

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 327**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/48 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2012 E 13196447 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2708608**

54 Título: **Detección de una secuencia de ácidos nucleicos diana mediante un ensayo de escisión y extensión de PTO**

30 Prioridad:

11.01.2011 KR 20110002840

16.03.2011 KR 20110023465

17.06.2011 WO PCT/KR2011/004452

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

02.08.2017

73 Titular/es:

**Seegene, Inc. (100.0%)
8FI, 9FI Taewon Bldg. 65-5, Bangi-dong
Songpa-gu
Seoul 138-050, KR**

72 Inventor/es:

**CHUN, JONG YOON y
LEE, YOUNG JO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 628 327 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Detección de una secuencia de ácidos nucleicos diana mediante un ensayo de escisión y extensión de PTO

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a la detección de una secuencia de ácidos nucleicos diana mediante un ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO).

Descripción de la técnica relacionada

10 La hibridación del ADN es un proceso fundamental en la biología molecular, en el que influyen la fuerza iónica, la composición de bases, la longitud del fragmento a que ha sido reducido el ácido nucleico, el grado de desapareamiento de las bases y la presencia de agentes desnaturalizantes. Las técnicas de hibridación del ADN constituyen herramientas sumamente útiles para la determinación de secuencias de ácidos nucleicos específicas y son sin duda valiosas en disciplinas como el diagnóstico clínico, la investigación genética y el análisis de laboratorio forense.

15 Con todo, los métodos y procesos convencionales que dependen primordialmente de la hibridación están sujetos a un alto riesgo de resultados positivos falsos a causa de la hibridación inespecífica entre las sondas y las secuencias que no son la diana. Por tanto, existen problemas que de resolverse mejorarían su fiabilidad.

Aparte de los procesos de hibridación con sondas, se han planteado diversas estrategias con reacciones enzimáticas adicionales, como por ejemplo, el método con sonda TaqMan™.

20 En dicho método, la sonda marcada e hibridada con una secuencia de ácidos nucleicos diana es escindida por la actividad 5'-nucleasa de una ADN-polimerasa dependiente de cebador situada corriente arriba (*upstream*), lo cual genera una señal que indica la presencia de una secuencia diana (Patentes de EE. UU. n.º 5.210.015, 5.538.848 y 6.326.145). El método de la sonda TaqMan™ sugiere dos estrategias para la generación de la señal: La escisión dependiente de la polimerización y la escisión independiente de la polimerización. En la primera de ellas, la extensión del cebador situado corriente arriba tiene que producirse antes de que la polimerasa de ácidos nucleicos alcance el extremo 5' de la sonda marcada. A medida que la reacción de extensión prosigue, la polimerasa escinde progresivamente el extremo 5' de la sonda marcada. En la segunda modalidad de escisión, el cebador situado corriente arriba y la sonda marcada se hibridan con una secuencia de ácidos nucleicos diana muy próxima, de tal modo que la unión de la polimerasa de ácidos nucleicos al extremo 3' del citado cebador la pone en contacto con el extremo 5' de la sonda marcada para liberar el marcador. Asimismo, el método de la sonda TaqMan™ expone que la sonda marcada que en su extremo 5' tiene una región de cola 5' no hibridable con la secuencia diana también es escindida y forma un fragmento que comprende la citada región de cola 5'.

30 Se han descrito otros métodos en que una sonda portadora de una región de cola en 5' no complementaria con la secuencia diana es escindida por una 5'-nucleasa que libera un fragmento que comprende la citada región de cola en 5'.

35 Por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 5.691.142 da a conocer una estructura de escisión que ha de ser digerida por la actividad 5'-nucleasa de la ADN-polimerasa. A modo de ejemplo se expone una estructura de escisión en la que un oligonucleótido que comprende un segmento 5' que no es complementario y un segmento 3' que es complementario con un molde se hibrida con dicho molde y un oligonucleótido situado corriente arriba se hibrida con el molde muy cerca. La estructura de escisión es desprendida por una ADN-polimerasa dotada de actividad 5'-nucleasa o por una ADN-polimerasa modificada con actividad sintética reducida que libera el segmento 5' que no es complementario con el molde. A continuación, el segmento 5' liberado se hibrida con un oligonucleótido dotado de una horquilla formando una estructura de escisión, provocando así reacciones de escisión progresivas que permiten detectar una secuencia diana.

45 La patente de EE. UU. N.º 7.381.532 da a conocer un proceso en que la estructura de escisión dotada del oligonucleótido situado corriente arriba con el extremo 3' bloqueado es escindida por una ADN-polimerasa dotada de actividad 5'-nucleasa o por una nucleasa FEN que libera una región «solapa» (*flap*) 5' no complementaria; esta región solapa 5' liberada es detectada por análisis de tamaño o con un marcador interactivo doble. La patente de EE. UU. N.º 6.893.819 da a conocer que las solapas (*flaps*) liberadas detectables son producidas con un método de amplificación secuencial mediado por solapa y dependiente de la síntesis de ácidos nucleicos. En este método, una solapa desprendida de una primera estructura de escisión escinde, de un modo dependiente de la síntesis de ácidos nucleicos, una segunda estructura de escisión que a su vez libera una solapa, detectándose las solapas liberadas.

50 Con la hibridación de sondas marcadas con fluorescencia en una fase líquida es posible detectar simultáneamente una pluralidad de secuencias nucleotídicas diana usando incluso un solo tipo de marcador fluorescente mediante el análisis de la curva de fusión. No obstante, las técnicas convencionales que detectan las secuencias diana mediante la escisión por 5'-nucleasa de sondas con doble marcaje interactivo requieren diversos tipos de marcadores

fluorescentes para diferentes secuencias diana si se pretenden detectar simultáneamente múltiples dianas (detección multiplexada), lo cual limita el número de secuencias diana detectables a causa de la limitación en el tipo de marcadores fluorescentes.

5 La solicitud de patente de EE. UU. 2008-0241838 da a conocer un método de detección de dianas consistente en la escisión de una sonda dotada de un segmento en 5' no complementario con la secuencia de ácidos nucleicos diana y la hibridación con una sonda de captura. En el segmento 5' no complementario se coloca un marcador. La sonda marcada hibridada con la secuencia diana se escinde y libera un fragmento, y a continuación ese fragmento se hibrida con la sonda de captura que permite detectar la presencia de la secuencia diana. En este método, es necesario que la sonda sin escindir/intacta no se hibride con la sonda de captura. Para ello, es preciso inmovilizar en 10 un sustrato sólido la sonda de captura más corta. No obstante, esa limitación reduce la eficiencia de la hibridación en el sustrato sólido y dificulta la optimización de las condiciones de reacción.

15 El método de detección de secuencias nucleotídicas para la identificación de polimorfismos o la detección cuantitativa del ADN fue probado por Lyamichev et al. (Nature Biotechnology, Vol 17 March 1999). Lyamichev y colaboradores usaron endonucleasas *flap* de arqueobacterias en un protocolo optimizado que comprende la hibridación de una señal y de una sonda invasiva con un nucleótido diana. Con el fin de aumentar la señal, después de la escisión, las solapas 5 prima son extendidas con nucleótidos marcados con digoxigenina.

Una revisión de Michael Oliver (Mutation research, 573 (2005) 103-110) comenta varias técnicas relativas a métodos de detección con endonucleasas de solapa (*flap*), entre ellos protocolos para la detección de la solapa 5-prima escindida con espectrometría de masas MALDI-TOF.

20 Roux P. y colaboradores (Assay and Drug Development Technologies, Vol. 2, No. 6, 2004) sugieren el uso de moléculas marcadoras electroforéticas (eTags, en inglés) para la detección de la solapa 5-prima escindida. El ensayo con eTag permite la detección y la cuantificación directa del ARNm prescindiendo de la extracción y la purificación del ARN.

25 La importancia de las horquillas presentes en la sonda o en los oligonucleótidos invasivos utilizados en el ensayo Invader[®] es analizada por Allawi y colaboradores (RNA, 20014, 10:1153-1161). En dicha referencia se demuestra que la señal de detección generada en el ensayo Invader[®] depende de la temperatura.

WO 2009/117327 A2 da a conocer un método de detección que aplica un oligonucleótido de detección sintético provisto de una región autocomplementaria que forma una horquilla.

30 WO 2006/004949 A1 da a conocer un método de detección que utiliza una reacción de detección con ligasa en lugar de la extensión mediada por la polimerasa.

US 2007/0099211 A1 da a conocer la detección de ácidos nucleicos mediante la detección electroquímica de una secuencia marcadora.

35 A la vista de lo anterior, resulta patente que desde hace tiempo la disciplina precisa de nuevos enfoques novedosos para la detección de secuencias diana, preferiblemente de varias secuencias a la vez, en una fase líquida o en una fase sólida y no solo basados en la hibridación sino en reacciones enzimáticas como la reacción de escisión nucleolítica en 5' con más facilidad, fiabilidad y reproducibilidad. Asimismo, la técnica también precisa nuevos métodos de detección de dianas que no se vean limitados por la cantidad de tipos de marcadores (en especial de marcadores fluorescentes).

40 A lo largo de la presente solicitud se ofrecen las referencias de varias patentes y publicaciones y se facilitan las citas bibliográficas entre paréntesis.

Resumen de la invención

45 Los presentes inventores han llevado a cabo investigaciones exhaustivas para desarrollar nuevas estrategias destinadas a detectar secuencias diana con más precisión y facilidad, entre otros aspectos, y posibilitar la detección simultánea de varias de ellas (multiplexación). Como resultado, se han creado protocolos novedosos para la detección de secuencias diana, en que la detección de la diana se logra mediante la hibridación de sondas, la escisión enzimática de dichas sondas, y la extensión y detección de un ácido nucleico bicatenario extendido. Dichos protocolos están bien adaptados tanto a las reacciones en fase líquida como en fase sólida y garantizan la detección de varias secuencias diana con mayor precisión y facilidad.

50 Así pues, uno de los objetivos de la presente invención consiste en proporcionar un método para la detección de una secuencia de ácidos nucleicos diana en un ADN o en una mezcla de ácidos nucleicos por medio del ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO).

Otro objetivo de esta invención consiste en proporcionar un equipo para la detección de una secuencia de ácidos nucleicos diana en un ADN o en una mezcla de ácidos nucleicos por medio del ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO).

55

Otros objetivos y ventajas de la presente invención se harán patentes en la descripción detallada que sigue conjuntamente con las reivindicaciones y las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

- 5 La Fig. 1 muestra las estructuras esquemáticas del PTO (Oligonucleótido de sondeo y marcaje, por sus siglas en inglés) y del CTO (Oligonucleótido de captura y molde, por sus siglas en inglés) usados en el ensayo de escisión y extensión de PTO (ensayo PTOCE). Es preferible que los extremos 3' del PTO y del CTO estén bloqueados para impedir su extensión.
- 10 La Fig. 2 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE con el análisis de fusión incluido. El CTO contiene una molécula indicadora (*reporter*, en inglés) y una molécula amortiguadora (*quencher*, en inglés) en su segmento molde.
- La Fig. 3 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE con el análisis de fusión incluido. El CTO contiene una molécula indicadora en su segmento molde. La molécula indicadora es necesaria para mostrar distintas intensidades de la señal según su presencia en forma monocatenaria o bicatenaria.
- 15 La Fig. 4 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE con el análisis de fusión incluido. El CTO contiene un residuo iso-dC y una molécula indicadora en su segmento molde. Durante la reacción de extensión se incorpora un complejo de molécula amortiguadora-iso-dGTP al ácido nucleico bicatenario extendido.
- La Fig. 5 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE con el análisis de fusión incluido. El PTO contiene una molécula indicadora en su segmento de marcaje en 5' y el CTO un residuo iso-dC en su segmento molde. Durante la reacción de extensión se incorpora un complejo de molécula amortiguadora-iso-dGTP al ácido nucleico bicatenario extendido.
- 20 La Fig. 6 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE con el análisis de fusión incluido. El PTO contiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora en su segmento de marcaje en 5'.
- La Fig. 7 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE con el análisis de fusión incluido. El PTO contiene una molécula indicadora en su segmento de marcaje en 5'. La molécula indicadora es necesaria para mostrar distintas intensidades de la señal según su presencia en forma monocatenaria o bicatenaria.
- 25 La Fig. 8 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE con el análisis de fusión incluido. El PTO contiene una molécula amortiguadora en su segmento de marcaje en 5' y el CTO una molécula indicadora en su segmento de captura.
- La Fig. 9 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE incluyendo la detección a una temperatura prefijada. El CTO contiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora en su segmento molde. El CTO está inmovilizado en un sustrato sólido por su extremo 3'.
- 30 La Fig. 10 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE incluyendo la detección a una temperatura prefijada. Durante la reacción de extensión se incorpora un dATP marcado con un grupo indicador al ácido nucleico bicatenario extendido. El CTO está inmovilizado en un sustrato sólido a través de su extremo 3'.
- 35 La Fig. 11 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE incluyendo la detección a una temperatura prefijada. El CTO posee un residuo iso-dC en su segmento molde y durante la reacción de extensión se incorpora un complejo de indicador-iso-dGTP al ácido nucleico bicatenario extendido. El CTO está inmovilizado en un sustrato sólido por su extremo 3'.
- La Fig. 12 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE incluyendo la detección a una temperatura prefijada. El PTO contiene una molécula indicadora en su segmento de marcaje en 5'. El CTO está inmovilizado en un sustrato sólido por su extremo 5'.
- 40 La Fig. 13 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE incluyendo la detección a una temperatura prefijada con un colorante intercalante. El CTO está inmovilizado en un sustrato sólido por su extremo 5'.
- La Fig. 14 muestra los resultados de la detección de un gen de *Neisseria gonorrhoeae* mediante el ensayo PTOCE incluido el análisis de fusión. El CTO contiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora en su segmento molde.
- 45 La Fig. 15 muestra los resultados de la detección de un gen de *Neisseria gonorrhoeae* mediante el ensayo PTOCE incluido el análisis de fusión. El PTO contiene una molécula amortiguadora en su extremo 5' y el CTO una molécula indicadora en su extremo 3'.
- 50 La Fig. 16 muestra que los valores de la T_m de los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos se ajustan con las secuencias del CTO.
- La Fig. 17 muestra los resultados de la detección de un gen de *Neisseria gonorrhoeae* mediante el ensayo PTOCE con amplificación por PCR. El CTO contiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora en su segmento molde. La Fig. 17A muestra los resultados del ensayo PTOCE complementado con la detección con PCR en tiempo real y la Fig. 17B muestra los resultados del ensayo PTOCE complementado con el análisis de la fusión tras la PCR.
- 55 La Fig. 18 muestra los resultados de la detección de un gen de *Neisseria gonorrhoeae* mediante el ensayo PTOCE con amplificación por PCR. El CTO contiene un residuo iso-dC y una molécula indicadora en su extremo 5'. Durante la reacción de extensión se incorpora un complejo de molécula amortiguadora-iso-dGTP al ácido nucleico bicatenario extendido. La Fig. 18A muestra los resultados del ensayo PTOCE complementado con la detección con PCR en tiempo real y la Fig. 18B muestra los resultados del ensayo PTOCE complementado con el análisis de la fusión tras la PCR.
- 60 La Fig. 19 muestra los resultados de la detección de un gen de *Neisseria gonorrhoeae* mediante el ensayo PTOCE con amplificación por PCR. El PTO contiene una molécula amortiguadora en su extremo 5' y el CTO una

molécula indicadora en su extremo 3'. La Fig. 19A muestra los resultados del ensayo PTOCE complementado con la detección con PCR en tiempo real y la Fig. 19B muestra los resultados del ensayo PTOCE complementado con el análisis de la fusión tras la PCR.

La Fig. 20 muestra los resultados de la detección simultánea del gen de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) y del gen de *Staphylococcus aureus* (SA) mediante el ensayo PTOCE complementado con análisis de la fusión tras la PCR. El CTO contiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora en su segmento molde.

La Fig. 21 muestra los resultados de la detección de un gen de *Neisseria gonorrhoeae* mediante el ensayo PTOCE complementado con el análisis de la fusión en una micromatriz. El CTO está inmovilizado por su extremo 5'. El PTO contiene una molécula indicadora en su segmento de marcaje en 5'.

La Fig. 22 muestra los resultados de la detección de un gen de *Neisseria gonorrhoeae* mediante el ensayo PTOCE complementado con la detección en tiempo real a una temperatura prefijada en una micromatriz. El CTO está inmovilizado por su extremo 5'. El PTO contiene una molécula indicadora en su segmento de marcaje en 5'.

La Fig. 23 muestra los resultados de la detección de un gen de *Neisseria gonorrhoeae* mediante el ensayo PTOCE complementado con la detección en tiempo real a una temperatura prefijada en una micromatriz. El CTO queda inmovilizado por su extremo 3' y contiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora en su segmento molde.

La Fig. 24 muestra los resultados de la detección de una o varias dianas mediante el ensayo PTOCE complementado con la detección de punto final a una temperatura prefijada en una micromatriz. El CTO está inmovilizado por su extremo 5'. El PTO contiene una molécula indicadora en su segmento de marcaje en 5'. El gen de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) y el gen de *Staphylococcus aureus* (SA) actuaron como secuencias de ácidos nucleicos diana.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un novedoso método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos diana mediante un ensayo PTOCE (Siglas en inglés de Escisión y extensión de PTO) y un equipo para detectar una secuencia de ácidos nucleicos diana mediante un ensayo PTOCE conforme a las reivindicaciones de la patente 1 a 22.

La presente invención no solo implica reacciones de hibridación sino, además, reacciones enzimáticas que ocurren dependiendo de la presencia de una secuencia de ácidos nucleicos diana.

I. Proceso de detección de la diana mediante el PTOCE con análisis de la fusión

Un aspecto de la presente descripción proporciona un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos diana en un ADN o en una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO), el cual comprende:

(a) hibridación de la secuencia de ácidos nucleicos diana con un oligonucleótido situado corriente arriba y un PTO (Oligonucleótido de sondeo y marcaje); en que dicho oligonucleótido situado corriente arriba comprende una secuencia de nucleótidos complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana y se hibrida con ella; el PTO comprende: (I) un segmento localizador en 3' que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana con la cual hibrida, y (II) un segmento de marcaje en 5' que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana; dicho segmento localizador en 3' se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana y el segmento de marcaje en 5' no se hibrida con dicha secuencia diana; el oligonucleótido situado corriente arriba está ubicado antes del PTO;

(b) puesta en contacto del resultado de la etapa (a) con una enzima dotada de actividad 5'-nucleasa en condiciones para la escisión del PTO; de forma que el oligonucleótido situado corriente arriba o su hebra extendida induce la escisión del PTO por la enzima dotada de actividad 5'-nucleasa de tal modo que la escisión libera un fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' o una parte del segmento de marcaje en 5' del PTO;

(c) hibridación del fragmento desprendido del PTO con el CTO (oligonucleótido de captura y molde); en el que el CTO comprende en la dirección 3' a 5': (I) un segmento de captura que comprende una secuencia nucleotídica complementaria al segmento de marcaje en 5' o a una parte del segmento de marcaje en 5' del PTO; y (II) un segmento molde que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con el segmento de marcaje en 5' y el segmento localizador en 3' del PTO; de forma que el fragmento desprendido del PTO se hibrida con el segmento de captura del CTO;

(d) reacción de extensión con el resultado de la etapa (c) y una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde; en la que el fragmento hibridado con el segmento de captura del CTO se extiende y forma un ácido nucleico bicatenario extendido; en el que este ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de T_m que puede ajustarse con: (I) la secuencia y/o la longitud del fragmento; (II) la secuencia y/o la longitud del CTO; o (III) la secuencia y/o la longitud del fragmento y la secuencia y/o la longitud del CTO;

(e) fusión del ácido nucleico bicatenario extendido a lo largo de un intervalo de temperaturas que da una señal diana indicadora de la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido; en que la señal diana la proporciona: (I) al menos un marcador unido al fragmento y/o al CTO; (II) un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión; (III) un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión y un marcador unido al fragmento y/o al CTO; o (IV) un

marcador intercalante; y

(f) detección del ácido nucleico bicatenario extendido mediante la medición de la señal diana; la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido indica la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

5 Los presentes inventores han llevado a cabo investigaciones exhaustivas para desarrollar nuevas estrategias destinadas a detectar secuencias diana con más precisión y facilidad, entre otros aspectos, y posibilitar la detección simultánea de varias de ellas (multiplexación). Como resultado, se han creado protocolos novedosos para la detección de secuencias diana, en los que la detección de la diana se logra mediante la hibridación de sondas, la escisión enzimática de dichas sondas, y la extensión y detección de un ácido nucleico bicatenario extendido. Dichos protocolos están bien adaptados tanto a las reacciones en fase líquida como en fase sólida y garantizan la detección de varias secuencias diana con mayor precisión y facilidad.

10 La presente invención emplea eventos sucesivos seguidos por la hibridación de una sonda; escisión del PTO (Oligonucleótido de sondeo y marcaje) y extensión; formación de un ácido nucleico bicatenario extendido dependiente de la diana; y detección del ácido nucleico bicatenario extendido. Por tanto, se denomina un ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO).

15 En la presente invención, el ácido nucleico bicatenario extendido se caracteriza por tener uno o varios marcadores que proporcionan una señal que indica la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido mediante el análisis de la fusión o la detección a una temperatura prefijada. Asimismo, el ácido nucleico bicatenario extendido se caracteriza por tener un valor de T_m ajustable, que desempeña un papel crucial en la detección de múltiples dianas o en la discriminación de señales que no son la diana.

20 Puesto que el ácido nucleico bicatenario extendido solo se produce si está presente el ácido nucleico diana, la presencia del primero indica la presencia de este último.

El ensayo PTOCE con análisis de la fusión se describe con mayor detalle a continuación:

Etapa (a): Hibridación de un oligonucleótido situado corriente arriba y un PTO con una secuencia de ácidos nucleicos diana

25 De acuerdo con la presente invención, primero se hibrida una secuencia de ácidos nucleicos diana con un oligonucleótido situado corriente arriba (*upstream*) y un PTO (oligonucleótido de sondeo y marcaje).

30 Los términos usados en la presente memoria «ácido nucleico diana», «secuencia de ácidos nucleicos diana» o «secuencia diana» se refieren a una secuencia de ácidos nucleicos cuya detección reviste interés, que se reasocia o se hibrida con una sonda o con un cebador en condiciones de hibridación, reasociación o amplificación. El término usado en la presente memoria «sonda» se refiere a una molécula de ácido nucleico monocatenaria que comprende un segmento o segmentos que son sustancialmente complementarios con una secuencia de ácidos nucleicos diana.

35 El término «cebador» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a un oligonucleótido que es capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis cuando se sitúa en condiciones que inducen la síntesis del producto de extensión del cebador es complementario con una hebra de ácido nucleico (molde), es decir, en presencia de nucleótidos y de un agente de polimerización, como una ADN-polimerasa, y a una temperatura y un pH adecuados.

Preferentemente, la sonda y el cebador son moléculas monocatenarias de desoxirribonucleótidos. Las sondas o cebadores usados en esta invención pueden comprender dNMP naturales (dAMP, dGMP, dCMP y dTMP), nucleótidos modificados o nucleótidos no naturales. Las sondas o los cebadores también pueden contener ribonucleótidos.

40 El cebador debe ser lo bastante largo para propiciar la síntesis de los productos de extensión en presencia del agente de polimerización. La longitud exacta de los cebadores depende de muchos factores, tales como la temperatura, la aplicación y la fuente del cebador. El término «reasociación» o «iniciación» tal y como se emplea en la presente memoria se refiere a la colocación en aposición de un oligodesoxinucleótido o de un ácido nucleico respecto de un ácido nucleico molde, colocación que permite a la polimerasa añadir nucleótidos (polimerizar) a la molécula de ácido nucleico que es complementaria al ácido nucleico molde o a un segmento del mismo.

45 El término «hibridación» tal y como se emplea en la presente memoria se refiere a la formación de un ácido nucleico bicatenario a partir de ácidos nucleicos monocatenarios que son complementarios. La hibridación puede tener lugar entre dos hebras de ácido nucleico que concuerdan perfectamente o bien concuerdan notablemente con algunos desapareamientos. La complementariedad para la hibridación puede depender de las condiciones de hibridación, en especial de la temperatura.

50 La hibridación de una secuencia de ácidos nucleicos diana con el oligonucleótido situado corriente arriba y con el PTO puede llevarse a cabo en condiciones de hibridación adecuadas que se determinan habitualmente con procedimientos de optimización. Condiciones como la temperatura, la concentración de los componentes, los tiempos de hibridación y de lavado, los componentes de la solución tampón, y su pH y fuerza iónica pueden variar dependiendo de diversos factores, tales como la longitud y el contenido de GC del oligonucleótido (tanto del

oligonucleótido situado corriente arriba como del PTO) y de la secuencia nucleotídica diana. Por ejemplo, cuando se utiliza un oligonucleótido relativamente corto es preferible adoptar condiciones poco restrictivas (poco rigurosas). Las condiciones pormenorizadas de hibridación se pueden encontrar en Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); y en M. L.M. Anderson, Nucleic acid Hybridization, Springer-Verlag Nueva York Inc. N.Y.(1999).

No existe distinción pretendida entre los términos «reasociación» e «hibridación» y ambos se usan indistintamente.

El oligonucleótido situado corriente arriba y el PTO poseen secuencias nucleotídicas que hibridan por su complementariedad con la secuencia de ácidos nucleicos diana. El término «complementariedad» se usa en la presente memoria para indicar que los cebadores o las sondas son lo bastante complementarios para hibridar selectivamente con una secuencia de ácidos nucleicos diana en las condiciones de reasociación o de restrictividad indicadas, abarcando los términos «notablemente complementario» y «perfectamente complementario», preferiblemente esto último.

El segmento de marcaje en 5' del PTO tiene una secuencia nucleotídica no complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana. El segmento molde del CTO (Oligonucleótido de captura y molde) tiene una secuencia nucleotídica no complementaria con el segmento de marcaje en 5' y el segmento localizador en 3' del PTO. El término «no complementario» se usa en la presente memoria para indicar que los cebadores o las sondas no son lo bastante complementarios para hibridar selectivamente con una secuencia de ácidos nucleicos diana en las condiciones de reasociación o de restrictividad indicadas, abarcando los términos «notablemente no complementario» y «perfectamente no complementario», preferiblemente esto último.

El término usado en la presente memoria «PTO (Oligonucleótido de sondeo y marcaje)» significa un oligonucleótido que comprende: (I) un segmento localizador en 3' que sirve como sonda; y (II) un segmento de marcaje en 5' con una secuencia nucleotídica no complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana, que se desprende por nucleólisis del PTO tras la hibridación con la secuencia de ácidos nucleicos diana. El segmento de marcaje en 5' y el segmento localizador en 3' del PTO deben estar colocados en orden 5' a 3'. El PTO se ilustra esquemáticamente en la Fig. 1.

Preferiblemente, la hibridación de la etapa (a) se preforma en condiciones restrictivas, de modo que el segmento localizador en 3' se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana y el segmento de marcaje en 5' no se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana.

El PTO no requiere ninguna longitud específica. Por ejemplo, el PTO puede tener una longitud de 15-150 nucleótidos, 15-100 nucleótidos, 15-80 nucleótidos, 15-60 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 20-150 nucleótidos, 20-100 nucleótidos, 20-80 nucleótidos, 20-60 nucleótidos, 20-50 nucleótidos, 30-150 nucleótidos, 30-100 nucleótidos, 30-80 nucleótidos, 30-60 nucleótidos, 30-50 nucleótidos, 35-100 nucleótidos, 35-80 nucleótidos, 35-60 nucleótidos o 35-50 nucleótidos. El segmento localizador en 3' del PTO puede ser de cualquier longitud siempre que se hibride específicamente con las secuencias de ácidos nucleicos diana. Por ejemplo, el segmento localizador en 3' del PTO puede tener 10-100 nucleótidos, 10-80 nucleótidos, 10-50 nucleótidos, 10-40 nucleótidos, 10-30 nucleótidos, 15-100 nucleótidos, 15-80 nucleótidos, 15-50 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 15-30 nucleótidos, 20-100 nucleótidos, 20-80 nucleótidos, 20-50 nucleótidos, 20-40 nucleótidos o 20-30 nucleótidos de longitud. El segmento de marcaje en 5' puede ser de cualquier longitud siempre que se hibride específicamente con el segmento molde del CTO y después se extienda. Por ejemplo, el segmento de marcaje en 5' del PTO puede tener una longitud de 5-50 nucleótidos, 5-40 nucleótidos, 5-30 nucleótidos, 5-20 nucleótidos, 10-50 nucleótidos, 10-40 nucleótidos, 10-30 nucleótidos, 10-20 nucleótidos, 15-50 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 15-30 nucleótidos o 15-20 nucleótidos.

El extremo 3' del PTO puede tener un 3'-OH terminal. Es preferible que el extremo 3' del PTO esté «bloqueado» para impedir su extensión.

El bloqueo se puede conseguir con métodos convencionales. Por ejemplo, el bloqueo se puede realizar añadiendo al grupo 3'-hidroxilo del último nucleótido un compuesto o radical químico como biotina, marcadores, un grupo fosfato, grupo alquilo, enlazante no nucleotídico, fosforotioato o alcanodiol. Alternativamente, el bloqueo se puede llevar a cabo eliminando el grupo 3'-hidroxilo del último nucleótido o usando un nucleótido que carece de ese grupo, como un didesoxinucleótido.

Alternativamente, el PTO puede estar diseñado para tener una estructura de horquilla.

La no hibridación entre el segmento de marcaje en 5' del PTO y la secuencia de ácidos nucleicos diana se refiere a la no formación de una doble cadena estable entre ellos en ciertas condiciones de hibridación. Según una forma de realización preferida, el segmento de marcaje en 5' del PTO que no está implicado en la hibridación con la secuencia de ácidos nucleicos diana forma una monocadena.

El oligonucleótido situado corriente arriba está situado antes del PTO.

Además, el oligonucleótido situado corriente arriba o su hebra extendida hibridada con la secuencia de ácidos nucleicos diana induce la escisión del PTO mediante una enzima dotada de actividad 5'-nucleasa.

La inducción de la escisión del PTO por el oligonucleótido situado corriente arriba se puede realizar de dos modos: (I) inducción de la escisión independiente de la extensión del oligonucleótido situado corriente arriba; y (II) inducción de la escisión dependiente de la extensión del oligonucleótido situado corriente arriba.

5 Si el oligonucleótido situado corriente arriba se coloca lo bastante cerca del PTO para inducir la escisión del PTO por la enzima con actividad 5'-nucleasa, la enzima unida al oligonucleótido situado corriente arriba digerirá el PTO sin reacción de extensión. En cambio, si el oligonucleótido situado corriente arriba se coloca lejos del PTO, la enzima con actividad polimerasa (p. ej., polimerasa dependiente de molde) catalizará la extensión del oligonucleótido situado corriente arriba (p. ej., cebador situado corriente arriba) y la enzima con actividad 5'-nucleasa unida al producto extendido digerirá el PTO.

10 Así pues, el oligonucleótido situado corriente arriba puede estar situado respecto al PTO de dos modos. El oligonucleótido situado corriente arriba puede estar localizado lo bastante cerca del PTO para inducir la escisión del PTO sin que ésta dependa de la extensión. O, alternativamente, el oligonucleótido situado corriente arriba puede estar situado lo bastante lejos del PTO para inducir la escisión del PTO de un modo que dependerá de la extensión.

15 El término usado en la presente memoria «adyacente» en alusión a posiciones o ubicaciones significa que el oligonucleótido situado corriente arriba está localizado junto al segmento localizador en 3' del PTO con el que forma una muesca. Asimismo, el término significa que el oligonucleótido situado corriente arriba está localizado 1-30 nucleótidos, 1-20 nucleótidos o 1-15 nucleótidos aparte del segmento localizador en 3' del PTO.

El término usado en la presente memoria «distante» o «alejado» en referencia a posiciones o ubicaciones incluye cualquier posición o localización suficiente para asegurar las reacciones de extensión.

20 Según una forma de realización preferida, el oligonucleótido situado corriente arriba está situado lo bastante lejos del PTO para inducir la escisión del PTO de un modo que depende de la extensión.

25 Según una forma de realización preferida, el oligonucleótido situado corriente arriba es un cebador o una sonda situados corriente arriba. El cebador situado corriente arriba es adecuado para la inducción de la escisión independiente de la extensión o la escisión dependiente de la extensión, y la sonda situada corriente arriba es adecuada para la inducción de la escisión independiente de la extensión.

30 Alternativamente, el oligonucleótido situado corriente arriba puede tener una secuencia parcialmente solapada con la parte 5' del segmento localizador en 3' del PTO. Preferentemente, la secuencia solapada tiene una longitud de 1 a 10 nucleótidos, preferiblemente de 1 a 5 nucleótidos o, aún más preferiblemente, de 1 a 3 nucleótidos. Si el oligonucleótido situado corriente arriba tiene una secuencia parcialmente solapada con la parte 5' del segmento localizador en 3' del PTO, el segmento localizador en 3' es digerido parcialmente junto con el segmento de marcaje en 5' en la reacción de escisión de la etapa (b). Además, la secuencia solapada permite escindir un punto deseado del segmento localizador en 3'.

En una forma de realización preferida, el cebador situado corriente arriba induce a través de su hebra extendida la escisión del PTO por la enzima dotada de actividad 5'-nucleasa.

35 Las técnicas convencionales para las reacciones de escisión con oligonucleótidos situados corriente arriba se pueden aplicar a la presente invención, siempre que el oligonucleótido situado corriente arriba induzca la escisión del PTO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana para liberar un fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' o una parte de ese segmento del PTO. Por ejemplo, a la presente invención se pueden aplicar las patentes de EE. UU. N.º 5.210.015, 5.487.972, 5.691.142, 5.994.069 y 7.381.532 y la solicitud publicada de EE. UU. N.º 2008-0241838.

40 En una forma de realización preferida, el método se lleva a cabo en presencia de un cebador situado corriente abajo (*downstream*). El cebador situado corriente abajo genera adicionalmente una secuencia de ácidos nucleicos diana que ha de hibridarse con el PTO, lo cual mejora la sensibilidad de la detección de la diana.

45 Según una forma de realización preferida, cuando se usan el cebador situado corriente arriba y el cebador situado corriente abajo, además, se emplea una polimerasa de ácidos nucleicos dependiente de molde para la extensión de los cebadores.

50 Según una forma de realización preferida, el oligonucleótido situado corriente arriba (cebador situado corriente arriba o sonda situada corriente arriba), el cebador situado corriente abajo y/o el segmento de marcaje en 5' en del PTO tienen una estructura de oligonucleótido de cebado doble (DPO) desarrollada por el presente inventor. Los oligonucleótidos dotados de la estructura DPO presentan una especificidad hacia la diana notablemente mejor que los cebadores y las sondas convencionales (véase WO 2006/095981; Chun et al., Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene, Nucleic Acid Research, 35:6e40 (2007)).

55 Según una forma de realización preferida, el segmento localizador en 3' del PTO tiene una estructura de oligonucleótido de especificidad doble modificado (mDSO) desarrollado por el presente inventor. La estructura del

oligonucleótido de especificidad doble modificado (mDSO) presenta una especificidad hacia la diana notablemente mejor que las sondas convencionales (véase WO 2011/028041).

Etapa (b): Liberación de un fragmento del PTO

5 Después, el producto de la etapa (a) se pone en contacto con una enzima dotada de actividad 5'-nucleasa en las condiciones para la escisión del PTO. El PTO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana es digerido por la enzima con actividad 5'-nucleasa, de forma que se desprende un fragmento que comprende el fragmento de marcaje en 5' o una parte del segmento de marcaje en 5' del PTO.

