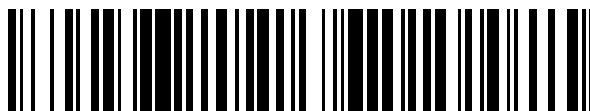


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 759**

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 14186326 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2826868**

54 Título: **Detección de secuencias 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:

14.08.2017

73 Titular/es:

SEEGENE, INC. (100.0%)

**8FL, 9FL Taewon Bldg., 91, Ogeum-ro, Songpa-gu
Seoul 05548, KR**

72 Inventor/es:

CHUN, JONG YOON y

LEE, YOUNG JO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 629 759 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 secuencias 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 procedimiento fundamental en la biología molecular y está afectado por 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 desnaturizantes. 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 Sin embargo, los métodos y procedimientos convencionales que dependen primordialmente de la hibridación están sujetos a un alto riesgo de resultados falsos positivos 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 procedimientos de hibridación con sondas, se han planteado diversas estrategias con reacciones enzimáticas adicionales, como por ejemplo, el procedimiento con sonda TaqMan™.

20 En el procedimiento con sonda TaqMan™, 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 cadena arriba 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 procedimiento 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 cadena 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 cadena 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 procedimiento 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'.

Se han descrito otros procedimientos 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 plantilla se hibrida con dicho plantilla y un oligonucleótido situado cadena arriba se hibrida con el plantilla 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 plantilla. 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 procedimiento en que la estructura de escisión dotada del oligonucleótido situado cadena 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 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 liberadas detectables son producidas con un procedimiento de amplificación secuencial mediado por solapa y dependiente de la síntesis de ácidos nucleicos. En este procedimiento, 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.

55 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 pub. de EE. UU. 2008-0241838 da a conocer un procedimiento 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 procedimiento, es necesario que la sonda sin escindir/intacta no se hibride con la sonda de captura. Para ello, es preciso inmovilizar en 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 Un procedimiento de detección de secuencias nucleotídicas para la identificación de polimorfismos o la detección cuantitativa del ADN fue probado por Lyamichev y col. (Nature Biotechnology, Vol 17 March 1999). Lyamichev y colaboradores usaron endonucleasas *flap* de arqueas en un protocolo optimizado que comprende la hibridación de una sonda señal y de una sonda invasiva con un nucleótido diana. Después de la escisión, las solapas 5 prima son extendidas con nucleótidos marcados con digoxigenina.

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

Roux P y colaboradores (Assay and Drug Development Technologies, Vol 2, N.º 6, 2004) sugiere el uso de moléculas de etiqueta electroforética (eTags) en la detección de la solapa 5 prima escindida. El ensayo eTag permite la detección directa y la cuantificación del ARNm sin la necesidad de extracción y purificación de ARN.

25 La importancia de las estructuras en horquilla presentes en la sonda o los oligonucleótidos invasivos usados en ensayos invasores se analiza por Allaw y colaboradores (RNA, 20014, 10:1153-1161). Se muestra una dependencia de temperatura de la señal de detección generada en el ensayo invasor.

30 Por lo tanto, se mantienen necesidades desde hace tiempo de desarrollar enfoques novedosos para la detección de secuencias diana, preferentemente 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. Adicionalmente, la técnica también precisa nuevos procedimientos de detección de dianas que no se vean limitados por la cantidad de tipos de marcadores (en especial de marcadores fluorescentes).

A lo largo de la presente solicitud, se ofrecen las referencias de varias patentes entre paréntesis.

Sumario de la invención

35 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 dúplex 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.

40 Por lo tanto, uno de los objetivos de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento 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).

45 Otro objetivo de esta invención consiste en proporcionar un kit 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).

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 los dibujos

La Figura 1 muestra las estructuras esquemáticas del PTO (oligonucleótido de sondeo y marcaje, por sus siglas en inglés) y del CTO (oligonucleótido de captura y plantilla, por sus siglas en inglés) usados en el ensayo de escisión y extensión de PTO (ensayo PTOCE). Preferentemente, que los extremos 3' del PTO y del CTO estén bloqueados para impedir su extensión.

La Figura 2 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE con el análisis de fusión incluido. El CTO contiene una molécula indicadora y una molécula inactivadora en su segmento plantilla.

La Figura 3 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE con el análisis de fusión incluido. El CTO contiene una molécula indicadora en su segmento plantilla. La molécula indicadora es necesaria para mostrar distintas intensidades de la señal De acuerdo con su presencia en forma monocatenaria o bicatenaria.

La Figura 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 plantilla. Durante la reacción de extensión se incorpora un complejo de molécula inactivadora-iso-dGTP al dúplex extendido.

La Figura 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 plantilla. Durante la reacción de extensión se incorpora un complejo de molécula inactivadora-iso-dGTP al dúplex extendido.

La Figura 6 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE con el análisis de fusión incluido. El PTO contiene una molécula indicadora y una molécula inactivadora en su segmento de marcaje en 5'.

La Figura 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 De acuerdo con su presencia en forma monocatenaria o bicatenaria.

La Figura 8 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE con el análisis de fusión incluido. El PTO contiene una molécula inactivadora en su segmento de marcaje en 5' y el CTO una molécula indicadora en su segmento de captura.

La Figura 9 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE incluyendo la detección a una temperatura predeterminada. El CTO contiene una molécula indicadora y una molécula inactivadora en su segmento plantilla. El CTO está inmovilizado en un sustrato sólido por su extremo 3'.

La Figura 10 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE incluyendo la detección a una temperatura predeterminada. Durante la reacción de extensión se incorpora un dATP marcado con un grupo indicador al dúplex extendido. El CTO está inmovilizado en un sustrato sólido a través de su extremo 3'.

La Figura 11 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE incluyendo la detección a una temperatura predeterminada. El CTO posee un residuo iso-dC en su segmento plantilla y durante la reacción de extensión se incorpora un complejo de indicador-iso-dGTP al dúplex extendido. El CTO está inmovilizado en un sustrato sólido por su extremo 3'.

La Figura 12 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE incluyendo la detección a una temperatura predeterminada. 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'.

La Figura 13 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE incluyendo la detección a una temperatura predeterminada con un colorante intercalante. El CTO está inmovilizado en un sustrato sólido por su extremo 5'.

La Figura 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 inactivadora en su segmento plantilla.

La Figura 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 inactivadora en su extremo 5' y el CTO una molécula indicadora en su extremo 3'.

La Figura 16 muestra que los valores de la T_m de los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos se ajustan con las secuencias del CTO.

La Figura 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 inactivadora en su segmento plantilla. La Figura 17A muestra los resultados del ensayo PTOCE complementado con la detección con PCR en tiempo real y la Figura 17B muestra los resultados del ensayo PTOCE complementado con el análisis de la fusión tras la PCR.

La Figura 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 inactivadora-iso-dGTP al dúplex extendido. La Figura 18A muestra los resultados del ensayo PTOCE complementado con la detección con PCR en tiempo real y la Figura 18B muestra los resultados del ensayo PTOCE complementado con el análisis de la fusión tras la PCR.

La Figura 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 inactivadora en su extremo 5' y el CTO una molécula indicadora en su extremo 3'. La Figura 19A muestra los resultados del ensayo PTOCE complementado con la detección con PCR en tiempo real y la Figura 19B muestra los resultados del ensayo PTOCE complementado con el análisis de la fusión tras la PCR.

La Figura 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 inactivadora en su segmento plantilla.

La Figura 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 Figura 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 predeterminada 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 Figura 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 predeterminada en una micromatriz. El CTO queda inmovilizado por su extremo 3' y contiene una molécula indicadora y una molécula inactivadora en su segmento plantilla.

La Figura 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 predeterminada 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 esta invención

La presente invención se refiere a un novedoso procedimiento para detectar una secuencia de ácidos nucleicos diana mediante un ensayo PTOCE (Siglas en inglés de Escisión y extensión de PTO) y un kit para detectar una secuencia de ácidos nucleicos diana mediante un ensayo PTOCE.

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. Procedimiento de detección de la diana mediante el PTOCE con análisis de la fusión

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento 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), que comprende:

(a) hibridación de la secuencia de ácidos nucleicos diana con un oligonucleótido situado cadena arriba y un PTO (oligonucleótido de sondeo y marcaje); en que dicho oligonucleótido situado cadena arriba comprende una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana; el PTO comprende: (i) una porción elegida como diana en 3' que comprende una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) un segmento de marcaje en 5' que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana; dicha porción elegida como diana 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 cadena 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 cadena 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 plantilla); 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 plantilla que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con el segmento de marcaje en 5' y la porción elegida como diana 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 plantilla; en la que el fragmento hibridado con el segmento de captura del CTO se extiende y forma un dúplex extendido; en el que este dúplex 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 dúplex extendido a lo largo de un intervalo de temperaturas que da una señal diana indicadora de la presencia del dúplex 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 dúplex extendido durante la reacción de extensión; (iii) un marcador incorporado al dúplex 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 dúplex extendido mediante la medición de la señal diana; la presencia del dúplex extendido indica la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

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, de manera multiplexada. 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 dúplex 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.

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 dúplex extendido dependiente de la diana; y detección del dúplex extendido. Por tanto, se denomina un ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO).

- 5 En la presente invención, el dúplex extendido se caracteriza por tener uno o varios marcadores que proporcionan una señal que indica la presencia del dúplex extendido mediante el análisis de la fusión o la detección a una temperatura predeterminada. Asimismo, el dúplex 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 no diana.

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

- 10 El ensayo PTOCE con análisis de la fusión se describe con mayor detalle como sigue:

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

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

- 15 Las frases usadas en el presente documento "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.

- 20 El término usado en el presente documento "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.

El término "cebador" tal y como se utiliza en el presente documento 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 (plantilla), es decir, en presencia de nucleótidos y de un agente de polimerización, como una ADN-polimerasa, y a una temperatura y un pH adecuados.

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

- 30 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 el presente documento se refiere a la colocación en aposición de un oligodesoxinucleótido o de un ácido nucleico respecto de un ácido nucleico plantilla, colocación que permite a la polimerasa añadir nucleótidos (polimerizar) a la molécula de ácido nucleico que es complementaria al ácido nucleico plantilla o a un segmento del mismo.

- 35 El término "hibridación" tal y como se emplea en el presente documento se refiere a la formación de un dúplex 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 sustancialmente con algunos desapareamientos. La complementariedad para la hibridación puede depender de las condiciones de hibridación, en especial de la temperatura.

- 40 La hibridación de una secuencia de ácidos nucleicos diana con el oligonucleótido situado cadena 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 cadena 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 pomenorizadas de hibridación se pueden encontrar en Joseph Sambrook, y col., 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).

- 50 No existe distinción pretendida entre los términos "reasociación" e "hibridación" y ambos se usan indistintamente.

El oligonucleótido situado cadena arriba y el PTO poseen secuencias nucleotídicas de hibridación por su complementariedad con la secuencia de ácidos nucleicos diana. El término "complementariedad" se usa en el presente documento 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 “sustancialmente complementario” y “perfectamente complementario”, preferentemente 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 plantilla del CTO (Oligonucleótido de captura y plantilla) tiene una secuencia nucleotídica no complementaria con el segmento de marcaje en 5' y la porción elegida como diana en 3' del PTO. La frase “no complementario” se usa en el presente documento 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 “sustancialmente no complementario” y “perfectamente no complementario”, preferentemente esto último.

El término usado en el presente documento “PTO (Oligonucleótido de sondeo y marcaje)” significa un oligonucleótido que comprende: (i) una porción elegida como diana 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 la porción elegida como diana en 3' del PTO deben estar colocados en orden 5' a 3'. El PTO se ilustra esquemáticamente en la Figura 1.

Preferentemente, la hibridación de la etapa (a) se realiza en condiciones restrictivas, de modo que la porción elegida como diana 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. La porción elegida como diana en 3' del PTO puede ser de cualquier longitud siempre que se hibride específicamente con las secuencias de ácidos nucleicos diana. Por ejemplo, la porción elegida como diana 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 plantilla 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 de acuerdo con procedimientos 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, conector 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. De acuerdo con una 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 cadena arriba está situado antes del PTO.

Además, el oligonucleótido situado cadena 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 cadena arriba se puede realizar de dos modos: (i) inducción de la escisión independiente de la extensión del oligonucleótido situado cadena arriba; y (ii) inducción de la escisión dependiente de la extensión del oligonucleótido situado cadena arriba.

Si el oligonucleótido situado cadena 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 cadena arriba digerirá el PTO sin reacción de extensión. En cambio, si el oligonucleótido situado cadena arriba se coloca lejos del PTO, la enzima con actividad polimerasa (por ejemplo, polimerasa dependiente de plantilla) catalizará la extensión del oligonucleótido situado cadena arriba (por ejemplo, cebador situado cadena arriba) y la enzima con actividad 5'-nucleasa unida al producto extendido digerirá el PTO.

Por lo tanto, el oligonucleótido situado cadena arriba puede estar situado respecto al PTO de dos modos. El oligonucleótido situado cadena 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 cadena arriba puede estar situado lo bastante lejos del PTO para inducir la escisión del PTO de un modo que dependerá de la extensión.

5 El término usado en el presente documento "adyacente" en alusión a posiciones o ubicaciones significa que el oligonucleótido situado cadena arriba está localizado junto a la porción elegida como diana en 3' del PTO con el que forma una muesca. Asimismo, el término significa que el oligonucleótido situado cadena arriba está localizado 1-30 nucleótidos, 1-20 nucleótidos o 1-15 nucleótidos aparte de la porción elegida como diana en 3' del PTO.