10 El término usado en la presente memoria «condiciones para la escisión del PTO» designa las condiciones suficientes para digerir el PTO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana por la enzima con actividad 5'-nucleasa, tales como temperatura, pH, fuerza iónica, tampón, longitud y secuencia de los oligonucleótidos y enzimas. Por ejemplo, cuando la ADN-polimerasa Taq se usa como enzima con actividad 5'-nucleasa, las condiciones para la escisión del PTO incluyen tampón Tris-HCl, KCl, MgCl₂ y temperatura.

15 Cuando el PTO se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana, su segmento localizador en 3' participa en la hibridación y el segmento de marcaje en 5' forma una monocadena sin hibridar con la secuencia de ácidos nucleicos diana (véase la Fig. 2). Así pues, el oligonucleótido comprende tanto estructuras monocatenarias como bicatenarias que pueden ser digeridas con una enzima dotada de actividad 5'-nucleasa a través de diversas técnicas conocidas por las personas versadas en la materia.

20 Los puntos de escisión del PTO varían dependiendo del tipo de oligonucleótidos situados corriente arriba (sonda situada corriente arriba o cebador situado corriente arriba), de los puntos de hibridación de los oligonucleótidos situados corriente arriba y de las condiciones de la escisión (véanse las patentes de EE. UU. n.º 5.210.015, 5.487.972, 5.691.142, 5.994.069 y 7.381.532 y la solicitud de EE. UU publicada N.º 2008-0241838).

Se pueden emplear multitud de técnicas convencionales para la reacción de escisión del PTO, que resulta en el desprendimiento de un fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' o una parte de dicho segmento.

25 En resumen, en la etapa (b) puede haber tres puntos de escisión. En primer lugar, el punto de escisión es un punto de unión entre el segmento de hibridación del PTO (segmento localizador en 3') y un segmento no hibridado (segmento de marcaje en 5'). El segundo punto de escisión está alejado varios nucleótidos en dirección 3' del extremo 3' del segmento de marcaje en 5' del PTO. El segundo punto de escisión está ubicado en la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' del PTO. El tercer punto de escisión está alejado varios nucleótidos en dirección 5' del extremo 3' del segmento de marcaje en 5' del PTO.

30 Según una forma de realización preferida, el punto inicial para la escisión del PTO por la polimerasa dependiente de molde con actividad 5'-nucleasa tras la extensión del cebador situado corriente arriba es un punto de partida para la doble cadena formada por el PTO con la secuencia de ácidos nucleicos diana o un sitio situado de 1 a 3 nucleótidos de ese punto de partida.

35 A este respecto, el término usado en la presente memoria «fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' o una parte de dicho segmento del PTO» en conjunción con la escisión del PTO mediante la enzima con actividad 5'-nucleasa se usa para abarcar: (I) el segmento de marcaje en 5'; (II) el segmento de marcaje en 5' y la parte del extremo 5' del segmento 3'; y (III) alejado del segmento de marcaje en 5'. En la presente solicitud, el término «fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' o una parte de dicho segmento del PTO» también puede aparecer descrito como «fragmento del PTO».

40 El término «parte» usado en conjunción con el PTO o el CTO en calidad de parte del segmento de marcaje en 5' del PTO, de la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' del PTO y la parte del extremo 5' del segmento de captura del CTO se refiere a una secuencia nucleotídica compuesta de 1 a 40, 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10 o 1 a 5 nucleótidos, preferiblemente 1, 2, 3 o 4 nucleótidos.

45 Según una forma de realización preferida, la enzima dotada de actividad 5'-nucleasa es una ADN-polimerasa dotada de actividad 5'-nucleasa o una nucleasa FEN, más preferiblemente una ADN-polimerasa termostable dotada de actividad 5'-nucleasa o una nucleasa FEN.

50 ADN-polimerasas con actividad 5'-nucleasa que resultan adecuadas para la presente invención son las ADN-polimerasas termoestables procedentes de diversas especies de bacterias, entre ellas: *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermus antranikianii*, *Thermus caldophilus*, *Thermus chliarophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus igniterrae*, *Thermus lacteus*, *Thermus oshimai*, *Thermus ruber*, *Thermus rubens*, *Thermus scotoductus*, *Thermus silvanus*, *Thermus species Z05*, *Thermus species sps 17*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosipho africanus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus barossi*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosipho africanus*, *Pyrococcus woesei*, *Pyrococcus horikoshii*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrodictium occultum*, *Aquifex pyrophilus* y *Aquifex aeolicus*. Pero lo más preferible es que la ADN-polimerasa termoestable sea la polimerasa Taq.

Como alternativa, la presente invención puede emplear ADN-polimerasas con actividad 5'-nucleasa modificadas para tener menos actividad polimerasa.

La nucleasa FEN (endonucleasa de solapa o *flap*) usada es una nucleasa específica de solapa en 5'.

5 La nucleasa FEN adecuada para la presente invención comprende nucleasas FEN procedentes de varias especies de bacterias, entre ellas: *Sulfolobus solfataricus*, *Pyrobaculum aerophilum*, *Thermococcus litoralis*, *Archaeoglobus veneficus*, *Archaeoglobus profundus*, *Acidianus brierlyi*, *Acidianus ambivalens*, *Desulfurococcus amylolyticus*, *Desulfurococcus mobilis*, *Pyrodictium brockii*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermococcus zillgii*, *Methanopyrus kandleri*, *Methanococcus igneus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeropyrum pernix* y *Archaeoglobus veneficus*.

10 En los casos en que en la etapa (a) se utilice el cebador situado corriente arriba, es preferible que las condiciones para la escisión del PTO comprendan la reacción de extensión del cebador situado corriente arriba.

Según una forma de realización preferida, el cebador situado corriente arriba se usa en la etapa (a), una polimerasa dependiente de molde se usa para la extensión del cebador situado corriente arriba y la polimerasa dependiente de molde es idéntica a la enzima con actividad 5'-nucleasa.

15 Otra opción consiste en usar el cebador situado corriente arriba en la etapa (a), una polimerasa dependiente de molde para la extensión del cebador situado corriente arriba y la polimerasa dependiente de molde es distinta de la enzima con actividad 5'-nucleasa.

Etapa (c): Hibridación del fragmento desprendido del PTO con el CTO

El fragmento desprendido del PTO se hibrida con el CTO (Oligonucleótido de captura y molde).

20 El CTO comprende en dirección 3' a 5': (I) un segmento de captura que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con el segmento de marcaje en 5' o una parte de este segmento del PTO; y (II) un segmento molde que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con el segmento de marcaje en 5' y el segmento localizador en 3' del PTO.

El CTO actúa como molde para la extensión del fragmento desprendido del PTO. El fragmento que está actuando como cebador se hibrida con el CTO y se extiende hasta formar un ácido nucleico bicatenario extendido.

25 El segmento molde puede comprender cualquier secuencia mientras ésta no sea complementaria con el segmento de marcaje en 5' y el segmento localizador en 3' del PTO. Asimismo, el segmento molde puede comprender cualquier secuencia mientras ésta pueda actuar como molde para la extensión del fragmento desprendido del PTO.

30 Tal y como se ha descrito antes, cuando el fragmento portador del segmento de marcaje en 5' del PTO se desprende, es preferible que el segmento de captura del CTO esté diseñado para comprender una secuencia nucleotídica complementaria con el segmento de marcaje en 5'. Cuando el fragmento portador del segmento de marcaje en 5' y la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' se libera, es preferible que el segmento de captura del CTO esté diseñado para comprender una secuencia nucleotídica complementaria con el segmento de marcaje en 5' y la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3'. Cuando el fragmento portador de una parte del segmento de marcaje en 5' del PTO se libera, es preferible que el segmento de captura del CTO esté diseñado para comprender una secuencia nucleotídica complementaria con la parte del segmento de marcaje en 5'.

35 Asimismo, es posible diseñar el segmento de captura del CTO para que incorpore de antemano puntos de escisión del PTO. Por ejemplo, en los casos en que el segmento de captura del CTO está diseñado para comprender una secuencia nucleotídica complementaria con el segmento de marcaje en 5', el fragmento portador de una parte del segmento de marcaje en 5' o el fragmento portador del segmento de marcaje en 5' se pueden hibridar con el segmento de captura y después extenderse. Si se desprende el fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' y la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3', se puede hibridar con el segmento de captura del CTO diseñado para comprender una secuencia nucleotídica complementaria con el segmento de marcaje en 5' y después extenderse, aunque la parte del extremo 3' del fragmento contenga nucleótidos desapareados. Esto es posible porque la extensión de los cebadores depende de las condiciones de la reacción y puede consumarse aunque su extremo 3' contenga algunos nucleótidos desapareados (p. ej., de 1 a 3 de tales nucleótidos).

40 Cuando el fragmento comprende el segmento de marcaje en 5' y se desprende una parte del extremo 5' del segmento localizador en 3', la parte del extremo 5' del segmento de captura del CTO puede estar diseñada para tener una secuencia nucleotídica complementaria con la parte del extremo 5' escindida del segmento localizador en 3', lo cual resuelve los problemas relacionados con los nucleótidos desapareados (véase la Fig.1).

50 Preferiblemente, la secuencia nucleotídica de la parte del extremo 5' del segmento de captura del CTO complementaria con la parte del extremo 5' escindida del segmento localizador en 3' puede seleccionarse en función de los puntos de escisión decididos de antemano en el segmento localizador en 3' del PTO. Es preferible que la secuencia nucleotídica de la parte del extremo 5' del segmento de captura del CTO complementaria con la parte del extremo 5' escindida del segmento localizador en 3' tenga entre 1 a 10 nucleótidos, preferentemente de 1

a 5 nucleótidos, y más preferentemente de 1 a 3 nucleótidos.

El extremo 3' del CTO puede comprender nucleótidos adicionales que no intervengan en la hibridación con el fragmento. Asimismo, el segmento de captura del CTO puede comprender una secuencia nucleotídica que solo sea complementaria con una parte del fragmento (p. ej., una parte del fragmento que contenga el segmento del extremo 3') siempre que se hibride de forma estable con el fragmento.

El término usado «segmento de captura que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con el segmento de marcaje en 5' o con una parte del segmento de marcaje en 5'» se describe en la presente memoria para abarcar varios diseños y composiciones del segmento de captura del CTO tal y como se explica arriba.

El CTO puede estar diseñado para tener una estructura de horquilla.

La longitud del CTO puede variar ampliamente. Por ejemplo, el CTO puede tener una longitud de 7-1000 nucleótidos, 7-500 nucleótidos, 7-300 nucleótidos, 7-100 nucleótidos, 7-80 nucleótidos, 7-60 nucleótidos, 7-40 nucleótidos, 15-1000 nucleótidos, 15-500 nucleótidos, 15-300 nucleótidos, 15-100 nucleótidos, 15-80 nucleótidos, 15-60 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 20-1000 nucleótidos, 20-500 nucleótidos, 20-300 nucleótidos, 20-100 nucleótidos, 20-80 nucleótidos, 20-60 nucleótidos, 20-40 nucleótidos, 30-1000 nucleótidos, 30-500 nucleótidos, 30-300 nucleótidos, 30-100 nucleótidos, 30-80 nucleótidos, 30-60 nucleótidos o 30-40 nucleótidos. El segmento de captura del CTO puede tener cualquier longitud siempre que se hibride específicamente con el fragmento desprendido del PTO. Por ejemplo, el segmento de captura del CTO puede tener una longitud de 5-100 nucleótidos, 5-60 nucleótidos, 5-40 nucleótidos, 5-30 nucleótidos, 5-20 nucleótidos, 10-100 nucleótidos, 10-60 nucleótidos, 10-40 nucleótidos, 10-30 nucleótidos, 10-20 nucleótidos, 15-100 nucleótidos, 15-60 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 15-30 nucleótidos o 15-20 nucleótidos. El segmento molde del CTO puede tener cualquier longitud siempre que pueda actuar como molde en la extensión del fragmento desprendido del PTO. Por ejemplo, el segmento molde del CTO puede tener una longitud de 2-900 nucleótidos, 2-400 nucleótidos, 2-300 nucleótidos, 2-100 nucleótidos, 2-80 nucleótidos, 2-60 nucleótidos, 2-40 nucleótidos, 2-20 nucleótidos, 5-900 nucleótidos, 5-400 nucleótidos, 5-300 nucleótidos, 5-100 nucleótidos, 5-80 nucleótidos, 5-60 nucleótidos, 5-40 nucleótidos, 5-30 nucleótidos, 10-900 nucleótidos, 10-400 nucleótidos, 10-300 nucleótidos, 15-900 nucleótidos, 15-100 nucleótidos, 15-80 nucleótidos, 15-60 nucleótidos, 15-40 nucleótidos o 15-20 nucleótidos.

El extremo 3' del CTO puede tener un 3'-OH terminal. Preferiblemente, el extremo 3' del CTO está bloqueado para impedir su extensión. El bloqueo de la extensión del CTO se puede conseguir con métodos convencionales. Por ejemplo, el bloqueo se puede realizar añadiendo al grupo 3'-hidroxilo del último nucleótido del CTO un compuesto o radical químico como biotina, marcadores, un grupo fosfato, un grupo alquilo, un enlazante no nucleotídico, fosforotioato o alcanodiol. Otra alternativa consiste en consumir el bloqueo eliminando el grupo 3'-hidroxilo del último nucleótido o usando un nucleótido carente de tal grupo hidroxilo, como un didesoxinucleótido.

El fragmento desprendido del PTO se hibrida con el CTO, proporcionando una forma adecuada en extensión del fragmento. Aunque el PTO sin digerir también se hibrida con el segmento de captura del CTO a través de su segmento de marcaje en 5', su segmento localizador en 3' no queda hibridado con el CTO lo cual impide la formación de un ácido nucleico bicatenario extendido.

La hibridación de la etapa (c) se puede describir pormenorizadamente con alusiones a las descripciones de la etapa (a).

Etapa (d): Extensión del fragmento

La reacción de extensión se lleva a cabo con el producto de la etapa (c) y una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde. El fragmento hibridado con el segmento de captura del CTO se extiende hasta formar un ácido nucleico bicatenario extendido. En cambio, el PTO no escindido que se hibrida con el segmento de captura del CTO no se extiende, de modo que no se forma ese ácido nucleico bicatenario extendido.

El término usado en la presente memoria «ácido nucleico bicatenario extendido» designa un ácido nucleico bicatenario formado por una reacción de extensión en la que el fragmento hibridado con el segmento de captura del CTO se extiende usando el segmento molde del CTO como molde y la polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde.

El ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de T_m distinto del valor del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO.

Preferiblemente, el ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de T_m superior al del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO.

El valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido puede ajustarse con: (I) la secuencia y/o la longitud del fragmento; (II) la secuencia y/o la longitud del CTO; o (III) la secuencia y/o la longitud del fragmento y la secuencia y/o la longitud del CTO.

Una característica sobresaliente de la presente invención es que el valor de T_m ajustable del ácido nucleico bicatenario extendido se utiliza para dar una señal diana indicadora de la presencia de dicho ácido nucleico bicatenario extendido mediante la fusión del mismo en la etapa (e).

5 El término « T_m » tal y como se usa en la presente memoria se refiere a la temperatura de fusión a la que la mitad de la población de moléculas bicatenarias de ácido nucleico se disocia en moléculas monocatenarias. El valor de T_m está determinado por la longitud y por el contenido de G/C en los nucleótidos hibridados. El valor de T_m se puede calcular con métodos convencionales como la regla de Wallace (R.B. Wallace, et al., *Nucleic Acids Research*, 6:3543-3547(1979)) y el llamado «método del vecino más cercano» (SantaLucia J. Jr., et al., *Biochemistry*, 35:3555-3562(1996)); Sugimoto N., et al., *Nucleic Acids Res.*, 24:4501-4505(1996)).

10 Según una forma preferida de realización, el valor de T_m se refiere a los valores de T_m reales que se dan en las condiciones de reacción puestas en práctica.

15 La polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde usada en la etapa (d) puede incluir cualquier polimerasa de ácido nucleico, por ejemplo, el fragmento de Klenow de la ADN-polimerasa I de *E. coli*, una ADN-polimerasa termostable y la ADN-polimerasa del bacteriófago T7. Preferiblemente, la polimerasa es una ADN-polimerasa termostable que se puede obtener de varias especies de bacterias, entre ellas: *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermus antranikianii*, *Thermus caldophilus*, *Thermus chliarophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus igniterrae*, *Thermus lacteus*, *Thermus oshimai*, *Thermus ruber*, *Thermus rubens*, *Thermus scotoductus*, *Thermus silvanus*, *Thermus species Z05*, *Thermus species sps 17*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosipho africanus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus barossi*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosipho africanus*, *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Pyrococcus woesei*, *Pyrococcus horikoshii*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrodictium occultum*, *Aquifex pyrophilus* y *Aquifex aeolicus*. Pero lo más preferible es que la polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde sea la polimerasa Taq.

25 Según una forma preferida de realización, la enzima con actividad 5'-nucleasa usada en la etapa (b) es idéntica a la polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde usada en la etapa (d). Más preferiblemente, la enzima con actividad 5'-nucleasa usada en la etapa (b), la polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde usada para la extensión del cebador situado corriente arriba y la polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde usada en la etapa (d) son idénticas entre sí.

30 El ácido nucleico bicatenario extendido tiene un marcador procedente de: (I) al menos un marcador unido al fragmento de PTO y/o al CTO; (II) un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión; (III) un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión y un marcador unido al fragmento de PTO y/o al CTO; o (IV) un marcador intercalante.

35 La presencia del ácido nucleico bicatenario extendido puede indicar la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana porque el ácido nucleico bicatenario extendido se forma cuando dicha secuencia diana está presente. Para detectar la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido de modo directo, en la etapa (d) se forma un ácido nucleico bicatenario extendido portador de un marcador que proporciona una señal detectable. El marcador usado en el ácido nucleico bicatenario extendido proporciona un cambio de la señal dependiendo de si el ácido nucleico bicatenario extendido está en una cadena doble o sencilla, dando finalmente la señal diana indicadora de la presencia de dicho ácido nucleico bicatenario extendido mediante la fusión de éste último.

40 **Etapa (e): Fusión del ácido nucleico bicatenario extendido**

Según la descripción, tras la reacción de extensión, el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona a lo largo de un intervalo de temperaturas y da una señal diana indicadora de su presencia.

45 La señal diana la proporciona: (I) al menos un marcador unido al fragmento y/o al CTO; (II) un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión; (III) un marcador incorporado en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión y un marcador unido al fragmento y/o al CTO; o (IV) un marcador intercalante.

50 El término «señal diana» tal y como se utiliza en la presente memoria significa cualquier señal capaz de indicar la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido. Por ejemplo, la señal diana incluye una señal procedente de los marcadores (generación o extinción de la señal), un cambio de señal de los marcadores (aumento o disminución de la señal), una curva de fusión, un perfil de fusión y una temperatura de fusión (o valor de T_m).

55 Según una forma de realización preferida, la señal diana es un cambio de señal procedente del marcador situado en el ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa de fusión. El cambio de señal se puede obtener midiendo señales como mínimo a dos temperaturas distintas. Otra alternativa consiste en que la señal diana sea una curva de fusión, un perfil de fusión o una temperatura de fusión (o valor de T_m) obtenida mediante la medición de señales procedentes del marcador situado en el ácido nucleico bicatenario extendido a lo largo de un intervalo de temperaturas. Preferiblemente, el intervalo de temperaturas corresponde al de un análisis de la curva de fusión o a temperaturas cercanas al valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido.

El ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de T_m superior al del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO. Por tanto, el ácido nucleico bicatenario extendido y el híbrido muestran patrones de fusión distintos. Dichos perfiles dispares permiten distinguir la señal diana de las señales que no lo son. El distinto perfil de fusión o la distinta temperatura de fusión generan la señal diana junto con un sistema de marcaje adecuado.

5 La fusión se puede llevar a cabo con técnicas convencionales, entre otras, calentamiento, tratamiento con sustancias alcalinas, formamida, urea y glioxal, métodos enzimáticos (p. ej., con helicasas), y proteínas de unión. Por ejemplo, la fusión se puede lograr calentando a temperaturas de entre 80 °C y 105 °C. Métodos generales de dichos tratamientos se pueden encontrar en Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001).

10 Los sistemas de marcaje adecuados para la presente invención son diversos en cuanto a tipo, localización y modo de generación de la señal.

Los sistemas de marcaje útiles para la presente invención se describen pormenorizadamente a continuación:

(i) Marcador unido al fragmento y/o al CTO

15 Según una forma de realización preferida, la señal diana la proporciona como mínimo un marcador unido al fragmento y/o al CTO. Como el ácido nucleico bicatenario extendido se forma entre el fragmento del PTO y el CTO, contiene el marcador del fragmento del PTO o el del CTO, que proporciona la señal diana en la etapa de fusión.

El marcaje incluye un marcador interactivo doble y un marcador sencillo.

(i-1) Marcador interactivo doble

20 El sistema de marcaje interactivo es un sistema generador de señal en el que se transmite energía no radioactiva entre una molécula donadora y una molécula aceptora. Como ejemplo representativo del sistema de marcaje interactivo, el sistema de marcaje FRET (transferencia de energía de resonancia fluorescente) consta de una molécula indicadora (*reporter*) fluorescente que actúa como donadora y una molécula amortiguadora (*quencher*) que actúa como aceptora. En FRET, la donadora de energía es fluorescente, pero la aceptora de esa energía puede ser fluorescente o no. En otro tipo de sistemas interactivos de marcaje, el donante de energía no es fluorescente, como
25 p. ej., un cromóforo, y el aceptor de energía es fluorescente. En otros tipos de sistemas interactivos de marcaje, el donador de energía es luminiscente, p. ej., bioluminiscente, quimioluminiscente, electroquimioluminiscente, y el aceptor es fluorescente. En la presente invención la molécula donadora puede ser descrita como molécula indicadora y la molécula aceptora como molécula amortiguadora.

30 Preferiblemente, la señal indicadora de la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido (es decir, la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana) es generada por sistemas interactivos de marcaje, más preferiblemente por el sistema de marcaje FRET (es decir, un sistema interactivo de marcaje doble).

Primera forma de realización (marcaje interactivo doble intracatenario)

35 En una primera forma de realización del sistema interactivo de marcaje doble, el fragmento o el CTO poseen un marcaje interactivo doble que comprende una molécula indicadora y una molécula amortiguadora; la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble que da lugar a la señal diana en la etapa (e). La primera forma de realización del sistema interactivo de marcaje doble se ilustra en las Figs. 2, 6 y 9. La primera forma de realización se denomina marcaje interactivo doble intracatenario.

Primera forma de realización plasmada en la Fig. 2 (marcaje interactivo doble intracatenario)

40 La forma de realización mostrada a modo de ejemplo que se describe aparece esquematizada en la Fig. 2. El segmento molde del CTO contiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora. El PTO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana es digerido y libera el fragmento, y éste a su vez se hibrida con el segmento de captura del CTO y se extiende hasta formar el ácido nucleico bicatenario extendido.

45 Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se forma en la etapa (d), la molécula indicadora y la molécula amortiguadora del CTO quedan separadas por conformación y eso impide que la molécula amortiguadora atenúe la señal emitida por la molécula indicadora; cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona en la etapa (e), la molécula indicadora y la molécula amortiguadora quedan por conformación una junto a la otra de tal modo que la segunda atenúa la señal de la primera, y de esa forma se emite la señal diana que indica la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

50 La expresión usada en la presente memoria «la molécula indicadora y la molécula amortiguadora quedan por conformación una junto a la otra (o adyacentes)» significa que ambas moléculas quedan tridimensionalmente adyacentes una respecto a la otra por una estructura conformacional del fragmento o del CTO, como un arrollamiento al azar o una horquilla.

La expresión usada en la presente memoria «la molécula indicadora y la molécula amortiguadora quedan separadas por conformación» significa que ambas moléculas quedan tridimensionalmente separadas por el cambio de la estructura conformacional del fragmento o del CTO a raíz de la formación de la cadena doble.

5 Preferiblemente, la señal diana emitida en la etapa (e) incluye una curva de fusión, un perfil de fusión o un valor de T_m que se obtiene midiendo el cambio de la señal fluorescente generado en la etapa (d).

Según una forma de realización preferida, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora pueden estar localizadas en cualquier punto del CTO, siempre que la señal de la molécula indicadora pueda ser amortiguada y desamortiguada en función de la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

10 Según una forma de realización preferida, tanto la molécula indicadora como la molécula amortiguadora están unidas al segmento molde o al segmento de captura del CTO.

Según una forma de realización preferida, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora están situadas en el extremo 5' y en el extremo 3' del CTO.

15 Según una forma de realización preferida, la molécula indicadora o la molécula amortiguadora del CTO está localizada en su extremo 5' o a entre 1 y 5 nucleótidos de distancia del extremo 5' mientras que la otra está ubicada de tal modo que amortigua y desamortigua la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del CTO.

20 Según una forma de realización preferida, la molécula indicadora o la molécula amortiguadora del CTO está localizada en su extremo 3' o a entre 1 y 5 nucleótidos de distancia del extremo 3' mientras que la otra está ubicada de tal modo que amortigua y desamortigua la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del CTO.

25 Según una forma de realización preferida, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora están separadas como máximo por 80 nucleótidos, preferiblemente como máximo por 60 nucleótidos, más preferiblemente como máximo por 30 nucleótidos, y mucho más preferiblemente como máximo por 25 nucleótidos. Según una forma de realización preferida, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora están separadas como mínimo por 4 nucleótidos, preferiblemente como mínimo por 6 nucleótidos, más preferiblemente como mínimo por 10 nucleótidos, y mucho más preferiblemente como mínimo por 15 nucleótidos.

En la presente invención se puede formar un híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO.

30 En el caso de que el segmento molde del CTO esté marcado con un marcador interactivo doble como el de la Fig. 2, no habrá un cambio de la señal del marcador en el híbrido formado por el PTO sin escindir y el CTO. Por tanto, el híbrido no proporciona una señal que no sea la diana.

En el caso de que el segmento de captura del CTO esté marcado con un marcador interactivo doble, el híbrido formado por el PTO sin escindir y el CTO ofrece una señal que no es la diana en la etapa de fusión. En tal caso, la diferencia entre los valores T_m del ácido nucleico bicatenario extendido y del híbrido permite diferenciar la señal diana del ácido nucleico bicatenario extendido de la señal no diana del híbrido.

35 Primera forma de realización plasmada en la Fig. 6 (marcaje interactivo doble intracatenario)

40 La forma de realización mostrada a modo de ejemplo que se describe aparece esquematizada en la Fig. 6. El segmento de marcaje en 5' del PTO contiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora. El PTO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana es digerido para liberar el fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' con la molécula indicadora y la molécula amortiguadora. El fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO.

45 Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se forma en la etapa (d), la molécula indicadora y la molécula amortiguadora del fragmento quedan separadas conformacionalmente y eso impide que la molécula amortiguadora atenúe la señal emitida por la molécula indicadora; cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona en la etapa (e), la molécula indicadora y la molécula amortiguadora quedan por conformación una junto a la otra de tal modo que la segunda atenúa la señal de la primera, y de esa forma se emite la señal diana que indica la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

Según una forma de realización preferida, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora pueden estar localizadas en cualquier punto del fragmento, siempre que la señal de la molécula indicadora sea amortiguada y desamortiguada en función de la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

50 Según una forma de realización preferida, la molécula indicadora o la molécula amortiguadora del CTO está localizada en su extremo 5' o a entre 1 y 5 nucleótidos de distancia del extremo 5' mientras que la otra está ubicada de tal modo que amortigua y desamortigua la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del fragmento.

Según una forma de realización preferida, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora están separadas entre sí como máximo por 50 nucleótidos, preferiblemente como máximo por 40 nucleótidos, más preferiblemente como máximo por 30 nucleótidos, y mucho más preferiblemente como máximo por 20 nucleótidos. Según una forma de realización preferida, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora están separadas como mínimo por 4 nucleótidos, preferiblemente como mínimo por 6 nucleótidos, más preferiblemente como mínimo por 10 nucleótidos, y mucho más preferiblemente como mínimo por 15 nucleótidos.

Tal y como aparece representado en la Fig. 6, el híbrido formado entre el PTO sin escindir y el CTO proporciona una señal que no es la diana en la etapa de fusión. En tal caso, la diferencia entre el valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido y el del híbrido permite diferenciar la señal diana del ácido nucleico bicatenario extendido de la señal no diana del híbrido.

Segunda forma de realización (marcaje interactivo doble intracatenario)

En la segunda forma de realización del sistema interactivo de marcaje doble, el fragmento tiene un marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora y una molécula amortiguadora y el CTO posee otro marcador interactivo doble; la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble que da lugar a la señal diana en la etapa (e).

La forma de realización mostrada a modo de ejemplo que se describe aparece esquematizada en la Fig. 8.

Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se forma en la etapa (d), la señal emitida por la molécula indicadora unida al CTO es amortiguada por la molécula amortiguadora unida al PTO. Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona en la etapa (d), la molécula indicadora y la molécula amortiguadora quedan separadas, lo que impide que la molécula amortiguadora atenúe la señal emitida por la molécula indicadora, de modo que la señal diana es emitida indicando la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

Preferiblemente, la señal diana emitida en la etapa (e) incluye una curva de fusión, un perfil de fusión o un valor de T_m que se obtiene midiendo el cambio de la señal fluorescente emitida por el marcador interactivo doble.

La molécula indicadora y la molécula amortiguadora pueden estar localizadas en cualquier punto del fragmento del PTO y del CTO, siempre que la señal de la molécula indicadora sea atenuada por la molécula amortiguadora en el ácido nucleico bicatenario extendido.

Según una forma de realización preferida, la molécula indicadora o la molécula amortiguadora situadas en el fragmento del PTO está localizada en el extremo 5' del segmento de marcaje en 5'.

Según una forma de realización preferida, la molécula indicadora o la molécula amortiguadora situada en el CTO está localizada en el extremo 3'.

Tal y como aparece representado en la Fig. 8, el híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO proporciona una señal que no es la diana en la etapa de fusión. En tal caso, la diferencia entre el valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido y el del híbrido permite diferenciar la señal diana emitida por el ácido nucleico bicatenario extendido de la señal no diana emitida por el híbrido.

La molécula indicadora y la molécula amortiguadora útiles en la presente invención pueden incluir cualquier molécula conocida en la técnica. Algunos ejemplos son: Cy2TM(506), YO-PROTM-1 (509), YOYOTM-1 (509), calceína (517), FITC (518), FluorXTM (519), AlexaTM (520), rodamina 110 (520), Oregon GreenTM 500 (522), Oregon GreenTM 488 (524), Ri-boGreenTM (525), Rhodamine GreenTM (527), rodamina 123 (529), Magnesium GreenTM(531), Calcium GreenTM (533), TO-PROTM-1 (533), TOTO1 (533), JOE (548), BODIPY530/550 (550), Dil (565), BODIPY TMR (568), BODIPY558/568(568), BODIPY564/570 (570), Cy3TM (570), AlexaTM 546 (570), TRITC (572), Magnesium OrangeTM (575), ficoeritrina R&B (575), rodamina faloidina (575), Calcium OrangeTM(576), pironina Y (580), rodamina B (580), TAMRA (582), Rhodamine RedTM (590), Cy3.5TM (596), ROX (608), Calcium CrimsonTM (615), AlexaTM 594 (615), rojo de Texas (615), rojo Nilo (628), YO-PROTM-3 (631), YOYOTM-3 (631), R-ficocianina (642), C-ficocianina (648), TO-PROTM-3 (660), TOTO3 (660), DiDDiC(5) (665), Cy5TM (670), tiadicarbocianina (671), Cy5.5 (694), HEX (556), TET (536), BiosearchBlue (447), CAL Fluor Gold 540 (544), CAL Fluor Orange 560 (559), CAL Fluor Red 590 (591), CAL Fluor Red 610(610), CAL Fluor Red 635 (637), FAM (520), fluoresceína (520), fluoresceína-C3 (520), Pulsar 650 (566), Quasar 570 (667), Quasar 670 (705) y Quasar 705 (610). El número entre paréntesis indica la longitud de onda máxima de emisión en nanómetros. Preferiblemente, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora incluyen JOE, FAM, TAMRA, ROX y un marcador a base de fluoresceína.

Los pares más adecuados de molécula indicadora-molécula amortiguadora se exponen en diversas publicaciones citadas a continuación: Pesce et al., editores, Fluorescence Spectroscopy (Marcel Dekker, Nueva York, 1971); White et al., Fluorescence Analysis: A Practical Approach (Marcel Dekker, Nueva York, 1970); Berlin, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2nd Edition (Academic Press, Nueva York, 1971); Griffiths, Color AND Constitution of Organic Molecules (Academic Press, Nueva York, 1976); Bishop, editor, Indicators (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Molecular Probes, Eugene, 1992); Pringsheim, Fluorescence and Phosphorescence (Interscience Publishers, Nueva York, 1949); Haugland, R.

P., Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6th Edition (Molecular Probes, Eugene, Oreg., 1996), Patentes de EE. UU. N.º 3.996.345 y 4.351.760.

5 Es destacable que en la presente invención se pueda utilizar una molécula amortiguadora negra no fluorescente capaz de atenuar la fluorescencia de un amplio intervalo de longitudes de onda o una longitud de onda concreta. Ejemplos de ellas son BHQ y DABCYL.

En el marcador FRET adoptado en el CTO, la molécula indicadora abarca una donadora de FRET y la amortiguadora abarca a la otra pareja (aceptora) de FRET. Por ejemplo, un colorante de fluoresceína se usa como indicador y un colorante de rodamina como amortiguador.

(i-2) Marcador sencillo

10 La presente invención también se ejecuta muy bien con sistemas de marcaje sencillos que proporcionan señales indicadoras de la presencia de secuencias de ácidos nucleicos diana.

Según una forma de realización preferida, el fragmento o el CTO tienen un solo marcador, y la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e) induce el cambio de señal del marcador sencillo que da lugar a la señal diana en la etapa (e).

15 Primera forma de realización plasmada en la Fig. 3 (sistema de marcaje sencillo)

La forma de realización mostrada a modo de ejemplo que se describe aparece esquematizada en la Fig. 3. El segmento molde del CTO tiene un marcador fluorescente sencillo. El PTO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana es digerido, con lo que se libera el fragmento. El fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO y se extiende hasta formar el ácido nucleico bicatenario extendido. Con la formación del ácido nucleico bicatenario extendido, la intensidad de la fluorescencia emitida por el marcador fluorescente sencillo aumenta. Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona en la etapa (e), la intensidad de la fluorescencia emitida por el marcador fluorescente sencillo disminuye, de tal modo que la señal diana indica la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

25 Según una forma de realización preferida, el marcador sencillo puede estar localizado en cualquier punto del CTO, siempre que el nivel de la señal emitida por el marcador sencillo cambie en función de la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

Según una forma de realización preferida, el marcador sencillo está unido al segmento molde o al segmento de captura del CTO.

30 En el caso de que el segmento molde del CTO esté marcado con un marcador sencillo como el de la Fig. 3, no se inducirá un cambio de la señal del marcador situado en el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO. Por tanto, el híbrido no proporciona una señal que no sea la diana.

35 Si el segmento de captura del CTO está marcado con un marcador sencillo, el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO proporciona una señal que no es la diana en la etapa de fusión. En este caso, la diferencia entre el valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido y el del híbrido permite diferenciar la señal diana emitida por el ácido nucleico bicatenario extendido de la señal no diana emitida por el híbrido.

Segunda forma de realización plasmada en la Fig. 7 (sistema de marcaje sencillo)

40 La forma de realización mostrada a modo de ejemplo que se describe aparece esquematizada en la Fig. 7. El segmento de marcaje en 5' del PTO tiene un marcador fluorescente sencillo. El PTO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana es digerido, con lo que se libera el fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' con el marcador fluorescente sencillo. Con la hibridación, la intensidad de la señal emitida por el marcador fluorescente sencillo situado en el segmento de marcaje en 5' aumenta. Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona en la etapa (e), la intensidad de la señal emitida por el marcador fluorescente sencillo disminuye, de tal modo que la señal diana indica la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

45 Según una forma de realización preferida, el marcador sencillo puede estar localizado en cualquier punto del fragmento del PTO, siempre que el nivel de la señal emitida por el marcador sencillo cambie en función de la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

50 Tal y como aparece representado en la Fig. 7, el híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO proporciona una señal que no es la diana en la etapa de fusión. En tal caso, la diferencia entre el valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido y el del híbrido permite diferenciar la señal diana emitida por el ácido nucleico bicatenario extendido de la señal no diana emitida por el híbrido.

El marcador sencillo usado aquí tiene que ser capaz de emitir una señal distinta dependiendo de si hay presente una cadena doble o una cadena sencilla. El marcador sencillo puede ser un marcador fluorescente, un marcador

luminiscente, un marcador quimioluminiscente, un marcador electroquímico o un marcador metálico. Preferiblemente, el marcador sencillo consiste en un marcador fluorescente.

5 Los tipos y los puntos de unión preferibles para los marcadores fluorescentes sencillos usados en esta invención se dan a conocer en las patentes de EE. UU. N.º 7.537.886 y 7.348.141, las enseñanzas de las cuales se incorporan a la presente memoria como referencia en su integridad. Preferiblemente, el marcador fluorescente sencillo incluye JOE, FAM, TAMRA, ROX y un marcador a base de fluoresceína. Es preferible que el residuo nucleotídico marcado esté ubicado como residuo interno en el seno del oligonucleótido, en lugar de en los extremos 5' o 3'.

El marcador fluorescente sencillo útil para la presente invención puede describirse en referencia a descripciones de moléculas indicadora y amortiguadora tal y como se ha indicado antes.

10 En particular, en el caso de que la presente invención en fase sólida se lleve a cabo con un marcador sencillo, se puede utilizar un marcador fluorescente general y no se precisa un marcador fluorescente específico capaz de proporcionar una señal fluorescente con diferentes intensidades dependiendo de su presencia en una cadena doble o en una cadena sencilla. La señal diana proporcionada en el sustrato sólido se mide. La forma de realización del sistema de marcaje sencillo con el CTO inmovilizado se ilustra en la Fig. 12.

15 Cuando se emplea el CTO inmovilizado sobre el sustrato sólido se pueden usar marcadores químicos (p. ej., biotina) o enzimáticos (p. ej., fosfatasa alcalina, peroxidasa, β -galactosidasa y β -glucosidasa).

20 En el sistema de marcaje «marcador unido al fragmento y/o al CTO», los marcadores pueden estar situados en cualquier punto siempre que el híbrido formado entre el PTO sin escindir y el CTO no emita ninguna señal que no sea la diana en la etapa (e). Como alternativa, los marcadores pueden estar colocados en cualquier punto siempre que el híbrido formado entre el PTO sin escindir y el CTO emita una señal que no sea la diana en la etapa (e); en ese caso el valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido es superior al del híbrido formado entre el PTO sin escindir y el CTO.

25 En concreto, en el caso de que los marcadores estén colocados de tal modo que el híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO no ofrezca una señal que no es la diana, el intervalo que incluya el valor de T_m del híbrido puede ser utilizado para seleccionar el valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido para detectar la secuencia de ácido nucleico diana.

(ii) Marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido

30 La presente invención puede emplear un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión para proporcionar la señal diana que indique la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido.

35 Aunque el fragmento del PTO o el CTO carezcan de marcador, la incorporación de un marcador al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión sirve para marcarlo. Las Figs. 10 y 11 ilustran una forma de realización en la que un nucleótido marcado con un marcador sencillo se incorpora al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión (véanse los apartados C y D de las Figs. 10 y 11). Esta forma de realización también es aplicable a otras formas de realización en las que se recurre al análisis de la fusión.

40 Según una forma de realización preferida, la señal diana la proporciona un marcador sencillo incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión; el marcador sencillo incorporado está unido a un nucleótido que se incorpora durante la reacción de extensión; la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e) provoca un cambio de la señal emitida por el marcador sencillo que da lugar a la señal diana en la etapa (e).

45 La forma de realización mostrada a modo de ejemplo que se describe aparece esquematizada en la Fig. 10. El PTO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana es digerido para liberar el fragmento. El fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO inmovilizado en un sustrato sólido y se extiende en presencia de nucleótidos marcados con un marcador fluorescente sencillo hasta formar el ácido nucleico bicatenario extendido. La señal fluorescente emitida por el ácido nucleico bicatenario extendido puede ser detectada directamente en el sustrato sólido que acoge el CTO inmovilizado. Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona, la hebra portadora del marcador fluorescente se libera y la señal fluorescente deja de detectarse directamente (no mostrado en la Fig. 10). Por tanto, la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido puede proporcionar directamente un cambio de la señal. A este respecto, se emite la señal diana que indica la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

50 La señal diana emitida en la etapa (e) incluye una curva de fusión, un perfil de fusión o un valor de T_m que se obtiene midiendo el cambio de la intensidad de la fluorescencia directamente en el soporte que acoge el CTO inmovilizado.

55 Según una forma de realización preferida, un nucleótido incorporado durante la reacción de extensión tiene una primera base no natural y el CTO tiene un nucleótido portador de una segunda base no natural con una afinidad de unión específica hacia la primera base no natural, tal y como ilustra la Fig. 11. El nucleótido dotado de la segunda

base no natural está localizado preferiblemente en cualquier punto del segmento molde del CTO.

El término «base no natural» tal y como se usa en la presente memoria se refiere a derivados de bases naturales tales como adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U), que son capaces de formar pares de bases unidos por puentes de hidrógeno. El término «base no natural» tal y como se emplea en la presente memoria incluye bases dotadas de patrones de apareamiento distintos de los de las bases naturales como compuestos originales, tal y como describen, entre otras, las patentes de EE. UU. N.º 5.432.272, 5.965.364, 6.001.983 y 6.037.120. El apareamiento entre bases no naturales también implica dos o tres puentes de hidrógeno, como en las bases naturales. El apareamiento entre bases no naturales también se forma de manera específica.

Ejemplos concretos de bases no naturales son, entre otros, las siguientes bases en combinaciones de pares: iso-C/iso-G, iso-dC/iso-dG, K/X, H/J y M/N (véase la patente de EE. UU. n.º 7.422.850).

La forma de realización mostrada a modo de ejemplo que se describe aparece esquematizada en la Fig. 11. El fragmento se hibrida con el CTO que incorpora un nucleótido dotado de una segunda base no natural (p. ej., iso-dC) que tiene una afinidad de unión específica hacia una primera base no natural (p. ej., iso-dG). La extensión se lleva a cabo en presencia de un nucleótido dotado de la primera base no natural marcada con un marcador fluorescente sencillo, dando lugar al ácido nucleico bicatenario extendido. En la reacción de extensión, el nucleótido portador de la primera base no natural se incorpora en la posición opuesta a la del nucleótido portador de la segunda base no natural.

La señal fluorescente emitida por el ácido nucleico bicatenario extendido puede ser detectada directamente en el sustrato sólido que acoge el CTO inmovilizado. Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona, la hebra portadora del marcador fluorescente se libera y la señal fluorescente deja de detectarse directamente (no mostrado en la Fig. 11). Por tanto, la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido puede proporcionar directamente un cambio de la señal. A este respecto, se emite la señal diana que indica la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

Si se opta por la incorporación del marcador al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, el marcador no se incorporará al híbrido formado entre el PTO sin escindir y el CTO porque dicho híbrido no se extiende. Así pues, el híbrido no proporciona una señal que no sea la diana.

Los tipos y las características de los marcadores sencillos usados pueden estar descritos con referencia a las descripciones del sistema de marcaje basado en «un marcador unido al fragmento y/o al CTO» tal y como se ha indicado antes en la presente memoria.

(iii) Marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido y marcador unido al fragmento o al CTO

La presente invención puede emplear un sistema de marcaje basado en la cooperación de un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión con otro marcador unido al fragmento y/o al CTO, tal y como ilustran las figuras 4 y 5.

Según una forma de realización preferida, la señal diana es proporcionada por un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión y por un marcador unido al fragmento y/o al CTO, y el marcador incorporado está unido a un nucleótido incorporado durante la reacción de extensión; ambos marcadores forman un marcador interactivo doble con una molécula indicadora y una molécula amortiguadora; la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e) induce el cambio de señal emitida por el marcador interactivo doble que da lugar a la señal diana en la etapa (e).

Más preferiblemente, el nucleótido incorporado durante la reacción de extensión tiene una primera base no natural y el CTO tiene un nucleótido dotado de una segunda base no natural con una afinidad de unión específica hacia la primera base no natural.

La forma de realización mostrada a modo de ejemplo que se describe aparece esquematizada en la Fig. 4. El fragmento que se hibrida con el CTO comprende una molécula indicadora o amortiguadora y un nucleótido dotado de una segunda base no natural (p. ej., iso-dC) que tiene una afinidad de unión específica hacia una primera base no natural (p. ej., iso-dG). La extensión se lleva a cabo en presencia de un nucleótido dotado con la primera base no natural marcada con una molécula amortiguadora o indicadora, y da lugar a un ácido nucleico bicatenario extendido en el que la señal emitida por la molécula indicadora es atenuada por la molécula amortiguadora. En la reacción de extensión, el nucleótido portador de la primera base no natural se incorpora en la posición opuesta a la del nucleótido portador de la segunda base no natural.

Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona en la etapa (e), la molécula indicadora y la molécula amortiguadora quedan separadas, lo que impide que la molécula amortiguadora atenúe la señal emitida por la molécula indicadora, de ese modo la señal diana es emitida e indica la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

Preferiblemente, la señal diana emitida en la etapa (e) incluye una curva de fusión, un perfil de fusión o un valor de

T_m que se obtiene midiendo el cambio de la señal emitida por el marcador interactivo doble.

El punto que ocupa el marcador en el CTO y el punto de incorporación del marcador incorporado dependen de la contribución de los dos marcadores al sistema de marcaje interactivo doble a la hora de provocar el cambio de señal en la etapa de fusión.

5 Aún más preferible es que el segmento molde del CTO incorpore una molécula indicadora o amortiguadora y un nucleótido dotado de una segunda base no natural. La reacción de extensión de la etapa (d) se lleva a cabo en presencia de un nucleótido dotado de una molécula indicadora o amortiguadora y de una primera base no natural con una afinidad de unión específica hacia la segunda base no natural del CTO. Las dos bases no naturales del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (d) forman un par de bases que amortigua la señal de la molécula indicadora por efecto de la molécula amortiguadora y provocan así el cambio de la señal, que proporciona la señal diana. Como alternativa, el fragmento posee una molécula indicadora o amortiguadora y el segmento molde del CTO tiene un nucleótido dotado de una segunda base no natural. La reacción de extensión de la etapa (d) se lleva a cabo en presencia de un nucleótido dotado de una molécula indicadora o amortiguadora y de una primera base no natural con una afinidad de unión específica hacia la segunda base no natural del CTO. Las dos bases no naturales del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (d) forman un par de bases que inducen un cambio en la señal de la molécula indicadora por amortiguación, proporcionando así la señal diana.

Otra forma de realización mostrada a modo de ejemplo que se describe aparece esquematizada en la Fig. 5. En esta forma de realización, el fragmento dotado con una molécula indicadora o amortiguadora se hibrida con el CTO que comprende un nucleótido dotado de una segunda base no natural (p. ej., iso-dC) que tiene una afinidad de unión específica hacia una primera base no natural (p. ej., iso-dG). La extensión se lleva a cabo en presencia de un nucleótido dotado de la primera base no natural marcada con una molécula amortiguadora o indicadora, y da lugar a un ácido nucleico bicatenario extendido en el que la señal emitida por la molécula indicadora es atenuada por la molécula amortiguadora. En la reacción de extensión, el nucleótido dotado de la primera base no natural se incorpora en la posición opuesta a la del nucleótido portador de la segunda base no natural.

25 Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se forma en la etapa (d), la molécula indicadora y la molécula amortiguadora quedan separadas conformacionalmente y eso impide que la molécula amortiguadora atenúe la señal emitida por la molécula indicadora; cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona en la etapa (e), la molécula indicadora y la molécula amortiguadora quedan por conformación una junto a la otra de tal modo que la segunda atenúa la señal de la primera, y de esa forma se emite la señal diana que indica la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

Preferiblemente, la señal diana emitida en la etapa (e) incluye una curva de fusión, un perfil de fusión o un valor de T_m que se obtiene midiendo el cambio de la señal emitida por el marcador interactivo doble.

El lugar que ocupa el marcador en el CTO y el lugar de incorporación del marcador incorporado dependen de la contribución de los dos marcadores al sistema de marcaje interactivo doble a la hora de provocar el cambio de señal en la etapa de fusión.

Si se opta por la incorporación del marcador al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, el marcador no se incorporará al híbrido formado entre el PTO sin escindir y el CTO porque dicho híbrido no se extiende. Así pues, el híbrido no proporciona una señal que no sea la diana en la etapa de fusión.

(iv) Marcador intercalante

40 La presente invención puede emplear un marcador intercalante para proporcionar la señal diana indicadora de la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido. El marcador intercalante es más útil en una reacción en fase sólida con CTO inmovilizados porque las moléculas de ácido nucleico bicatenarias presentes en las muestras pueden generar señales.

45 Algunos ejemplos de colorantes intercalantes que son útiles para esta invención son: SYBRTM Green I, PO-PROTM-1, BO-PROTM-1, SYTOTM43, SYTOTM44, SYTOTM45, SYTOXTM Blue, POPOTM-1, POPOTM-3, BOBOTM-1, BOBOTM-3, LO-PROTM-1, JO-PROTM-1, YO-PROTM1, TO-PROTM1, SYTOTM11, SYTOTM13, SYTOTM15, SYTOTM16, SYTOTM20, SYTOTM23, TOTOTM-3, YOYOTM3, GelStarTM y naranja de tiazol. Los colorantes intercalantes se intercalan específicamente en las moléculas de ácido nucleico bicatenarias para generar las señales.

50 La Fig. 13 ilustra una forma de realización en la que los colorantes intercalantes se intercalan entre pares de bases del ácido nucleico bicatenario extendido (etapas C y D de la Fig. 13). Esta forma de realización también es aplicable a otras formas de realización en las que se recurre al análisis de la fusión.

55 La forma de realización mostrada a modo de ejemplo que se describe aparece esquematizada en la Fig. 13. El fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO inmovilizado en un sustrato sólido. La extensión se lleva a cabo en presencia de un colorante intercalante (p. ej., SYBRTM Green) y produce el ácido nucleico bicatenario extendido con colorantes intercalados. La señal fluorescente emitida por el ácido nucleico bicatenario extendido directamente en el sustrato sólido portador del CTO inmovilizado puede ser detectada mediante colorantes

intercalantes fluorescentes. Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona, los colorantes intercalantes fluorescentes se liberan y la señal fluorescente deja de detectarse directamente (no mostrado en la Fig. 13). A este respecto, se emite la señal diana que indica la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

5 El híbrido formado entre el PTO sin escindir y el CTO proporciona una señal que no es la diana en la etapa de fusión. En este caso, la diferencia entre el valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido y el del híbrido permite diferenciar la señal diana emitida por el ácido nucleico bicatenario extendido de la señal no diana emitida por el híbrido (no mostrado en la Fig. 13).

Preferiblemente, la señal diana emitida en la etapa (e) incluye una curva de fusión, un perfil de fusión o un valor de T_m que se obtiene midiendo el cambio de la señal fluorescente generada en la etapa (d).

10 **Etapa (f): Detección de la señal diana**

Por último, el ácido nucleico bicatenario extendido se detecta con la medición de la señal diana en la etapa (e); la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

La detección se puede llevar a cabo de diversas maneras dependiendo del tipo de señal diana.

15 Según una forma de realización preferida, la detección de la señal diana se lleva a cabo mediante un análisis de la fusión.

El término «análisis de la fusión» tal y como se utiliza en la presente memoria significa un método en que la señal diana indicadora de la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido se obtiene mediante la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido, e incluye un método para medir señales a dos temperaturas distintas, análisis de la curva de fusión, análisis del perfil de fusión o análisis del pico de fusión. Preferiblemente, el análisis de la fusión
20 consiste en un análisis de la curva de fusión.

Según una forma de realización preferida, a la fusión de la etapa (e) le sigue la hibridación que proporciona la señal diana indicadora de la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido. En ese caso, la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido se detecta mediante el análisis de la curva de fusión.

25 La curva de fusión o curva de hibridación se puede obtener con técnicas convencionales, por ejemplo, como las descritas en las patentes de EE. UU. N.º 6.174.670 y 5.789.167, Drobyshv et al., Gene 188: 45(1997); Kochinsky and Mirzabekov Human Mutation 19:343(2002); Livehits et al. J. Biomol. Structure Dynam.11:783(1994); y Howell et al. Nature Biotechnology 17:87(1999). Por ejemplo, la curva de fusión o curva de hibridación puede consistir en una gráfica o una presentación de la variación de la señal de emisión con el parámetro de restrictividad de la hibridación (rigurosidad). La señal emitida puede representarse directamente en una gráfica que la compare con el parámetro de hibridación. Por norma general la curva de fusión o curva de hibridación consta de la señal de emisión, por
30 ejemplo fluorescencia, que indica el grado de estructura del ácido nucleico bicatenario (la magnitud de la hibridación), representada en el eje de ordenadas (Y) y el parámetro de hibridación en el eje de abscisas (X).

El PTO y el CTO pueden comprender dNMP naturales. Como alternativa, el PTO y el CTO pueden comprender nucleótidos modificados o nucleótidos no naturales como APN (ácidos peptidonucleicos, véase la publicación PCT N.º WO 92/20702) o LNA (ácidos nucleicos cerrados, véanse las publicaciones PCT N.º WO 98/22489, WO 98/39352 y WO 99/14226).

El PTO y el CTO pueden comprender bases universales como desoxiinosina, inosina, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol y 5-nitroindol. El término «base universal» se refiere a toda base capaz de formar pares de bases con todas las bases naturales del ADN/ARN sin apenas discriminación entre ellas. Tal y como se ha descrito antes, el PTO puede ser escindido en un punto situado en dirección 3' alejado del extremo 3' del segmento de marcaje en 5' del PTO. El punto de escisión puede estar localizado en la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' del PTO. Si el fragmento del PTO comprende la parte del extremo 5' del segmento de marcaje en 3' del PTO, un lugar del CTO hibridado con la parte del extremo 5' del segmento de marcaje en 3' puede contener una base universal, una secuencia degenerada o una combinación de ambas. Por ejemplo, si el PTO se escinde en
40 un punto situado a un nucleótido en dirección 3' del extremo 3' del segmento de marcaje en 5' del PTO, es ventajoso que la parte del extremo 5' del segmento de captura del CTO comprenda una base universal para la hibridación con el nucleótido. Si el PTO se escinde en un punto situado a dos nucleótidos en dirección 3' del extremo 3' del segmento de marcaje en 5' del PTO, es ventajoso que el extremo 5' del segmento de captura del CTO comprenda una secuencia degenerada y que su nucleótido adyacente en dirección 3' contenga una base universal. Así pues, si la escisión del PTO ocurre en varios puntos de la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3', es útil que el CTO contenga bases universales y secuencias degeneradas. Asimismo, si se usan PTO dotados del mismo segmento de marcaje en 5' para detectar varias secuencias de ácidos nucleicos diana en condiciones de inducción de la escisión dependiente de la extensión del cebador situado corriente arriba, se pueden generar fragmentos del PTO con distintas partes del extremo 5' del segmento localizador en 3'. En tales casos,
55 resulta conveniente el uso de bases universales y de secuencias degeneradas en el CTO. Las estrategias basadas en el uso de bases universales y de secuencias degeneradas en el CTO aseguran el uso de un solo tipo o de un número mínimo de tipos del CTO en el cribado de varias secuencias de ácidos nucleicos diana.

Según una forma de realización preferida, el método comprende, además, la repetición de las etapas (a)-(b), (a)-(d) o (a)-(f) preferiblemente con desnaturalización entre los ciclos repetidos, con un cebador situado corriente abajo. Dicha repetición permite amplificar la secuencia de ácidos nucleicos diana y/o la señal diana.

5 Según una forma de realización preferida, las etapas (a)-(f) se llevan a cabo en un recipiente de reacción o en recipientes de reacción separados. Por ejemplo, las etapas (a)-(b), (c)-(d) o (e)-(f) se pueden realizar en recipientes de reacción separados.

Según una forma de realización preferida, las etapas (a)-(b) y (c)-(f) pueden ocurrir de forma simultánea o separada en un recipiente de reacción dependiendo de las condiciones de reacción (en especial de la temperatura).

10 La presente invención no exige que las secuencias de ácidos nucleicos diana que vayan a ser objeto de detección y/o amplificación tengan una secuencia o longitud concretas, ni en el caso del ADN (ADNg y ADNc) ni en el del ARN.

15 En los casos en que se emplee ARNm como material de partida, será necesario un paso de transcripción inversa antes de la etapa de reasociación, cuyos detalles se pueden encontrar en Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); y en Noonan, K. F. et al., Nucleic Acids Res. 16:10366(1988). Para la transcripción inversa se puede usar un hexámero aleatorio o un cebador oligonucleotídico de dT hibridable con ARNm.

Las secuencias de ácidos nucleicos diana que pueden ser detectadas y/o amplificadas incluyen cualquier secuencia natural presente en procariotas, eucariotas (protozoos y parásitos, hongos, levaduras, plantas superiores e inferiores y animales superiores, entre ellos mamíferos y seres humanos, entre otros ejemplos) o virus (herpesvirus, VIH, virus de la gripe, virus de Epstein-Barr, virus de la hepatitis, poliovirus, etc.) o ácido nucleico viroide.

20 La presente invención también es útil para la detección de variaciones nucleotídicas. Preferiblemente, la secuencia de ácidos nucleicos diana comprende una variación nucleotídica. El término «variación nucleotídica» tal y como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier sustitución, delección o inserción de uno o varios nucleótidos en una secuencia de ADN en un lugar concreto entre segmentos de ADN contiguos que, por lo demás, son similares en cuanto a secuencia. Tales segmentos contiguos de ADN incluyen un gen o cualquier otra porción de un cromosoma.
25 Estas variaciones nucleotídicas pueden ser variaciones mutantes o variaciones alélicas polimórficas. Por ejemplo, la variación nucleotídica detectada en la presente invención incluye SNP (polimorfismos mononucleotídicos), mutaciones, delecciones, inserciones, sustituciones y translocaciones. La variación nucleotídica mostrada a título de ejemplo incluye numerosas variaciones del genoma humano (p. ej., variaciones en el gen MTHFR, metileno-
30 tetrahidrofolato-reductasa), variaciones implicadas en la farmacoresistencia de los microbios patógenos y variaciones relacionadas con la oncogénesis.

En la presente invención para la detección de una variación nucleotídica en una secuencia de ácidos nucleicos diana, cuando los cebadores o las sondas usados tienen una secuencia que es complementaria con la variación nucleotídica en la secuencia de ácidos nucleicos diana, la secuencia de ácidos nucleicos diana que contiene dicha
35 variación se describe como molde apareado. Cuando los cebadores o sondas usados tienen una secuencia que no es complementaria con la variación nucleotídica en la secuencia de ácidos nucleicos diana, la secuencia de ácidos nucleicos diana que contiene dicha variación se describe como molde desapareado.

Para la detección de variaciones nucleotídicas, el extremo 3' del cebador situado corriente arriba se puede diseñar para quedar situado en oposición al punto de la variación nucleotídica en la secuencia de ácidos nucleicos diana. Según una forma de realización preferida, el extremo 3' del cebador situado corriente arriba tiene una secuencia
40 complementaria con la variación nucleotídica de la secuencia de ácidos nucleicos diana. El extremo 3' del cebador situado corriente arriba portador de la secuencia complementaria con la variación nucleotídica de la secuencia de ácidos nucleicos diana se hibrida con el molde apareado y se extiende hasta provocar la escisión del PTO. El fragmento del PTO resultante se hibrida con el CTO y proporciona la señal diana. En cambio, si el extremo 3' del
45 cebador situado corriente arriba no concuerda con la variación nucleotídica en un molde desapareado, éste no se extenderá en las condiciones en que la hibridación del extremo 3' de los cebadores es esencial para la extensión, aunque el cebador situado corriente arriba esté hibridado con el molde desapareado, lo que tiene como consecuencia que no se genere la señal diana.

Como alternativa, es posible usar la escisión del PTO dependiente de la hibridación del PTO dotado de una secuencia que es complementaria de la variación nucleotídica en la secuencia de ácidos nucleicos diana. Por
50 ejemplo, en condiciones controladas, un PTO dotado de una secuencia complementaria con la de la variación nucleotídica de la secuencia de ácidos nucleicos diana se hibrida con el molde apareado y después es escindida. El fragmento del PTO resultante se hibrida con el CTO y proporciona la señal diana. En cambio, en las condiciones controladas, el PTO no se hibrida con el molde desapareado cuya secuencia no es complementaria con la posición de la variación nucleotídica y no se escinde. Preferiblemente, en este caso, la secuencia complementaria con la
55 variación nucleotídica del PTO está situada en mitad del segmento localizador en 3' del PTO.

Como alternativa, es preferible que la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' del PTO esté situada con respecto a la variación nucleotídica en una secuencia de ácidos nucleicos diana para la detección de la variación nucleotídica y que la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' del PTO tenga una secuencia

complementaria con la variación nucleotídica de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

5 En una forma de realización para la detección de una variación mononucleotídica, el extremo 5' del segmento localizador en 3' del PTO tiene una secuencia complementaria con la variación mononucleotídica de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Tal y como se ha descrito antes, la escisión del PTO hibridado con el molde apareado puede inducirse en el punto inmediatamente adyacente en dirección 3' al extremo 5' del segmento localizador en 3' del PTO, por ejemplo, en las condiciones de inducción de la escisión dependiente de la extensión del cebador situado corriente arriba. El extremo 3' del fragmento del PTO tiene el nucleótido complementario con la variación mononucleotídica. El fragmento del PTO se hibrida con el CTO cuyo segmento de captura comprende una secuencia que corresponde con la variación nucleotídica y a continuación se extiende hasta formar el ácido nucleico bicatenario extendido, proporcionando así la señal diana. Si el mismo PTO se hibrida con un molde desapareado cuya secuencia es idéntica a la del molde apareado salvo por la variación mononucleotídica, la escisión del PTO puede tener lugar en un punto situado a dos nucleótidos de distancia en dirección 3' del extremo 5' del segmento localizador en 3' del PTO.

15 Al extremo 3' del fragmento del PTO se le escinde el nucleótido situado más allá del nucleótido complementario de la variación mononucleotídica. Si el punto del CTO que se hibrida con el nucleótido escindido adicional está diseñado para que su secuencia no sea complementaria con ese nucleótido escindido adicional, el extremo 3' del fragmento del PTO no se hibridará con el CTO y, por tanto, el fragmento del PTO no se extenderá en condiciones controladas. Aunque el fragmento del PTO se extienda hasta formar el ácido nucleico bicatenario extendido, el ácido nucleico bicatenario tendrá un valor de T_m distinto del ácido nucleico bicatenario derivado de la hibridación del PTO con el molde desapareado.

20 Según una forma de realización preferida, el punto de escisión del PTO cuya secuencia es complementaria con la variación nucleotídica en su parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' difiere dependiendo de si la hibridación tiene lugar con un molde apareado o con uno desapareado, de modo que el fragmento del PTO desprendido de cada hibridación tiene una secuencia distinta, preferiblemente en la parte del extremo 3' y más preferiblemente en el propio extremo 3'.

25 Según una forma de realización preferida, la selección de la secuencia nucleotídica del CTO teniendo en cuenta la diferencia entre las partes del extremo 3' de los fragmentos del PTO permite diferenciar el molde apareado del molde desapareado.

30 Según una forma de realización preferida, la secuencia de ácidos nucleicos diana usada en la presente invención es una secuencia de ácido nucleico amplificada previamente. La utilización de la secuencia de ácido nucleico amplificada previamente permite mejorar notablemente la sensibilidad y la especificidad de la detección de la diana en la presente invención.

En una forma de realización preferida, el método se lleva a cabo en presencia de un cebador situado corriente abajo.

35 Las ventajas de la presente invención pueden ser evidentes en la detección simultánea («multiplexada») de dos secuencias de ácidos nucleicos diana como mínimo.

40 Según una forma de realización preferida, el método tiene por finalidad detectar como mínimo dos tipos (más preferiblemente, como mínimo tres tipos, y aún más preferiblemente como mínimo cinco tipos) de secuencias de ácidos nucleicos diana. Según una forma de realización preferida, el método tiene por finalidad detectar como mínimo dos tipos (más preferiblemente, como mínimo tres tipos, y aún más preferiblemente como mínimo cinco tipos) de secuencias de ácidos nucleicos diana; en el mismo el oligonucleótido situado corriente arriba comprende como mínimo dos tipos (más preferiblemente como mínimo tres tipos, y aún más preferiblemente como mínimo cinco tipos) de oligonucleótidos, el PTO comprende como mínimo dos tipos (más preferiblemente como mínimo tres tipos, y aún más preferiblemente como mínimo cinco tipos) de los PTO y el CTO comprende como mínimo un tipo (preferiblemente como mínimo dos tipos, más preferiblemente como mínimo tres tipos, y aún más preferiblemente como mínimo cinco tipos) del CTO; cuando como mínimo concurren dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana, el método proporciona como mínimo dos tipos de señales diana que corresponden como mínimo a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana.

45 Los segmentos de marcaje en 5' de al menos dos PTO pueden tener secuencias idénticas entre sí. Por ejemplo, si la presente invención se lleva a cabo para cribar secuencias de ácidos nucleicos diana, los segmentos de marcaje en 5' de los PTO pueden tener secuencias idénticas.

Además, se puede usar un solo tipo de CTO para detectar una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos diana. Por ejemplo, si se emplean PTO con segmentos de marcaje en 5' de idéntica secuencia para el cribado de secuencias de ácidos nucleicos diana, se puede usar un solo tipo de CTO.

55 Según una forma de realización preferida, los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos corresponden como mínimo a dos tipos de las secuencias de ácidos nucleicos diana que tienen distintos valores de T_m .

Según una forma de realización preferida, los como mínimo dos tipos de señales diana correspondientes al menos a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana proceden de distintos tipos de marcadores.

Según una forma de realización preferida, los como mínimo dos tipos de señales diana correspondientes al menos a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana proceden del mismo tipo de marcadores.

- 5 Según una forma de realización preferida, los como mínimo dos tipos de señales diana correspondientes al menos a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana proceden del mismo tipo de marcadores; los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos correspondientes al menos a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana tienen valores de T_m distintos.

- 10 El término «distintos tipos de marcadores» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a marcadores cuyas señales detectables tienen características diferentes. Por ejemplo, los marcadores indicadores fluorescentes FAM y TAMRA se consideran tipos distintos de marcadores porque sus longitudes de onda de excitación y de emisión difieren.

- 15 Si la presente invención se lleva a cabo para detectar simultáneamente al menos dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana mediante el análisis de la curva de fusión y los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos correspondientes como mínimo a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana tienen valores de T_m distintos, es posible detectar como mínimo dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana aunque se utilice un solo tipo de marcador (p. ej., FAM).

Detección de la diana con el CTO inmovilizado en una fase sólida

- 20 La ventaja sobresaliente de la presente invención estriba en que es eficaz para la detección de secuencias de ácidos nucleicos diana incluso sobre una fase sólida como una micromatriz.

Según una forma de realización preferida, la presente invención se lleva a cabo sobre una fase sólida y el CTO permanece inmovilizado en un sustrato sólido por su extremo 5' o por su extremo 3'. En la fase sólida se mide la señal diana proporcionada sobre el sustrato sólido.

- 25 Si se emplea un CTO inmovilizado, el análisis de la fusión con sistemas de marcaje como los antes descritos es aplicable a la reacción en fase sólida de la presente invención.

- 30 Según una forma de realización preferida, la señal diana la proporciona un solo marcador unido al fragmento o por medio de un solo marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión. En particular, en el caso de que la presente invención en fase sólida se lleve a cabo con un marcador sencillo, se puede utilizar un marcador fluorescente general y no se precisa un marcador fluorescente específico capaz de proporcionar una señal fluorescente con intensidades diferentes dependiendo de su presencia en una cadena doble o en una cadena sencilla.

Cuando se emplea el CTO inmovilizado en un sustrato sólido se pueden usar marcadores químicos (p. ej., biotina) o enzimáticos (p. ej., fosfatasa alcalina, peroxidasa, β -galactosidasa y β -glucosidasa).

- 35 Para la reacción en fase sólida, el CTO se inmoviliza directa o indirectamente (preferiblemente de forma indirecta) por su extremo 5' o por su extremo 3' (preferiblemente este último) sobre la superficie del sustrato sólido. Asimismo, el CTO puede quedar inmovilizado en la superficie del sustrato sólido de forma covalente o no covalente. Si los CTO inmovilizados quedan inmovilizados indirectamente en la superficie del sustrato sólido, se usan conectores adecuados. Los conectores útiles en esta invención pueden incluir cualquier conector utilizado para la inmovilización de sondas en la superficie de sustratos sólidos. Por ejemplo, los compuestos alquilo o arilo con un grupo funcional amino, o los compuestos alquilo o arilo con un grupo funcional tiol sirven como conectores para la inmovilización del CTO. También las colas de poli-T o de poli-A pueden servir como conectores.

- 45 Según una forma de realización preferida, el sustrato sólido usado en la presente invención es una micromatriz. La micromatriz destinada a proporcionar el entorno de reacción para esta invención puede incluir cualquiera de las conocidas por las personas versadas en la técnica. Todos los procesos de la presente invención, es decir, la hibridación con las secuencias de ácidos nucleicos diana, la escisión, la extensión, la fusión y la detección de la fluorescencia, se llevan a cabo en la micromatriz. Los CTO inmovilizados en la micromatriz actúan como elementos de la matriz hibridables. Los sustratos sólidos aptos para fabricar micromatrices incluyen, entre otros, metales (p. ej., oro, aleación de oro y cobre, aluminio), óxido metálico, vidrio, cerámica, cuarzo, silicio, semiconductor, obleas de Si/SiO₂, germanio, arseniuro de galio, carbono, nanotubos de carbono, polímeros (p. ej., poliestireno, polietileno, polipropileno y poliacrilamida), sefrosa, agarosa y coloides. Una pluralidad de CTO inmovilizados en esta invención pueden quedar inmovilizados en una región accesible o en dos o más regiones accesibles de un sustrato sólido que puede comprender de 2 a 1.000.000 de regiones accesibles. Los CTO inmovilizados pueden ser fabricados para producir una matriz o matrices para una aplicación dada con técnicas de fabricación convencionales como fotolitografía, chorro de tinta, *microspotting* mecánico o derivadas de las mismas.