10 El término usado en el presente documento "distante" en referencia a posiciones o ubicaciones incluye cualquier posición o localización suficiente para asegurar las reacciones de extensión.

De acuerdo con una realización preferida, el oligonucleótido situado cadena arriba está situado lo bastante lejos del PTO para inducir la escisión del PTO de un modo que depende de la extensión.

15 De acuerdo con una realización preferida, el oligonucleótido situado cadena arriba es un cebador o una sonda situados cadena arriba. El cebador situado cadena arriba es adecuado para la inducción de la escisión independiente de la extensión o la escisión dependiente de la extensión, y la sonda cadena arriba es adecuada para la inducción de la escisión independiente de la extensión.

20 Alternativamente, el oligonucleótido situado cadena arriba puede tener una secuencia parcialmente solapada con la parte 5' de la porción elegida como diana en 3' del PTO. Preferentemente, la secuencia solapada tiene una longitud de 1 a 10 nucleótidos, preferentemente de 1 a 5 nucleótidos o, aún más preferentemente, de 1 a 3 nucleótidos. Si el oligonucleótido situado cadena arriba tiene una secuencia parcialmente solapada con la parte 5' de la porción elegida como diana en 3' del PTO, la porción elegida como diana 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 de la porción elegida como diana en 3'.

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

30 Las técnicas convencionales para las reacciones de escisión con oligonucleótidos situados cadena arriba se pueden aplicar a la presente invención, siempre que el oligonucleótido situado cadena 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.

De acuerdo con una realización preferida, el procedimiento se lleva a cabo en presencia de un cebador situado cadena abajo. El cebador situado cadena 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.

35 De acuerdo con una realización preferida, cuando se usan el cebador situado cadena arriba y el cebador situado cadena abajo, además, se emplea una polimerasa de ácidos nucleicos dependiente de plantilla para la extensión de los cebadores.

40 De acuerdo con una realización preferida, el oligonucleótido situado cadena arriba (cebador situado cadena arriba o sonda cadena arriba), el cebador situado cadena 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 sustancialmente mejor que los cebadores y las sondas convencionales (véase el documento WO 2006/095981; Chun y col., Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene, Nucleic Acid Research, 35:6e40 (2007)).

45 De acuerdo con una realización preferida, la porción elegida como diana 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 sustancialmente mejor que las sondas convencionales (véase el documento WO 2011/028041).

Etapa (b): Liberación de un fragmento del PTO

50 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.

La frase usada en el presente documento “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.

Cuando el PTO se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana, su porción elegida como diana 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 Figura 2). Por lo tanto, 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 expertas en la materia.

Los puntos de escisión del PTO varían dependiendo del tipo de oligonucleótidos situados cadena arriba (sonda cadena arriba o cebador situado cadena arriba), de los puntos de hibridación de los oligonucleótidos situados cadena 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 tecnologías 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.

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 (porción elegida como diana 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' de la porción elegida como diana 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.

De acuerdo con una realización preferida, el punto inicial para la escisión del PTO por la polimerasa dependiente de plantilla con actividad 5'-nucleasa tras la extensión del cebador situado cadena 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.

A este respecto, el término usado en el presente documento “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, la frase “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”.

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' de la porción elegida como diana en 3' del PTO y la parte del extremo 5' del segmento de captura del CTO se refiere a una secuencia nucleotídica compuesta por 1-40, 1-30, 1-20, 1-15, 1-10 o 1-5 nucleótidos, preferentemente 1, 2, 3 o 4 nucleótidos.

De acuerdo con una realización preferida, la enzima dotada de actividad 5'-nucleasa es una ADN-polimerasa dotada de actividad 5'-nucleasa o una nucleasa FEN, más preferentemente una ADN-polimerasa termostable dotada de actividad 5'-nucleasa o una nucleasa FEN.

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'.

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 brieryi*, *Acidianus ambivalens*, *Desulfurococcus amyolyticus*, *Desulfurococcus mobilis*, *Pyrodictium brockii*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermococcus zilligii*, *Methanopyrus*

kandleri, *Methanococcus igneus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeropyrum pernix* y *Archaeoglobus veneficus*.

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

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

Opcionalmente, se usa el cebador situado cadena arriba en la etapa (a), una polimerasa dependiente de plantilla para la extensión del cebador situado cadena arriba y la polimerasa dependiente de plantilla es distinta de la enzima con actividad 5'-nucleasa.

10 **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 plantilla).

15 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 plantilla que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con el segmento de marcaje en 5' y la porción elegida como diana en 3' del PTO.

El CTO actúa como plantilla 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 dúplex extendido.

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

25 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' de la porción elegida como diana 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' de la porción elegida como diana 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'.

30 Además, 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' de la porción elegida como diana 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 (por ejemplo, 1-3 nucleótidos desapareados).

40 Cuando el fragmento comprende el segmento de marcaje en 5' y se desprende una parte del extremo 5' de la porción elegida como diana 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 de la porción elegida como diana en 3', lo cual resuelve los problemas relacionados con los nucleótidos desapareados (véase la Figura 1).

45 Preferentemente, la secuencia nucleotídica de la parte del extremo 5' del segmento de captura del CTO complementaria con la parte del extremo 5' escindida de la porción elegida como diana en 3' puede seleccionarse en función de los puntos de escisión decididos de antemano en la porción elegida como diana 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 de la porción elegida como diana en 3' tenga entre 1-10 nucleótidos, preferentemente de 1-5 nucleótidos, y más preferentemente de 1-3 nucleótidos.

50 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 (por ejemplo, una parte del fragmento que contenga el segmento del extremo 3') siempre que se hibride de forma estable con el fragmento.

La frase usada "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 el presente documento para abarcar varios diseños y composiciones del segmento de captura del CTO tal y como se explica anteriormente.

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

- 5 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 plantilla del CTO puede tener cualquier longitud siempre que pueda actuar como plantilla en la extensión del fragmento desprendido del PTO. Por ejemplo, el segmento plantilla 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. Preferentemente, el extremo 3' del CTO está bloqueado para impedir su extensión. El bloqueo de la extensión del CTO se puede conseguir con procedimientos 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 conector 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 porción elegida como diana en 3' no queda hibridado con el CTO lo cual impide la formación de un dúplex extendido.

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

Etapa (d): Extensión del fragmento

- 35 La reacción de extensión se lleva a cabo con el producto de la etapa (c) y una polimerasa de ácido nucleico dependiente de plantilla. El fragmento hibridado con el segmento de captura del CTO se extiende hasta formar un dúplex 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 dúplex extendido.

- El término usado en el presente documento "dúplex extendido" designa un dúplex formado por una reacción de extensión en la que el fragmento hibridado con el segmento de captura del CTO se extiende usando el segmento plantilla del CTO como plantilla y la polimerasa de ácido nucleico dependiente de plantilla.

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

Preferentemente, el dúplex extendido tiene un valor de T_m superior al del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO.

- 45 El valor de T_m del dúplex 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 dúplex extendido se utiliza para dar una señal diana indicadora de la presencia de dicho dúplex extendido mediante la fusión del mismo en la etapa (e).

- El término " T_m " tal y como se usa en el presente documento 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 procedimientos convencionales como la regla de Wallace (R.B. Wallace, y col., *Nucleic Acids Research*, 6:3543-3547(1979)) y el llamado "procedimiento del vecino más cercano" (SantaLucia J. Jr., y col., *Biochemistry*,

35:3555-3562(1996)); Sugimoto N., y col., *Nucleic Acids Res.*, 24:4501-4505(1996)).

De acuerdo con una realización preferida, 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.

5 La polimerasa de ácido nucleico dependiente de plantilla 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. Preferentemente, 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*,
10 *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*, *Pyrodicticum occultum*, *Aquifex pyrophilus* y *Aquifex aeolicus*. Pero lo más preferible es que la
15 polimerasa de ácido nucleico dependiente de plantilla sea la polimerasa Taq.

De acuerdo con una realización preferida, la enzima con actividad 5'-nucleasa usada en la etapa (b) es idéntica a la polimerasa de ácido nucleico dependiente de plantilla usada en la etapa (d). Más preferentemente, la enzima con actividad 5'-nucleasa usada en la etapa (b), la polimerasa de ácido nucleico dependiente de plantilla usada para la extensión del cebador situado cadena arriba y la polimerasa de ácido nucleico dependiente de plantilla usada en la
20 etapa (d) son idénticas entre sí.

El dúplex 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 dúplex extendido durante la reacción de extensión; (iii) un marcador incorporado al dúplex extendido durante la reacción de extensión y un marcador unido al fragmento de PTO y/o al CTO; o (iv) un marcador intercalante.

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

Etapa (e): Fusión del dúplex extendido

Tras la reacción de extensión, el dúplex extendido se fusiona a lo largo de un intervalo de temperaturas y da una señal diana indicadora de su presencia.

35 La señal diana la proporciona: (i) al menos un marcador unido al fragmento y/o al CTO; (ii) un marcador incorporado al dúplex extendido durante la reacción de extensión; (iii) un marcador incorporado en el dúplex extendido durante la reacción de extensión y un marcador unido al fragmento y/o al CTO; o (iv) un marcador intercalante.

La frase "señal diana" tal y como se utiliza en el presente documento significa cualquier señal capaz de indicar la presencia del dúplex 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),
40 una curva de fusión, un perfil de fusión y una temperatura de fusión (o valor de T_m).

De acuerdo con una realización preferida, la señal diana es un cambio de señal procedente del marcador situado en el dúplex extendido en la etapa de fusión. El cambio de señal se puede obtener midiendo señales al menos 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
45 situado en el dúplex extendido a lo largo de un intervalo de temperaturas. Preferentemente, el intervalo de temperaturas corresponde al de un análisis de la curva de fusión o a temperaturas cercanas al valor de T_m del dúplex extendido.

El dúplex extendido tiene un valor de T_m superior al del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO. Por tanto, el dúplex extendido y el híbrido muestran patrones de fusión distintos. Dichos perfiles dispares permiten
50 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.

La fusión se puede llevar a cabo con tecnologías convencionales, entre otras, calentamiento, tratamiento con sustancias alcalinas, formamida, urea y glioxal, procedimientos enzimáticos (por ejemplo, acción de helicasas), y proteínas de unión. Por ejemplo, la fusión se puede lograr calentando a temperaturas de 80 °C a 105 °C. Los
55 procedimientos generales de dichos tratamientos se pueden encontrar en Joseph Sambrook, y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001).

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 con detalle a continuación:

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

- 5 De acuerdo con una realización preferida, la señal diana la proporciona al menos un marcador unido al fragmento y/o al CTO. Como el dúplex 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 único.

(i-1) Marcador interactivo doble

- 10 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 fluorescente que actúa como donadora y una molécula inactivadora 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 por ejemplo, un cromóforo, y el aceptor de energía es fluorescente. En otros tipos de sistemas interactivos de marcaje, el donador de energía es luminiscente, por ejemplo, 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 inactivadora, respectivamente.
- 15 En otro tipo de sistemas interactivos de marcaje, el donante de energía no es fluorescente, como por ejemplo, un cromóforo, y el aceptor de energía es fluorescente. En otros tipos de sistemas interactivos de marcaje, el donador de energía es luminiscente, por ejemplo, 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 inactivadora, respectivamente.
- 20 Preferentemente, la señal indicadora de la presencia del dúplex extendido (es decir, la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana) es generada por sistemas interactivos de marcaje, más preferentemente por el sistema de marcaje FRET (es decir, un sistema interactivo de marcaje doble).

Primera realización (marcaje interactivo doble intracatenario)

- 25 En una primera 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 inactivadora; la fusión del dúplex 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 realización del sistema interactivo de marcaje doble se ilustra en las Figuras 2, 6 y 9. La primera realización se denomina marcaje interactivo doble intracatenario.

Primera realización plasmada en la Figura 2 (marcaje interactivo doble intracatenario)

- 30 La realización mostrada a modo de ejemplo que se describe aparece esquematizada en la Figura 2. El segmento plantilla del CTO contiene una molécula indicadora y una molécula inactivadora. 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 dúplex extendido.

- 35 Cuando el dúplex extendido se forma en la etapa (d), la molécula indicadora y la molécula inactivadora del CTO quedan separadas por conformación y eso impide que la molécula inactivadora atenúe la señal emitida por la molécula indicadora; cuando el dúplex extendido se fusiona en la etapa (e), la molécula indicadora y la molécula inactivadora 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 dúplex extendido en la etapa (e).

- 40 La expresión usada en el presente documento "la molécula indicadora y la molécula inactivadora 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 enrollamiento al azar o una horquilla.

- 45 La expresión usada en el presente documento "la molécula indicadora y la molécula inactivadora 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.

Preferentemente, 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).

- 50 De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora y la molécula inactivadora pueden estar localizadas en cualquier punto del CTO, siempre que la señal de la molécula indicadora pueda ser inactivada y activada en función de la fusión del dúplex extendido.

De acuerdo con una realización preferida, tanto la molécula indicadora como la molécula inactivadora están unidas al segmento plantilla o al segmento de captura del CTO.

De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora y la molécula inactivadora están situadas en el extremo 5' y en el extremo 3' del CTO.

5 De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora o la molécula inactivadora 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 inactiva y activa la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del CTO.

De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora o la molécula inactivadora 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 inactiva y activa la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del CTO.

10 De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora y la molécula inactivadora están separadas como máximo por 80 nucleótidos, preferentemente como máximo por 60 nucleótidos, más preferentemente como máximo por 30 nucleótidos, y mucho más preferentemente como máximo por 25 nucleótidos. De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora y la molécula inactivadora están separadas por al menos 4 nucleótidos, preferentemente por al menos 6 nucleótidos, más preferentemente por al menos 10 nucleótidos, y mucho más preferentemente por al menos 15 nucleótidos.

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

En el caso de que el segmento plantilla del CTO esté marcado con un marcador interactivo doble como el de la Figura 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.

20 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 no diana en la etapa de fusión. En tal caso, la diferencia entre los valores T_m del dúplex extendido y del híbrido permite diferenciar la señal diana del dúplex extendido de la señal no diana del híbrido.

Primera realización plasmada en la Figura 6 (marcaje interactivo doble intracatenario)

25 La realización mostrada a modo de ejemplo que se describe aparece esquematizada en la Figura 6. El segmento de marcaje en 5' del PTO contiene una molécula indicadora y una molécula inactivadora. 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 inactivadora. El fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO.

30 Cuando el dúplex extendido se forma en la etapa (d), la molécula indicadora y la molécula inactivadora del fragmento quedan separadas conformacionalmente y eso impide que la molécula inactivadora atenúe la señal emitida por la molécula indicadora; cuando el dúplex extendido se fusiona en la etapa (e), la molécula indicadora y la molécula inactivadora 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 dúplex extendido en la etapa (e).

35 De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora y la molécula inactivadora pueden estar localizadas en cualquier punto del fragmento, siempre que la señal de la molécula indicadora sea inactivada y activada en función de la fusión del dúplex extendido.

De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora o la molécula inactivadora 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 inactiva y activa la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del fragmento.

40 De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora y la molécula inactivadora están separadas entre sí como máximo por 50 nucleótidos, preferentemente como máximo por 40 nucleótidos, más preferentemente como máximo por 30 nucleótidos, y mucho más preferentemente como máximo por 20 nucleótidos. De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora y la molécula inactivadora están separadas por al menos 4 nucleótidos, preferentemente por al menos 6 nucleótidos, más preferentemente por al menos 10 nucleótidos, y mucho más preferentemente por al menos 15 nucleótidos.

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

Segunda realización (marcaje interactivo doble intracatenario)

50 En la segunda realización del sistema interactivo de marcaje doble, el fragmento tiene un marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora y una molécula inactivadora y el CTO posee otro marcador interactivo doble; la fusión del dúplex 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 realización mostrada a modo de ejemplo que se describe aparece esquematizada en la Figura 8.

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

Preferentemente, 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 inactivadora 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 inactivadora en el dúplex extendido.

De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora o la molécula inactivadora situadas en el fragmento del PTO está localizada en el extremo 5' del segmento de marcaje en 5'.

De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora o la molécula inactivadora situada en el CTO está localizada en el extremo 3'.

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

La molécula indicadora y la molécula inactivadora 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), DiDDilC(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. Preferentemente, la molécula indicadora y la molécula inactivadora incluyen JOE, FAM, TAMRA, ROX y un marcador a base de fluoresceína.

Los pares más adecuados de molécula indicadora-molécula inactivadora se exponen en diversas publicaciones citadas a continuación: Pesce y col., editores, Fluorescence Spectroscopy (Marcel Dekker, Nueva York, 1971); White y col., Fluorescence Analysis: A Practical Approach (Marcel Dekker, Nueva York, 1970); Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2a Edición (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, 6a Edición (Molecular Probes, Eugene, Oreg., 1996), Patentes de EE. UU. N.º 3.996.345 y 4.351.760.

Es destacable que en la presente invención se pueda utilizar una molécula inactivadora 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 inactivadora abarca a la otra pareja (aceptora) de FRET. Por ejemplo, un colorante de fluoresceína se usa como indicador y un colorante de rodamina como inactivador.

(i-2) Marcador único

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.

5 De acuerdo con una realización preferida, el fragmento o el CTO tienen un solo marcador, y la fusión del dúplex extendido en la etapa (e) induce el cambio de señal del marcador único que da lugar a la señal diana en la etapa (e).

Primera realización en la Figura 3 (sistema de marcaje sencillo)

10 La realización ejemplificada se describe con referencia a la Figura 3. El segmento plantilla 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 dúplex extendido. Con la formación del dúplex extendido, la intensidad de la fluorescencia emitida por el marcador fluorescente sencillo aumenta. Cuando el dúplex 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 dúplex extendido en la etapa (e).

15 De acuerdo con una realización preferida, el marcador único puede estar localizado en cualquier punto del CTO, siempre que el nivel de la señal emitida por el marcador único cambie en función de la fusión del dúplex extendido.

De acuerdo con una realización preferida, el marcador único está unido al segmento plantilla o al segmento de captura del CTO.

20 En el caso de que el segmento plantilla del CTO esté marcado con un marcador único como el de la Figura 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.

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

Segunda realización en la Figura 7 (sistema de marcaje sencillo)

30 La realización ejemplificada se describe con referencia a la Figura 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 dúplex 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 dúplex extendido en la etapa (e).

35 De acuerdo con una realización preferida, el marcador único puede estar localizado en cualquier punto del fragmento del PTO, siempre que el nivel de la señal emitida por el marcador único cambie en función de la fusión del dúplex extendido.

Como se representa en la Figura 7, el híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO proporciona una señal no diana en la etapa de fusión. En tal caso, la diferencia entre el valor de T_m del dúplex extendido y el del híbrido permite diferenciar la señal diana emitida por el dúplex extendido de la señal no diana emitida por el híbrido.

40 El marcador único 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 único puede ser un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador quimioluminiscente, un marcador electroquímico o un marcador metálico. Preferentemente, el marcador único consiste en un marcador fluorescente.

45 Los tipos y los puntos de unión preferibles para los marcadores fluorescentes sencillos usados en la presente 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 el presente documento como referencia en su integridad. Preferentemente, 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'.

50 El marcador fluorescente sencillo útil para la presente invención puede describirse en referencia a descripciones de moléculas indicadora y inactivadora 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 único, 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 realización del sistema de marcaje sencillo con el CTO inmovilizado se ilustra en la Figura 12.

Cuando se emplea el CTO inmovilizado sobre el sustrato sólido pueden usarse marcadores químicos (por ejemplo, biotina) o enzimáticos (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa, β -galactosidasa y β -glucosidasa).

- 5 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 dúplex extendido es superior al del híbrido formado entre el PTO sin escindir y el CTO.
- 10 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 no diana, el intervalo que incluya el valor de T_m del híbrido puede ser utilizado para seleccionar el valor de T_m del dúplex extendido para detectar la secuencia de ácido nucleico diana.

(ii) Marcador incorporado al dúplex extendido

- 15 La presente invención puede emplear un marcador incorporado al dúplex extendido durante la reacción de extensión para proporcionar la señal diana que indique la presencia del dúplex extendido.

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

20

De acuerdo con una realización preferida, la señal diana la proporciona un marcador único incorporado al dúplex extendido durante la reacción de extensión; el marcador único incorporado está unido a un nucleótido que se incorpora durante la reacción de extensión; la fusión del dúplex extendido en la etapa (e) provoca un cambio de la señal emitida por el marcador único que da lugar a la señal diana en la etapa (e).

- 25 La realización mostrada a modo de ejemplo que se describe aparece esquematizada en la Figura 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 dúplex extendido. La señal fluorescente emitida por el dúplex extendido puede ser detectada directamente en el sustrato sólido que acoge el CTO inmovilizado. Cuando el dúplex extendido se fusiona, la hebra portadora del marcador fluorescente se libera y la señal fluorescente deja de detectarse directamente (no mostrado en la Figura 10). Por tanto, la fusión del dúplex extendido puede proporcionar directamente un cambio de la señal. A este respecto, se emite la señal diana que indica la presencia del dúplex extendido en la etapa (e).
- 30

- 35 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.

De acuerdo con una 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 Figura 11. El nucleótido dotado de la segunda base no natural está localizado preferentemente en cualquier punto del segmento plantilla del CTO.

- 40 El término "base no natural" tal y como se usa en el presente documento 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. La frase "base no natural" tal y como se emplea en el presente documento 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.
- 45

Los ejemplos específicos 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).

- 50 La realización mostrada a modo de ejemplo que se describe aparece esquematizada en la Figura 11. El fragmento se hibrida con el CTO que incorpora un nucleótido dotado de una segunda base no natural (por ejemplo, iso-dC) que tiene una afinidad de unión específica hacia una primera base no natural (por ejemplo, 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 dúplex 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 dúplex extendido puede ser detectada directamente en el sustrato sólido que acoge el CTO inmovilizado. Cuando el dúplex extendido se fusiona, la hebra portadora del marcador fluorescente se libera y la señal fluorescente deja de detectarse directamente (no mostrado en la Figura 11). Por tanto, la fusión del dúplex extendido puede proporcionar directamente un cambio de la señal. A este respecto, se emite la señal diana que indica la presencia del dúplex extendido en la etapa (e).

Donde se emplea la incorporación del marcador al dúplex 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. Por lo tanto, 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 el presente documento.

(iii) Marcador incorporado al dúplex 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 dúplex 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.

De acuerdo con una realización preferida, la señal diana se proporciona por un marcador incorporado al dúplex 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 inactivadora; la fusión del dúplex 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 preferentemente, 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 realización mostrada a modo de ejemplo que se describe aparece esquematizada en la Figura 4. El fragmento que se hibrida con el CTO comprende una molécula indicadora o inactivadora y un nucleótido dotado de una segunda base no natural (por ejemplo, iso-dC) que tiene una afinidad de unión específica hacia una primera base no natural (por ejemplo, iso-dG). La extensión se lleva a cabo en presencia de un nucleótido dotado con la primera base no natural marcada con una molécula inactivadora o indicadora, y da lugar a un dúplex extendido en el que la señal emitida por la molécula indicadora es atenuada por la molécula inactivadora. 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 dúplex extendido se fusiona en la etapa (e), la molécula indicadora y la molécula inactivadora quedan separadas, lo que impide que la molécula inactivadora atenúe la señal emitida por la molécula indicadora, de ese modo la señal diana es emitida e indica la presencia del dúplex extendido en la etapa (e).

Preferentemente, 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.

Aún más preferentemente, el segmento plantilla del CTO incorpora una molécula indicadora o inactivadora 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 inactivadora 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 dúplex extendido en la etapa (d) forman un par de bases que inactiva la señal de la molécula indicadora por efecto de la molécula inactivadora y provocan así el cambio de la señal, que proporciona la señal diana. Como alternativa, el fragmento posee una molécula indicadora o inactivadora y el segmento plantilla 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 inactivadora 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 dúplex extendido en la etapa (d) forman un par de bases que inducen un cambio en la señal de la molécula indicadora por inactivación, proporcionando así la señal diana.

Otra realización mostrada a modo de ejemplo que se describe aparece esquematizada en la Figura 5. En esta realización, el fragmento dotado con una molécula indicadora o inactivadora se hibrida con el CTO que comprende un nucleótido dotado de una segunda base no natural (por ejemplo, iso-dC) que tiene una afinidad de unión específica hacia una primera base no natural (por ejemplo, iso-dG). La extensión se lleva a cabo en presencia de un

nucleótido dotado de la primera base no natural marcada con una molécula inactivadora o indicadora, y da lugar a un dúplex extendido en el que la señal emitida por la molécula indicadora es atenuada por la molécula inactivadora. 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.

5 Cuando el dúplex extendido se forma en la etapa (d), la molécula indicadora y la molécula inactivadora quedan separadas conformacionalmente y eso impide que la molécula inactivadora atenúe la señal emitida por la molécula indicadora; cuando el dúplex extendido se fusiona en la etapa (e), la molécula indicadora y la molécula inactivadora 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 dúplex extendido en la etapa (e).

10 Preferentemente, 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.

15 Si se opta por la incorporación del marcador al dúplex 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. Por lo tanto, el híbrido no proporciona una señal que no sea la diana en la etapa de fusión.

(iv) Marcador intercalante

20 La presente invención puede emplear un marcador intercalante para proporcionar la señal diana indicadora de la presencia del dúplex 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.

25 Los colorantes intercalantes ejemplificados que son útiles para esta invención son: SYBR™ Green I, PO-PRO™-1, BO-PRO™-1, SYTO™43, SYTO™44, SYTO™45, SYTOX™ Blue, POPO™-1, POPO™-3, BOBO™-1, BOBO™-3, LO-PRO™-1, JO-PRO™-1, YO-PRO™1, TO-PRO™1, SYTO™11, SYTO™13, SYTO™15, SYTO™16, SYTO™20, SYTO™23, TOTO™-3, YOYO™3, GelStar™ y naranja de tiazol. Los colorantes intercalantes se intercalan específicamente en las moléculas de ácido nucleico bicatenarias para generar las señales.

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

35 La realización mostrada a modo de ejemplo que se describe aparece esquematizada en la Figura 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 (por ejemplo, SYBR™ Green) y produce el dúplex extendido con colorantes intercalados. La señal fluorescente emitida por el dúplex extendido directamente en el sustrato sólido portador del CTO inmovilizado puede ser detectada mediante colorantes intercalantes fluorescentes. Cuando el dúplex extendido se fusiona, los colorantes intercalantes fluorescentes se liberan y la señal fluorescente deja de detectarse directamente (no mostrado en la Figura 13). A este respecto, se emite la señal diana que indica la presencia del dúplex extendido en la etapa (e).

40 El híbrido formado entre el PTO sin escindir y el CTO proporciona una señal no diana en la etapa de fusión. En este caso, la diferencia entre el valor de T_m del dúplex extendido y el del híbrido permite diferenciar la señal diana emitida por el dúplex extendido de la señal no diana emitida por el híbrido (no mostrado en la Figura 13).