55

La presente invención realizada en fase sólida puede detectar simultáneamente una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos diana aunque se utilice un solo tipo de marcador, porque los marcadores incorporados a los CTO inmovilizados están físicamente separados. A este respecto, el número de secuencias de ácidos nucleicos diana que pueden ser detectadas por la presente invención en la fase sólida no son limitadas.

5 II. Forma de realización preferida con amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos diana

Preferentemente, la presente invención se lleva a cabo simultáneamente con la amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos diana usando una pareja de cebadores compuesta por un cebador situado corriente arriba y otro cebador situado corriente abajo capaces de sintetizar la secuencia de ácidos nucleicos diana.

10 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos diana en un ADN o en una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO), el cual comprende:

15 (a) hibridación de las secuencias de ácidos nucleicos diana con una pareja de cebadores que comprende un cebador situado corriente arriba y otro cebador situado corriente abajo y un PTO (Oligonucleótido de sondeo y marcaje); en que tanto el cebador situado corriente arriba como el cebador situado corriente abajo comprenden una secuencia nucleotídica complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana y se hibridan con ella; el PTO comprende: (I) un segmento localizador en 3' que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana con la cual se hibrida; y (II) un segmento de marcaje en 5' que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana; dicho segmento localizador en 3' se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana y el segmento de marcaje en 5' no se hibrida con dicha secuencia diana; el PTO está localizado entre el cebador situado corriente arriba y el cebador situado corriente abajo; dicho PTO está bloqueado en su extremo 3' para impedir su extensión:

20 (b) puesta en contacto del resultado de la etapa (a) con una polimerasa de ácidos nucleicos dependiente de molde dotada de actividad 5'-nucleasa en las condiciones adecuadas para la extensión de los cebadores y para la escisión del PTO; cuando el PTO se hibrida con las secuencias de ácidos nucleicos diana, el cebador situado corriente arriba se extiende y la hebra extendida induce la escisión del PTO por la polimerasa de ácidos nucleicos dependiente de molde dotada de actividad 5'-nucleasa de tal modo que la escisión libera un fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' o una parte de dicho segmento del PTO;

25 (c) hibridación del fragmento desprendido del PTO con el CTO (Oligonucleótido de captura y molde); el CTO comprende en dirección 3' a 5': (I) un segmento de captura que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con el segmento de marcaje en 5' o una parte de este segmento del PTO; y (II) un segmento molde que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con el segmento de marcaje en 5' y el segmento localizador en 3'; en que el fragmento desprendido del PTO se hibrida con los segmentos de captura del CTO;

30 (d) realización de una reacción de extensión con el resultado de la etapa (c) y la polimerasa de ácidos nucleicos dependiente de molde; en la cual el fragmento hibridado con el segmento de captura del CTO se extiende y forma un ácido nucleico bicatenario extendido; este ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de T_m que puede ajustarse con: (I) la secuencia y/o la longitud del fragmento, (II) la secuencia y/o la longitud del CTO, o (III) la secuencia y/o la longitud del fragmento y la secuencia y/o la longitud del CTO;

35 (e) fusión del ácido nucleico bicatenario extendido a lo largo de un intervalo de temperaturas que da una señal diana indicadora de la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido; en la cual la señal diana es provista por: (I) al menos un marcador unido al fragmento y/o al CTO, (II) un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, (III) un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión y un marcador unido al fragmento y/o al CTO, o (IV) un marcador intercalante; y

40 (f) detección del ácido nucleico bicatenario extendido mediante la medición de la señal diana; en la cual la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

Como la forma de realización preferible de la presente invención sigue las etapas del presente método antes descritas, las descripciones comunes de ambas se han omitido para evitar la redundancia innecesaria que complicaría la presente solicitud.

45 Según una forma de realización preferida, el método además comprende la repetición de las etapas (a)-(b), (a)-(d) o (a)-(f) con desnaturalización entre los ciclos repetidos. La repetición de la reacción se acompaña de la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Preferiblemente, la amplificación se lleva a cabo de acuerdo con la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que se da a conocer en las patentes de EE. UU. n.º 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159. Según una forma de realización preferida, el método se realiza para detectar como mínimo dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana.

Según una forma de realización preferida, los como mínimo dos tipos de señales diana correspondientes al menos a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana proceden del mismo tipo de marcadores; los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos correspondientes al menos a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana tienen valores de T_m distintos.

III. Proceso de detección de la diana mediante PTOCE que comprende la detección a una temperatura prefijada

La presente invención se refiere específicamente a una modificada para utilizar una señal diana generada en asociación con la formación del ácido nucleico bicatenario extendido.

5 En otro aspecto más de esta invención, se proporciona un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos diana en un ADN o en una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO), el cual comprende:

10 (a) hibridación de la secuencia de ácidos nucleicos diana con un oligonucleótido situado corriente arriba y un PTO (Oligonucleótido de sondeo y marcaje); en la que dicho oligonucleótido situado corriente arriba comprende una secuencia de nucleótidos complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana con la cual se hibrida; el PTO comprende: (I) un segmento localizador en 3' que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana con la cual se hibrida; y (II) un segmento de marcaje en 5' que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana; dicho segmento localizador en 3' se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana y el segmento de marcaje en 5' no se hibrida con dicha secuencia diana; el oligonucleótido situado corriente arriba está ubicado antes del PTO;

20 (b) puesta en contacto del resultado de la etapa (a) con una enzima dotada de actividad 5'-nucleasa en condiciones para la escisión del PTO; en la cual el oligonucleótido situado corriente arriba o su hebra extendida induce la escisión del PTO por la enzima con actividad 5'-nucleasa de tal modo que la escisión libera un fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' o una parte de este segmento del PTO;

25 (c) hibridación del fragmento desprendido del PTO con un CTO (Oligonucleótido de captura y molde); en el que el CTO comprende en dirección 3' a 5': (I) un segmento de captura que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con el segmento de marcaje en 5' o una parte de este segmento del PTO, y (II) un segmento molde que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con el segmento de marcaje en 5' y el segmento localizador en 3'; de forma que el fragmento desprendido del PTO se hibrida con el segmento de captura del CTO;

30 (d) reacción de extensión con el resultado de la etapa (c) y una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde; en la cual el fragmento hibridado con el segmento de captura del CTO se extiende hasta formar un ácido nucleico bicatenario extendido; el valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido puede ajustarse con: (I) la secuencia y/o la longitud del fragmento, (II) la secuencia y/o la longitud del CTO, o (III) la secuencia y/o la longitud del fragmento y la secuencia y/o la longitud del CTO; de forma que el ácido nucleico bicatenario extendido proporciona una señal diana mediante (I) al menos un marcador unido al fragmento y/o al CTO; (II) un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión; (III) al menos un marcador unido al fragmento y/o al CTO y un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reciente extensión; o (IV) un marcador intercalante; y

35 (e) detección del ácido nucleico bicatenario extendido mediante la medición de la señal diana a una temperatura prefijada en la que el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene su forma bicatenaria; la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

40 Como la forma de realización preferida de la presente invención sigue las etapas del presente método antes descritas, excepto la de la etapa de fusión, las descripciones comunes de ambas se han omitido para evitar la redundancia innecesaria que complicaría la presente solicitud.

La presente invención con el análisis de la fusión descrito antes requiere la detección de señales emitidas por marcadores como mínimo a dos temperaturas distintas porque la señal diana la da la medición del cambio de la señal proporcionada por la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

45 Es improbable que en este aspecto de la presente invención el ácido nucleico bicatenario extendido produzca por sí mismo una señal capaz de discriminar la formación de la no formación del mismo, y la señal se detecta a una temperatura prefijada en la que el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene su forma bicatenaria, que permite determinar la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

50 La presente invención consiste en medir la señal diana junto con la formación del ácido nucleico bicatenario extendido, para la detección de la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

En la presente invención, el ácido nucleico bicatenario extendido tiene un marcador de tal modo que el ácido nucleico bicatenario extendido proporciona una señal diana.

Preferiblemente, la señal diana incluye una señal (generación o extinción de la señal) emitida por el marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido a una temperatura prefijada.

55 El marcaje en la presente invención puede ejecutarse del mismo modo que el aplicado para el método con análisis de la fusión antes descrito. Las Figs. 2-13 pueden ilustrar este aspecto de la presente invención con una pequeña modificación relativa a la detección a una temperatura prefijada.

El principio de funcionamiento de la señal diana emitida por el ácido nucleico bicatenario extendido es el siguiente:
 (I) la extensión del fragmento induce un cambio de la señal emitida por el marcador que proporciona la señal diana;
 o

5 (ii) la hibridación del fragmento y el CTO induce un cambio de la señal emitida por el marcador que proporciona la señal diana y el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana.

10 La forma de realización mostrada a título de ejemplo del principio de funcionamiento (I) puede ser descrita con referencia a la Fig. 9. Si se utilizan CTO inmovilizados, la presente invención detecta una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos diana de un modo mucho más eficaz. El segmento molde del CTO inmovilizado contiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora. La molécula indicadora y la molécula amortiguadora quedan por conformación una junto a la otra y ello permite que la segunda amortigüe la señal de la primera. Cuando el fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO, la molécula amortiguadora atenúa la señal emitida por la molécula indicadora. Con la formación del ácido nucleico bicatenario extendido, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora quedan por conformación separadas lo que impide que ésta última amortigüe la señal de la primera. La señal diana se produce en la etapa de extensión (C y D de la Fig. 9).

15 En la Fig. 9, el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO no forma un ácido nucleico bicatenario extendido. Por tanto, la molécula amortiguadora sigue atenuando la señal emitida por la molécula indicadora. El híbrido no proporciona una señal que no sea la diana.

20 La forma de realización mostrada a título de ejemplo sobre el principio de funcionamiento (II) puede ser descrita con referencia a la Fig. 6. La figura ilustra el presente aspecto, así como el método que utiliza el análisis de la fusión. El segmento de marcaje en 5' del PTO contiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora. La molécula indicadora y la molécula amortiguadora quedan por conformación una junto a la otra y ello permite que la segunda amortigüe la señal de la primera. El PTO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana es digerido y se desprende el fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' con la molécula indicadora y la molécula amortiguadora, y este fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO. Con la hibridación, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora quedan por conformación separadas lo que impide que ésta última amortigüe la señal de la primera. La señal diana se produce en la etapa de la hibridación del fragmento y el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana (C y D en la Fig. 6).

25 En la Fig. 6, el híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO proporciona una señal que no es la diana (C y D en la Fig. 6) y para eliminar la señal no diana es necesario que el híbrido se disocie. Por consiguiente, la temperatura para medir la señal diana está determinada por la disociación del híbrido. Según una forma de realización preferida, la temperatura además se determina teniendo en cuenta el valor de T_m del híbrido.

Según una forma de realización preferida, el ácido nucleico bicatenario extendido puede ser detectado a temperaturas en las que el híbrido queda parcialmente disociado.

35 La temperatura preajustada es superior a la del valor de T_m del híbrido menos 10 °C, preferiblemente superior a la del valor de T_m del híbrido menos 5 °C, más preferiblemente superior a la del valor de T_m del híbrido, y más preferiblemente aún superior a la del valor de T_m del híbrido más 5 °C.

Según una forma de realización preferida, la señal diana proporcionada por el ácido nucleico bicatenario extendido se da durante la extensión de la etapa (d); en ella el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO no proporciona una señal que no sea la diana, tal y como se representa en las figuras 2-4 y 9-11.

40 Según una forma de realización preferida, la señal diana proporcionada por el ácido nucleico bicatenario extendido es dada por la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) y la formación del ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana en la etapa (d); en la misma el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO no proporciona una señal que no sea la diana; la temperatura prefijada es superior a la del valor de T_m del híbrido, tal y como se representa en las figuras 5-8 y 12-13.

45 Cuando el híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO proporciona una señal que no es la diana (Panel D en la Fig. 6), eliminar esa señal no diana exige disociar el híbrido. Por tanto, la temperatura para medir la señal diana está determinada por la disociación del híbrido.

Los sistemas de marcaje útiles para esta invención se describen pormenorizadamente a continuación:

(i) Marcador unido al fragmento y/o al CTO

50 **(i-1) Marcador interactivo doble**

En una forma de realización de un sistema de marcaje interactivo doble, el CTO incorpora un marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora y una molécula amortiguadora; la extensión del fragmento en la etapa (d) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble que proporciona la señal diana. La primera forma de realización del sistema de marcaje interactivo doble se ilustra en la Fig. 2. La señal diana es dada por la

generación de la señal sincronizada con la extensión.

Según una forma de realización preferida, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora pueden estar ubicadas en el segmento molde del CTO.

5 Según una forma de realización preferida, la molécula indicadora o la molécula amortiguadora del CTO está localizada en su extremo 5' o a entre 1 y 5 nucleótidos de distancia del extremo 5', mientras que la otra está ubicada de tal modo que amortigua y desamortigua la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del CTO. En una forma de realización de un sistema de marcaje interactivo doble, el CTO incorpora un marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora y una molécula amortiguadora; la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble que proporciona la señal diana y el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana.

10 Según una forma de realización preferida, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora pueden estar ubicadas en el segmento de captura del CTO.

15 Según una forma de realización preferida, la molécula indicadora o la molécula amortiguadora del CTO está localizada en su extremo 3' o a entre 1 y 5 nucleótidos de distancia del extremo 3' mientras que la otra está ubicada de tal modo que amortigua y desamortigua la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del CTO.

En esta forma de realización, el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO proporciona una señal que no es la diana; la temperatura para medir la señal diana se determina teniendo en cuenta el valor de T_m del híbrido.

20 En una forma de realización de un sistema de marcaje interactivo doble, el fragmento incorpora un marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora y una molécula amortiguadora; la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble que proporciona la señal diana, y el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana. La primera forma de realización del sistema de marcaje interactivo doble se ilustra en la Fig. 6.

25 Según una forma de realización preferida, la molécula indicadora o la molécula amortiguadora del fragmento está localizada en su extremo 5' o a entre 1 y 5 nucleótidos de distancia del extremo 5', mientras que la otra está ubicada de tal modo que amortigua y desamortigua la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del fragmento.

En esta forma de realización, el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO proporciona una señal que no es la diana; la temperatura para medir la señal diana se determina teniendo en cuenta el valor de T_m del híbrido.

30 En una forma de realización del sistema de marcaje interactivo doble, el fragmento incorpora una parte del marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora y una molécula amortiguadora y el CTO tiene la otra parte del marcador interactivo doble; la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble que proporciona la señal diana, y el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana. La forma de realización del sistema de marcaje interactivo doble se ilustra en la Fig. 8.

35 La molécula indicadora y la molécula amortiguadora pueden estar ubicadas en cualquier punto del fragmento del PTO y del CTO, siempre que la señal de la molécula indicadora sea atenuada por la molécula amortiguadora.

Según la forma de realización, la molécula indicadora o la molécula amortiguadora situadas en el fragmento PTO está localizada, preferiblemente, en su extremo 5'.

40 Según la forma de realización, la molécula indicadora o la molécula amortiguadora situada en el CTO está localizada, preferiblemente, en su extremo 5'.

En esta forma de realización, el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO proporciona una señal que no es la diana; la temperatura para medir la señal diana se determina teniendo en cuenta el valor de T_m del híbrido.

(i-2) Marcador sencillo

45 En una forma de realización de un sistema de marcador sencillo, el CTO tiene un marcador sencillo y la extensión del fragmento en la etapa (d) induce un cambio de la señal emitida por el marcador sencillo que da la señal diana. La forma de realización del sistema de marcaje sencillo se ilustra en la Fig. 3. La señal diana es dada por la generación de la señal sincronizada con la extensión.

Según la forma de realización, el segmento molde del CTO está marcado con el marcador sencillo.

50 En una forma de realización de un sistema de marcaje sencillo, el CTO incorpora un marcador sencillo y la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble que proporciona la señal diana, y el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana.

Según la forma de realización, el segmento de captura del CTO está marcado con el marcador sencillo.

En esta forma de realización, el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO proporciona una señal que no es la diana; la temperatura para medir la señal diana se determina teniendo en cuenta el valor de T_m del híbrido.

5 En una forma de realización de un sistema de marcaje sencillo, el fragmento incorpora un marcador sencillo y la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble que da la señal diana y el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana. La forma de realización del sistema de marcaje sencillo se ilustra en la Fig. 12.

En esta forma de realización, el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO proporciona una señal que no es la diana; la temperatura para medir la señal diana se determina teniendo en cuenta el valor de T_m del híbrido.

10 El marcador sencillo usado aquí tiene que ser capaz de proporcionar una señal distinta dependiendo de si hay presente una cadena doble o una cadena sencilla. El marcador sencillo puede ser un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador quimioluminiscente, un marcador electroquímico o un marcador metálico. Preferiblemente, el marcador sencillo consiste en un marcador fluorescente. Los tipos y los puntos de unión
15 preferibles para los marcadores fluorescentes sencillos usados en esta invención se dan a conocer en las patentes de EE. UU. n.º 7.537.886 y 7.348.141, las enseñanzas de las cuales se incorporan en su integridad a la presente memoria como referencia. Preferiblemente, el marcador fluorescente sencillo incluye JOE, FAM, TAMRA, ROX y un marcador a base de fluoresceína. Es preferible que el residuo nucleotídico marcado esté ubicado como residuo interno en el seno del oligonucleótido, en lugar de en los extremos 5' o 3'.

20 El marcador fluorescente sencillo que es útil para la presente invención puede ser descrito en referencia a las descripciones de las moléculas indicadora y amortiguadora tal y como se ha indicado antes.

En particular, en el caso de que la presente invención en fase sólida se lleve a cabo con un marcador sencillo, se puede utilizar un marcador fluorescente general y no se precisa un marcador fluorescente específico capaz de proporcionar una señal fluorescente con diferentes intensidades dependiendo de su presencia en una cadena doble o en una cadena sencilla.

25 Si se emplea el CTO inmovilizado en un sustrato sólido se pueden usar marcadores químicos (p. ej., biotina) o enzimáticos (p. ej., fosfatasa alcalina, peroxidasa, β -galactosidasa y β -glucosidasa).

30 En una forma de realización preferida, los marcadores unidos al fragmento y/o al CTO están situados en cualquier punto siempre que el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO no emita ninguna señal que no sea la diana en la etapa (d), tal y como aparece representado en las Figs. 2-3 y 9. Como alternativa, los marcadores pueden estar ubicados en cualquier punto siempre que el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO emita una señal que no sea la diana en la etapa (d); en ese caso el valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido es superior a la del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO, tal y como aparece representado en las Figs. 6-8 y 12.

(ii) Marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido

35 En concreto, si la presente invención se lleva a cabo en una fase sólida con un CTO inmovilizado, este sistema de marcaje resulta más útil para proporcionar la señal diana tal y como se ilustra en las Figs. 10 y 11.

40 Según una forma de realización preferida, la señal diana es proporcionada por un marcador sencillo incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión; el marcador sencillo incorporado está unido a un nucleótido que se incorpora durante la reacción de extensión; la extensión del fragmento en la etapa (d) provoca un cambio de la señal emitida por el marcador sencillo que da lugar a la señal diana en la etapa (d).

Según una forma de realización preferida, el nucleótido incorporado durante la reacción de extensión tiene una primera base no natural y el CTO tiene un nucleótido portador de una segunda base no natural con una afinidad de unión específica hacia la primera base no natural, tal y como ilustra la Fig. 11. El nucleótido dotado de la segunda base no natural está localizado preferiblemente en cualquier punto del segmento molde del CTO.

45 Si se opta por la incorporación del marcador al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, el marcador no se incorporará al híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO porque dicho híbrido no se extiende. Así pues, el híbrido no proporciona una señal que no sea la diana.

(iii) Marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido y marcador unido al fragmento o al CTO

50 La presente invención puede emplear un sistema de marcaje basado en la cooperación de un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión con otro marcador unido al fragmento y/o al CTO, tal y como ilustran las figuras 4 y 5.

Según una forma de realización preferida, la señal diana está provista por un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión y un marcador unido al fragmento y/o al CTO; el marcador

incorporado está unido a un nucleótido que se incorpora durante la reacción de extensión; los dos marcadores constituyen un sistema de marcaje interactivo doble formado por una molécula indicadora y una molécula amortiguadora; la extensión del fragmento en la etapa (d) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble que proporciona la señal diana.

- 5 Más preferiblemente, el nucleótido incorporado durante la reacción de extensión tiene una primera base no natural y el CTO tiene un nucleótido dotado de una segunda base no natural con una afinidad de unión específica hacia la primera base no natural.

Preferiblemente, la señal diana dada en la etapa (e) es una señal emitida por el marcador interactivo doble en la etapa (d).

- 10 Si se opta por la incorporación del marcador al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, el marcador no se incorporará al híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO porque dicho híbrido no se extiende. Así pues, el híbrido no proporciona una señal que no sea la diana.

(iv) Marcador intercalante

- 15 La presente invención puede emplear un marcador intercalante para proporcionar la señal diana indicadora de la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido. El marcador intercalante es más útil en una reacción en fase sólida con CTO inmovilizados porque las moléculas de ácido nucleico bicatenarias presentes en las muestras pueden generar señales.

- 20 La forma de realización mostrada a modo de ejemplo que se describe aparece esquematizada en la Fig. 13. El PTO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana es digerido para liberar el fragmento. El fragmento se hibrida con el CTO. La extensión se lleva a cabo en presencia de un colorante intercalante (p. ej., SYBR™ Green) y forma el ácido nucleico bicatenario extendido con colorantes intercalados.

En la Fig. 13, el híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO proporciona una señal que no es la diana (C y D en la Fig. 13) y para eliminar la señal no diana es necesario que el híbrido se disocie. Por tanto, la temperatura para medir la señal diana se determina teniendo en cuenta el valor de T_m del híbrido.

- 25 Preferiblemente, la señal diana dada en la etapa (e) es una señal emitida por el colorante intercalado.

Según una forma de realización preferida, el PTO y/o el CTO están bloqueados en su extremo 3' para impedir su extensión.

Según una forma de realización preferida, el oligonucleótido situado corriente arriba es un cebador o una sonda situados corriente arriba.

- 30 Según una forma de realización preferida, el oligonucleótido situado corriente arriba puede estar ubicado junto al PTO en la medida en que el oligonucleótido situado corriente arriba induzca la escisión del PTO por la enzima dotada de actividad 5'-nucleasa.

Según una forma de realización preferida, el cebador situado corriente arriba induce a través de su hebra extendida la escisión del PTO por la enzima dotada de actividad 5'-nucleasa.

- 35 Según una forma de realización preferida, el método además comprende la repetición de las etapas (a)-(b), (a)-(d) o (a)-(e) con desnaturalización entre los ciclos repetidos.

Según una forma de realización preferida, las etapas (a)-(b) y (c)-(e) se llevan a cabo en un recipiente de reacción o en recipientes de reacción separados.

- 40 Según una forma de realización preferida, el método se realiza para detectar como mínimo dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana; de forma que el oligonucleótido situado corriente arriba comprende al menos dos tipos de oligonucleótidos, el PTO comprende al menos dos tipos de PTO, y el CTO comprende al menos un tipo de CTO: cuando como mínimo están presentes dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana, el método proporciona al menos dos tipos de señales diana correspondientes como mínimo a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana.

- 45 Según una forma de realización preferida, el oligonucleótido situado corriente arriba es un cebador situado corriente arriba y la etapa (b) usa una polimerasa de ácidos nucleicos dependiente de molde para la extensión del cebador situado corriente arriba.

Según una forma de realización preferida, el CTO permanece inmovilizado por su extremo 5' o 3' en un sustrato sólido y se mide la señal diana proporcionada sobre el sustrato sólido.

- 50 Según una forma de realización preferida, la señal diana es provista por un marcador sencillo unido al fragmento o por un marcador sencillo incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión.

Según una forma de realización preferida, el método se lleva a cabo en presencia de un cebador situado corriente abajo (*downstream*).

La detección de la etapa (e) se puede realizar en tiempo real, en punto final, o con un intervalo de tiempo prefijado. En los casos en que la presente invención además comprende la repetición de las etapas (a)-(b), (a)-(d) o (a)-(e), es preferible que la detección de la señal se lleve a cabo en cada ciclo de la repetición a una temperatura prefijada (en tiempo real), al final de la repetición a una temperatura prefijada (punto final) o a cada uno de los intervalos de tiempo prefijados durante la repetición a una temperatura prefijada. Es preferible que la detección se realice en cada ciclo de la repetición en tiempo real a fin de mejorar la exactitud y la cuantificación de la detección.

IV. Equipos para la detección de la diana

10 En otro aspecto de esta descripción se proporciona un equipo para detectar una secuencia de ácidos nucleicos diana en un ADN o en una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO), el cual comprende:

(a) un oligonucleótido situado corriente arriba que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana con la cual se hibrida;

15 (b) un PTO (Oligonucleótido de sondeo y marcaje) que comprende: (I) un segmento localizador en 3' que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana con la cual se hibrida; y (II) un segmento localizador en 5' que comprende una secuencia nucleotídica que no es complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana, en que el segmento localizador en 3' se hibrida con dicha secuencia diana y el segmento de marcaje en 5' no se hibrida con dicha secuencia diana; el oligonucleótido situado corriente arriba está localizado antes del PTO; el oligonucleótido situado corriente arriba o su hebra extendida induce la escisión del PTO por una enzima dotada de actividad 5'-nucleasa de tal modo que la escisión libera un fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' o una parte de este segmento del PTO; y

20 (c) un CTO (Oligonucleótido de captura y molde) que comprende en dirección 3' a 5': (I) un segmento de captura que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con el segmento de marcaje en 5' o una parte de este segmento del PTO; y (II) un segmento molde que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con el segmento de marcaje en 5' y el segmento localizador en 3' del PTO; de forma que el fragmento desprendido del PTO se hibrida con el segmento de captura del CTO; y el fragmento hibridado con el segmento de captura del CTO es extendido por una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde hasta formar un ácido nucleico bicatenario extendido.

Como el equipo se construye para ejecutar el método de detección de la presente invención antes descrito, las descripciones comunes de ambos se han omitido para evitar la redundancia innecesaria que complicaría la presente solicitud.

35 Según un aspecto preferido de la descripción, el equipo además comprende una enzima dotada de actividad 5'-nucleasa.

Según un aspecto preferido de la descripción, el equipo además comprende una polimerasa de ácidos nucleicos dependiente de molde.

Según un aspecto preferido de la descripción, el PTO y/o el CTO tienen como mínimo un marcador.

40 Según un aspecto preferido de la descripción, el equipo además comprende un marcador que se ha de incorporar al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión.

Según un aspecto preferido de la descripción, el equipo además comprende un marcador que ha de incorporarse al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión y el PTO y/o el CTO tienen como mínimo un marcador.

Según un aspecto preferido de la descripción, el equipo además comprende un marcador intercalante.

45 Según un aspecto preferido de la descripción, el marcador es un marcador sencillo o un marcador interactivo doble.

Según un aspecto preferido de la descripción, el equipo se usa para la detección de al menos dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos, el oligonucleótido situado corriente arriba comprende al menos dos tipos de oligonucleótidos, el PTO comprende al menos dos tipos de PTO y el CTO comprende al menos dos tipos de CTO.

50 Según un aspecto preferido de la descripción, el CTO permanece inmobilizado por su extremo 5' o su extremo 3' en un sustrato sólido.

Según un aspecto preferido de la descripción, el equipo además comprende un oligonucleótido situado corriente abajo.

Todos los presentes equipos descritos en la presente memoria pueden incluir opcionalmente los reactivos necesarios para realizar las reacciones de amplificación de la diana por PCR (reacciones de PCR) como tampones, cofactores de la ADN-polimerasa y desoxirribonucleótidos-5-trifosfato. Como opción los equipos también pueden incluir varias moléculas polinucleotídicas, transcriptasa inversa, diversos tampones y reactivos, y anticuerpos que inhiben la actividad de la ADN-polimerasa. Los equipos también pueden incluir reactivos necesarios para realizar reacciones de control positivo y negativo. Las cantidades óptimas de reactivos que han de utilizarse en una reacción dada pueden ser determinados por la persona versada en la materia que disponga de la presente descripción. Los equipos normalmente se adaptan para contener los susodichos componentes en envases o en compartimentos separados.

10 Las características y las ventajas de esta invención se resumen a continuación:

(a) La presente invención proporciona un ácido nucleico bicatenario extendido dependiente de la diana en el que un PTO (Oligonucleótido de sondeo y marcaje) hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana es escindido y desprende un fragmento, y este fragmento se hibrida a su vez con el CTO (Oligonucleótido de captura y molde) formando el ácido nucleico bicatenario extendido. El ácido nucleico bicatenario extendido proporciona una señal (generación o extinción de señal) o un cambio de señal (aumento o descenso de señal) que indica la presencia de una secuencia de ácidos nucleicos diana.

(b) La presencia del ácido nucleico bicatenario extendido se determina por medio de diversos métodos o procesos como el análisis de la curva de fusión y la detección a una temperatura prefijada (p. ej., en tiempo real y en punto final).

(c) La presente invención permite detectar simultáneamente al menos dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana mediante el análisis de la curva de fusión incluso utilizando un solo tipo de marcador (p. ej., FAM). En cambio, el método multiplexado en tiempo real convencional que se lleva a cabo en fase líquida adolece de una grave limitación relacionada con el número de marcadores fluorescentes detectables. La presente invención permite solventar con éxito esos inconvenientes y amplía la aplicación de la detección multiplexada en tiempo real.

(d) La presente invención se puede materializar con numerosos sistemas de marcaje. Por ejemplo, los marcadores unidos a cualquier punto del PTO y/o del CTO pueden ser utilizados para proporcionar la señal diana que indica la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido. Asimismo, en la presente invención se pueden usar marcadores incorporados al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión. Además, se puede recurrir a una combinación de tales marcadores. Los versátiles sistemas de marcaje aplicables a la presente invención permiten escoger el sistema de marcaje más adecuado para las condiciones experimentales o los objetivos.

(e) La presente invención proporciona un ácido nucleico bicatenario extendido dependiente de diana que tiene un valor de T_m prefijado que puede ajustarse con: (I) la secuencia y/o la longitud del fragmento, (II) la secuencia y/o la longitud del CTO o (III) la secuencia y/o la longitud del fragmento y la secuencia y/o la longitud del CTO.

(f) El análisis convencional de la curva de fusión con un producto amplificado depende de la secuencia del producto amplificado, por lo que resulta difícil conseguir el valor de T_m deseado del producto amplificado. En cambio, la presente invención depende de la secuencia de un ácido nucleico bicatenario extendido y no de la secuencia de un producto amplificado, lo cual permite escoger el valor de T_m deseado del ácido nucleico bicatenario extendido. Por consiguiente, la presente invención se puede adaptar con facilidad para la detección de múltiples secuencias diana.

(g) El análisis convencional de la curva de fusión con hibridación directa entre las sondas marcadas y las secuencias de ácidos nucleicos diana es harto probable que genere señales positivas falsas a causa de la hibridación inespecífica de las sondas. En cambio, la presente invención no sólo emplea la hibridación del PTO sino también la escisión y la extensión catalizada por enzimas, lo que resuelve completamente el problema de las señales positivas falsas.

(h) El valor de T_m del análisis convencional de la curva de fusión resulta afectado por la variación de las secuencias de los ácidos nucleicos diana. Sin embargo, el ácido nucleico bicatenario extendido de la presente invención ofrece un valor de T_m constante con independencia de la variación de la secuencia en las secuencias de ácidos nucleicos diana, lo cual asegura una excelente precisión en el análisis de la curva de fusión.

(i) Resulta destacable que la secuencia del segmento de marcaje en 5' del PTO y la secuencia del CTO puedan ser seleccionadas sin tener en cuenta las secuencias de ácidos nucleicos diana. Esto hace posible prediseñar un conjunto de secuencias para el segmento de marcaje en 5' del PTO y para el CTO. A pesar de que el segmento localizador en 3' del PTO tiene que estar preparado teniendo en cuenta las secuencias de ácidos nucleicos diana, el CTO se puede preparar listo para usar sin tener en cuenta ni conocer las secuencias de ácidos nucleicos diana. Tales características ofrecen ventajas notorias en la detección de múltiples dianas, entre otros aspectos, en un ensayo de micromatriz con CTO inmovilizados en un sustrato sólido.

La presente invención aparece a continuación descrita con más detalle por medio de ejemplos. A toda persona versada en la materia le resultará evidente que tales ejemplos solo pretenden ser ilustrativos y que el alcance de la presente invención establecido por las reivindicaciones adjuntas no se ve limitado por los mismos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Evaluación del ensayo de escisión y extensión de oligonucleótido de sondeo y marcaje (PTOCE)

Un nuevo ensayo, el ensayo de escisión y extensión de oligonucleótido de sondeo y marcaje (PTOCE, por sus siglas en inglés), se evaluó para ver si un ácido nucleico bicatenario extendido podía proporcionar una señal diana para la detección de una secuencia de ácidos nucleicos diana.

Para tal evaluación se llevó a cabo un ensayo PTOCE que detecta la presencia de un ácido nucleico bicatenario extendido mediante el análisis de la fusión (ensayo PTOCE con análisis de la fusión). Se usó la ADN-polimerasa Taq dotada de actividad 5'-nucleasa para la extensión del cebador situado corriente arriba, la escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO.

El ácido nucleico bicatenario extendido formado durante el ensayo se diseñó para tener un marcador interactivo doble. El marcador interactivo doble incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido fue proporcionado por: (I) CTO marcado con una molécula indicadora y una molécula amortiguadora (CTO con marcaje doble); o (II) PTO dotado de una molécula amortiguadora y CTO dotado de una molécula indicadora (un PTO marcado con molécula amortiguadora y un CTO marcado con molécula indicadora). El PTO y el CTO están bloqueados con un espaciador de carbonos en sus extremos 3'. El oligonucleótido sintético para un gen de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) se usó como molde diana.

1-1. Ensayo PTOCE con un CTO con marcaje doble

El PTO no tiene marcador. El CTO tiene una molécula amortiguadora (BHQ-1) y una molécula indicadora fluorescente (FAM) en su segmento molde. Las secuencias del molde sintético, del cebador situado corriente arriba, del PTO y del CTO usadas en este ejemplo son:

NG-T 5'-

AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTGTTCCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATACCGAT
CCATTGAAAAA-3' (SEQ ID n.º 1)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID n.º 2)

NG-PTO-1 5'-ACGACGGCTTGGCTGCCCCCTCATTGGCGTGTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID n.º 3)

NG-CTO-1 5'-[BHQ-1]CCTCCTCCTCCTCCTCC[T(FAM)]CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3]-
3'(SEQ ID N.º 4)

(las letras subrayadas indica el segmento de marcaje en 5' del PTO)

La reacción se llevó a cabo con un volumen final de 20 µl que contenían 2 pmol de molde sintético (SEQ ID n.º 1) del gen de NG, 10 pmol de cebador situado corriente arriba (SEQ ID n.º 2), 5 pmol de PTO (SEQ ID n.º 3), 2 pmol de CTO (SEQ ID n.º 4) y 10 µl de Mezcla maestra 2X que contenía MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 200 µM y 1,6 unidades de ADN-polimerasa H-*Taq* (Solgent, Corea); el tubo con la mezcla de reacción se introdujo en un termociclador de tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 °C y se sometió a 30 ciclos de 30 s a 95 °C y 60 s a 60 °C. Después de la reacción, se obtuvo la curva de fusión mediante el enfriamiento de la mezcla de reacción a 35 °C, mantenimiento a 35 °C durante 30 s y calentamiento lento de 35 °C a 90 °C. La fluorescencia se midió continuamente durante el alza de la temperatura para controlar la disociación de las moléculas bicatenarias de ADN. El pico de fusión se dedujo de los datos de la curva de fusión.