Preferentemente, 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).

Etapa (f): Detección de la señal diana

45 Por último, el dúplex extendido se detecta con la medición de la señal diana en la etapa (e); la presencia del dúplex 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.

De acuerdo con una realización preferida, la detección de la señal diana se lleva a cabo mediante un análisis de la fusión.

50 El término "análisis de la fusión" tal y como se utiliza en el presente documento significa un procedimiento en que la señal diana indicadora de la presencia del dúplex extendido se obtiene mediante la fusión del dúplex extendido, e incluye un procedimiento para medir señales a dos temperaturas distintas, análisis de la curva de fusión, análisis del perfil de fusión o análisis del pico de fusión. Preferentemente, el análisis de la fusión consiste en un análisis de la

curva de fusión.

De acuerdo con una realización preferida, a la fusión de la etapa (e) le sigue la hibridación que proporciona la señal diana indicadora de la presencia del dúplex extendido. En ese caso, la presencia del dúplex extendido se detecta mediante el análisis de la curva de fusión.

5 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, Drobyshev y col., Gene 188: 45(1997); Kochinsky and Mirzabekov Human Mutation 19:343(2002); Livehits y col. J. Biomol. Structure Dynam.11:783(1994); y Howell y col. 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 ejemplo fluorescencia, que indica el grado de estructura del dúplex (la magnitud de la hibridación), representada en el eje Y y el parámetro de hibridación en el eje X.

15 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.

20 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' de la porción elegida como diana 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 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. Por lo tanto, si la escisión del PTO ocurre en varios puntos de la parte del extremo 5' de la porción elegida como diana 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 cadena arriba, se pueden generar fragmentos del PTO con distintas partes del extremo 5' de la porción elegida como diana en 3'. En tales casos, 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.

40 De acuerdo con una realización preferida, el procedimiento comprende, además, la repetición de las etapas (a)-(b), (a)-(d) o (a)-(f) preferentemente con desnaturalización entre los ciclos repetidos, con un cebador situado cadena abajo. Dicha repetición permite amplificar la secuencia de ácidos nucleicos diana y/o la señal diana.

De acuerdo con una 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.

45 De acuerdo con una 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 (particularmente, la temperatura).

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.

5 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, y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); y en Noonan, K. F. y col., 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.

10 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.

15 La presente invención también es útil para la detección de variaciones nucleotídicas. Preferentemente, la secuencia de ácidos nucleicos diana comprende una variación nucleotídica. El término "variación nucleotídica" tal y como se usa en el presente documento 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. 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 (por ejemplo, variaciones en el gen MTHFR, metileno-tetrahidrofolato-reductasa), variaciones implicadas en la farmacoresistencia de los microbios patógenos y variaciones relacionadas con la tumorigénesis.

20 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 variación se describe como plantilla 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 plantilla desapareado.

25 Para la detección de variaciones nucleotídicas, el extremo 3' del cebador situado cadena arriba se puede diseñar para quedar situado en oposición al punto de la variación nucleotídica en la secuencia de ácidos nucleicos diana. De acuerdo con una realización preferida, el extremo 3' del cebador situado cadena arriba tiene una secuencia complementaria con la variación nucleotídica de la secuencia de ácidos nucleicos diana. El extremo 3' del cebador situado cadena arriba portador de la secuencia complementaria con la variación nucleotídica de la secuencia de ácidos nucleicos diana se hibrida con el plantilla 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 cebador situado cadena arriba no concuerda con la variación nucleotídica en un plantilla 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 cadena arriba esté hibridado con el plantilla desapareado, lo que tiene como consecuencia que no se genere la señal diana.

30 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 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 plantilla 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 plantilla desapareado cuya secuencia no es complementaria con la posición de la variación nucleotídica y no se escinde. Preferentemente, en este caso, la secuencia complementaria con la variación nucleotídica del PTO está situada en mitad de la porción elegida como diana en 3' del PTO.

35 Como alternativa, es preferible que la parte del extremo 5' de la porción elegida como diana 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' de la porción elegida como diana en 3' del PTO tenga una secuencia complementaria con la variación nucleotídica de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

40 En una realización para la detección de una variación mononucleotídica, el extremo 5' de la porción elegida como diana 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 plantilla apareado puede inducirse en el punto inmediatamente adyacente en dirección 3' al extremo 5' de la porción elegida como diana en 3' del PTO, por ejemplo, en las condiciones de inducción de la escisión dependiente de la extensión del cebador situado cadena 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 dúplex

- extendido, proporcionando así la señal diana. Si el mismo PTO se hibrida con un plantilla desapareado cuya secuencia es idéntica a la del plantilla 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' de la porción elegida como diana en 3' del PTO. 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 dúplex extendido, el dúplex tendrá un valor de T_m distinto del dúplex derivado de la hibridación del PTO con el plantilla desapareado.
- 5 De acuerdo con una realización preferida, el punto de escisión del PTO cuya secuencia es complementaria con la variación nucleotídica en su parte del extremo 5' de la porción elegida como diana en 3' difiere dependiendo de si la hibridación tiene lugar con un plantilla apareado o con uno desapareado, de modo que el fragmento del PTO desprendido de cada hibridación tiene una secuencia distinta, preferentemente en la parte del extremo 3' y más preferentemente en el propio extremo 3'.
- 10 De acuerdo con una 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 plantilla apareado del plantilla desapareado.
- 15 De acuerdo con una 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 sustancialmente la sensibilidad y la especificidad de la detección de la diana en la presente invención.
- 20 En una realización preferida, el procedimiento se lleva a cabo en presencia de un cebador situado cadena abajo.
- Las ventajas de la presente invención pueden ser evidentes en la detección simultánea ("multiplexada") de dos secuencias de ácidos nucleicos diana al menos.
- 25 De acuerdo con una realización preferida, el procedimiento tiene por finalidad detectar al menos dos tipos (más preferentemente, al menos tres tipos, y aún más preferentemente al menos cinco tipos) de secuencias de ácidos nucleicos diana.
- De acuerdo con una realización preferida, el procedimiento se realiza para detectar al menos dos tipos (más preferentemente, al menos tres tipos, y aún más preferentemente al menos cinco tipos) de secuencias de ácidos nucleicos diana; en el mismo el oligonucleótido situado cadena arriba comprende al menos dos tipos (más preferentemente al menos tres tipos, y aún más preferentemente al menos cinco tipos) de oligonucleótidos, el PTO comprende al menos dos tipos (más preferentemente al menos tres tipos, y aún más preferentemente al menos cinco tipos) de los PTO y el CTO comprende al menos un tipo (Preferentemente al menos dos tipos, más preferentemente al menos tres tipos, y aún más preferentemente al menos cinco tipos) del CTO; cuando al menos concurren dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana, el procedimiento proporciona al menos dos tipos de señales diana que corresponden al menos a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana.
- 30 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.
- 35 Adicionalmente, 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.
- De acuerdo con una realización preferida, los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos corresponden al menos a dos tipos de las secuencias de ácidos nucleicos diana que tienen distintos valores de T_m .
- 40 De acuerdo con una realización preferida, los al menos dos tipos de señales diana correspondientes al menos a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana proceden de distintos tipos de marcadores entre sí.
- De acuerdo con una realización preferida, los al menos dos tipos de señales diana correspondientes al menos a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana proceden del mismo tipo de marcadores.
- 45 De acuerdo con una realización preferida, los al menos 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 entre sí.
- 50

El término “distintos tipos de marcadores” tal y como se utiliza en el presente documento 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 entre sí.

- 5 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 al menos a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana tienen valores de T_m distintos, es posible detectar al menos dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana aunque se utilice un solo tipo de marcador (por ejemplo, FAM).

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

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.

- 15 De acuerdo con una 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.

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.

- 20 De acuerdo con una realización preferida, la señal diana la proporciona un solo marcador unido al fragmento o un solo marcador incorporado al dúplex 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 único, 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 (por ejemplo, biotina) o enzimáticos (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa, β -galactosidasa y β -glucosidasa).

- 25 Para la reacción en fase sólida, el CTO se inmoviliza directa o indirectamente (preferentemente de forma indirecta) por su extremo 5' o por su extremo 3' (preferentemente 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.

- 30 De acuerdo con una 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 expertas en la técnica. Todos los procedimientos 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 (por ejemplo, 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 (por ejemplo, poliestireno, polietileno, polipropileno y poli(acrilamida)), 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.

- 35 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.

50 **II. 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 cadena arriba y otro cebador situado cadena abajo capaces de sintetizar la secuencia de ácidos nucleicos diana.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento 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), que comprende:

- 5 (a) hibridación de las secuencias de ácidos nucleicos diana con una pareja de cebadores que comprende un cebador situado cadena arriba y otro cebador situado cadena abajo y un PTO (Oligonucleótido de sondeo y marcaje); en que tanto el cebador situado cadena arriba como el cebador situado cadena abajo comprenden una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana; el PTO comprende: (i) una porción elegida como diana en 3' que comprende una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana; y (ii) un segmento de marcaje en 5' que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana; dicha porción elegida como diana 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 cadena arriba y el cebador situado cadena abajo; dicho PTO está bloqueado en su extremo 3' para impedir su extensión;
- 10 (b) puesta en contacto del resultado de la etapa (a) con una polimerasa de ácidos nucleicos dependiente de plantilla 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 cadena arriba se extiende y la hebra extendida induce la escisión del PTO por la polimerasa de ácidos nucleicos dependiente de plantilla 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;
- 15 (c) hibridación del fragmento desprendido del PTO con el CTO (Oligonucleótido de captura y plantilla); 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 plantilla que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con el segmento de marcaje en 5' y la porción elegida como diana en 3'; en que el fragmento desprendido del PTO se hibrida con los segmentos de captura del CTO;
- 20 (d) realización de una reacción de extensión con el resultado de la etapa (c) y la polimerasa de ácidos nucleicos dependiente de plantilla; en la cual el fragmento hibridado con el segmento de captura del CTO se extiende y forma un dúplex extendido; este dúplex 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;
- 25 (e) fusión del dúplex extendido a lo largo de un intervalo de temperaturas que da una señal diana indicadora de la presencia del dúplex 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 dúplex extendido durante la reacción de extensión, (iii) un marcador incorporado al dúplex extendido durante la reacción de extensión y un marcador unido al fragmento y/o al CTO, o (iv) un marcador intercalante; y
- 30 (f) detección del dúplex extendido mediante la medición de la señal diana; en la cual la presencia del dúplex extendido indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

35 Como la realización preferible de la presente invención sigue las etapas del presente procedimiento antes descritas, las descripciones comunes de ambas se han omitido para evitar la redundancia innecesaria que complicaría la presente memoria descriptiva.

40 De acuerdo con una realización preferida, el procedimiento 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. Preferentemente, 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.

45 De acuerdo con una realización preferida, el procedimiento se realiza para detectar al menos dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana.

50 De acuerdo con una realización preferida, los al menos 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 entre sí.

III. Procedimiento de detección de la diana mediante PTOCE que comprende la detección a una temperatura predeterminada

55 La presente invención puede modificarse para utilizar una señal diana generada en asociación con la formación del dúplex extendido.

En otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un procedimiento 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), que comprende:

(a) hibridación de la secuencia de ácidos nucleicos diana con un oligonucleótido situado cadena arriba y un PTO (Oligonucleótido de sondeo y marcaje); en la que dicho oligonucleótido situado cadena arriba comprende una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana; el PTO comprende: (i) una porción elegida como diana en 3' que comprende una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana; y (ii) un segmento de marcaje en 5' que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana; dicha porción elegida como diana 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 cadena 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; en la cual el oligonucleótido situado cadena 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;

(c) hibridación del fragmento desprendido del PTO con un CTO (Oligonucleótido de captura y plantilla); 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 plantilla que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con el segmento de marcaje en 5' y la porción elegida como diana en 3'; 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 plantilla; en la cual el fragmento hibridado con el segmento de captura del CTO se extiende hasta formar un dúplex extendido; el valor de T_m del dúplex 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 dúplex extendido proporciona una señal diana mediante (i) al menos un marcador unido al fragmento y/o al CTO; (ii) un marcador incorporado al dúplex extendido durante la reacción de extensión; (iii) al menos un marcador unido al fragmento y/o al CTO y un marcador incorporado al dúplex extendido durante la reciente extensión; o (iv) un marcador intercalante; y

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

30 Como la realización preferida de la presente invención sigue las etapas del presente procedimiento 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 memoria descriptiva.

La presente invención con el análisis de la fusión descrito antes requiere la detección de señales emitidas por marcadores al menos a dos temperaturas distintas porque la señal diana la da la medición del cambio de la señal proporcionada por la fusión del dúplex extendido.

Es improbable, en este aspecto de la presente invención, que el dúplex 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 predeterminada en la que el dúplex extendido mantiene su forma bicatenaria, que permite determinar la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

40 La presente invención consiste en medir la señal diana junto con la formación del dúplex extendido, para la detección de la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

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

45 Preferentemente, la señal diana incluye una señal (generación o extinción de la señal) emitida por el marcador incorporado al dúplex extendido a una temperatura predeterminada.

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

50 El principio de funcionamiento de la señal diana emitida por el dúplex 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

(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 dúplex extendido mantiene la señal diana.