Tal y como muestra la Figura 14, en presencia del molde se detectó un pico a 76,5 °C correspondiente al valor de T_m esperado del ácido nucleico bicatenario extendido. No se detectó ningún pico sin la presencia del molde. Como el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO no ofrece ninguna señal en este método de marcaje, no hubo ningún pico que correspondiera a dicho híbrido. En los casos en que no había PTO o CTO, no se observó ningún pico.

1-2. Ensayo PTOCE con un PTO marcado con molécula amortiguadora y un CTO marcado con molécula indicadora

El PTO está marcado con una molécula amortiguadora (BHQ-1) en su extremo 5'. El CTO está marcado con una molécula indicadora fluorescente (FAM) en su extremo 3'.

Las secuencias del molde sintético, del cebador situado corriente arriba, del PTO y del CTO usadas en este ejemplo son:

NG-T 5'-

AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTGTTCCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATACCGAT
CCATTGAAAAA-3' (SEQ ID n.º 1)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID n.º 2)

NG-PTO-2 5'-[BHQ-1]ACGACGGCTTGGCTTTACTGCCCTCATTGGCGTGTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID N.º 5)
 NG-CTO-2 5'-CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[FAM]-3' (SEQ ID n.º 6)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5' del PTO)

5 La reacción se llevó a cabo con un volumen final de 20 µl que contenía 2 pmol de molde sintético (SEQ ID n.º 1) del gen de NG, 10 pmol de cebador situado corriente arriba (SEQ ID n.º 2), 5 pmol de PTO (SEQ ID n.º 5), 2 pmol de CTO (SEQ ID n.º 6) y 10 µl de Mezcla maestra 2X que contenía MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 200 µM y 1,6 unidades de ADN-polimerasa H-Taq (Solgent, Corea); el tubo con la mezcla de reacción se introdujo en un termociclador de tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 °C y se sometió a 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 60 s a 60 °C y 30 s a 72 °C. Después de la reacción, se obtuvo la curva de fusión mediante el enfriamiento de la mezcla de reacción a 35 °C, mantenimiento a 35 °C durante 30 s y calentamiento lento de 35 °C a 90 °C. La fluorescencia se midió continuamente durante el alza de la temperatura para controlar la disociación de las moléculas bicatenarias de ADN. El pico de fusión se dedujo de los datos de la curva de fusión.

15 Tal y como muestra la Figura 15, en presencia del molde se detectó un pico a 77,0 °C correspondiente al valor de T_m esperado del ácido nucleico bicatenario extendido. Como el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO ofrece una señal no diana en este método de marcaje, hubo un pico a 64,0 °C-64,5 °C correspondiente al valor de T_m esperado del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO. En los casos en que no había PTO o CTO, no se observó ningún pico.

20 Estos resultados indican que se produce un ácido nucleico bicatenario extendido y que éste proporciona la señal diana indicando la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

Ejemplo 2: Ajustabilidad del valor de T_m de un ácido nucleico bicatenario extendido

Se examinó en mayor detalle si el valor de T_m de un ácido nucleico bicatenario extendido es ajustable con la secuencia de CTO en el ensayo PTOCE.

25 Para el examen, se emplearon tres tipos de CTO cuyos segmentos molde tenían secuencias distintas. El PTO no tiene marcador. Los tres tipos de CTO incorporan una molécula amortiguadora (BHQ-1) y una molécula indicadora fluorescente (FAM) en los segmentos molde. El PTO y el CTO están bloqueados con un espaciador de carbonos en sus extremos 3'.

Los tres tipos de CTO fueron sometidos al ensayo PTOCE con análisis de la fusión.

30 Las secuencias del molde sintético, del cebador situado corriente arriba, del PTO y del CTO usadas en este ejemplo son:

NG-T 5'-

AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTTGTTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATACCGAT
 CCATTGAAAAA-3' (SEQ ID n.º 1)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID n.º 2)

35 NG-PTO-3 5'-ACGACGGCTTGGCCCTCATTGGCGTGTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID n.º 7)

NG-CTO-1 5'-[BHQ-1]CCTCCTCCTCCTCCTCCTCC[T(FAM)]CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador
 C3]-3 (SEQ ID n.º 4)

NG-CTO-3 5'-[BHQ-1]TTTTTTTTTCTCCTCCAG[T(FAM)]AAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3]-3'
 (SEQ ID n.º 8)

40 NG-CTO-4 5'-[BHQ-1]TTTTTTTTTTTTTTTTTTAG[T(FAM)]AAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3]-3' (SEQ
 ID n.º 9)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5' del PTO)

45 La reacción se llevó a cabo con un volumen final de 20 µl que contenía 2 pmol de molde sintético (SEQ ID n.º 1) del gen de NG, 10 pmol de cebador situado corriente arriba (SEQ ID n.º 2), 5 pmol de PTO (SEQ ID n.º 7), 2 pmol de CTO (SEQ ID n.º 4, 8 o 9) y 10 µl de Mezcla maestra 2X que contenía MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 200 µM y 1,6 unidades de ADN-polimerasa H-Taq (Solgent, Corea); el tubo con la mezcla de reacción se introdujo en un termociclador de tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 °C y se sometió a 30 ciclos de 30 s a 95 °C y 60 s a 60 °C. Después de la reacción, se obtuvo la curva de fusión mediante el enfriamiento de la mezcla de reacción a 35 °C, mantenimiento a 35 °C durante 30 s y calentamiento lento de 35 °C a 90 °C. La fluorescencia se midió continuamente durante el alza de la temperatura para controlar la disociación de las moléculas bicatenarias de ADN. El pico de fusión se dedujo de los datos de la curva de fusión.

50 Tal y como muestra la Figura 16, se detectó un pico a 76,0 °C, 69,0 °C o 64,5 °C en presencia del molde. Cada pico corresponde a la T_m esperada del ácido nucleico bicatenario extendido generado a partir del CTO examinado. No se detectó ningún pico sin la presencia del molde.

Estos resultados indican que el valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido es ajustable mediante la secuencia del CTO.

Ejemplo 3: Detección de una secuencia de ácidos nucleicos diana con el ensayo PTOCE que comprende la detección en tiempo real o el análisis de la fusión

- 5 Se examinó en mayor detalle si el ensayo PTOCE podía detectar una secuencia de ácidos nucleicos diana con (I) la PCR en tiempo real o (II) el análisis de la fusión tras la PCR: (I) La escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO estuvieron acompañadas por la amplificación de un ácido nucleico diana con el proceso de PCR y la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido se detectó a una temperatura prefijada en cada ciclo (ensayo PTOCE con detección en tiempo real a temperatura prefijada) o; (II) la escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO
10 estuvieron acompañadas por la amplificación de un ácido nucleico diana con el proceso de PCR y la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido se detectó mediante un análisis de la fusión tras la PCR (ensayo PTOCE con análisis de la fusión).

15 El cebador situado corriente arriba interviene tanto en la escisión del PTO por una enzima con actividad 5'-nucleasa como en la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana con el cebador situado corriente abajo mediante el proceso de PCR. La ADN-polimerasa Taq dotada de actividad 5'-nucleasa se usó para la extensión del cebador situado corriente arriba y del cebador situado corriente abajo, la escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO.

20 El ácido nucleico bicatenario extendido se diseñó para tener un marcador interactivo doble. El marcador interactivo doble incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido se proporcionó en forma de: (I) CTO marcado con una molécula indicadora y una molécula amortiguadora, (II) un complejo de molécula amortiguadora-iso-dGTP incorporado durante la reacción de extensión y CTO dotado de una molécula amortiguadora y un residuo iso-dC, o (III) PTO dotado de una molécula amortiguadora y un CTO dotado de una molécula indicadora. El PTO y el CTO están bloqueados con un espaciador de carbonos en sus extremos 3'.

El ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) se usó como ácido nucleico diana.

25 3-1. Ensayo PTOCE con un CTO con marcaje doble

El PTO no tiene marcador y el CTO está marcado con una molécula amortiguadora (BHQ-1) y una molécula indicadora fluorescente (FAM) en su segmento molde.

Las secuencias del cebador situado corriente arriba, del cebador situado corriente abajo, del PTO y del CTO usadas en este ejemplo son:

30 NG-F 5' TACGCCTGCTACTTTTCACGCT 3' (SEQ ID n.º 10)
 NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID n.º 2)
 NG-PTO-3 5'-ACGACGGCTTGGCCCCCTCATTGGCGTGTTCG[espaciador C3] -3' (SEQ ID n.º 7)
 NG-CTO-1 5'-[BHQ-1]CCTCCTCCTCCTCCTCC[T(FAM)]CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGTC[espacia-dor C3] -3' (SEQ ID N.º. 4)

35 (Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5' del PTO)

3-1-1. Ensayo PTOCE con detección en tiempo real a una temperatura prefijada

40 La reacción se llevó a cabo con un volumen final de 20 µl que contenía 100 pg de ADN genómico de NG, 10 pmol de cebador situado corriente abajo (SEQ ID n.º 10), 10 pmol de cebador situado corriente arriba (SEQ ID n.º 2), 5 pmol de PTO (SEQ ID n.º 7), 2 pmol de CTO (SEQ ID n.º 4) y 10 µl de Mezcla maestra 2X que contenía MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 200 µM y 1,6 unidades de ADN-polimerasa H-*Taq* (Solgent, Corea); el tubo con la mezcla de reacción se introdujo en un termociclador de tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 °C y se sometió a 60 ciclos de 30 s a 95 °C, 60 s a 60 °C y 30 s a 72 °C. La detección de la señal se llevó a cabo a 60 °C en cada ciclo. La temperatura de detección se determinó en función de que el ácido nucleico bicatenario extendido mantuviera la forma bicatenaria.

45 Tal y como muestra la Figura 17A, la señal diana (Ct 31,36) se detectó en presencia del molde. No se detectó ninguna señal sin la presencia del molde.

3-1-2. Ensayo PTOCE con análisis de la fusión

50 En el ejemplo 3-1-1, después de la reacción se obtuvo la curva de fusión mediante el enfriamiento de la mezcla de reacción a 35 °C, mantenimiento a 35 °C durante 30 s y calentamiento lento de 35 °C a 90 °C. La fluorescencia se midió continuamente durante el alza de la temperatura para controlar la disociación de las moléculas bicatenarias de ADN. El pico de fusión se dedujo de los datos de la curva de fusión.

Tal y como muestra la Figura 17B, en presencia del molde se detectó un pico a 76,0 °C correspondiente al valor de T_m esperado del ácido nucleico bicatenario extendido. No se detectó ningún pico sin la presencia del molde. Como el

híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO no ofrece ninguna señal en este método de marcaje, no hubo ningún pico que correspondiera a dicho híbrido.

3-2. Ensayo PTOCE con un complejo de molécula amortiguadora-iso-dGTP y un CTO marcado con molécula indicadora dotado de un residuo iso-dC

- 5 El PTO no tiene marcador. El CTO contiene una molécula indicadora (FAM) y un residuo iso-dC en su extremo 5'. Durante la reacción de extensión del fragmento del PTO, un iso-dGTP marcado con una molécula amortiguadora (dabcyl) se incorpora en la posición complementaria al residuo iso-dC.

Las secuencias del cebador situado corriente arriba, del cebador situado corriente abajo, del PTO y del CTO usadas en este ejemplo son:

10 NG-F 5' TACGCCTGCTACTTTTCACGCT-3' (SEQ ID n.º 10)
 NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID n.º 2)
 NG-PTO-1 5'-ACGACGGCTTGGCTGCCCCTCATTGGCGTGTTCG[espaciador C3] -3' (SEQ ID n.º 3)
 NG-CTO-5 5'-[FAM][Iso-dC]JCTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTTCGT[espaciador C3] -3' (SEQ ID n.º 11)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5' del PTO)

15 3-2-1. Ensayo PTOCE con detección en tiempo real a una temperatura prefijada

La reacción se llevó a cabo con un volumen final de 20 µl que contenía 100 pg de ADN genómico de NG, 10 pmol de cebador situado corriente abajo (SEQ ID n.º 10), 10 pmol de cebador situado corriente arriba (SEQ ID n.º 2), 5 pmol de PTO (SEQ ID n.º 3), 2 pmol de CTO (SEQ ID n.º 11) y 10 µl de Mezcla maestra 2X Plexor® (n.º de catálogo A4100, Promega, EE. UU.); el tubo con la mezcla de reacción se introdujo en un termociclador de tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 °C y se sometió a 60 ciclos de 30 s a 95 °C, 60 s a 60 °C y 30 s a 72 °C y 5 ciclos de 30 s a 72 °C y 30 s a 55 °C. La detección de la señal se llevó a cabo a 60 °C en cada ciclo. La temperatura de detección se determinó en función de que el ácido nucleico bicatenario extendido mantuviera la forma bicatenaria.

20

La ADN-polimerasa dotada de actividad 5'-nucleasa de la Mezcla maestra Plexor® se usó para la extensión del cebador situado corriente arriba y la del cebador situado corriente abajo, la escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO.

25

Tal y como muestra la Figura 18A, la señal diana (Ct 33,03) se detectó en presencia del molde. No se detectó ninguna señal sin la presencia del molde.

3-2-2. Ensayo PTOCE con análisis de la fusión

30 En el ejemplo 3-2-1, después de la reacción se obtuvo la curva de fusión mediante el enfriamiento de la mezcla de reacción a 35 °C, mantenimiento a 35 °C durante 30 s y calentamiento lento de 35 °C a 90 °C. La fluorescencia se midió continuamente durante el alza de la temperatura para controlar la disociación de las moléculas bicatenarias de ADN. El pico de fusión se dedujo de los datos de la curva de fusión.

Tal y como muestra la Figura 18B, en presencia del molde se detectó un pico a 70,0 °C correspondiente al valor de T_m esperado del ácido nucleico bicatenario extendido. No se detectó ningún pico sin la presencia del molde. Como el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO no ofrece ninguna señal en este método de marcaje, no hubo ningún pico que correspondiera a dicho híbrido.

35

3-3. Ensayo PTOCE con un PTO marcado con molécula amortiguadora y un CTO marcado con molécula indicadora

40 El PTO está marcado con una molécula amortiguadora (BHQ-1) en su extremo 5'. El CTO está marcado con una molécula indicadora fluorescente (FAM) en su extremo 3'.

Las secuencias del cebador situado corriente arriba, del cebador situado corriente abajo, del PTO y del CTO usadas en este ejemplo son:

45 NG-F 5'-TACGCCTGCTACTTTTCACGCT 3' (SEQ ID n.º 10)
 NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID n.º 2)
 NG-PTO-4 5'-[BHQ-1]ACGACGGCTTGGCTGCCCCTCATTGGCGTGTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID n.º 12)
 NG-CTO-2 5'-CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTTCGT[FAM]-3' (SEQ ID n.º 6)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5' del PTO)

3-3-1. Ensayo PTOCE con detección en tiempo real a una temperatura prefijada

50 La reacción se llevó a cabo con un volumen final de 20 µl que contenía 100 pg de ADN genómico de NG, 10 pmol de cebador situado corriente abajo (SEQ ID n.º 10), 10 pmol de cebador situado corriente arriba (SEQ ID n.º 2), 5 pmol

de PTO (SEQ ID n.º 12), 2 pmol de CTO (SEQ ID n.º 6) y 10 µl de Mezcla maestra 2X que contenía MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 200 µM y 1,6 unidades de ADN-polimerasa H-*Taq* (Solgent, Corea); el tubo con la mezcla de reacción se introdujo en un termociclador de tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 °C y se sometió a 60 ciclos de 30 s a 95 °C, 60 s a 60 °C y 30 s a 72 °C. La detección de la señal se llevó a cabo a 60 °C en cada ciclo. La temperatura de detección se determinó en función de que el ácido nucleico bicatenario extendido mantuviera la forma bicatenaria y la temperatura fuera superior al valor de T_m del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO.

Tal y como muestra la Figura 19A, la señal diana (Ct 29,79) se detectó en presencia del molde. No se detectó ninguna señal sin la presencia del molde.

10 3-3-2. Ensayo PTOCE con análisis de la fusión

En el ejemplo 3-3-1, después de la reacción se obtuvo la curva de fusión mediante el enfriamiento de la mezcla de reacción a 35 °C, mantenimiento a 35 °C durante 30 s y calentamiento lento de 35 °C a 90 °C. La fluorescencia se midió continuamente durante el alza de la temperatura para controlar la disociación de las moléculas bicatenarias de ADN. El pico de fusión se dedujo de los datos de la curva de fusión.

15 Tal y como muestra la Figura 19B, en presencia del molde se detectó un pico a 76,5 °C correspondiente al valor de T_m esperado del ácido nucleico bicatenario extendido. Como el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO ofrece una señal no diana en este método de marcaje, el pico correspondiente al valor de T_m del híbrido de PTO sin escindir con CTO se detectó a 48,0 °C sin presencia del molde.

20 Estos resultados indican que el ensayo PTOCE con detección en tiempo real o análisis de la fusión puede detectar una secuencia de ácidos nucleicos diana.

Ejemplo 4: Detección de múltiples secuencias de ácidos nucleicos diana con el ensayo PTOCE que comprende el análisis de la fusión

También se examinó si el ensayo PTOCE con análisis de la fusión podía detectar múltiples secuencias de ácidos nucleicos diana con el mismo tipo de molécula indicadora.

25 A la escisión de los PTO y la extensión de los fragmentos del PTO le acompañó la amplificación de las secuencias de ácidos nucleicos diana con el proceso de PCR y la presencia de ácidos nucleicos bicatenarios extendidos se detectó mediante análisis de la fusión tras la PCR (ensayo PTOCE con análisis de la fusión).

30 Los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos formados durante el ensayo fueron diseñados para tener un marcador interactivo doble. El marcador interactivo doble del ácido nucleico bicatenario extendido se proporcionó en forma de CTO marcado con una molécula indicadora y una molécula amortiguadora en su segmento molde. Los CTO tenían el mismo tipo de molécula indicadora fluorescente (FAM), pero tenían secuencias distintas para generar los diferentes valores de T_m de los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos. El PTO y el CTO están bloqueados con un espaciador de carbonos en sus extremos 3´.

35 Los ADN genómicos de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) y de *Staphylococcus aureus* (SA) se usaron como ácidos nucleicos diana.

Las secuencias del cebador situado corriente arriba, del cebador situado corriente abajo, de los PTO y de los CTO usadas en este ejemplo son:

40 NG-F 5´-TACGCCTGCTACTTTACGCT-3´ (SEQ ID n.º 10)
 NG-R 5´-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3´ (SEQ ID n.º 2)
 NG-PTO-3 5´-ACGACGGCTTGCCCCCTCATTGGCGTGTTCG[espaciador C3] -3´ (SEQ ID n.º 7)
 NG-CTO-1 5´-[BHQ-1]CCTCCTCCTCCTCCTCC[T(FAM)]CCAGTAAAGCCAAGCCGTGCGT[espaciador C3] -3´ (SEQ ID N.º. 4)
 SA-F 5´-TGTTAGAATTTGAACAAGGATTTAATC-3´ (SEQ ID n.º 13)
 SA-R 5´-GATAAGTTTAAAGCTTGACCGTCTG-3´ (SEQ ID n.º 14)
 45 SA-PTO-1 5´-AATCCGACCACGCATTCCGTGGTCAATCATTCGGTTTACG[espaciador C3] -3´ (SEQ ID n.º 15)
 SA-CTO-1 5´-[BHQ-1]TTTTTTTTTTTTTTTTTGCA[T(FAM)]AGCGTGGTCCGGATT[espaciador C3] -3´ (SEQ ID n.º 16)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5´ del PTO)

50 La reacción se llevó a cabo con un volumen final de 20 µl que contenía 100 pg de ADN genómico de NG, 100 pg de ADN genómico de SA, 10 pmol de cada cebador situado corriente abajo (SEQ ID n.º 10 y 13), 10 pmol de cada cebador situado corriente arriba (SEQ ID n.º 2 y 4), 5 pmol de cada PTO (SEQ ID n.º 7 y 15), 2 pmol de cada CTO (SEQ ID n.º 4 y 6) y 10 µl de Mezcla maestra 2X que contenía MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 200 µM y 1,6 unidades de ADN-polimerasa H-*Taq* (Solgent, Corea); el tubo con la mezcla de reacción se introdujo en un termociclador de tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 °C y se sometió a 60 ciclos de 30

s a 95 °C, 60 s a 60 °C y 30 s a 72 °C. Después de la reacción, se obtuvo la curva de fusión mediante el enfriamiento de la mezcla de reacción a 35 °C, mantenimiento a 35 °C durante 30 s y calentamiento lento de 35 °C a 90 °C. La fluorescencia se midió continuamente durante el alza de la temperatura para controlar la disociación de las moléculas bicatenarias de ADN. El pico de fusión se dedujo de los datos de la curva de fusión.

- 5 Tal y como se muestra en la Figura 20, se detectaron múltiples señales diana (T_m de NG: 75,5 °C y T_m de SA: 63,5 °C) en presencia de los moldes. No se detectó ninguna señal sin la presencia de los moldes.

Estos resultados indican que el ensayo PTOCE que comprende el análisis de la fusión permite detectar múltiples ácidos nucleicos diana usando el mismo tipo de molécula indicadora (p. ej., FAM) siempre que los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos correspondientes a los ácidos nucleicos diana tengan valores de T_m distintos.

10 **Ejemplo 5: Evaluación del ensayo PTOCE con análisis de la fusión en una micromatriz**

Se examinó con más profundidad el ensayo PTOCE con análisis de la fusión en una micromatriz. La escisión del PTO se llevó a cabo en un recipiente distinto y una parte alícuota del resultado se incorporó a una micromatriz que contenía CTO inmovilizado. Tras la reacción de extensión se detectó la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido mediante el análisis de la fusión.

- 15 La ADN-polimerasa Taq dotada de actividad 5'-nucleasa se usó para la extensión del cebador situado corriente arriba, la escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO. El ácido nucleico bicatenario extendido formado durante el ensayo se diseñó para que tuviera un marcador sencillo. El marcador sencillo del ácido nucleico bicatenario extendido consistió en el marcaje del PTO en su extremo 5' con Quasar570 como molécula indicadora fluorescente. El PTO y el CTO están bloqueados con un espaciador de carbonos en sus extremos 3'. El CTO tiene poli(T)₅ como brazo de enlace y se inmovilizó sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio a través de un grupo amino (AminoC7) en su extremo 5'. Una sonda marcadora dotada con una molécula indicadora fluorescente (Quasar570) en su extremo 5' se inmovilizó sobre la superficie del portaobjetos de vidrio a través de un grupo amino de su extremo 3'.

- 25 Las secuencias del molde sintético, del cebador situado corriente arriba, del PTO, del CTO y del marcador usadas en este ejemplo son:

NG-T 5'-

AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTTGTTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATA
CCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID n.º 1)

- 30 NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID n.º 2)
NG-PTO-5 5'-[Quasar570]ACGACGGCTTGGCTTTACTGCCCCTCATTGGCGTGTTCG[espaciador C3]-3'
(SEQ ID n.º 17)
NG-CTO-S1 5'-[AminoC7]TTTTTCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador
C3]-3' (SEQ ID n.º 18)

Marcador 5'-[Quasar570]ATATATATAT[AminoC7]-3' (SEQ ID n.º 19)

- 35 (Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5' del PTO)

Se usaron portaobjetos NSB9 NHS (NSBPOSTECH, Corea) para la fabricación del CTO y del marcador (SEQ ID n.º 18 y 19). El CTO y el marcador disueltos en tampón de aplicación NSB con una concentración final de 10 µM se imprimieron en los portaobjetos NSB9 NHS con PersonalArrayer™16 Microarray Spotter (CapitalBio, China). El CTO y el marcador se aplicaron uno junto al otro en un formato 2x1 (puntos «sonda» duplicados), y la micromatriz resultante se incubó hasta el día siguiente en una cámara mantenida a ~85% de humedad. A continuación, los portaobjetos se lavaron con una solución tampón que contenía 2 x SSPE (cloruro sódico 0,3 M, hidrogenofosfato de sodio 0,02 M y EDTA 2,0 mM), pH 7,4 y SDS 7,0 mM a 37 °C durante 30 min para eliminar el CTO y el marcador que no se hubieran unido específicamente y se enjuagó con agua destilada. Los portaobjetos con el ADN preparado se secaron en una centrifuga al efecto y se conservaron a oscuras y a 4 °C hasta su uso.

- 45 La reacción de escisión se llevó a cabo con un volumen final de 50 µl que contenía 2 pmol de molde sintético (SEQ ID n.º 1) del gen de NG, 10 pmol de cebador situado corriente arriba (SEQ ID n.º 2), 1 pmol de PTO (SEQ ID n.º 17), y 25 µl de Mezcla maestra 2X que contenía MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 200 µM y 4 unidades de ADN-polimerasa H-Taq (Solgent, Corea); el tubo con la mezcla de reacción se introdujo en un termociclador de tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 °C y se sometió a 30 ciclos de 30 s a 95 °C y 60 s a 63 °C.

Los 30 µl de la mezcla resultante se depositaron en una cámara montada sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio NSB al que se había fijado el CTO (SEQ ID n.º 18). El portaobjetos se colocó en el termobloque del termociclador (GeneProB41, China). Se prepararon seis portaobjetos iguales para el análisis de la fusión. La reacción de extensión duró 20 min a 55 °C. A continuación, los portaobjetos se incubaron 1 min a temperatura ambiente. Por

último, cada portaobjetos se lavó con agua destilada durante 1 min a 44 °C, 52 °C, 60 °C, 68 °C, 76 °C o 84 °C. La adquisición de imágenes se efectuó con un escáner láser confocal Axon GenePix4100A (Molecular Device, EE. UU.) con exploración a una resolución de píxel de 5 µm. La intensidad de la fluorescencia se analizó con el software para análisis cuantitativo de micromatrices GenePix pro6.0 (Molecular Device, EE. UU.). La intensidad de la fluorescencia se expresó en forma de mediana de cada punto sonda tras la preceptiva resta del fondo local. Cada punto sonda estaba duplicado para la prueba de reproducibilidad. La intensidad de la fluorescencia indica el valor promedio de los puntos sonda duplicados.

Tal y como aparece en las Figuras 21A y 21B, se obtuvo la curva de fusión midiendo la intensidad de la fluorescencia de los puntos sonda preparados con distintas temperaturas de lavado. La presencia del ácido nucleico bicatenario extendido se determinó a partir de los datos de la curva de fusión.

Ejemplo 6: Evaluación del ensayo PTOCE con detección en tiempo real en una micromatriz

Examinamos con mayor detalle el ensayo PTOCE con detección en tiempo real a una temperatura prefijada en una micromatriz.

La escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO se repitieron en una micromatriz que contenía el CTO inmovilizado. La presencia del ácido nucleico bicatenario extendido se detectó a una temperatura prefijada en varios ciclos concretos.

Se usó la ADN-polimerasa Taq dotada de actividad 5'-nucleasa para la extensión del cebador situado corriente arriba, la escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO.

El ácido nucleico bicatenario extendido formado durante el ensayo se diseñó para tener un marcador sencillo o un marcador interactivo doble. El marcador sencillo del ácido nucleico bicatenario extendido se proporcionó en forma de PTO con una molécula indicadora (PTO marcado con indicador). El marcador interactivo doble del ácido nucleico bicatenario extendido se proporcionó marcando el CTO con una molécula indicadora y una molécula amortiguadora (CTO con marcaje doble). El PTO y el CTO están bloqueados con un espaciador de carbonos en sus extremos 3'.

El CTO tiene un poli(T) como brazo de enlace. El CTO se inmovilizó sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio a través de un grupo amino (AminoC7) en su extremo 5' o en su extremo 3'. Una sonda marcadora dotada de una molécula indicadora fluorescente (Quasar570) en su extremo 5' se inmovilizó sobre la superficie del portaobjetos de vidrio a través de un grupo amino en su extremo 3'. La intensidad de la fluorescencia sobre el portaobjetos de vidrio se midió a una temperatura prefijada. La temperatura de detección se determinó en función de que el ácido nucleico bicatenario extendido mantuviera la forma bicatenaria. El oligonucleótido sintético para *Neisseria gonorrhoeae* (NG) se usó como molde.

6-1. Ensayo PTOCE con un PTO marcado con molécula indicadora

El PTO incorpora como molécula indicadora fluorescente Quasar570 en su extremo 5'. El CTO se inmovilizó por su extremo 5'. En este método de marcaje, la temperatura de detección se determinó en función de que el ácido nucleico bicatenario extendido mantuviera la forma bicatenaria y la temperatura fuera superior al valor de T_m del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO.

Las secuencias del molde sintético, del cebador situado corriente arriba, del PTO, del CTO y del marcador usadas en este ejemplo son:

NG-T 5'-

AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTTGTTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATA
CCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID n.º 1)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID n.º 2)

NG-PTO-5 5'-[Quasar570]ACGACGGCTTGGCTTTACTGCCCTCATTGGCGTGTTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID n.º 17)

NG-CTO-S1 5'-[AminoC7]TTTTTCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3]-3' (SEQ ID n.º 18)

Marcador 5'-[Quasar570]ATATATATAT[AminoC7]-3' (SEQ ID n.º 19)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5' del PTO)

La preparación del portaobjetos se hizo siguiendo el mismo protocolo del Ejemplo 5.

La reacción del PTOCE se llevó a cabo con un volumen final de 30 µl que contenía 2 pmol de molde sintético (SEQ ID n.º 1) del gen de NG, 10 pmol de cebador situado corriente arriba (SEQ ID n.º 2), 1 pmol de PTO (SEQ ID n.º 17), y 15 µl de Mezcla maestra 2X que contenía MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 200 µM y 2,4 unidades de ADN-polimerasa H-Taq (Solgent, Corea); la mezcla entera se depositó en una cámara montada sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio NSB al que se había fijado el CTO (SEQ ID n.º 18). El portaobjetos se colocó en el termobloque del

termociclador (GenePro B4I, China). Se prepararon cinco portaobjetos iguales para el análisis del ciclado. La reacción de PTOCE se llevó a cabo del modo siguiente: 15 min de desnaturalización a 95 °C y 0, 5, 10, 20 o 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 60 s a 60 °C y 60 s a 55 °C. Después de la reacción con el correspondiente número de ciclos, los portaobjetos se lavaron con agua destilada a 64 °C durante 1 min. La adquisición de imágenes se efectuó después de cada lavado con un escáner láser confocal Axon GenePix4100A (Molecular Device, EE. UU.) con exploración a una resolución de píxel de 5 µm. La intensidad de la fluorescencia se analizó con el software para análisis cuantitativo de micromatrices GenePix pro6.0 (Molecular Device, EE. UU.). La intensidad de la fluorescencia se expresó en forma de mediana de cada punto sonda tras la preceptiva resta del fondo local. Cada punto sonda estaba duplicado para la prueba de reproducibilidad. La intensidad de la fluorescencia indica el valor promedio de los puntos sonda duplicados.

Tal y como muestran las Figuras 22A y 22B, la intensidad de la fluorescencia emitida por la secuencia de ácidos nucleicos diana aumentó con el número de ciclos (Unidades de fluorescencia relativa (RFU) en el ciclo 0: 1304 ± 0,7; RFU a los 5 ciclos: 18 939 ± 1342,1; RFU a los 10 ciclos: 30 619 ± 285,0; RFU a los 20 ciclos: 56 248 ± 2208,3; y RFU a los 30 ciclos: 64 645 ± 1110,2) en presencia del molde. La intensidad de la fluorescencia no cambió en ningún ciclo cuando el molde no estaba presente.

6-2. Ensayo PTOCE con un CTO con marcaje doble

El CTO estaba inmovilizado por su extremo 3' e incorporaba una molécula amortiguadora (BHQ-2) y una molécula indicadora fluorescente (Quasar570) en su segmento molde.

Las secuencias del molde sintético, del cebador situado corriente arriba, del PTO, del CTO y del marcador usadas en este ejemplo son:

NG-T 5'-

AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTTGTTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATA
CCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID n.º 1)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID n.º 2)

NG-PTO-6 5'-ACGACGGCTTGGCTTTACTGCCCCCTCATTGGCGTGTTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID n.º 20)

NG-CTO-S2 5'-[BHQ-2]CCTCCTCCTCCTCCTCCTCC[T(Quasar570)]CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGTTTTTTTT
TTTT[AminoC7]-3' (SEQ ID n.º 21)

Marcador 5'-[Quasar570]ATATATATAT[AminoC7]-3' (SEQ ID n.º 19)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5' del PTO)

La preparación del portaobjetos se hizo siguiendo el mismo protocolo del Ejemplo 5.

La reacción del PTOCE se llevó a cabo con un volumen final de 30 µl que contenía 2 pmol de molde sintético (SEQ ID n.º 1) del gen de NG, 10 pmol de cebador situado corriente arriba (SEQ ID n.º 2), 1 pmol de PTO (SEQ ID n.º 20), y 15 µl de Mezcla maestra 2X que contenía MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 200 µM y 2,4 unidades de ADN-polimerasa H-*Taq* (Solgent, Corea); la mezcla entera se depositó en una cámara montada sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio NSB al que se había fijado el CTO (SEQ ID n.º 21). El portaobjetos se colocó en el termobloque del termociclador (GenePro B4I, China). Se prepararon cinco portaobjetos iguales para el análisis del ciclado. La reacción de PTOCE se llevó a cabo del modo siguiente: 15 min de desnaturalización a 95 °C y 0, 5, 10, 20 o 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 60 s a 60 °C y 60 s a 50 °C. Después de la reacción con el correspondiente número de ciclos, la adquisición de imágenes se efectuó con un escáner confocal láser Axon GenePix4100A (Molecular Device, EE. UU.) con exploración a una resolución de píxel de 5 µm. La intensidad de la fluorescencia se analizó con el software para análisis cuantitativo de micromatrices GenePix pro6.0 (Molecular Device, EE. UU.). La intensidad de la fluorescencia se expresó en forma de mediana de cada punto sonda tras la preceptiva resta del fondo local. Cada punto sonda estaba duplicado para la prueba de reproducibilidad. La intensidad de la fluorescencia indica el valor promedio de los puntos sonda duplicados.

Tal y como muestran las Figuras 23A y 23B, la intensidad de la fluorescencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana aumentó con el número de ciclos (RFU en el ciclo 0: 28 078 ± 460,3; RFU a los 5 ciclos: 35 967 ± 555,1; RFU a los 10 ciclos: 44 674 ± 186,0; RFU a los 20 ciclos: 65 423 ± 2,1; y RFU a los 30 ciclos: 65 426 ± 2,8) en presencia del molde. La intensidad de la fluorescencia no cambió en ningún ciclo cuando el molde no estaba presente.

50 Ejemplo 7: Detección de múltiples secuencias de ácidos nucleicos diana mediante el ensayo PTOCE con detección de punto final a una temperatura prefijada en una micromatriz

Se examinó con mayor detalle la detección de múltiples dianas mediante el ensayo PTOCE con detección de punto final a una temperatura prefijada en una micromatriz.

La escisión del PTO se llevó a cabo en un recipiente distinto al del proceso de PCR y una parte alícuota del resultado se incorporó a la micromatriz que contenía el CTO inmovilizado. Tras la reacción de extensión, la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido se detectó por detección de punto final a una temperatura prefijada.