La realización mostrada a título de ejemplo del principio de funcionamiento (i) puede ser descrita con referencia a la Figura 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 plantilla del CTO inmovilizado contiene una molécula indicadora y una molécula inactivadora. La molécula indicadora y la molécula inactivadora 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 inactivadora atenúa la señal emitida por la molécula indicadora.

Con la formación del dúplex extendido, la molécula indicadora y la molécula inactivadora 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 Figura 9).

5 En la Figura 9, el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO no forma un dúplex extendido. Por tanto, la molécula inactivadora sigue atenuando la señal emitida por la molécula indicadora. El híbrido no proporciona una señal que no sea la diana.

10 La realización mostrada a título de ejemplo sobre el principio de funcionamiento (ii) puede ser descrita con referencia a la Figura 6. La figura ilustra el presente aspecto, así como el procedimiento que utiliza el análisis de la fusión. El segmento de marcaje en 5' del PTO contiene una molécula indicadora y una molécula inactivadora. La molécula inactivadora y la molécula inactivadora 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 inactivadora, y este fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO. Con la hibridación, la molécula inactivadora y la molécula inactivadora 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 dúplex extendido mantiene la señal diana (C y D en la Figura 6).

20 En la Figura 6, el híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO proporciona una señal no diana (C y D en la Figura 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. De acuerdo con una realización preferida, la temperatura además se determina teniendo en cuenta el valor de T_m del híbrido.

De acuerdo con una realización preferida, el dúplex extendido puede ser detectado a temperaturas en las que el híbrido queda parcialmente disociado.

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

De acuerdo con una realización preferida, la señal diana proporcionada por el dúplex extendido es dada 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.

30 De acuerdo con una realización preferida, la señal diana proporcionada por el dúplex extendido se da por la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) y la formación del dúplex 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 predeterminada es superior a la del valor de T_m del híbrido, tal y como se representa en las Figuras 5-8 y 12-13.

35 Cuando el híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO proporciona una señal no diana (Panel D en la Figura 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 como sigue:

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

(I-1) Marcador interactivo doble

40 En una realización de un sistema de marcaje interactivo doble, el CTO incorpora un marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora y una molécula inactivadora; 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 realización del sistema de marcaje interactivo doble se ilustra en la Figura 2. La señal diana se da por la generación de la señal sincronizada con la extensión.

45 De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora y la molécula inactivadora están ubicadas en el segmento plantilla del CTO.

De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora o la molécula inactivadora 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 inactiva y activa la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del CTO.

50 En una realización de un sistema de marcaje interactivo doble, el CTO incorpora un marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora y una molécula inactivadora; 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 dúplex extendido mantiene la señal diana.

De acuerdo con la realización preferida, la molécula indicadora y la molécula inactivadora pueden estar ubicadas en el segmento de captura del CTO.

5 De acuerdo con la realización preferida, la molécula indicadora o la molécula inactivadora 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 inactiva y activa la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del CTO.

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

10 En una descripción de un sistema de marcaje interactivo doble, el fragmento incorpora un marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora y una molécula inactivadora; 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 dúplex extendido mantiene la señal diana. La primera realización del sistema de marcaje interactivo doble se ilustra en la Figura 6.

15 De acuerdo con la realización preferida, la molécula indicadora o la molécula inactivadora 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 inactiva y activa la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del fragmento.

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

20 En una realización del sistema de marcaje interactivo doble, el fragmento incorpora una parte del marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora y una molécula inactivadora 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 dúplex extendido mantiene la señal diana. La realización del sistema de marcaje interactivo doble se ilustra en la Figura 8.

La molécula indicadora y la molécula inactivadora 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 inactivadora.

25 De acuerdo con la realización, la molécula indicadora o la molécula inactivadora situadas en el fragmento PTO está localizada, preferentemente, en su extremo 5'.

De acuerdo con la realización, la molécula indicadora o la molécula inactivadora situada en el CTO está localizada, preferentemente, en su extremo 5'.

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

(I-2) Marcador único

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

De acuerdo con la realización, el segmento plantilla del CTO está marcado con el marcador único.

En una realización de un sistema de marcaje sencillo, el CTO incorpora un marcador único 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 dúplex extendido mantiene la señal diana.

40 De acuerdo con la realización, el segmento de captura del CTO está marcado con el marcador único.

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

45 En una realización de un sistema de marcaje sencillo, el fragmento incorpora un marcador único 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 dúplex extendido mantiene la señal diana. La realización del sistema de marcaje sencillo se ilustra en la Figura 12.

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

El marcador único 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 único puede ser un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador quimioluminiscente, un marcador electroquímico o un marcador metálico. Preferentemente, el marcador único consiste en un marcador fluorescente. 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 en su integridad a el presente documento como referencia. Preferentemente, 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 que es útil para la presente invención puede ser descrito en referencia a las descripciones de las moléculas indicadora y inactivadora 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 único, 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.

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

En una 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 Figuras 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 dúplex extendido es superior a la del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO, tal y como aparece representado en las Figuras 6-8 y 12.

25 (ii) Marcador incorporado al dúplex extendido

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 Figuras 10 y 11.

De acuerdo con una realización preferida, la señal diana la proporciona un marcador único incorporado al dúplex extendido durante la reacción de extensión; el marcador único 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 único que da lugar a la señal diana en la etapa (d).

De acuerdo con una 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 Figura 11. El nucleótido dotado de la segunda base no natural está localizado preferentemente en cualquier punto del segmento plantilla del CTO.

Si se opta por la incorporación del marcador al dúplex 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. Por lo tanto, el híbrido no proporciona una señal que no sea la diana.

(iii) Marcador incorporado al dúplex 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 dúplex 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.

De acuerdo con una realización preferida, la señal diana la proporciona un marcador incorporado al dúplex 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 inactivadora; la extensión del fragmento en la etapa (d) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble que proporciona la señal diana.

Más preferentemente, 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.

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

Si se opta por la incorporación del marcador al dúplex 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. Por lo tanto, el híbrido no proporciona una señal que no sea la diana.

(iv) Marcador intercalante

5 La presente invención puede emplear un marcador intercalante para proporcionar la señal diana indicadora de la presencia del dúplex 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.

10 La realización mostrada a modo de ejemplo que se describe aparece esquematizada en la Figura 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 (por ejemplo, SYBR™ Green) y forma el dúplex extendido con colorantes intercalados.

15 En la Figura 13, el híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO proporciona una señal no diana (C y D en la Figura 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.

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

De acuerdo con una realización preferida, el PTO y/o el CTO están bloqueados en su extremo 3' para impedir su extensión.

20 De acuerdo con una realización preferida, el oligonucleótido situado cadena arriba es un cebador o una sonda situados cadena arriba.

De acuerdo con una realización preferida, el oligonucleótido situado cadena arriba puede estar ubicado junto al PTO en la medida en que el oligonucleótido situado cadena arriba induzca la escisión del PTO por la enzima dotada de actividad 5'-nucleasa.

25 De acuerdo con una realización preferida, el cebador situado cadena arriba induce a través de su hebra extendida la escisión del PTO por la enzima dotada de actividad 5'-nucleasa.

De acuerdo con una realización preferida, el procedimiento además comprende la repetición de las etapas (a)-(b), (a)-(d) o (a)-(e) con desnaturalización entre los ciclos repetidos.

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

30 De acuerdo con una realización preferida, el procedimiento se realiza para detectar al menos dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana; de forma que el oligonucleótido situado cadena 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 al menos están presentes dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana, el procedimiento proporciona al menos dos tipos de señales diana correspondientes al menos a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana.

35 De acuerdo con una realización preferida, el oligonucleótido situado cadena arriba es un cebador situado cadena arriba y la etapa (b) usa una polimerasa de ácidos nucleicos dependiente de plantilla para la extensión del cebador situado cadena arriba.

40 De acuerdo con una 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.

De acuerdo con una realización preferida, la señal diana es provista por un marcador único unido al fragmento o por un marcador único incorporado al dúplex extendido durante la reacción de extensión.

De acuerdo con una realización preferida, el procedimiento se lleva a cabo en presencia de un cebador situado cadena abajo (*downstream*).

45 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 predeterminada (en tiempo real), al final de la repetición a una temperatura predeterminada (punto final) o a cada uno de los intervalos de tiempo prefijados durante la repetición a una temperatura predeterminada. 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.

50

IV. Kits para la detección de la diana

En otro aspecto de esta invención se proporciona un kit 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:

- 5 (a) un oligonucleótido situado cadena arriba que comprende una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana;
- (b) un PTO (Oligonucleótido de sondeo y marcaje) que comprende: (i) una porción elegida como diana en 3' que comprende una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana; y (ii) una porción elegida como diana en 5' que comprende una secuencia nucleotídica que no es complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana, en que la porción elegida como diana 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 cadena arriba está localizado antes del PTO; el oligonucleótido situado cadena 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
- 10 (c) un CTO (Oligonucleótido de captura y plantilla) 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 plantilla que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con el segmento de marcaje en 5' y la porción elegida como diana 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 plantilla hasta formar un dúplex extendido.
- 15
- 20

Como el kit de esta invención se construye para ejecutar el procedimiento 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 memoria descriptiva.

25

De acuerdo con una realización preferida, el kit además comprende una enzima dotada de actividad 5'-nucleasa.

De acuerdo con una realización preferida, el kit además comprende una polimerasa de ácidos nucleicos dependiente de plantilla.

De acuerdo con una realización preferida, el PTO y/o el CTO tienen al menos un marcador.

30 De acuerdo con una realización preferida, el kit además comprende un marcador que se ha de incorporar al dúplex extendido durante la reacción de extensión.

De acuerdo con una realización preferida, el kit además comprende un marcador que ha de incorporarse al dúplex extendido durante la reacción de extensión y el PTO y/o el CTO tienen al menos un marcador.

De acuerdo con una realización preferida, el kit además comprende un marcador intercalante.

35 De acuerdo con una realización preferida, el marcador es un marcador único o un marcador interactivo doble.

De acuerdo con una realización preferida, el kit se usa para la detección de al menos dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos, el oligonucleótido situado cadena 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.

40 De acuerdo con una realización preferida, el CTO permanece inmovilizado por su extremo 5' o su extremo 3' en un sustrato sólido.

De acuerdo con una realización preferida, el kit además comprende un oligonucleótido situado cadena abajo.

Todos los presentes kits descritos en el presente documento 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 kits también pueden incluir varias moléculas polinucleotídicas, transcriptasa inversa, diversos tampones y reactivos, y anticuerpos que inhiben la actividad de la ADN-polimerasa. Los kits 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 kits normalmente se adaptan para contener los susodichos componentes en envases o en compartimentos separados.

45

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

- (a) La presente invención proporciona un dúplex 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 plantilla)

formando el dúplex extendido. El dúplex 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 dúplex extendido se determina por medio de diversos procedimientos o procedimientos como el análisis de la curva de fusión y la detección a una temperatura predeterminada (por ejemplo, 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 (por ejemplo, FAM). En cambio, el procedimiento 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 dúplex extendido. Asimismo, en la presente invención se pueden usar marcadores incorporados al dúplex 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 dúplex 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 dúplex extendido y no de la secuencia de un producto amplificado, lo cual permite escoger el valor de T_m deseado del dúplex 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 dúplex 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 la porción elegida como diana 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 dúplex 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 dúplex 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 cadena arriba, la escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO.

El dúplex extendido formado durante el ensayo se diseñó para tener un marcador interactivo doble. El marcador interactivo doble incorporado al dúplex extendido fue proporcionado por: (i) CTO marcado con una molécula indicadora y una molécula inactivadora (CTO con marcaje doble); o (ii) PTO dotado de una molécula inactivadora y CTO dotado de una molécula indicadora (un PTO marcado con molécula inactivadora 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 plantilla diana.

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

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

NG-T 5'-

AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTTGTTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATA

CCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

5 NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
 NG-PTO-1 5'-ACGACGGCTTGGCTGCCCTCATTGGCGTGTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 3)
 NG-CTO-1 5'-[BHQ-1]CCTCCTCCTCCTCCTCC[T(FAM)]CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 4)

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

15 La reacción se llevó a cabo con un volumen final de 20 µl que contenían 2 pmol de plantilla sintético (SEQ ID NO: 1) del gen de NG, 10 pmol de cebador situado cadena arriba (SEQ ID NO: 2), 5 pmol de PTO (SEQ ID NO: 3), 2 pmol de CTO (SEQ ID NO: 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.

20 Tal y como muestra la Figura 14, en presencia del plantilla se detectó un pico a 76,5 °C correspondiente al valor de T_m esperado del dúplex extendido. No se detectó ningún pico sin la presencia del plantilla. Como el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO no ofrece ninguna señal en este procedimiento 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 inactivadora y un CTO marcado con molécula indicadora

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

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

NG-T 5'-

AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTTGTTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATA

CCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

30 NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
 NG-PTO-2 5'-[BHQ-1]ACGACGGCTTGGCTTTACTGCCCTCATTGGCGTGTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 5)
 NG-CTO-2 5'-CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[FAM]-3' (SEQ ID NO: 6)

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

35 La reacción se llevó a cabo con un volumen final de 20 µl que contenía 2 pmol de plantilla sintético (SEQ ID NO: 1) del gen de NG, 10 pmol de cebador situado cadena arriba (SEQ ID NO: 2), 5 pmol de PTO (SEQ ID NO: 5), 2 pmol de CTO (SEQ ID NO: 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.

Como se muestra en la Figura 15, en presencia del plantilla se detectó un pico a 77,0 °C correspondiente al valor de T_m esperado del dúplex extendido. Como el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO ofrece una señal no diana en este procedimiento 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.