- 5 La ADN-polimerasa Taq dotada de actividad 5'-nucleasa se usó para la extensión del cebador situado corriente arriba y del cebador situado corriente abajo, la escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO.

El ácido nucleico bicatenario extendido formado durante el ensayo se diseñó para tener un marcador sencillo. El marcador sencillo del ácido nucleico bicatenario extendido consistió en el marcaje del PTO por su extremo 5' con Quasar570 como molécula indicadora fluorescente. El PTO y el CTO están bloqueados con un espaciador de carbonos en sus extremos 3'.

10 El CTO tiene poli(T)₅ como brazo de enlace y se inmovilizó sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio a través de un grupo amino (AminoC7) en su extremo 5'. Una sonda marcadora dotada de una molécula indicadora fluorescente (Quasar570) en su extremo 5' se inmovilizó sobre la superficie del portaobjetos de vidrio a través de un grupo amino en su extremo 3'.

- 15 La intensidad de la fluorescencia en el portaobjetos de vidrio se midió a una temperatura prefijada. La temperatura de detección se determinó en función de que el ácido nucleico bicatenario extendido mantuviera la forma bicatenaria y la temperatura fuera superior al valor de T_m del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO. Se usaron los ADN genómicos de *Staphylococcus aureus* (SA) y de *Neisseria gonorrhoeae* (NG).

20 Las secuencias del cebador situado corriente arriba, del cebador situado corriente abajo, del PTO, del CTO y del marcador usadas en este ejemplo son:

NG-F 5'- TACGCCTGCTACTTTTCACGCT-3' (SEQ ID n.º 10)
 NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID n.º 2)
 NG-PTO-5 5'-[Quasar570]ACGACGGCTTGGCTTTACTGCCCTCATTGGCGTGTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID n.º 17)

25 NG-CTO-S1 5'-[AminoC7]TTTTTCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3]-3' (SEQ ID n.º 18)

SA-F5'-TGTTAGAATTTGAACAAGGATTTAATC-3' (SEQ ID n.º 13)
 SA-R2 5'-TTAGCTCCTGCTCCTAAACCA-3' (SEQ ID n.º 22)

30 SA-PTO-2 5'-[Quasar570]AATCCGACCACGCTATGCTCATTCCGTGGTCAATCATTGGTTTACG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 23)

SA_CTO-S1 5'-[AminoC7]TTTTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCCCCAGCATCGCGTGGTCCGATT [espaciadorC3]-3' (SEQ ID NO: 24)

35 Marcador 5'-[Quasar570]ATATATATAT[AminoC7]-3' (SEQ ID n.º 19)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5' del PTO)

La preparación del portaobjetos se hizo siguiendo el mismo protocolo del Ejemplo 5.

La reacción de escisión se llevó a cabo con un volumen final de 50 µl que contenía 100 pg de ADN genómico de SA y/o otros tantos de ADN genómico de NG, 10 pmol de cebador situado corriente abajo (SEQ ID n.º 10 y/o 13), 10 pmol de cebador situado corriente arriba (SEQ ID n.º 2 y/o 22), 1 pmol de PTO (SEQ ID n.º 17 y/o 23), y 25 µl de Mezcla maestra 2X que contenía MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 200 µM y 4 unidades de ADN-polimerasa H-Taq (Solgent, Corea); el tubo con la mezcla de reacción se introdujo en un termociclador de tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 °C y se sometió a 60 ciclos de 30 s a 95 °C y 60 s a 63 °C. Los 30 µl de la mezcla resultante se depositaron en una cámara montada sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio NSB en el que se habían fijado los CTO (SEQ ID n.º 18 y 24). El portaobjetos se colocó en el termobloque del termociclador (GenePro B4I, China). La reacción de extensión duró 20 min a 55 °C. A continuación, los portaobjetos se lavaron con agua destilada a 64 °C durante 1 min. La adquisición de imágenes se efectuó después de cada lavado con un escáner confocal láser Axon GenePix4100A (Molecular Device, EE. UU.) con exploración a una resolución de píxel de 10 µm. La intensidad de la fluorescencia se analizó con el software para análisis cuantitativo de micromatrices GenePix pro6.0 (Molecular Device, EE. UU.). La intensidad de la fluorescencia se expresó en forma de mediana de cada punto sonda tras la preceptiva resta del fondo local. Cada punto sonda estaba duplicado para la prueba de reproducibilidad. La intensidad de la fluorescencia indica el valor promedio de los puntos sonda duplicados.

Tal y como muestra la Figura 24, la señal diana de SA (RFU: 65 192 ± 198,7) se detectó en presencia del molde de SA. La señal diana de NG (RFU: 65 332 ± 1,4) se detectó en presencia del molde de NG. Tanto la señal diana de SA (RFU: 65 302 ± 0,7) como la de NG (RFU: 65 302 ± 0,7) se detectaron en presencia de ambos moldes.

5 Habiendo descrito una forma preferida de realización de la presente invención, se ha de entender que, para las personas versadas en la materia, pueden resultar claras o evidentes variantes y modificaciones de la misma que recaen en el espíritu de la invención, y que el ámbito de la presente invención quedará delimitado por las reivindicaciones anexas y sus equivalentes.

<110> Seegene, Inc.

10 <120> DETECCIÓN DE UNA SECUENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS DIANA MEDIANTE UN ENSAYO DE ESCISIÓN Y EXTENSIÓN DE PTO

<130> S12355EP-A

15 <150> 10-2011-0002840
<151> 2011-01-11

<150> 10-2011-0023465
<151> 2011-03-16

20 <150> PCT/KR2011/004452
<151> 2011-06-17

<160> 24

25 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1
<211> 86
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

30 <210> 1
<211> 86
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> NG-T

35 <400> 1

aaatatgcga aacacgcaa tgaggggcat gatgctttct ttttgttctt gctcggcaga 60

gcgagtgata ccgatccatt gaaaaa 86

40 <210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> NG-R

<400> 2
caatggatcg gtatcactcg c 21

50 <210> 3
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> NG-PTO-1

60 <400> 3
acgacggctt ggctgcccct cattggcgtg ttctg 35

ES 2 628 327 T3

<210> 4
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> NG-CTO-1
 <400> 4
 10 cctcctctc ctctctcc tccagtaaag ccaagcgcgtc gt 42
 <210> 5
 <211> 40
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> NG-PTO-2
 20 <400> 5
 acgacggctt ggcttactg ccctcattg gcgtgttcg 40
 <210> 6
 <211> 42
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> NG-CTO-2
 30 <400> 6
 cctcctctc ctctctcc tccagtaaag ccaagcgcgtc gt 42
 <210> 7
 <211> 32
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> NG-PTO-3
 40 <400> 7
 acgacggctt gcccctcat tggcgtgttt cg 32
 45 <210> 8
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> NG-CTO-3
 <400> 8
 55 tttttttt cctcctccag taaagccaag ccgctgt 37
 <210> 9
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> NG-CTO-4
 <400> 9
 65 tttttttt ttttttag taaagccaag ccgctgt 37

ES 2 628 327 T3

5	<210> 10 <211> 21 <212> DNA <213> Secuencia artificial <220> <223> NG-F	
10	<400> 10 tacgcctgct acttcacgc t	21
15	<210> 11 <211> 27 <212> DNA <213> Secuencia artificial <220> <223> NG-CTO-5	
20	<400> 11 cctcctccag taaagccaag ccgctgt	27
25	<210> 12 <211> 31 <212> DNA <213> Secuencia artificial <220> <223> NG-PTO-4	
30	<400> 12 acgacggctt gccctcatt ggcgtgttc g	31
35	<210> 13 <211> 27 <212> DNA <213> Secuencia artificial <220> <223> SA-F	
40	<400> 13 tgttagaatt tgaacaagga ttaatc	27
45	<210> 14 <211> 25 <212> DNA <213> Secuencia artificial <220> <223> SA-R	
50	<400> 14 gataagttta aagcttgacc gtctg	25
55	<210> 15 <211> 40 <212> DNA <213> Secuencia artificial <220> <223> SA-PTO-1	
60	<400> 15 aatccgacca cgcattccgt ggtcaatcat tcggttacg	40

ES 2 628 327 T3

<210> 16
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> SA-CTO-1
 <400> 16
 10 tttttttt ttttttgca tagcgtgggc ggatt 35
 <210> 17
 <211> 40
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> NG-PTO-5
 20 <400> 17
 acgacggctt ggcttactg ccctcattg gcgtgttcg 40
 <210> 18
 <211> 47
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> NG-CTO-S1
 30 <400> 18
 ttttctcc tcctctct cctctccag taaagccaag ccgctgt 47
 <210> 19
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Marcador
 40 <400> 19
 Atatatatat 10
 45 <210> 20
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> NG-PTO-6
 <400> 20
 55 acgacggctt ggcttactg ccctcattg gcgtgttcg 40
 <210> 21
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> NG-CTO-S2
 <400> 21
 65 cctctctc ctctctcc tcagtaaag ccaagccgctc gttttttt tt 52

ES 2 628 327 T3

5 <210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> SA-R2
<400> 22
ttagctcctg ctctaaacc a 21

10 <210> 23
<211> 47
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> SA-PTO-2

20 <400> 23
aatccgacca cgctatgctc attccgtggt caatcattcg gtttacg 47

25 <210> 24
<211> 53
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> SA_CTO-S1

<400> 24
ttttctct tcttctct ctctcttc cccagcata gcgtggtcgg att 53

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO) en una fase líquida, el cual comprende:

- 5 (a) Hibridación de la secuencia de ácido nucleico diana con un oligonucleótido situado corriente arriba y un PTO (oligonucleótido de sondeo y marcaje); en que dicho oligonucleótido situado corriente arriba comprende una secuencia de nucleótidos complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana y se hibrida con ella; el PTO comprende: (I) un segmento localizador en 3' que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana con la cual se hibrida; y (II) un segmento de marcaje en 5' que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana; en el que el segmento localizador en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y el segmento de marcaje en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana; el oligonucleótido situado corriente arriba está ubicado antes del PTO;
- 10 (b) Puesta en contacto del resultado de la etapa (a) con una enzima dotada de actividad 5'-nucleasa en las condiciones para la escisión del PTO; en el que el oligonucleótido situado corriente arriba o su hebra extendida induce la escisión del PTO por una enzima dotada de actividad 5'-nucleasa de tal modo que la escisión libera un fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' o una parte del segmento de marcaje en 5' del PTO;
- 15 (c) Hibridación del fragmento desprendido del PTO con el CTO (oligonucleótido de captura y molde); en el que el CTO comprende en dirección 3' a 5': (I) un segmento de captura que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con el segmento de marcaje en 5' o una parte de este segmento de marcaje en 5' del PTO, y (II) un segmento molde que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con el segmento de marcaje en 5' ni con el segmento localizador en 3' del PTO; en el que el fragmento desprendido del PTO se hibrida con el segmento de captura del CTO;
- 20 (d) Realización de una reacción de extensión con el resultado de la etapa (c) y una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde; en la cual el fragmento hibridado con el segmento de captura del CTO se extiende y forma un ácido nucleico bicatenario extendido; en el que el valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido puede ajustarse con: (I) la secuencia y/o la longitud del fragmento, (II) la secuencia y/o la longitud del CTO, o (III) la secuencia y/o la longitud del fragmento y la secuencia y/o la longitud del CTO; en que el ácido nucleico bicatenario extendido proporciona una señal diana mediante (I) al menos un marcador unido al fragmento y/o al CTO, (II) un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, (III) al menos un marcador unido al fragmento y/o al CTO y un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, o (IV) un marcador intercalante;
- 25 (e) Detección del ácido nucleico bicatenario extendido mediante la medición de la señal diana en una fase líquida a una temperatura prefijada en la que el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene su forma bicatenaria; de modo que la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido indica la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana; en el que el ácido nucleico bicatenario extendido no permanece inmovilizado sobre un sustrato sólido.
- 30
- 35

2. El método acorde con la forma de realización 1, en el que la señal diana proporcionada por el ácido nucleico bicatenario extendido es dada durante la extensión de la etapa (d); en el que el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO no proporciona una señal que no sea la diana.

40 3. El método acorde con la reivindicación 1, en el que la señal diana proporcionada por el ácido nucleico bicatenario extendido es dada por la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) y la formación del ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana en la etapa (d); en el que el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO proporciona una señal que no es la diana; en el que la temperatura prefijada es suficiente para disociar el híbrido y suprimir así la señal que no es la diana.

45 4. El método acorde con la reivindicación 1, en el que la señal diana la proporciona como mínimo un marcador unido al fragmento y/o al CTO.

50 5. El método acorde con la reivindicación 4, en el que el fragmento incorpora un marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora (*reporter*) y una molécula amortiguadora (*quencher*); en el que la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble que proporciona la señal diana y el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana.

6. El método acorde con la reivindicación 4, en el que el CTO incorpora un marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora (*reporter*) y una molécula amortiguadora (*quencher*); en el que la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble que proporciona la señal diana y el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana.

55 7. El método acorde con la reivindicación 4, en el que el CTO tiene un marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora (*reporter*) y una molécula amortiguadora (*quencher*); en el que la extensión del fragmento en la etapa (d) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble que proporciona la señal diana.

- 5 8. El método acorde con la reivindicación 4, en que el fragmento tiene una parte del marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora (*reporter*) y una molécula amortiguadora (*quencher*) y el CTO tiene la otra parte del marcador interactivo doble; en el que la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble que proporciona la señal diana y el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana.
9. El método acorde con la reivindicación 4, en el que el fragmento o el CTO incorpora un marcador sencillo y la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) induce un cambio de la señal del marcador sencillo que proporciona la señal diana y el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana.
- 10 10. El método acorde con la reivindicación 4, en el que el CTO tiene un marcador sencillo y la extensión del fragmento en la etapa (d) induce un cambio de la señal emitida por el marcador sencillo que proporciona la señal diana.
11. El método acorde con la reivindicación 4, en el que los marcadores están ubicados de modo que cuando se forme un híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO, el híbrido no ofrece una señal no diana en la etapa (d).
- 15 12. El método acorde con la reivindicación 4, en el que los marcadores están ubicados de modo que cuando se forme un híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO, este híbrido emita una señal que no sea la diana en la etapa (d); en el que el valor T_m del ácido nucleico bicatenario extendido es superior al del híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO.
- 20 13. El método acorde con la forma de realización 1, en el que la señal diana la proporciona un marcador sencillo incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión; en el cual el marcador sencillo incorporado está unido a un nucleótido incorporado durante la reacción de extensión; y en el que la extensión del fragmento que se da en la etapa (d) provoca un cambio en una señal del marcador sencillo que da como resultado la señal diana en la etapa (d).
- 25 14. El método acorde con la reivindicación 13, en el que el nucleótido incorporado durante la reacción de extensión tiene una primera base no natural y el CTO tiene un nucleótido dotado de una segunda base no natural con una afinidad de unión específica hacia la primera base no natural.
- 30 15. El método acorde con la reivindicación 1, en el que la señal diana es proporcionada por un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión y por un marcador unido al fragmento y/o al CTO, en el que el marcador incorporado está unido a un nucleótido incorporado durante la reacción de extensión; en el que los dos marcadores forman un marcador interactivo doble con una molécula indicadora (*reporter*) y una molécula amortiguadora (*quencher*); en el que la extensión del fragmento en la etapa (d) induce el cambio de la señal emitida por el marcador interactivo doble que da lugar a la señal diana.
- 35 16. El método acorde con la reivindicación 15, en el que el nucleótido incorporado durante la reacción de extensión tiene una primera base no natural y el CTO tiene un nucleótido dotado de una segunda base no natural con una afinidad de unión específica hacia la primera base no natural.
- 40 17. El método acorde con la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido situado corriente arriba es un cebador situado corriente arriba o una sonda situada corriente arriba.
18. El método acorde con la reivindicación 1, en el que el método además comprende la repetición de las etapas (a)-(b), (a)-(d) o (a)-(e) con desnaturalización entre los ciclos repetidos.
- 40 19. El método acorde con la reivindicación 1, en el que las etapas (a)-(e) se llevan a cabo en un recipiente de reacción o en recipientes de reacción separados.
20. El método acorde con la reivindicación 1, en el que el método se realiza para detectar como mínimo dos tipos de secuencias de ácido nucleico diana; en el que el oligonucleótido situado corriente arriba comprende al menos dos tipos de oligonucleótidos, el PTO comprende al menos dos tipos de PTO, y el CTO comprende al menos un tipo de CTO.
- 45 21. El método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que el método se lleva a cabo en presencia de un cebador situado corriente abajo.
22. Uso de un kit o equipo para detectar una secuencia de ácido nucleico diana a partir de ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo PTCOE (escisión y extensión de PTO) en la ejecución del método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, equipo que comprende:
- 50 (a) Un oligonucleótido situado corriente arriba que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana con la cual se hibrida;
- (b) Un PTO (oligonucleótido de sondeo y marcaje) que comprende: (I) un segmento localizador en 3' que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana con la cual se hibrida; y (II) un segmento de marcaje en 5' que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con

la secuencia de ácido nucleico diana, en el que el segmento localizador en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y el segmento de marcaje en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana; el oligonucleótido situado corriente arriba está ubicado antes del PTO; en que el oligonucleótido situado corriente arriba o su hebra extendida induce la escisión del PTO por una enzima dotada de actividad 5'-nucleasa de tal modo que la escisión libera un fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' o una parte del segmento de marcaje en 5' del PTO; y

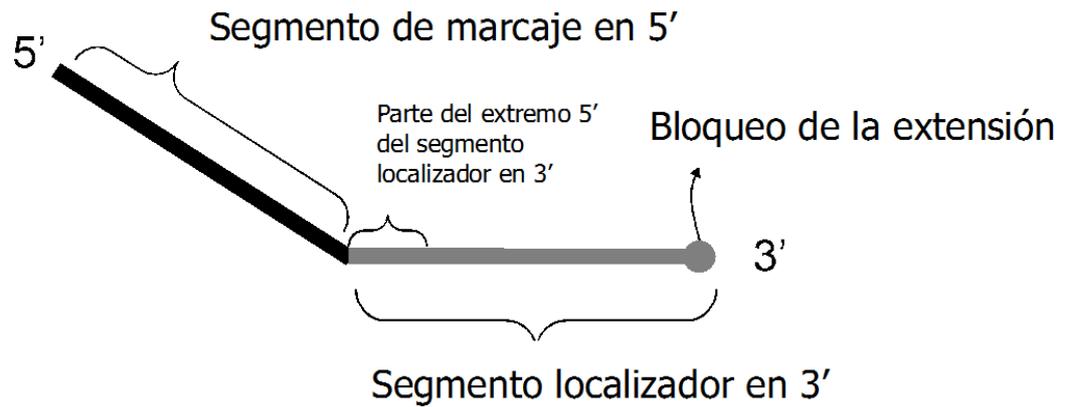
5

(c) Un CTO (oligonucleótido de captura y molde) comprende en dirección 3' a 5': (I) un segmento de captura que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con el segmento de marcaje en 5' o una parte de este segmento de marcaje en 5' del PTO; y (II) un segmento molde que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con el segmento de marcaje en 5' y el segmento localizador en 3' del PTO; en que el fragmento desprendido del PTO se hibrida con el segmento de captura del CTO; y el fragmento hibridado con el segmento de captura del CTO es extendido por una polimerasa de ácidos nucleicos dependiente de molde hasta formar un ácido nucleico bicatenario extendido.

10

Fig. 1

A. Oligonucleótido de sondeo y marcaje (PTO)



B. Oligonucleótido de captura y molde (CTO)

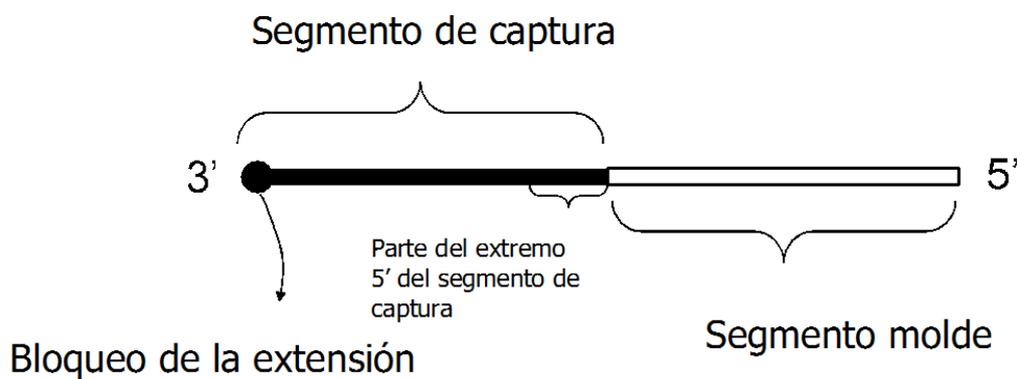
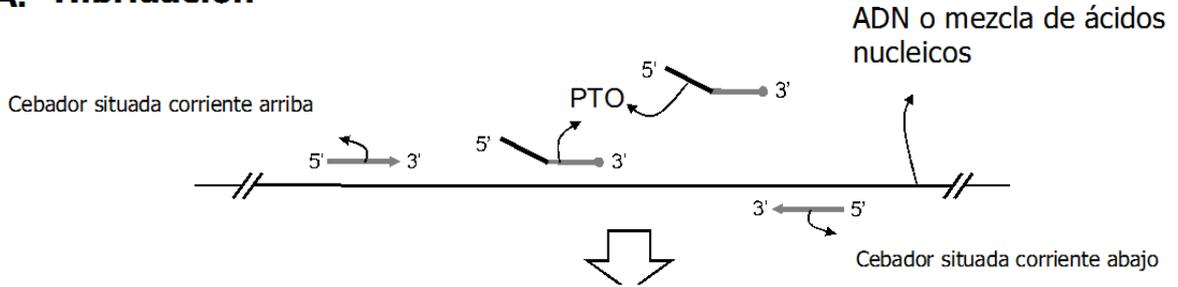
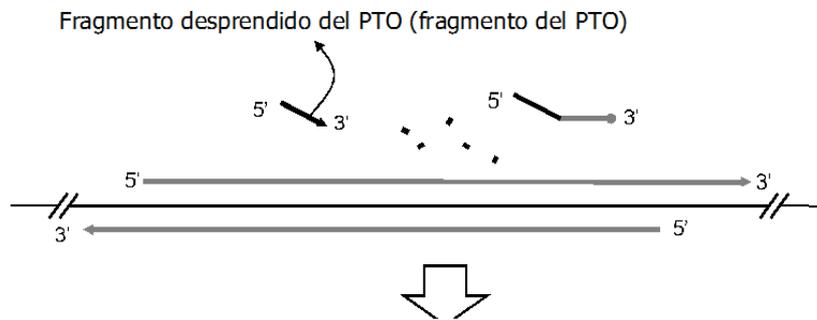


Fig. 2

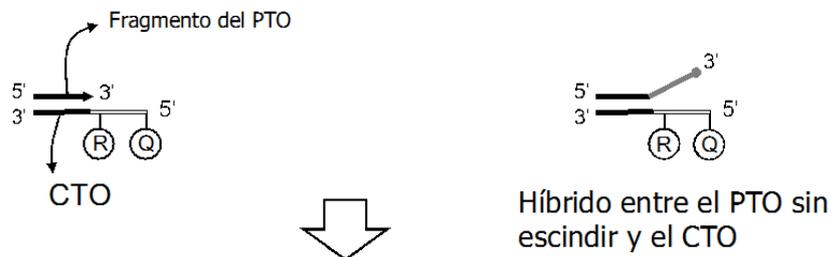
A. Hibridación



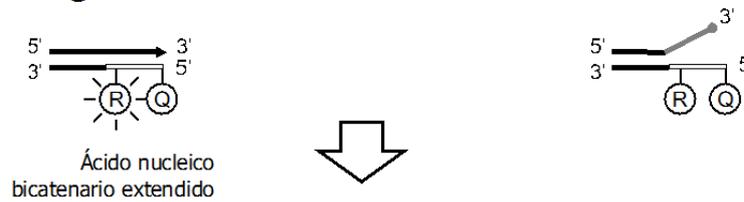
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO

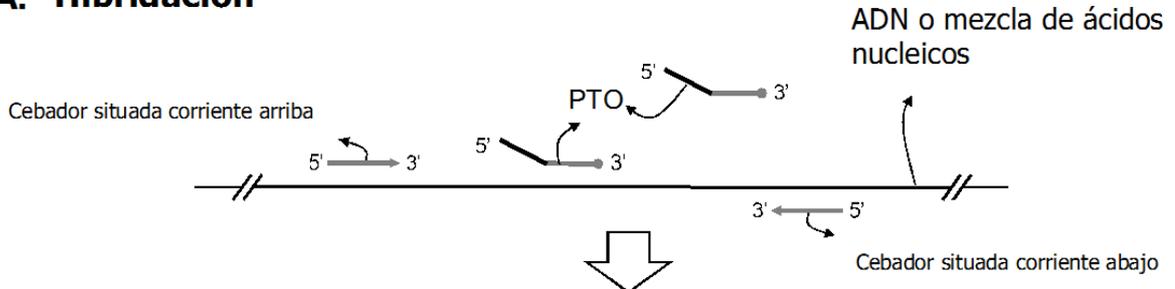


E. | Análisis de la fusión

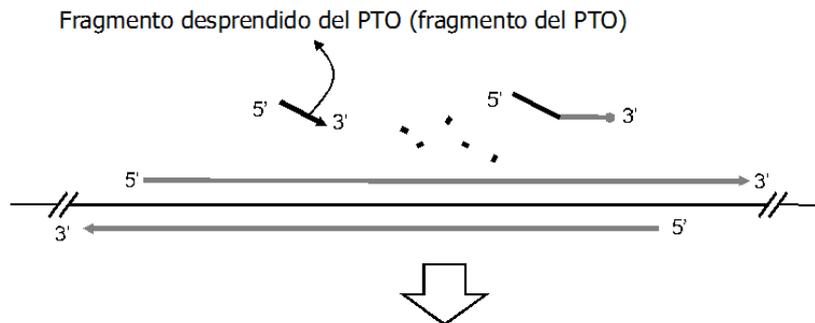


Fig. 3

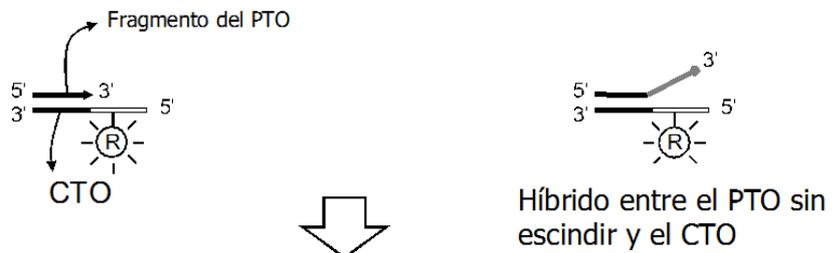
A. Hibridación



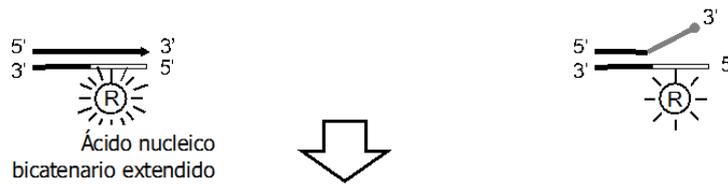
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO

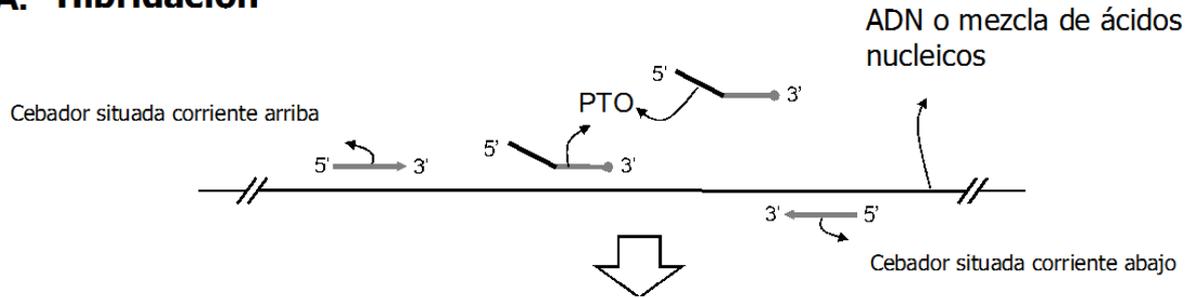


E. | Análisis de la fusión

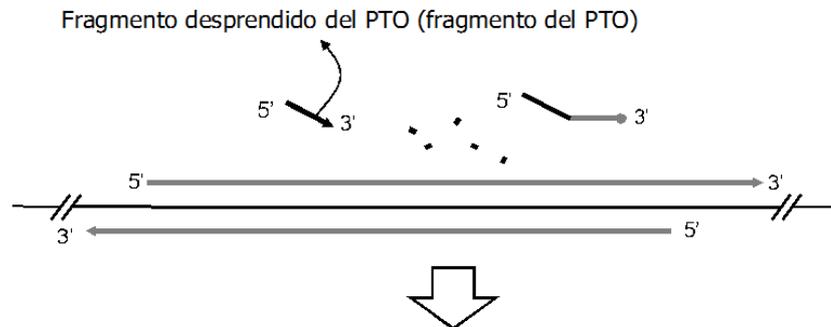


Fig. 4

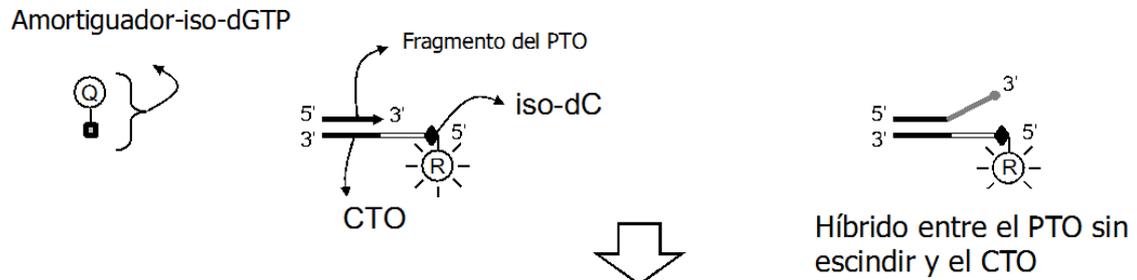
A. Hibridación



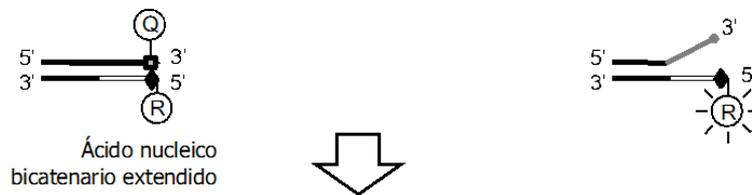
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO

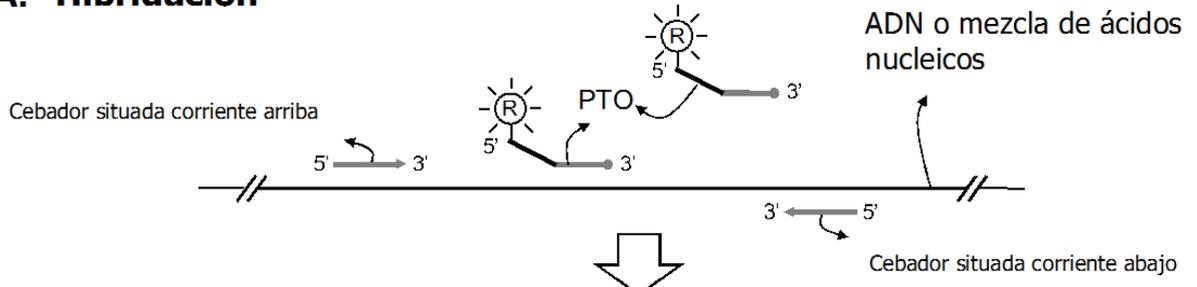


E. Análisis de la fusión

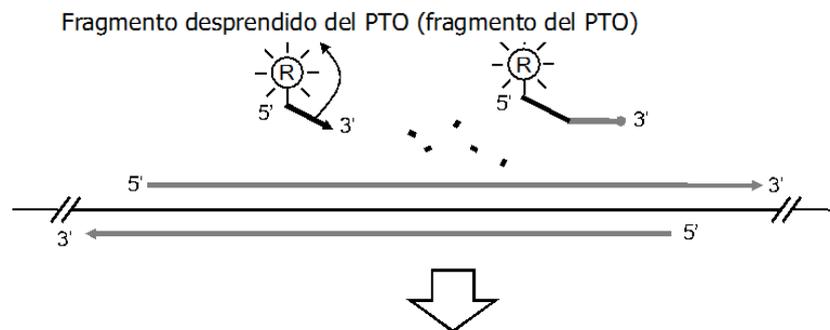


Fig. 5

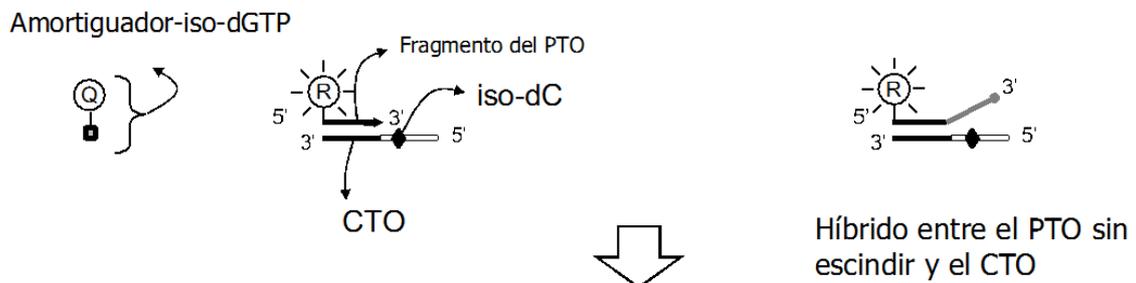
A. Hibridación



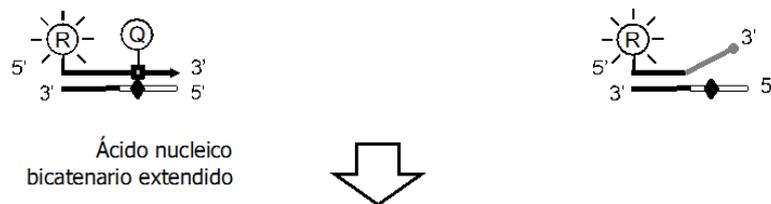
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO

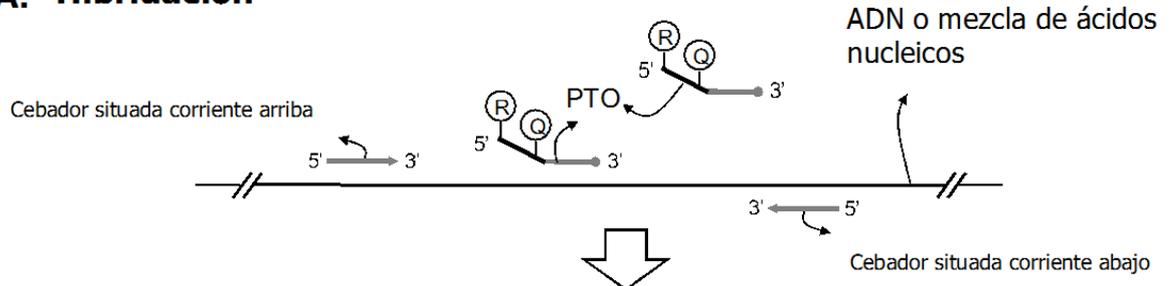


E. | Análisis de la fusión

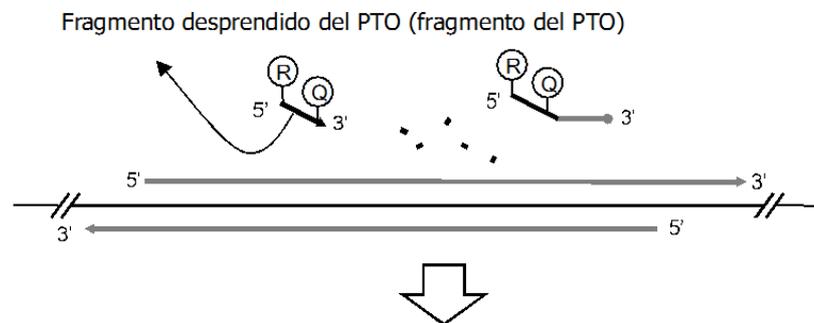


Fig. 6

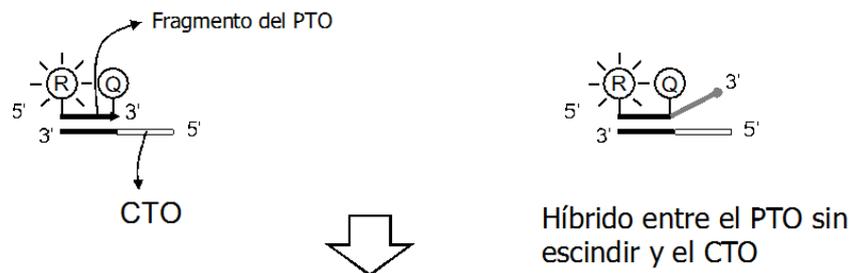
A. Hibridación



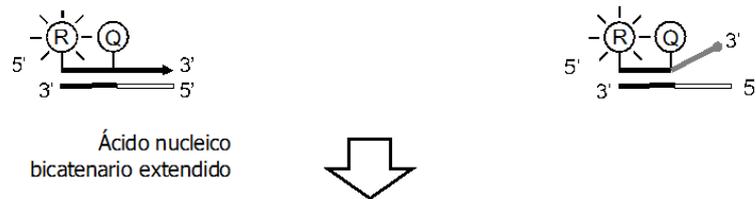
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO

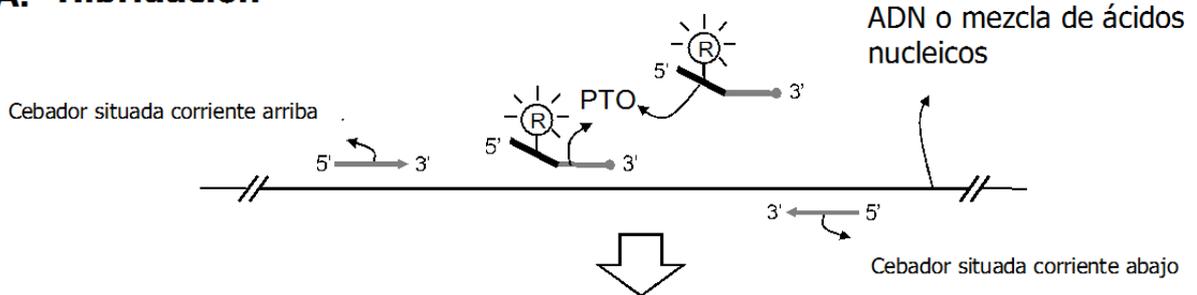


E. | Análisis de la fusión

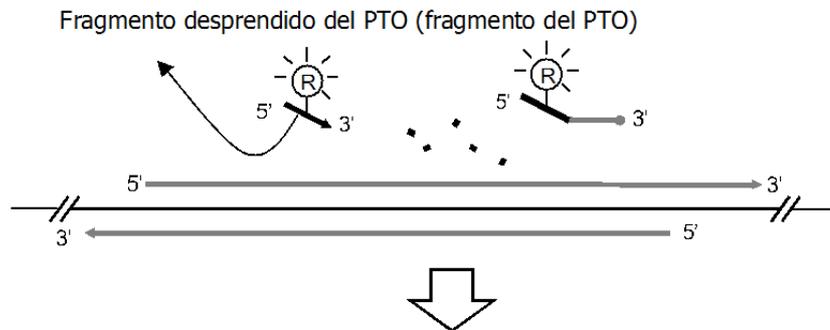


Fig. 7

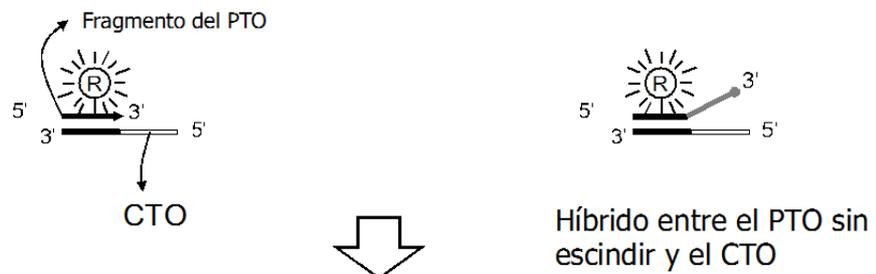
A. Hibridación



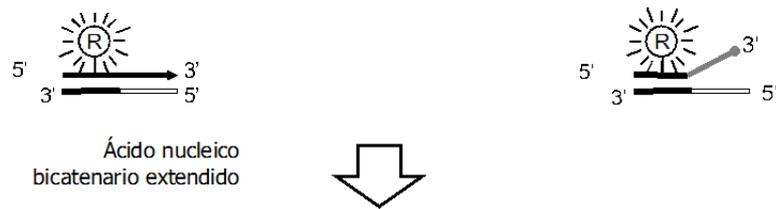
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO

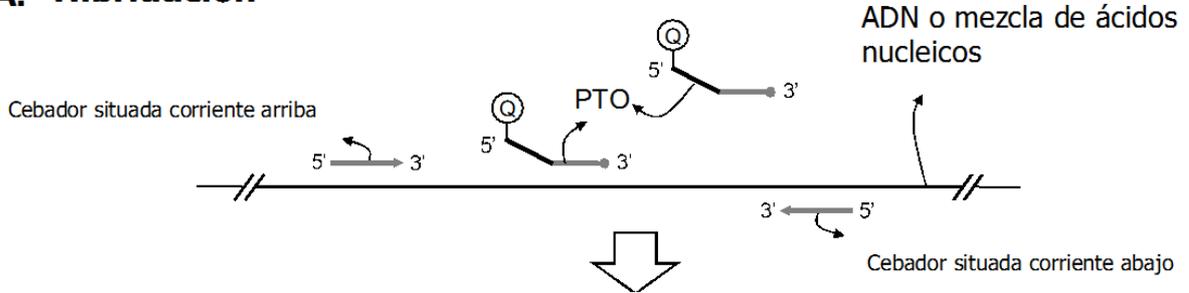


E. | Análisis de la fusión

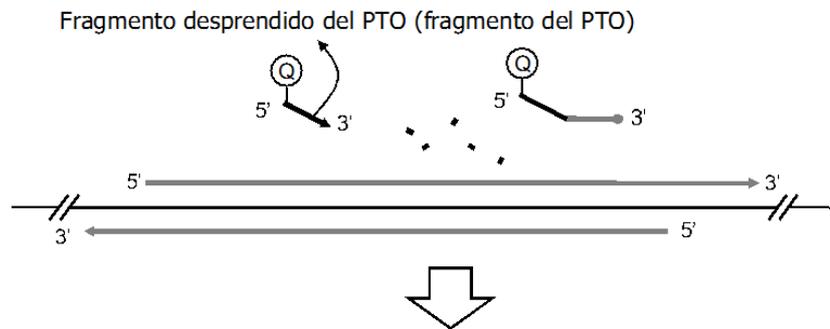


Fig. 8

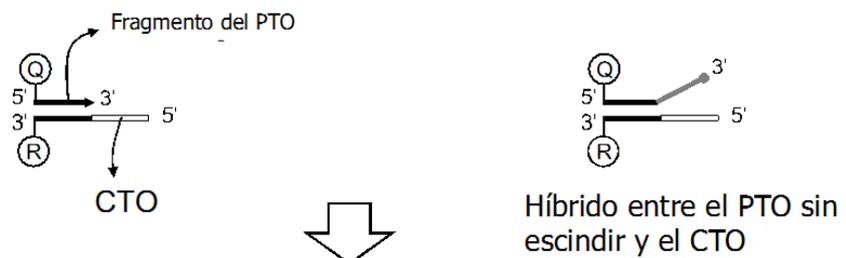
A. Hibridación



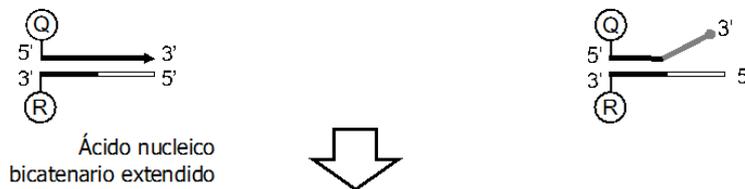
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO

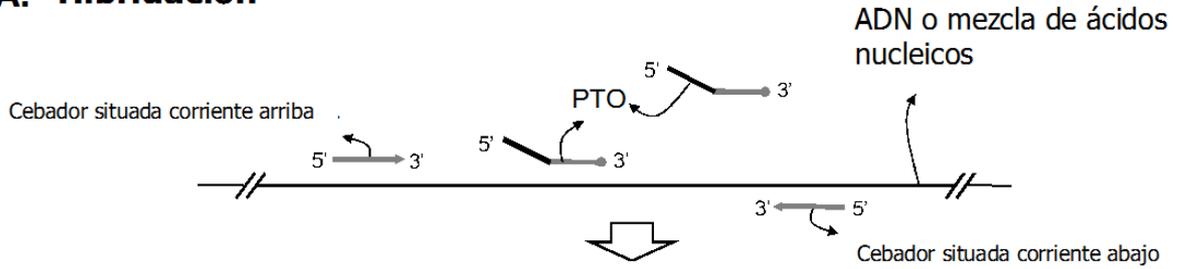


E. Análisis de la fusión

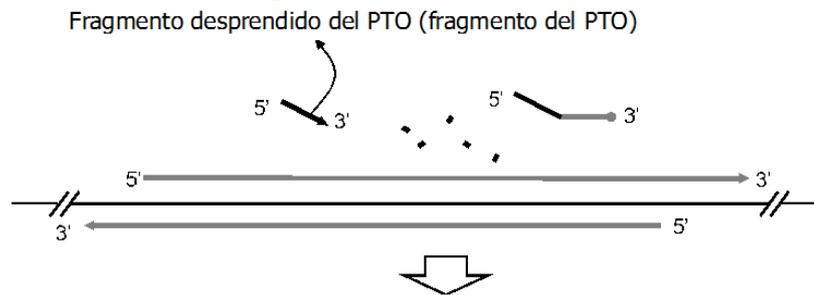


Fig. 9

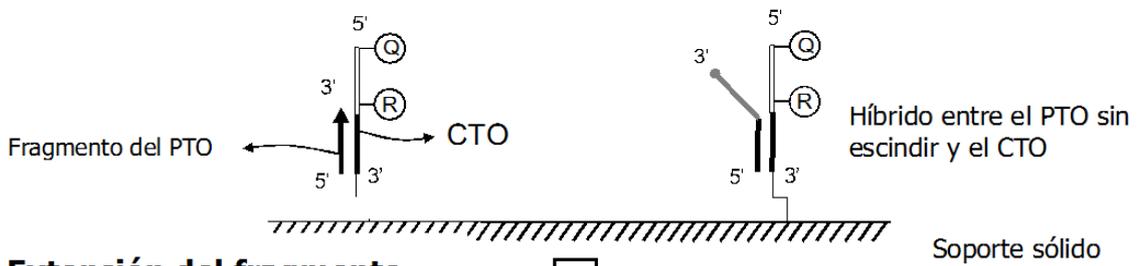
A. Hibridación



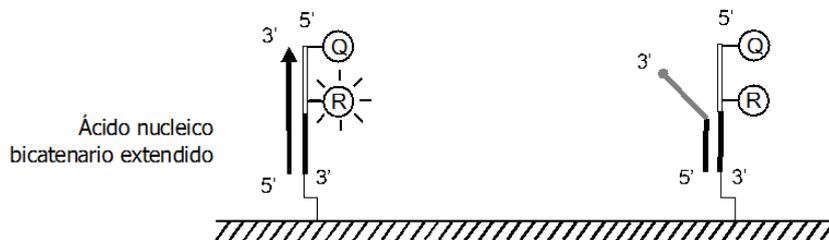
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO

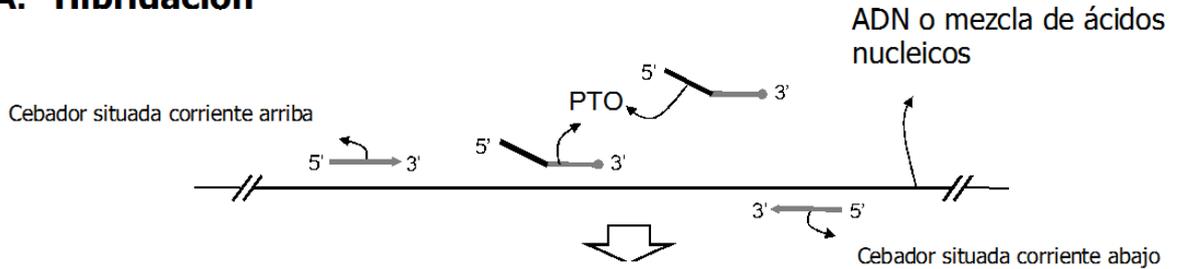


E. Detección a temperatura prefijada

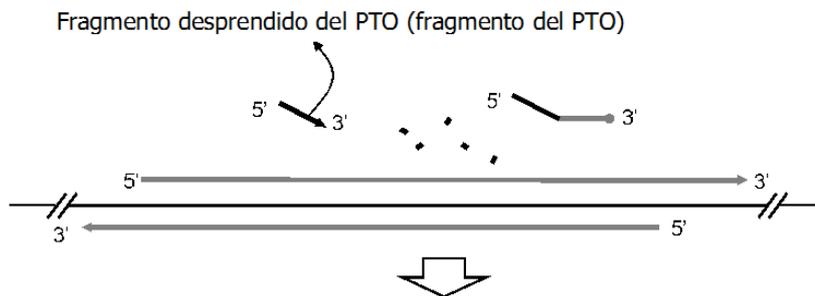


Fig. 10

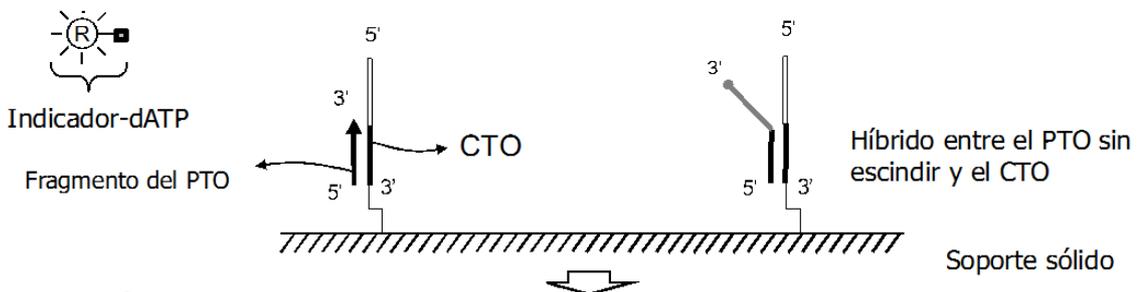
A. Hibridación



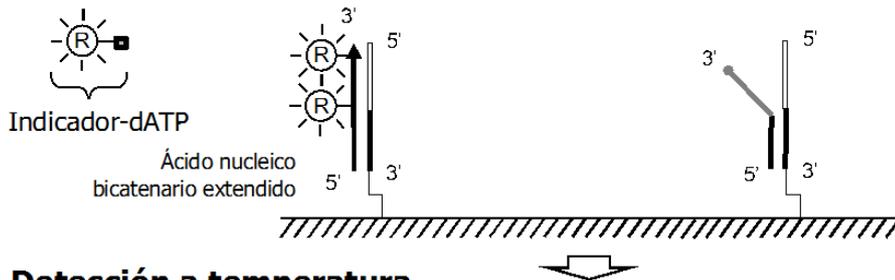
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO

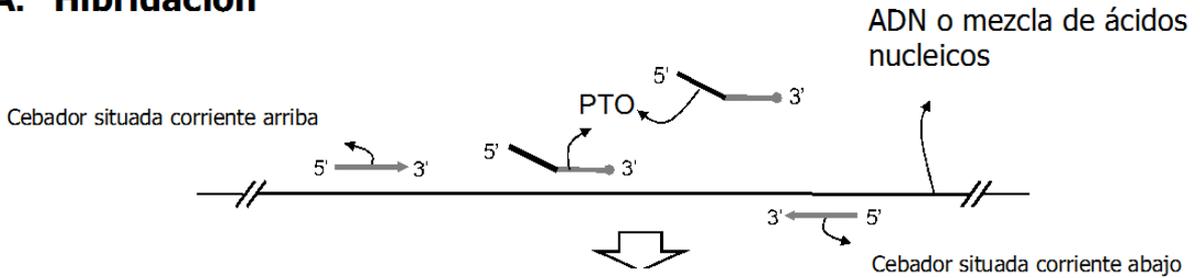


E. Detección a temperatura prefijada

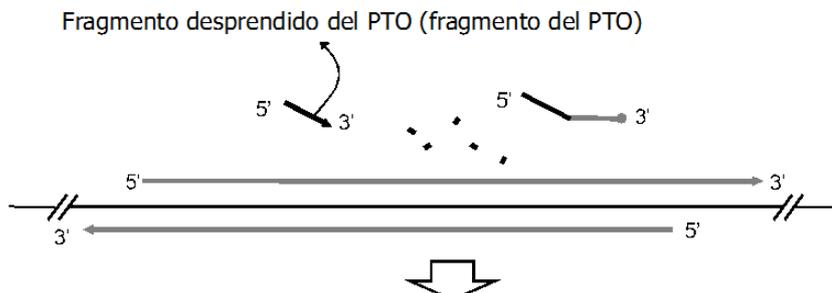


Fig. 11

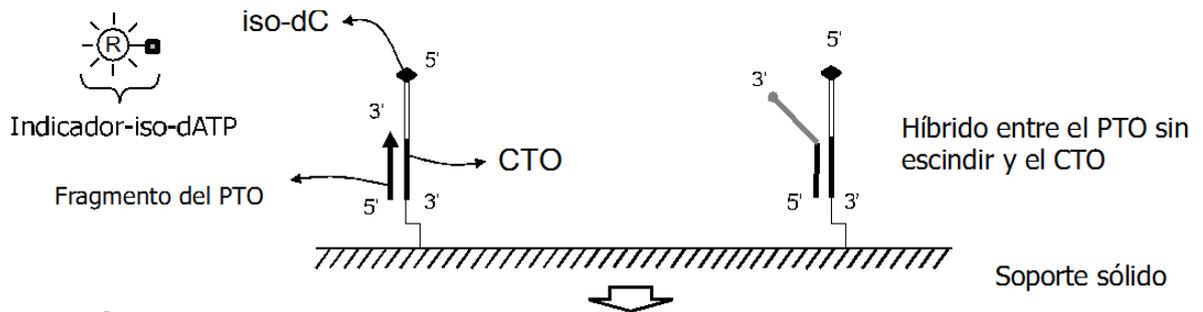
A. Hibridación



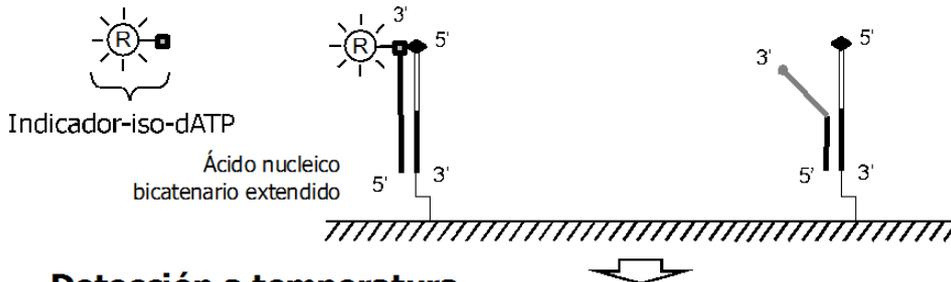
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO

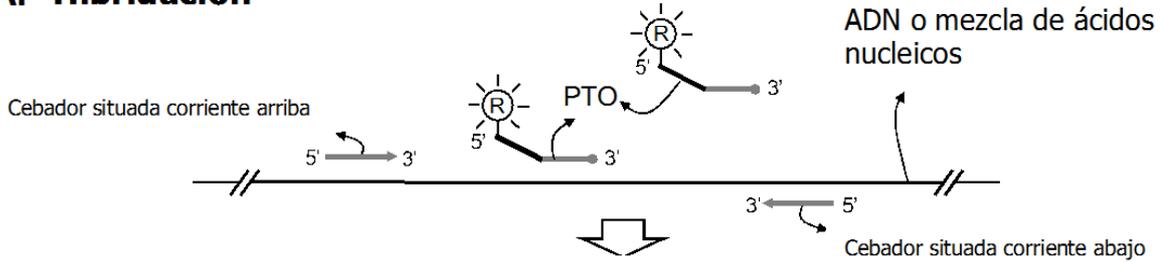


E. Detección a temperatura prefijada

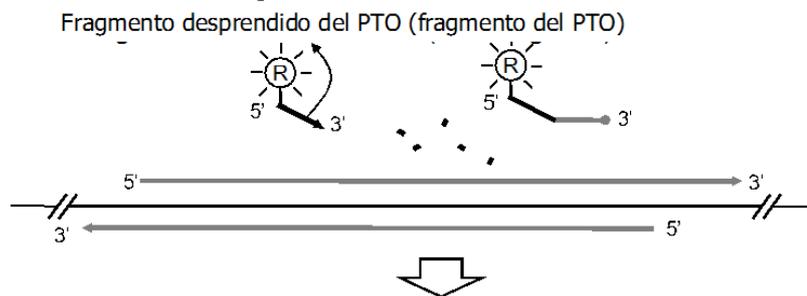


Fig. 12

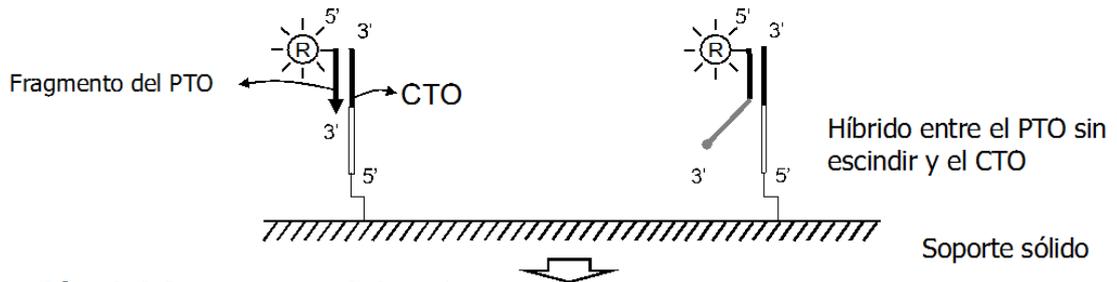
A. Hibridación



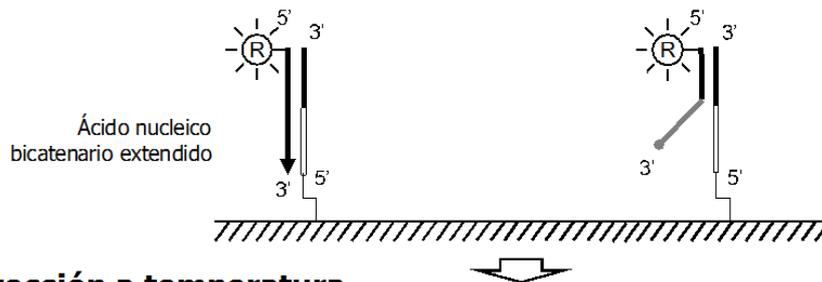
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO



E. Detección a temperatura prefijada

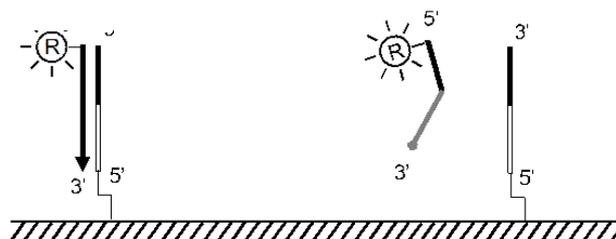
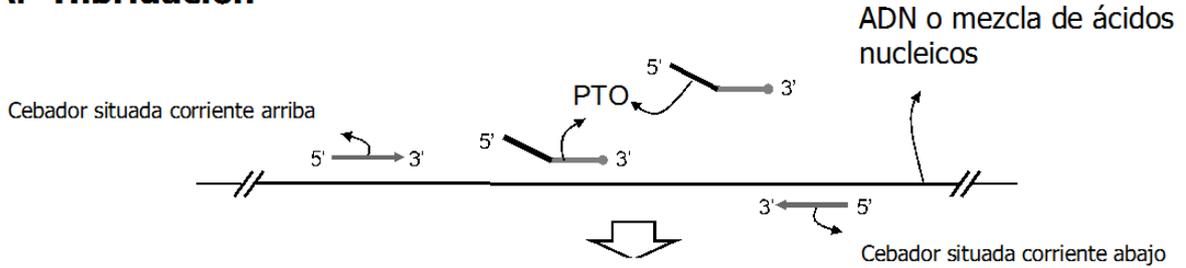
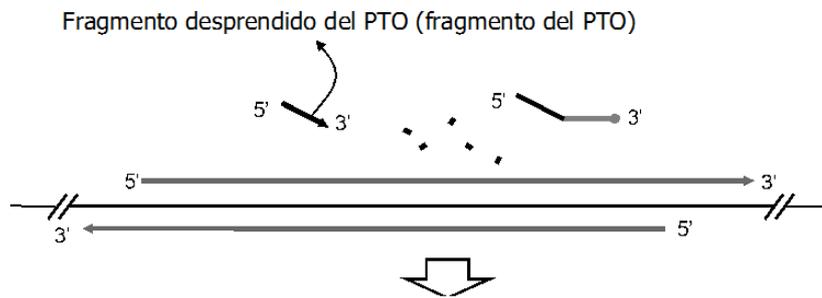


Fig. 13

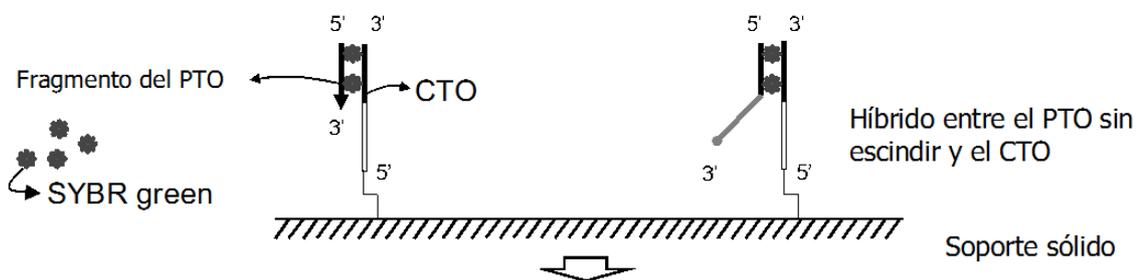
A. Hibridación



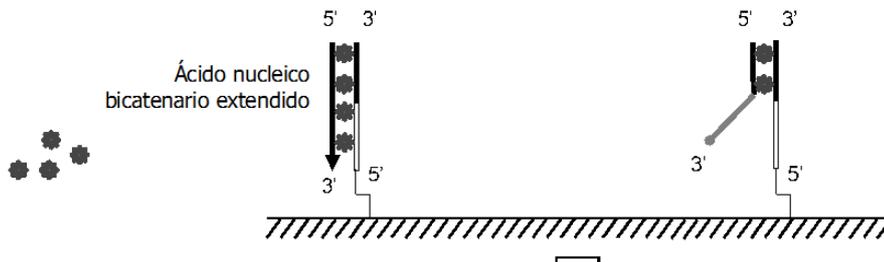
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO



E. Detección a temperatura prefijada

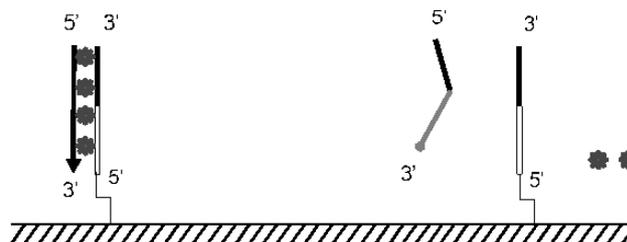
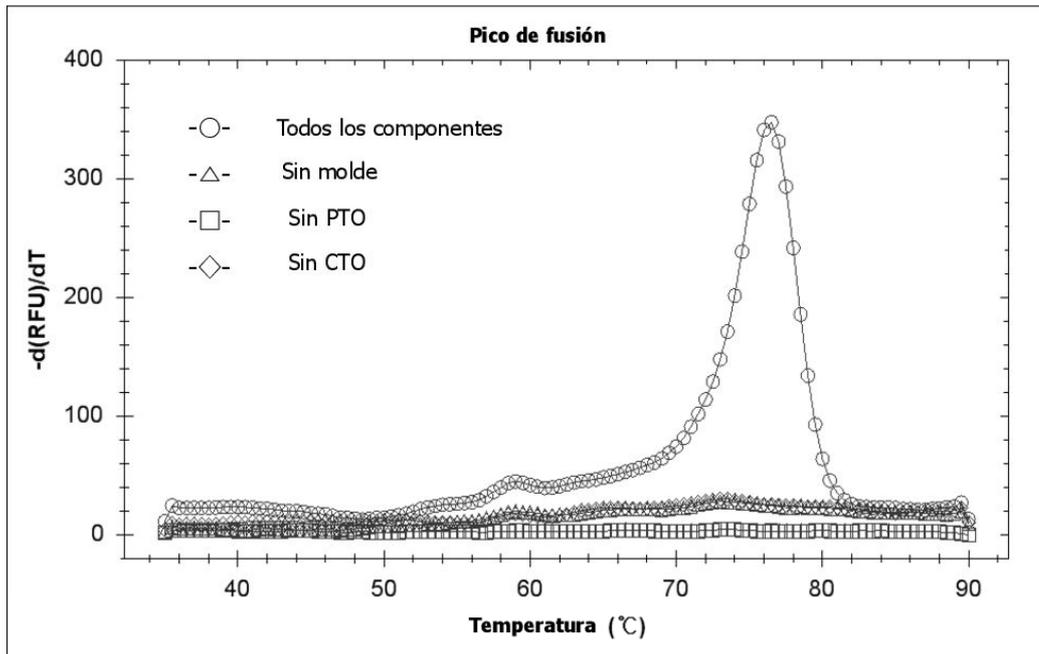


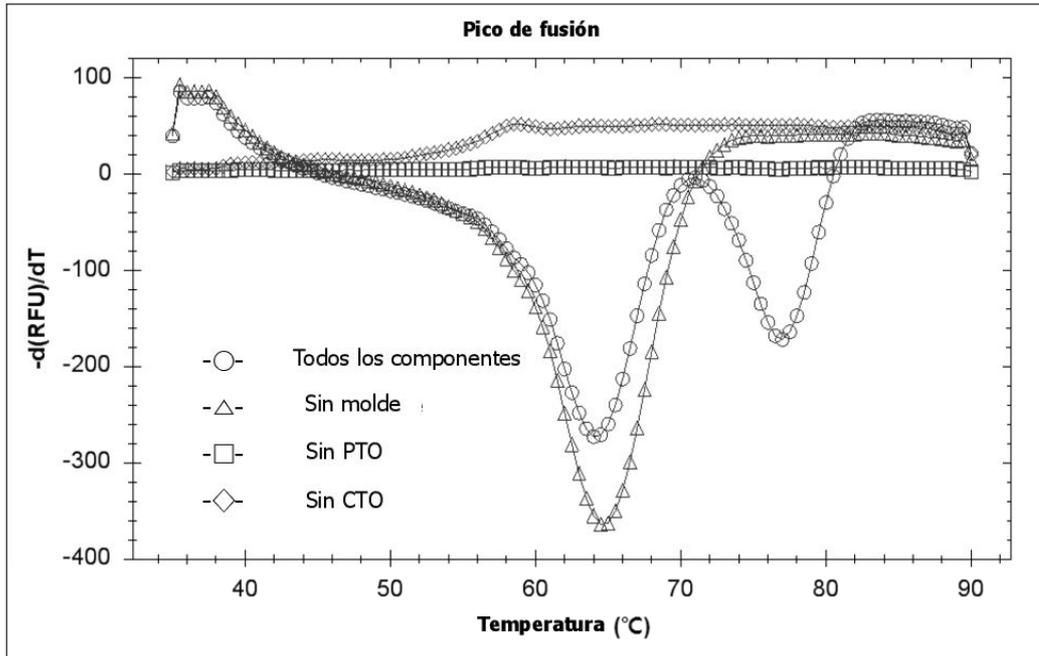
Fig. 14



Molde ¹⁾	Cebador situada corriente arriba	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Tm (°C)	
				Diana ⁴⁾	No diana ⁵⁾
+	+	+	+	76,5	-
-	+	+	+	-	-
+	+	-	+	-	-
+	+	+	-	-	-

- 1) El molde es un oligonucleótido sintético para el gen de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) El PTO no tiene marcador.
- 3) El CTO incorpora una molécula amortiguadora y una molécula indicadora fluorescente en su segmento molde.
- 4) La diana representa una señal diana que es la Tm del ácido nucleico bicatenario extendido.
- 5) La no diana representa una señal no diana que es la Tm del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO.

Fig. 15



Molde ¹⁾	Cebador situada corriente arriba	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Tm (°C)	
				Diana ⁴⁾	No diana ⁵⁾
+	+	+	+	77,0	64,0
-	+	+	+	-	64,5
+	+	-	+	-	-
+	+	+	-	-	-

1) El molde es un oligonucleótido sintético para el gen de *Neisseria gonorrhoeae*.