Estos resultados indican que se produce un dúplex 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 dúplex extendido

Los presentes inventores examinaron en mayor detalle si el valor de T_m de un dúplex extendido es ajustable con la secuencia de CTO en el ensayo PTOCE.

Para el examen, se emplearon tres tipos de CTO cuyos segmentos plantilla tenían secuencias distintas. El PTO no tiene marcador. Los tres tipos de CTO incorporan una molécula inactivadora (BHQ-1) y una molécula indicadora fluorescente (FAM) en los segmentos plantilla. 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.

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

NG-T 5'-

AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTGTTCCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATA

CCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)

NG-PTO-3 5'-ACGACGGCTTGCCCCCTCATTGGCGTGTTTCG[espaciador C3] -3' (SEQ ID NO: 7)

NG-CTO-1 5'-[BHQ-1]CCTCCTCCTCCTCCTCCTCC[T(FAM)]CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3] -3 (SEQ ID NO: 4)

NG-CTO-3 5'-[BHQ-1]TTTTTTTTTTCCTCCTCCAG[T(FAM)]AAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO:8)

NG-CTO-4 5'-[BHQ-1] TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAG[T(FAM)]AAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3] -3' (SEQ ID NO: 9)

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

La reacción se llevó a cabo con un volumen final de 20 µl que contenía 2 pmol de plantilla sintético (SEQ ID NO: 1) del gen de NG, 10 pmol de cebador situado cadena arriba (SEQ ID NO: 2), 5 pmol de PTO (SEQ ID NO: 7), 2 pmol de CTO (SEQ ID NO: 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.

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 plantilla. Cada pico corresponde a la T_m esperada del dúplex extendido generado a partir del CTO examinado. No se detectó ningún pico sin la presencia del plantilla.

Estos resultados indican que el valor de T_m del dúplex 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

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 procedimiento de PCR y la presencia del dúplex extendido se detectó a una temperatura predeterminada en cada ciclo (ensayo PTOCE con detección en tiempo real a temperatura predeterminada) o; (ii) la escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO estuvieron acompañadas por la amplificación de un ácido nucleico diana con el procedimiento de PCR y la presencia del dúplex extendido se detectó mediante un análisis de la fusión tras la PCR (ensayo PTOCE con análisis

de la fusión).

El cebador situado cadena 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 cadena abajo mediante el procedimiento de PCR. La ADN-polimerasa Taq dotada de actividad 5'-nucleasa se usó para la extensión del cebador situado cadena arriba y del cebador situado cadena abajo, la escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO.

El dúplex extendido se diseñó para tener un marcador interactivo doble. El marcador interactivo doble incorporado al dúplex extendido se proporcionó en forma de: (i) CTO marcado con una molécula indicadora y una molécula inactivadora, (ii) un complejo de molécula inactivadora-iso-dGTP incorporado durante la reacción de extensión y CTO dotado de una molécula inactivadora y un residuo iso-dC, o (iii) PTO dotado de una molécula inactivadora 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.

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

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

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

NG-F 5' TACGCCTGCTACTTTTACGCT 3' (SEQ ID NO: 10)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)

NG-PTO-3 5'-ACGACGGCTTGCCCCCTATTGGCGTGTTCG[espaciador C3] -3' (SEQ ID NO: 7)

NG-CTO-1 5'-[BHQ-1]CCTCCTCCTCCTCCTCC[T(FAM)]CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGTC[espaciador C3] -3' (SEQ ID NO: 4)

(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 predeterminada

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 cadena abajo (SEQ ID NO: 10), 10 pmol de cebador situado cadena arriba (SEQ ID NO: 2), 5 pmol de PTO (SEQ ID NO: 7), 2 pmol de CTO (SEQ ID NO: 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 dúplex extendido mantuviera la forma bicatenaria.

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

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

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 plantilla se detectó un pico a 76,0 °C correspondiente al valor de T_m esperado del dúplex extendido. No se detectó ningún pico sin la presencia del plantilla. Como el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO no ofrece ninguna señal en este procedimiento de marcaje, no hubo ningún pico que correspondiera a dicho híbrido.

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

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 inactivadora (dabcyl) se incorpora en la posición complementaria al residuo iso-dC.

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

NG-F 5' TACGCCTGCTACTTTACGCT-3' (SEQ ID NO: 10)
 NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
 NG-PTO-1 5'-ACGACGGCTTGGCTGCCCTCATTGGCGTGTTCG[espaciador C3] -3' (SEQ ID NO: 3)
 NG-CTO-5 5'-[FAM][Iso-dC]CTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3] -3' (SEQ ID NO: 11)

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

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

10 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 cadena abajo (SEQ ID NO: 10), 10 pmol de cebador situado cadena arriba (SEQ ID NO: 2), 5 pmol de PTO (SEQ ID NO: 3), 2 pmol de CTO (SEQ ID NO: 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 desnaturizó 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 dúplex extendido mantuviera la forma bicatenaria.

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

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

20 3-2-2. Ensayo PTOCE con análisis de la fusión

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.

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

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

30 El PTO está marcado con una molécula inactivadora (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 cadena arriba, del cebador situado cadena abajo, del PTO y del CTO usadas en este ejemplo son:

35 NG-F 5'-TACGCCTGCTACTTTACGCT 3' (SEQ ID NO: 10)
 NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
 NG-PTO-4 5'-[BHQ-1]ACGACGGCTTGGCTGCCCTCATTGGCGTGTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 12)
 NG-CTO-2 5'-CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[FAM]-3' (SEQ ID NO: 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 predeterminada

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 cadena abajo (SEQ ID NO: 10), 10 pmol de cebador situado cadena arriba (SEQ ID NO: 2), 5 pmol de PTO (SEQ ID NO: 12), 2 pmol de CTO (SEQ ID NO: 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 desnaturizó 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 dúplex 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.

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

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.

Tal y como muestra la Figura 19B, en presencia del plantilla se detectó un pico a 76,5 °C correspondiente al valor de T_m esperado del dúplex extendido. Como el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO ofrece una señal no diana en este procedimiento 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 plantilla.

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.

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 procedimiento 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).

Los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos formados durante el ensayo fueron diseñados para tener un marcador interactivo doble. El marcador interactivo doble del dúplex extendido se proporcionó en forma de CTO marcado con una molécula indicadora y una molécula inactivadora en su segmento plantilla. 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'.

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

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

NG-F 5'-TACGCCTGCTACTTTTCACGCT-3' (SEQ ID NO: 10)
 NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
 NG-PTO-3 5'-ACGACGGCTTGCCCCCTCATTGGCGTGTTCG[espaciador C3] -3' (SEQ ID NO: 7)
 NG-CTO-1 5'-[BHQ-1]CCTCCTCCTCCTCCTCC[T(FAM)]CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3] -3' (SEQ ID NO: 4)
 SA-F 5'-TGTTAGAATTTGAACAAGGATTTAATC-3' (SEQ ID NO: 13)
 SA-R 5'-GATAAGTTTAAAGCTTGACCGTCTG-3' (SEQ ID NO: 14)
 SA-PTO-1 5'-AATCCGACCACGCATTCCGTGGTCAATCATTGGTTACG[espaciador C3] -3' (SEQ ID NO: 15)
 SA-CTO-1 5'-[BHQ-1]TTTTTTTTTTTTTTTGGCA[T(FAM)]AGCGTGGTCGGATT[espaciador C3] -3' (SEQ ID NO: 16)

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

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 cadena abajo (SEQ ID NO: 10 y 13), 10 pmol de cada cebador situado cadena arriba (SEQ ID NO: 2 y 4), 5 pmol de cada PTO (SEQ ID NO: 7 y 15), 2 pmol de cada CTO (SEQ ID NO: 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.

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 plantillas. No se detectó ninguna señal sin la presencia de los plantillas.

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 (por ejemplo, FAM) siempre que los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos correspondientes a los ácidos nucleicos diana tengan valores de T_m distintos.

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 dúplex extendido mediante el análisis de la fusión.

La ADN-polimerasa Taq dotada de actividad 5'-nucleasa se usó para la extensión del cebador situado cadena arriba, la escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO. El dúplex extendido formado durante el ensayo se diseñó para que tuviera un marcador único. El marcador único del dúplex 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'.

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

NG-T 5'-

AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTGTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATA

CCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)

NG-PTO-5 5'-[Quasar570]ACGACGGCTTGGCTTTACTGCCCTCATTGGCGTGTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 17)

NG-CTO-S1 5'-[AminoC7]TTTTTCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 18)

Marcador 5'-[Quasar570]ATATATATAT[AminoC7]-3' (SEQ ID NO: 19)

(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 NO: 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.

La reacción de escisión se llevó a cabo con un volumen final de 50 µl que contenía 2 pmol de plantilla sintético (SEQ ID NO: 1) del gen de NG, 10 pmol de cebador situado cadena arriba (SEQ ID NO: 2), 1 pmol de PTO (SEQ ID NO: 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 un cámara montada sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio NSB al que se había fijado el CTO (SEQ ID NO: 18). El portaobjetos se colocó en el termobloque del termociclador (GeneProB4I, 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 dúplex 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

Los presentes inventores examinaron con mayor detalle el ensayo PTOCE con detección en tiempo real a una temperatura predeterminada en una micromatriz.

5 La escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO se repitieron en una micromatriz que contenía el CTO inmovilizado. La presencia del dúplex extendido se detectó a una temperatura predeterminada en varios ciclos determinados.

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

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

15 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 predeterminada. La temperatura de detección se determinó en función de que el dúplex extendido mantuviera la forma bicatenaria. El oligonucleótido sintético para *Neisseria gonorrhoeae* (NG) se usó como plantilla.

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

25 El PTO incorpora como molécula indicadora fluorescente Quasar570 en su extremo 5'. El CTO se inmovilizó por su extremo 5'. En este procedimiento de marcaje, la temperatura de detección se determinó en función de que el dúplex 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 plantilla sintético, del cebador situado cadena arriba, del PTO, del CTO y del marcador usadas en este ejemplo son:

NG-T 5'-

AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTGTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATA

CCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)

30 NG-PTO-5 5'-[Quasar570]ACGACGGCTTGGCTTTACTGCCCTCATTGGCGTGTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 17)

NG-CTO-S1 5'-[AminoC7]TTTTTCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 18)

Marcador 5'-[Quasar570]ATATATATAT[AminoC7]-3' (SEQ ID NO: 19)

35 (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.

40 La reacción del PTOCE se llevó a cabo con un volumen final de 30 μ l que contenía 2 pmol de plantilla sintético (SEQ ID NO: 1) del gen de NG, 10 pmol de cebador situado cadena arriba (SEQ ID NO: 2), 1 pmol de PTO (SEQ ID NO: 17), y 15 μ l de Mezcla maestra 2X que contenía $MgCl_2$ 2,5 mM, dNTP 200 μ M 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 NO: 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, 45 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 μ m. 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 50 estaba duplicado para la prueba de reproducibilidad. La intensidad de la fluorescencia indica el valor promedio de los

puntos sonda duplicados.

- 5 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: $1304 \pm 0,7$; RFU a los 5 ciclos: $18\,939 \pm 1342,1$; RFU a los 10 ciclos: $30\,619 \pm 285,0$; RFU a los 20 ciclos: $56\,248 \pm 2208,3$; y RFU a los 30 ciclos: $64\,645 \pm 1110,2$) en presencia del plantilla. La intensidad de la fluorescencia no cambió en ningún ciclo en ausencia del plantilla.

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

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

- 10 Las secuencias del plantilla sintético, del cebador situado cadena arriba, del PTO, del CTO y del marcador usadas en este ejemplo son:

NG-T 5'-

AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTGTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATA

CCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)

- 15 NG-PTO-6 5'-ACGACGGCTTGGCTTTACTGCCCTCATTGGCGTGTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 20)
 NG-CTO-S2 5'-[BHQ-2]CCTCCTCCTCCTCCTCC[T(Quasar570)]CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGTTTTTTTTTTT[AminoC7]-3' (SEQ ID n.º 21)

Marcador 5'-[Quasar570]ATATATATAT[AminoC7]-3' (SEQ ID NO: 19)

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

- 20 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 μ l que contenía 2 pmol de plantilla sintético (SEQ ID NO: 1) del gen de NG, 10 pmol de cebador situado cadena arriba (SEQ ID NO: 2), 1 pmol de PTO (SEQ ID NO: 20), y 15 μ l de Mezcla maestra 2X que contenía $MgCl_2$ 2,5 mM, dNTP 200 μ M 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 NO: 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 μ m. 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.

- 35 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: $28\,078 \pm 460,3$; RFU a los 5 ciclos: $35\,967 \pm 555,1$; RFU a los 10 ciclos: $44\,674 \pm 186,0$; RFU a los 20 ciclos: $65\,423 \pm 2,1$; y RFU a los 30 ciclos: $65\,426 \pm 2,8$) en presencia del plantilla. La intensidad de la fluorescencia no cambió en ningún ciclo cuando el plantilla no estaba presente.

40 **Ejemplo 7: Detección de múltiples secuencias de ácidos nucleicos diana mediante el ensayo PTOCE con detección de punto final a una temperatura predeterminada 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 predeterminada en una micromatriz.

- 45 La escisión del PTO se llevó a cabo en un recipiente distinto al del procedimiento 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 dúplex extendido se detectó por detección de punto final a una temperatura predeterminada.

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

El dúplex extendido formado durante el ensayo se diseñó para tener un marcador único. El marcador único del dúplex 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'.

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'.

La intensidad de la fluorescencia en el portaobjetos de vidrio se midió a una temperatura predeterminada. La temperatura de detección se determinó en función de que el dúplex 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).

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

NG-F 5'- TACGCCTGCTACTTTTCACGCT-3' (SEQ ID NO: 10)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)

NG-PTO-5 5'-[Quasar570]ACGACGGCTTGGCTTTACTGCCCTCATTGGCGTGTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 17)

NG-CTO-S1 5'-[AminoC7]TTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3]

3'

(SEQ ID NO: 18)

SA-F5'-TGTTAGAATTTGAACAAGGATTTAATC-3' (SEQ ID NO: 13)

SA-R2 5'-TTAGCTCCTGCTCCTAAACCA-3' (SEQ ID NO: 22)

SA-PTO-2 5'-[Quasar570] AATCCGACCACGCTATGCTCATTCCGTGGTCAATCATTCCGTTTACG[espaciador C3]

3' (SEQ ID NO: 23)

SA_CTO-S1 5'-[AminoC7]TTTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCCCCAGCATAGCGTGGTCCGATT [espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 24)

Marcador 5'-[Quasar570]ATATATATAT[AminoC7]-3' (SEQ ID NO: 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 cadena abajo (SEQ ID NO: 10 y/o 13), 10 pmol de cebador situado cadena arriba (SEQ ID NO: 2 y/o 22), 1 pmol de PTO (SEQ ID NO: 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 NO: 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 plantilla de SA. La señal diana de NG (RFU: 65 332 ± 1,4) se detectó en presencia del plantilla 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 plantillas.

<110> Seegene, Inc.

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

<130> S12355EP-B
 <150> 10-2011-0002840
 <151> 2011-01-11
 5 <150> 10-2011-0023465
 <151> 2011-03-16
 <150> PCT/KR2011/004452
 <151> 2011-06-17
 <160> 24
 <170> KopatentIn 2.0
 10 <210> 1
 <211> 86
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> NG-T
 <400> 1
aaatatgcga aacacgccaa tgaggggcat gatgctttct ttttgttctt gctcggcaga 60
gcgagtgata ccgatccatt gaaaaa 86
 <210> 2
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> NG-R
 <400> 2
 25 caatggatcg gatatcactcg c 21
 <210> 3
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> NG-PTO-1
 <400> 3
 acgacggctt ggctgcccct cattggcgtg ttctg 35
 <210> 4
 35 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> NG-CTO-1
 40 <400> 4
 cctcctctc ctctcctcc tccagtaaag ccaagccgtc gt 42
 <210> 5
 <211> 40
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> NG-PTO-2

ES 2 629 759 T3

<400> 5
 acgacggctt ggctttactg cccctcattg gcggtttcg 40

 <210> 6
 <211> 42
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> NG-CTO-2

 <400> 6
 10 cctcctcctc ctctcctcc tccagtaaag ccaagccgtc gt 42

 <210> 7
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> NG-PTO-3

 <400> 7
 acgacggctt ggcccctcat tggcgtgttt cg 32

 20 <210> 8
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> NG-CTO-3

 25 <400> 8
 ttttttttt cctcctccag taaagccaag ccgctgt 37

 <210> 9
 <211> 37
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> NG-CTO-4

 <400> 9
 ttttttttt ttttttttag taaagccaag ccgctgt 37

 35 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> NG-F

 <400> 10
 tacgcctgct actttcacgc t 21

 <210> 11
 <211> 27
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> NG-CTO-5

 <400> 11
 50 cctcctccag taaagccaag ccgctgt 27

<210> 12
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> NG-PTO-4
 <400> 12
 acgacggctt gccctcatt ggcgtgttc g 31
 10 <210> 13
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> SA-F
 15 <400> 13
 tgtagaatt tgaacaagga ttaatc 27
 <210> 14
 <211> 25
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> SA-R
 <400> 14
 gataagtta aagcttgacc gtctg 25
 25 <210> 15
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> SA-PTO-1
 <400> 15
 aatccgacca cgcattccgt ggatcaatcat tcggtttacg 40
 <210> 16
 <211> 35
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> SA-CTO-1
 <400> 16
 tttttttt ttttttgca tagcgtggtc ggatt 35
 <210> 17
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> NG-PTO-5
 <400> 17
 acgacggctt ggctttactg cccctcattg ggcgtgttcg 40
 <210> 18
 <211> 47
 50 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> NG-CTO-S1
 <400> 18
 5 ttttctctcc tctctctct cctcctccag taaagccaag ccgtoct47
 <210> 19
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Marcador
 <400> 19
 atatatatat 10
 <210> 20
 15 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> NG-PTO-6
 20 <400> 20
 acgacggctt ggcttactg ccctcattg gcgtgttctg 40
 <210> 21
 <211> 52
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> NG-CTO-S2
 <400> 21
 cctcctctc ctctctctcc tccagtaaag ccaagccgtc gttttttt tt 52
 30 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> SA-R2
 <400> 22
 ttagctcctg ctctaaacc a21
 <210> 23
 <211> 47
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> SA-PTO-2
 <400> 23
 45 aatccgacca cgctatgctc attccgtgtt caatcattcg gtttacg 47
 <210> 24
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>

<223> SA_CTO-S1

<400> 24

tttttctct tcttctctt cttctcttc cccagcata gcgtggtcgg att 53

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de 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) sobre una fase sólida, que comprende:

- 5 (a) Hibridación de la secuencia de ácido nucleico diana con un oligonucleótido situado cadena arriba y un PTO (oligonucleótido de sondeo y marcaje); en el que el oligonucleótido situado cadena arriba comprende una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana; el PTO comprende: (i) una porción elegida como diana en 3' que comprende una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana; y (ii) una porción de marcaje en 5' que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la porción elegida como diana en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y la porción de marcaje en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana; el oligonucleótido situado cadena arriba está ubicado cadena arriba del PTO;
- 10 (b) Poner en contacto el 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 cadena arriba o su hebra extendida induce la escisión del PTO por la enzima dotada de actividad 5'-nucleasa de tal modo que la escisión desprende un fragmento que comprende la porción de marcaje en 5' o una parte de la porción de marcaje en 5' del PTO;
- 15 (c) Hibridación del fragmento desprendido del PTO con un CTO (oligonucleótido de captura y plantilla); en el que el CTO permanece inmovilizado por su extremo 5' o por su extremo 3' en un sustrato sólido; en el que el CTO comprende en dirección 3' a 5': (i) una porción de captura que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con la porción de marcaje en 5' o una parte de la porción de marcaje en 5' del PTO, y (ii) una porción de plantilla que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con la porción de marcaje en 5' ni con la porción elegida como diana en 3' del PTO; en el que el fragmento desprendido del PTO se hibrida con la porción de captura del CTO;
- 20 (d) Realización de una reacción de extensión usando el resultado de la etapa (c) y una polimerasa de ácido nucleico dependiente de plantilla; en la cual el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende y forma dúplex extendido; en el que el dúplex extendido tiene un valor de T_m que puede ajustarse mediante (i) una secuencia y/o longitud del fragmento, (ii) una secuencia y/o longitud del CTO, o (iii) la secuencia y/o longitud del fragmento y la secuencia y/o longitud del CTO; en el que el dúplex extendido proporciona una señal diana mediante (i) al menos un marcador unido al fragmento y/o al CTO, (ii) un marcador incorporado al dúplex extendido durante la reacción de extensión, (iii) al menos un marcador unido al fragmento y/o al CTO y un marcador incorporado al dúplex extendido durante la reacción de extensión, o (iv) un marcador intercalante; y
- 25 (e) Detección del dúplex extendido mediante la medición de la señal diana sobre el sustrato sólido a una temperatura predeterminada en la que el dúplex extendido mantiene su forma bicatenaria; de modo que la presencia del dúplex extendido indica la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana; en el que el dúplex extendido permanece inmovilizado sobre el sustrato sólido a través del CTO.
- 30
- 35

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la señal diana proporcionada por el dúplex extendido se da durante la extensión de la etapa (d); en el que el híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO no proporciona una señal que no sea la diana.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la señal diana proporcionada por el dúplex extendido se da por la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) y la formación del dúplex extendido mantiene la señal diana en la etapa (d); en el que un híbrido entre un PTO sin escindir y el CTO proporciona una señal no diana; en el que la temperatura predeterminada es suficiente para disociar el híbrido para retirar la señal no diana.

40

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la señal diana la proporciona al menos un marcador unido al fragmento y/o al CTO.

45

5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el fragmento tiene un marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora y una molécula inactivadora; 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 dúplex extendido mantiene la señal diana.

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el CTO tiene un marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora y una molécula inactivadora; en el que la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble para proporcionar la señal diana y el dúplex extendido mantiene la señal diana.

50

7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el CTO tiene un marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora y una molécula inactivadora; en el que la extensión del fragmento en la etapa (d) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble para proporcionar la señal diana.

55

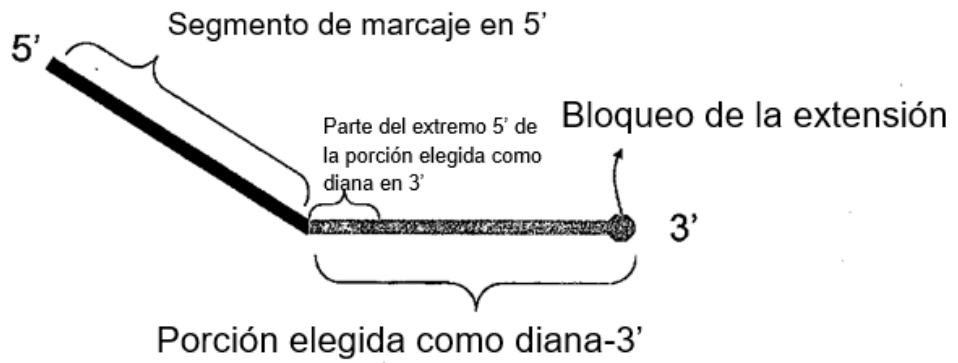
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el fragmento tiene uno de un marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora y una molécula inactivadora y el CTO tiene el otro del marcador

- 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 para proporcionar la señal diana y el dúplex extendido mantiene la señal diana.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el fragmento o el CTO tiene un marcador único y la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) induce un cambio de la señal del marcador único para proporcionar la señal diana y el dúplex extendido mantiene la señal diana.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el CTO tiene un marcador único y la extensión del fragmento en la etapa (d) induce un cambio de la señal emitida por el marcador único para proporcionar la señal diana.
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que los marcadores están ubicados de modo que cuando se forme un híbrido entre un PTO sin escindir y el CTO, el híbrido no da una señal no diana en la etapa (d).
12. El procedimiento de acuerdo 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 da una señal no diana en la etapa (d); en el que el valor T_m del dúplex extendido es superior al del híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la señal diana se proporciona por un marcador único unido al fragmento o un marcador único incorporado al dúplex extendido durante la reacción de extensión.
14. El procedimiento de acuerdo 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 que tiene una segunda base no natural con una afinidad de unión específica hacia la primera base no natural.
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la señal diana se proporciona por un marcador incorporado al dúplex 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 son un marcador interactivo doble de una molécula indicadora y una molécula inactivadora; en el que la extensión del fragmento en la etapa (d) induce el cambio de la señal del marcador interactivo doble que da la señal diana.
16. El procedimiento de acuerdo 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 que tiene una segunda base no natural con una afinidad de unión específica hacia la primera base no natural.
17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido situado cadena arriba es un cebador situado cadena arriba o una sonda situada cadena arriba.
18. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el procedimiento además comprende la repetición de las etapas (a)-(b), (a)-(d) o (a)-(e) con desnaturalización entre los ciclos repetidos.
19. El procedimiento de acuerdo 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 procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el procedimiento se realiza para detectar al menos dos tipos de secuencias de ácido nucleico diana; en el que el oligonucleótido situado cadena 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.
21. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en el que el procedimiento se lleva a cabo en presencia de un cebador situado cadena abajo.
22. Uso de un oligonucleótido situado cadena arriba, un PTO (oligonucleótido de sondeo y marcaje) y un CTO (oligonucleótido de captura y plantilla) en la fabricación de un kit para detectar una secuencia de ácido nucleico diana a partir de ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos de acuerdo con el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, el cual comprende:
- (a) el oligonucleótido situado cadena arriba que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana;
- (b) El PTO (oligonucleótido de sondeo y marcaje) que comprende: (i) una porción elegida como diana en 3' que comprende una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) una porción de marcaje en 5' que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana, en el que la porción elegida como diana en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y la porción de marcaje en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana; el oligonucleótido situado cadena arriba está ubicado cadena arriba del PTO; en que el oligonucleótido situado cadena arriba o su hebra extendida induce la escisión del PTO por una enzima dotada de actividad 5'-nucleasa de tal modo que la escisión desprende un fragmento que comprende la porción de marcaje en 5' o una parte de la porción de marcaje en 5' del PTO; y

- 5 (c) El CTO (oligonucleótido de captura y plantilla) comprende en una dirección 3' a 5': (i) una porción de captura que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con la porción de marcaje en 5' o una parte de la porción de marcaje en 5' del PTO; y (ii) una porción de plantilla que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con la porción de marcaje en 5' y la porción elegida como diana en 3' del PTO; en el que el CTO permanece inmovilizado por su extremo 5' o por su extremo 3' en un sustrato sólido; en que el fragmento desprendido del PTO se hibrida con la porción de captura del CTO; y el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO es extendido por una polimerasa de ácidos nucleicos dependiente de plantilla hasta formar un dúplex extendido.