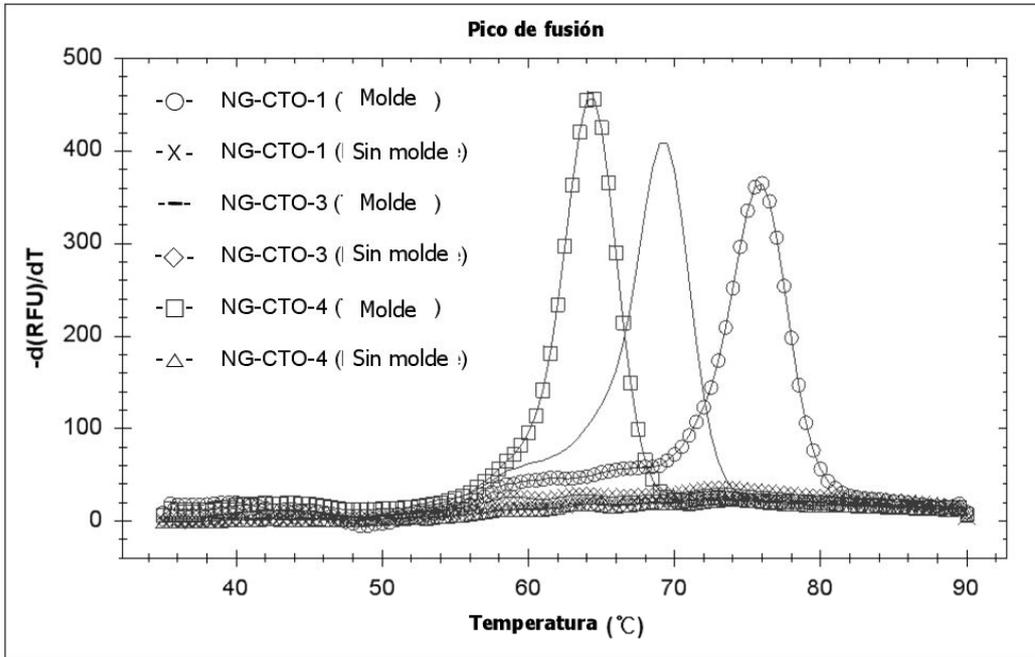
2) El PTO tiene una molécula amortiguadora en su extremo 5'.

3) El CTO incorpora una molécula indicadora fluorescente en su extremo 3'.

4) La diana representa una señal diana que es la Tm del ácido nucleico bicatenario extendido.

5) La no diana representa una señal no diana que es la Tm del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO.

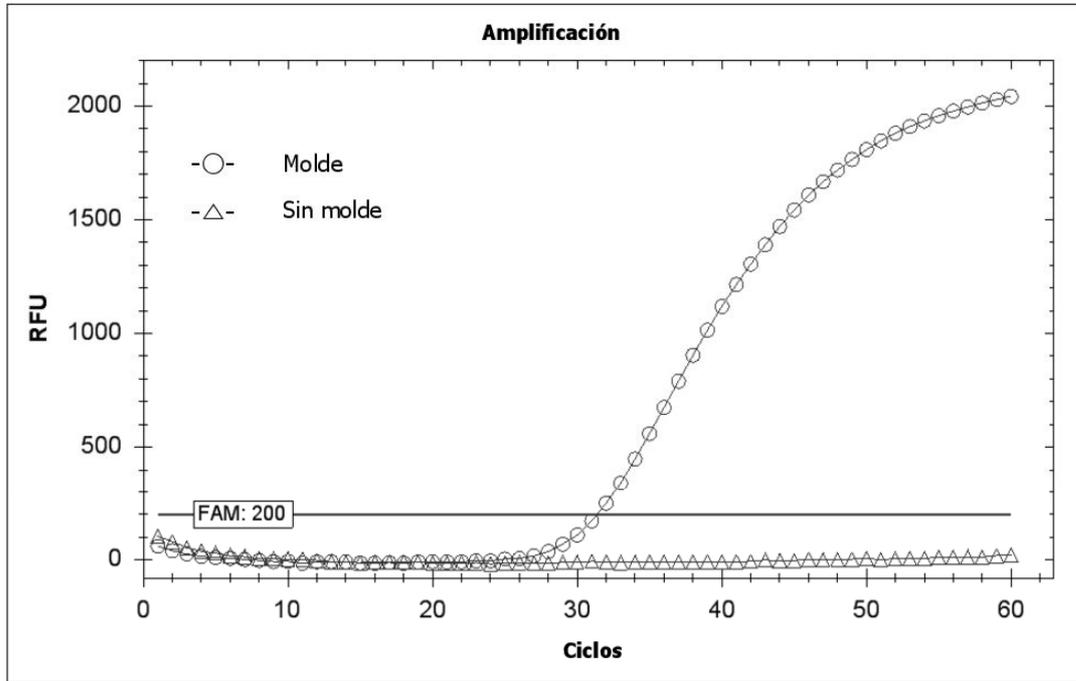
Fig. 16



Molde ¹⁾	Cebador situada corriente arriba	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Tm (°C) ⁴⁾
+	+	+	NG-CTO-1	76,0
-	+	+	NG-CTO-1	-
+	+	+	NG-CTO-3	69,0
-	+	+	NG-CTO-3	-
+	+	+	NG-CTO-4	64,5
-	+	+	NG-CTO-4	-

- 1) El molde es un oligonucleótido sintético para el gen de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) El PTO no tiene marcador.
- 3) El CTO incorpora una molécula amortiguadora y una molécula indicadora fluorescente en su segmento molde. Tres CTO tienen secuencias distintas en sus segmentos molde.
- 4) La Tm representa la temperatura de fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

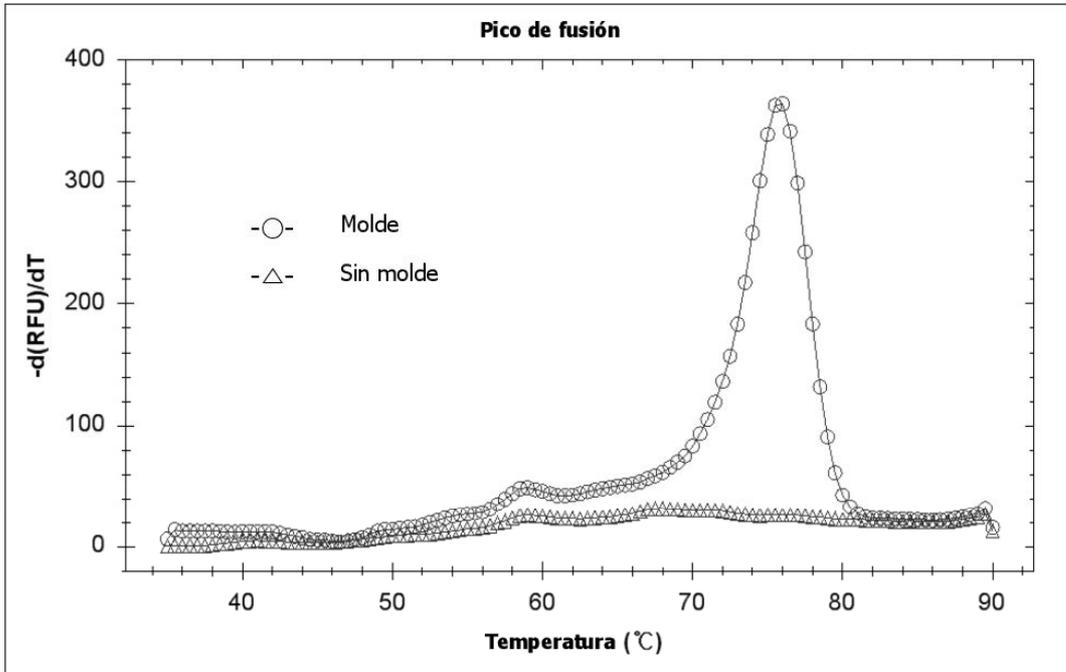
Fig. 17A



Molde ¹⁾	Cebador situada corriente arriba	Cebador situada corriente abajo	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Ct
+	+	+	+	+	31,36
-	+	+	+	+	-

- 1) **El molde es un ADN genómico de Neisseria gonorrhoeae.**
- 2) **El PTO no tiene marcador.**
- 3) **El CTO incorpora una molécula amortiguadora y una molécula indicadora fluorescente en su segmento molde.**

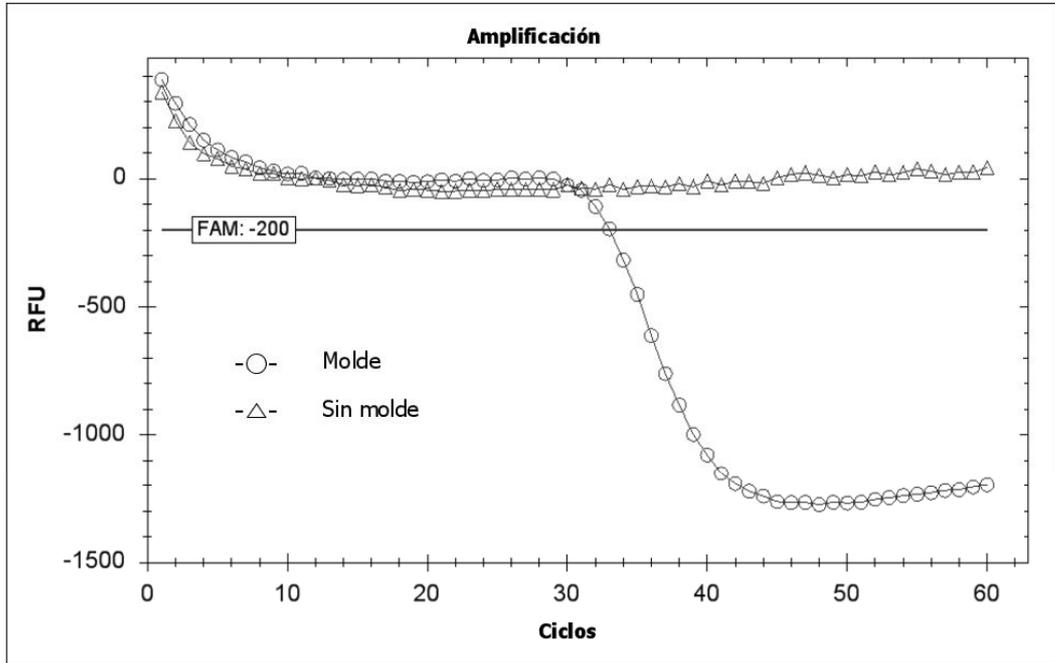
Fig. 17B



Molde ¹⁾	Cebador situada corriente arriba	Cebador situada corriente abajo	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Tm (°C) ⁴⁾
+	+	+	+	+	76,0
-	+	+	+	+	-

- 1) El molde es un ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) El PTO no tiene marcador.
- 3) El CTO incorpora una molécula amortiguadora y una molécula indicadora fluorescente en su segmento molde.
- 4) La Tm representa la temperatura de fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

Fig. 18A



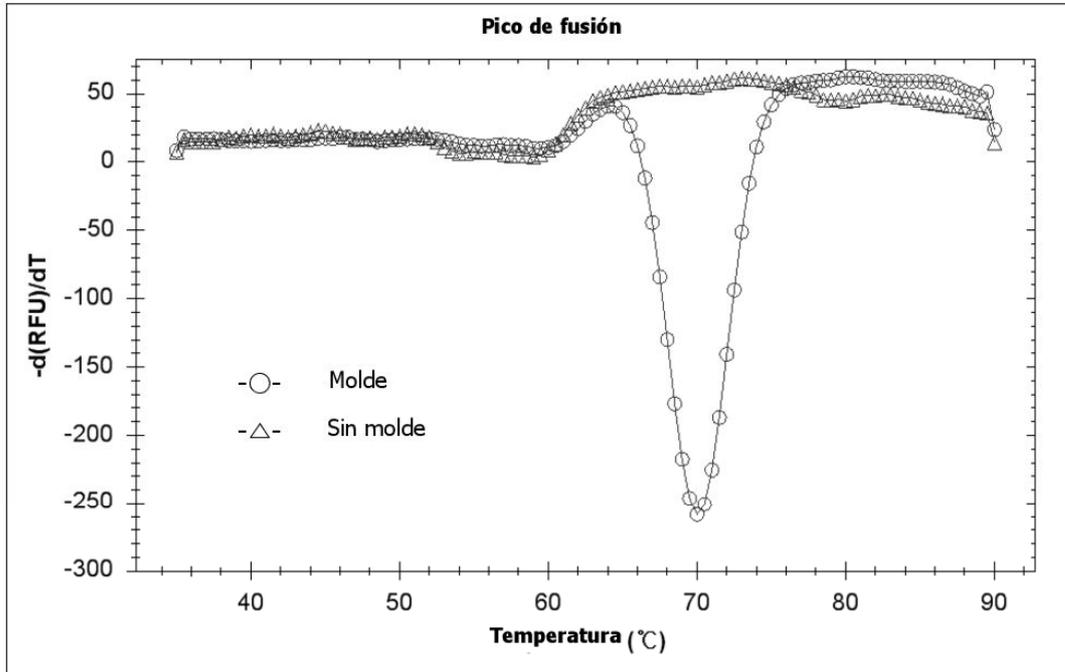
Molde ¹⁾	Cebador situada corriente arriba	Cebador situada corriente abajo	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Ct
+	+	+	+	+	33,03
-	+	+	+	+	-

1) El molde es un ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae*.

2) El PTO no tiene marcador.

3) El CTO contiene un nucleótido no natural (iso-dC) marcado con una molécula indicadora fluorescente en su extremo 5'.

Fig. 18B



Molde ¹⁾	Cebador situada corriente arriba	Cebador situada corriente abajo	PTO ²⁾	CTO ³⁾	T _m (°C) ⁴⁾
+	+	+	+	+	70,0
-	+	+	+	+	-

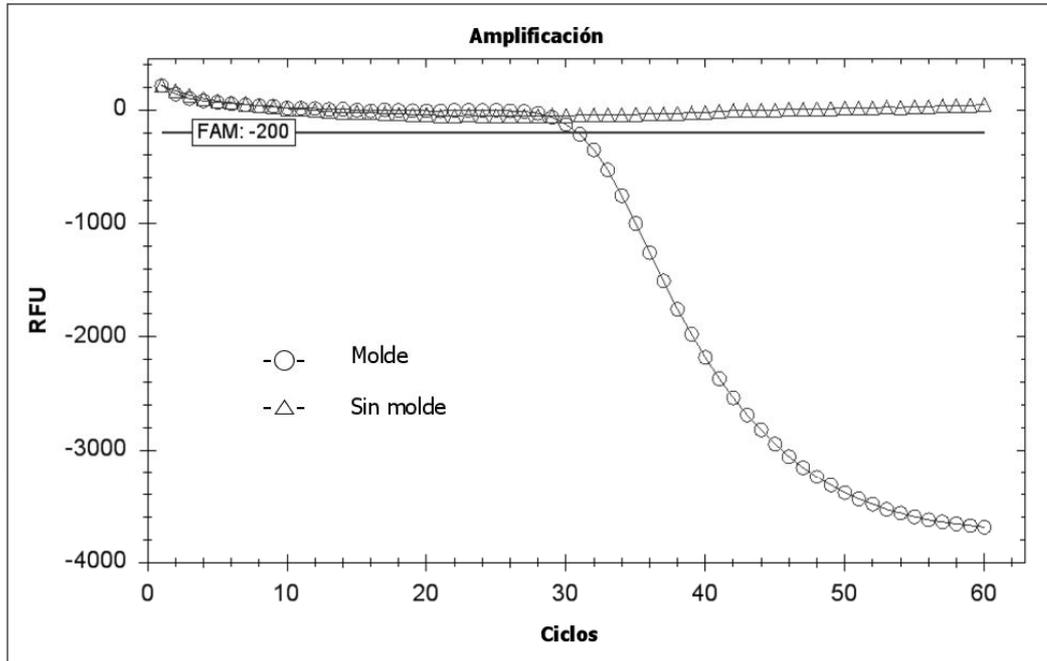
1) El molde es un ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae*.

2) El PTO no tiene marcador.

3) El CTO contiene un nucleótido no natural (iso-dC) y una molécula indicadora fluorescente en su extremo 5'.

4) La T_m representa la temperatura de fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

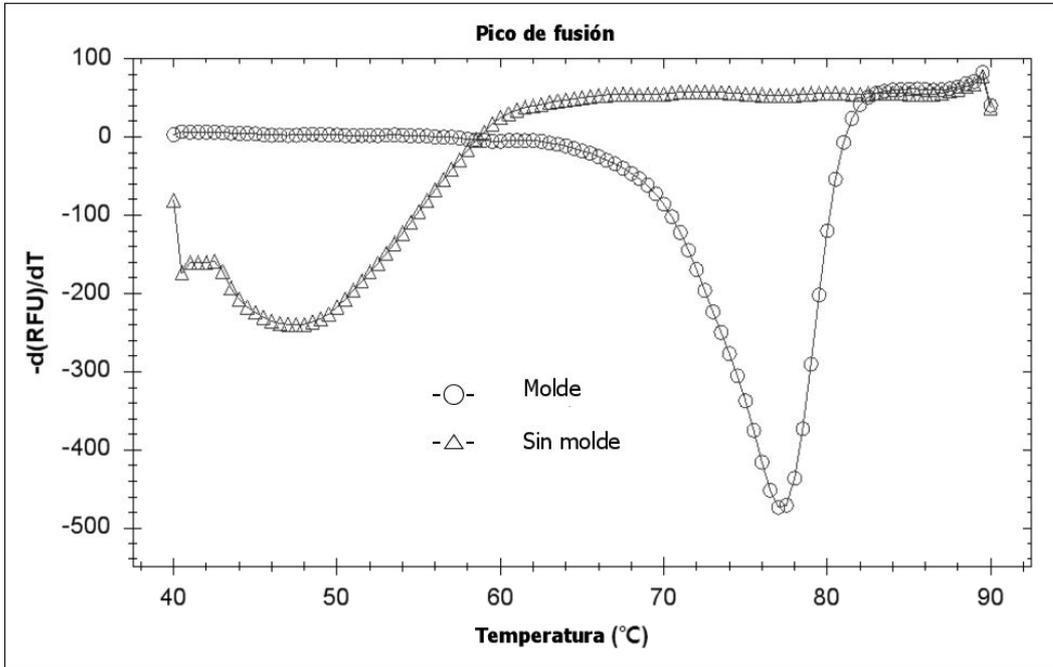
Fig. 19A



Molde ¹⁾	Cebador situada corriente arriba	Cebador situada corriente abajo	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Ct
+	+	+	+	+	29,79
-	+	+	+	+	-

- 1) **El molde es un ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae*.**
- 2) **El PTO tiene una molécula amortiguadora en su extremo 5'.**
- 3) **El CTO incorpora una molécula indicadora fluorescente en su extremo 3'.**

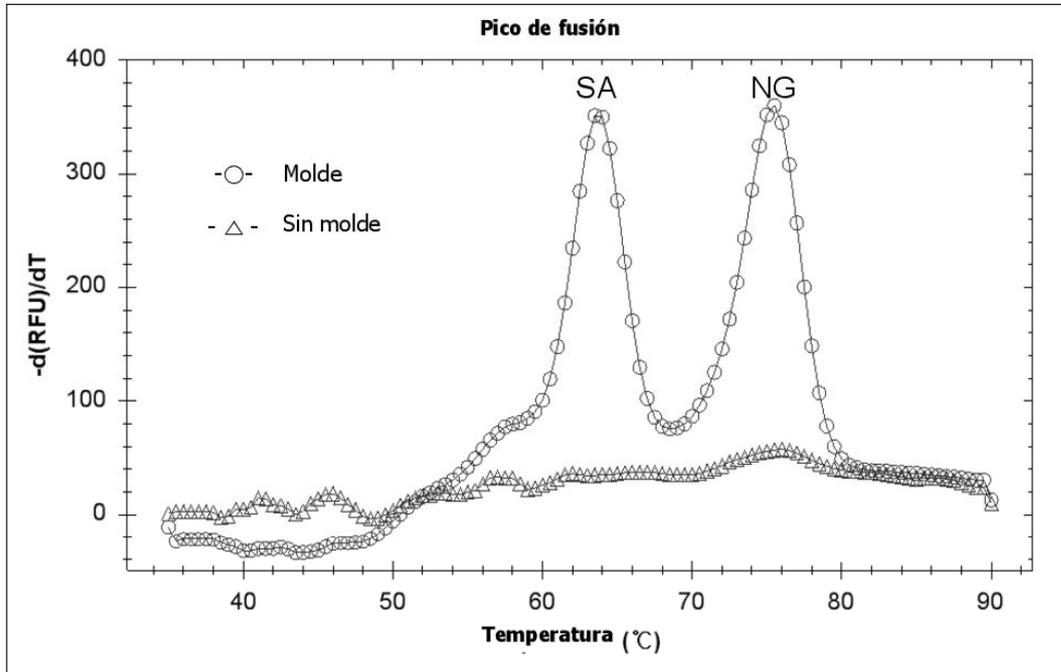
Fig. 19B



Molde ¹⁾	Cebador situada corriente arriba	Cebador situada corriente abajo	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Tm (°C)	
					Diana ⁴⁾	No diana ⁵⁾
+	+	+	+	+	76,5	-
-	+	+	+	+	-	48,0

- 1) El molde es un ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) El PTO tiene una molécula amortiguadora en su extremo 5'.
- 3) El CTO incorpora una molécula indicadora fluorescente en su extremo 3'.
- 4) La diana representa una señal diana que es la Tm del ácido nucleico bicatenario extendido.
- 5) La no diana representa una señal no diana que es la Tm del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO.

Fig. 20



Moldes ¹⁾	Cebador situada corriente arriba	Cebador situada corriente abajo	PTO ²⁾	CTO ³⁾	T _m (°C) ⁴⁾
NG y SA	+	+	+	+	75,5 y 63,5
-	+	+	+	+	-

1) Los moldes son ADN genómicos de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) y de *Staphylococcus aureus* (SA).

2) El PTO no tiene marcador.

3) El CTO incorpora una molécula amortiguadora y una molécula indicadora fluorescente en su segmento molde. Los CTO de NG y de SA incorporan el mismo tipo de molécula indicadora fluorescente (FAM).

4) La T_m representa la temperatura de fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

Fig. 21A

Imagen de la fluorescencia emitida en función de la temperatura sobre micromatriz

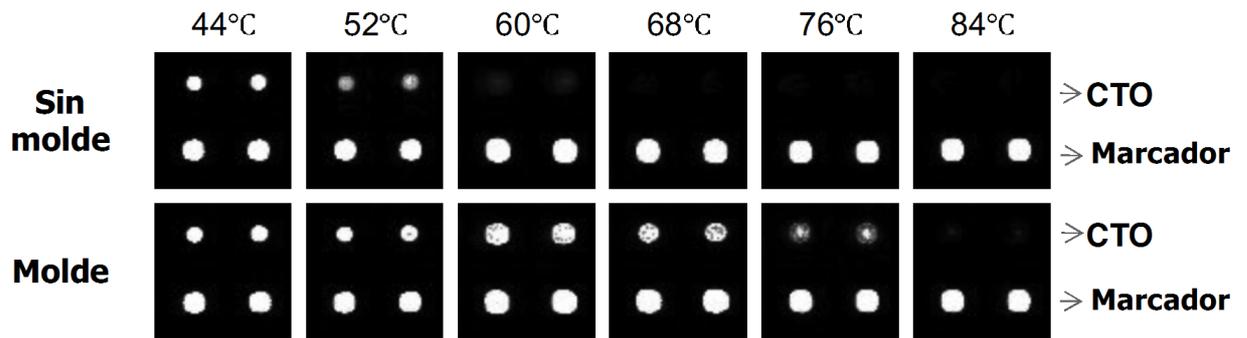


Fig. 21B

Imagen de la fluorescencia emitida en función de la temperatura sobre micromatriz

Molde ¹⁾	Cebador situada corriente arriba	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Unidades de fluorescencia relativa					
				44°C	52°C	60°C	68°C	76°C	84°C
-	+	+	+	65.438 (±1,4)	58.761 (±2.249,3)	9.989 (±473,1)	1.728 (±188,1)	862 (±184,6)	303 (±82,7)
+	+	+	+	65.434 (±3,5)	65.424 (±11,3)	65.397 (±9,9)	65.393 (±12,7)	40.184 (±3.297,9)	3.490 (±246,8)

- 1) El molde es un oligonucleótido sintético para el gen de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) El PTO incorpora una molécula indicadora fluorescente en su extremo 5'.
- 3) El CTO permanece inmovilizado sobre la superficie de un sustrato sólido a través de un grupo amino ubicado en su extremo 5'.

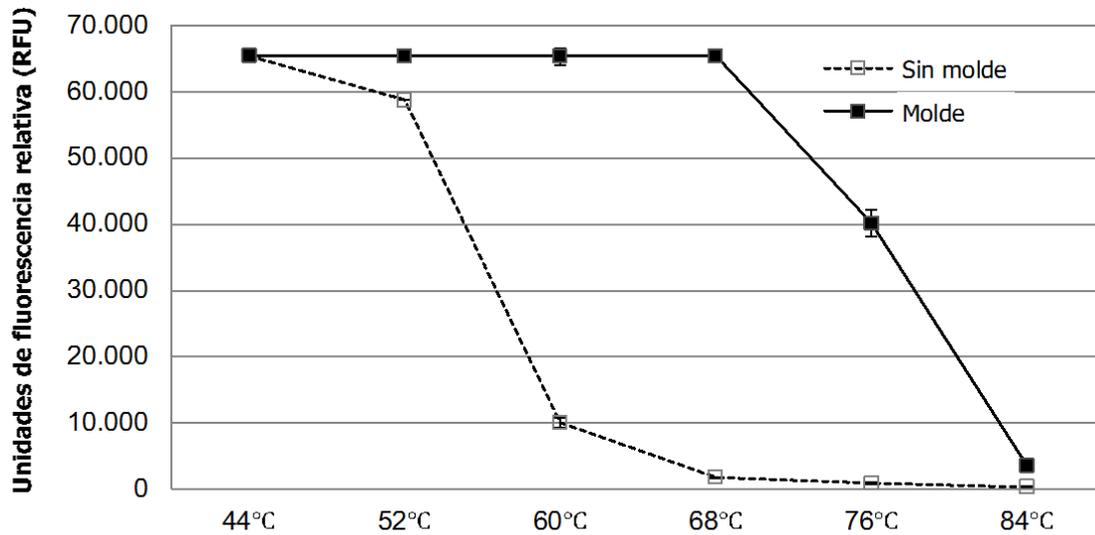


Fig. 22A

Imágenes de la fluorescencia emitida en función del número de ciclos sobre micromatriz

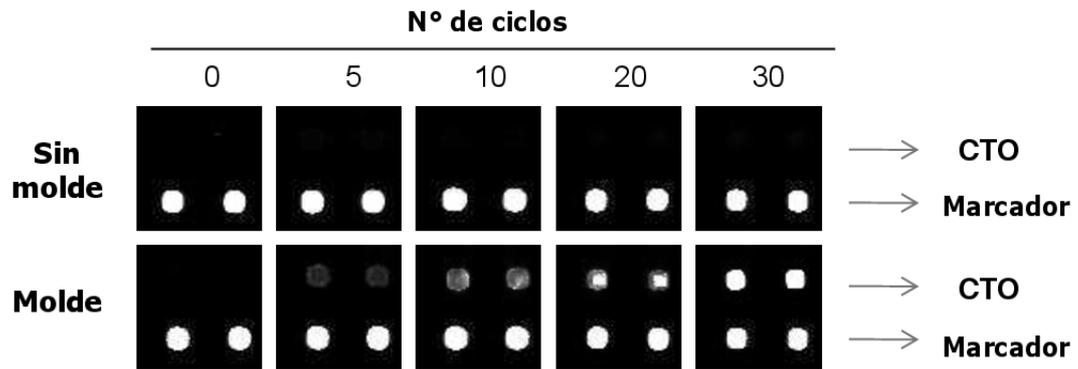


Fig. 22B

Imágenes de la fluorescencia emitida en función del número de ciclos sobre micromatriz

Molde: ¹⁾	Cebador situada corriente arriba	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Unidades de fluorescencia relativa					
				Nº de ciclos:	0	5	10	20	30
-	+	+	+		1.216 (±86,3)	3.012 (±929,1)	1.988 (±276,5)	1.961 (±25,5)	3.261 (±279,3)
+	+	+	+		1.304 (±0,7)	18.939 (±1.342,1)	30.619 (±258,0)	56.248 (±2.208,3)	64.645 (±1.110,2)

- 1) El molde es un oligonucleótido sintético para el gen de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) El PTO incorpora una molécula indicadora fluorescente en su extremo 5'.
- 3) El CTO permanece inmovilizado sobre la superficie de un sustrato sólido a través de un grupo amino ubicado en su extremo 5'.

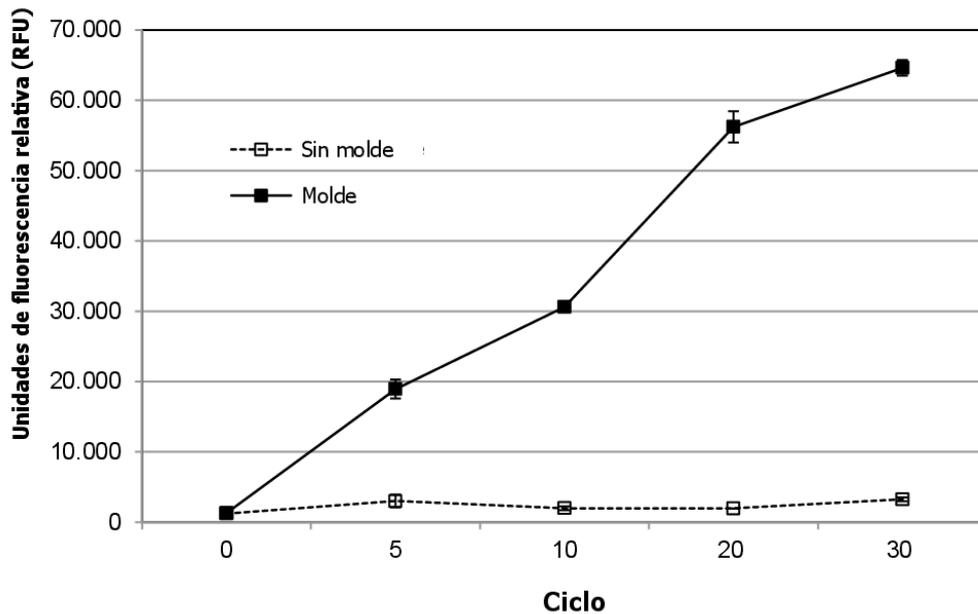


Fig. 23A

Imágenes de la fluorescencia emitida en función del número de ciclos sobre micromatriz

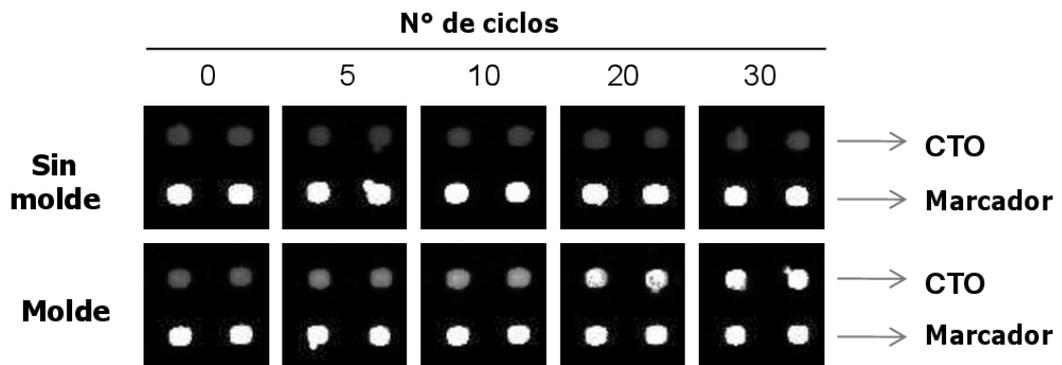


Fig. 23B

Cambio de la intensidad de la fluorescencia en función del número de ciclos sobre una micromatriz

Molde ¹⁾	Cebador situada corriente arriba	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Unidades de fluorescencia relativa					
				Nº de ciclos:	0	5	10	20	30
-	+	+	+		21.047 (±334,5)	17.867 (±478,7)	19.739 (±82,0)	19.144 (±176,8)	21.259 (±1.130,7)
+	+	+	+		28.078 (±460,3)	35.967 (±555,1)	44.674 (±186,0)	65.423 (±2,1)	65.426 (±2,8)

- 1) El molde es un oligonucleótido sintético para el gen de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) El PTO no tiene marcador.
- 3) El CTO incorpora una molécula amortiguadora y una molécula indicadora fluorescente en su segmento molde. El CTO permanece inmovilizado sobre la superficie de un sustrato sólido a través de un grupo amino ubicado en su extremo 3'.

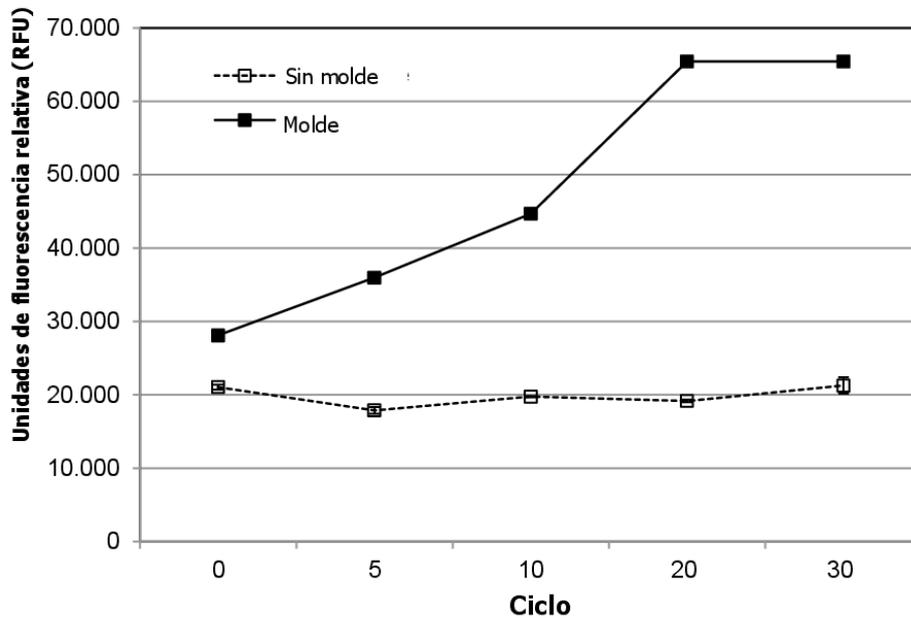
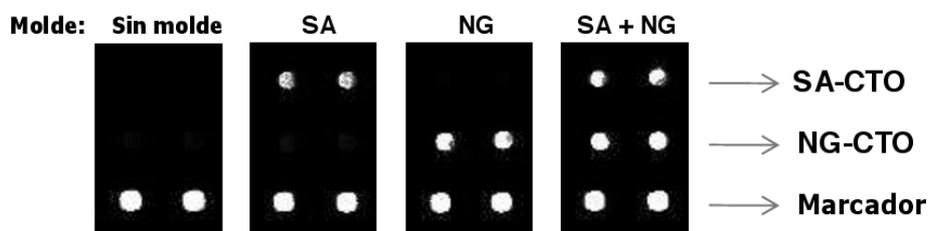


Fig. 24

Imagen de fluorescencia en una micromatriz



Intensidad de la fluorescencia sobre micromatriz

Molde ¹⁾	Cebadores ²⁾	PTO ³⁾	CTO ⁴⁾	Unidades de fluorescencia relativa	
				SA	NG
-	+	+	+	448 (±29,7)	2522 (±116,0)
SA	+	+	+	65.192 (±198,7)	4183 (±323,9)
NG	+	+	+	603 (±36,8)	65.332 (±1,4)
SA y NG	+	+	+	65.302 (±0,7)	65.302 (±0,7)

1) El molde es un ADN genómico de *Staphylococcus aureus* (SA) y/o de *Neisseria gonorrhoeae* (NG).

2) Los cebadores son un cebador en anteposición y otro en retroposición para la PCR.

3) El PTO incorpora una molécula indicadora fluorescente en su extremo 5'.

4) El CTO permanece inmovilizado sobre la superficie de un sustrato sólido a través de un grupo amino ubicado en su extremo 5'.