Fig. 1

A. Oligonucleótido de sondeo y marcaje (PTO)



B. Oligonucleótido de captura y plantilla (CTO)

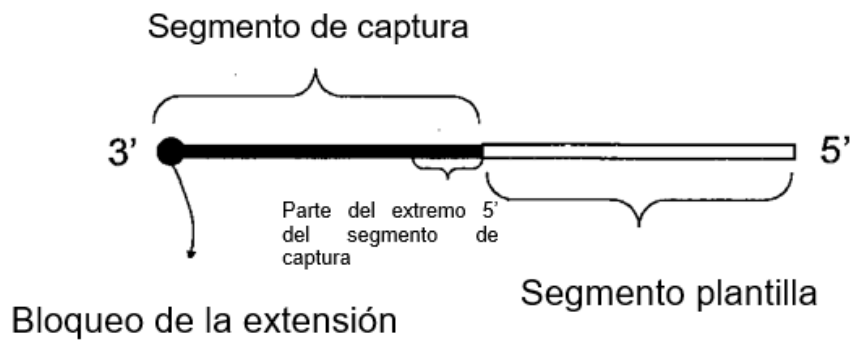
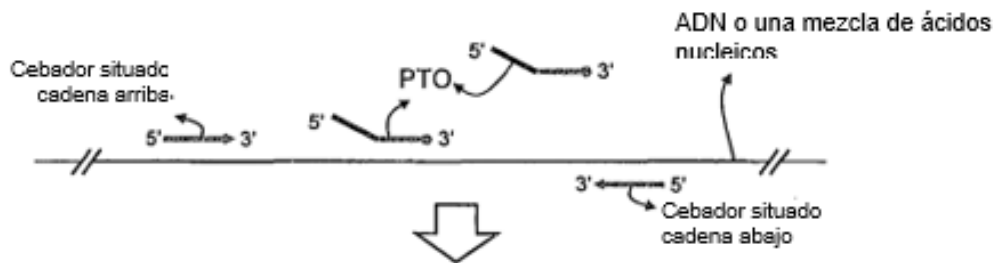
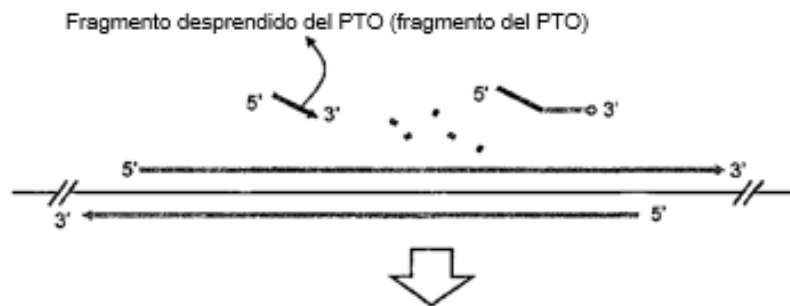


Fig. 2

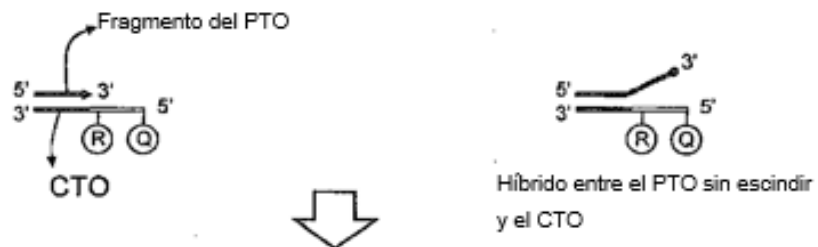
A. Hibridación



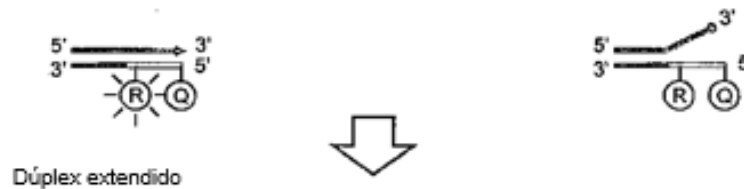
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO



E. Análisis de la fusión

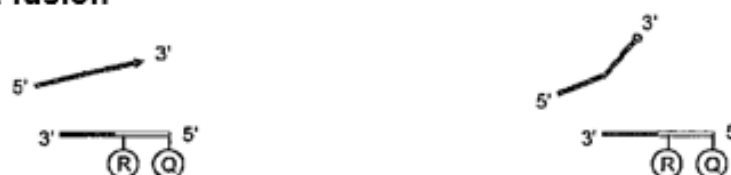
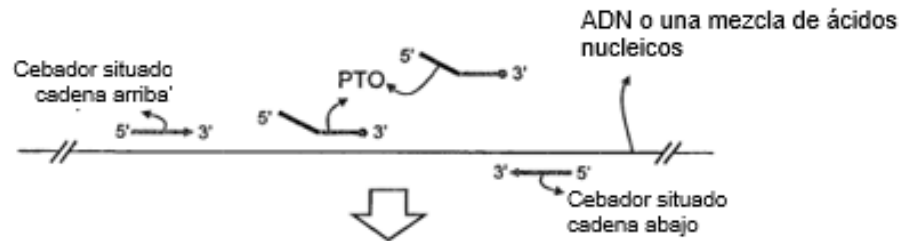
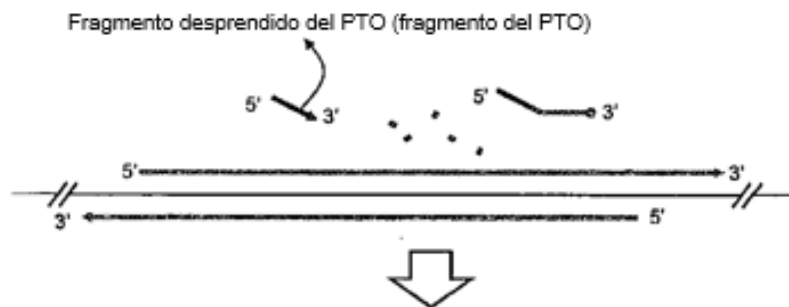


Fig. 3

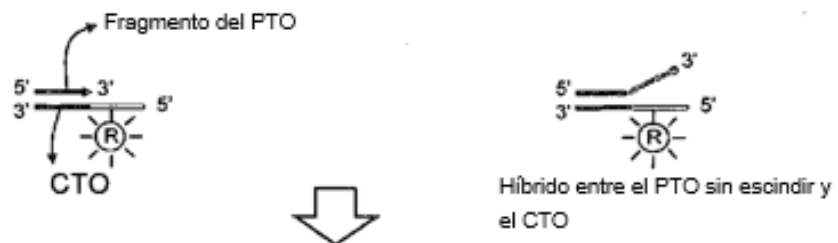
A. Hibridación



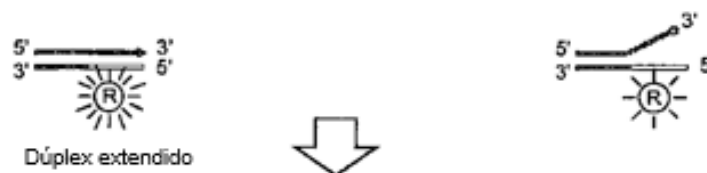
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO

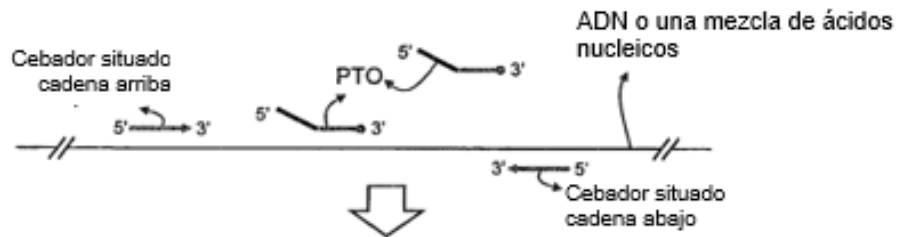


E. Análisis de la fusión

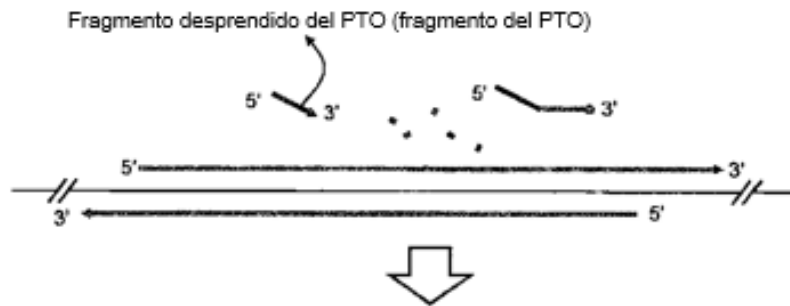


Fig. 4

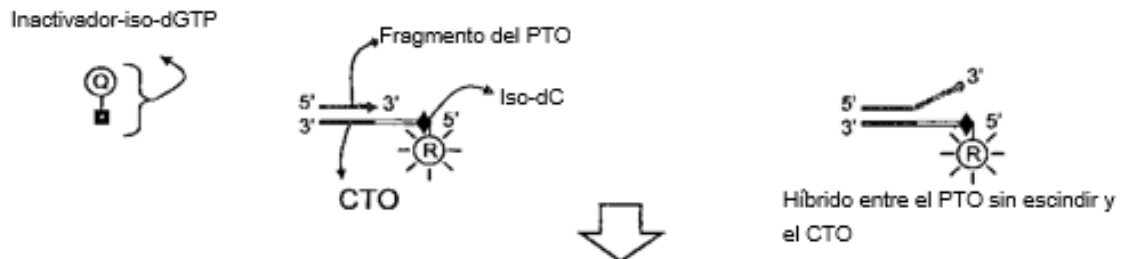
A. Hibridación



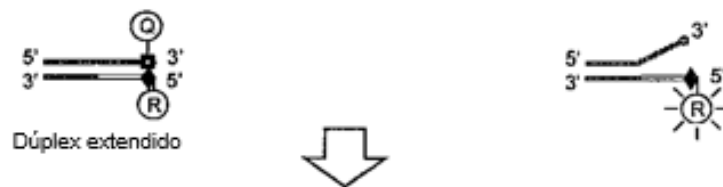
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO

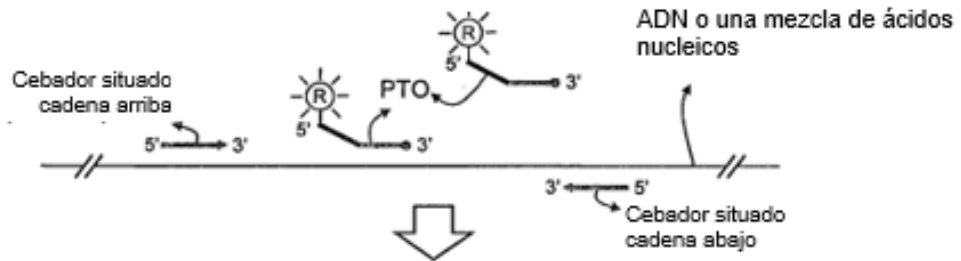


E. Análisis de la fusión

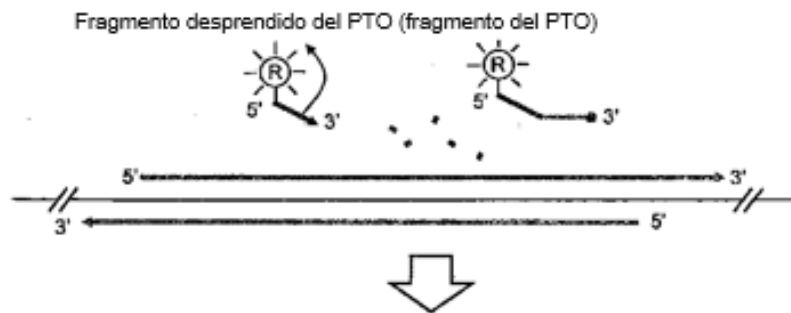


Fig. 5

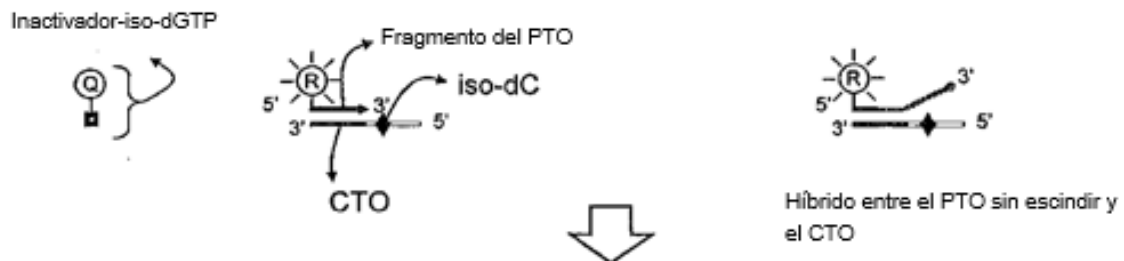
A. Hibridación



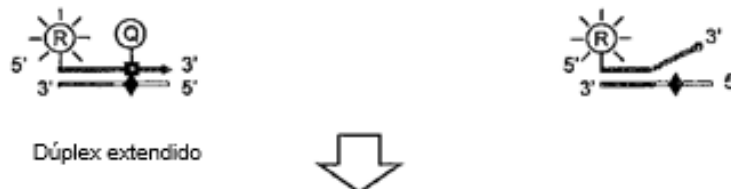
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO

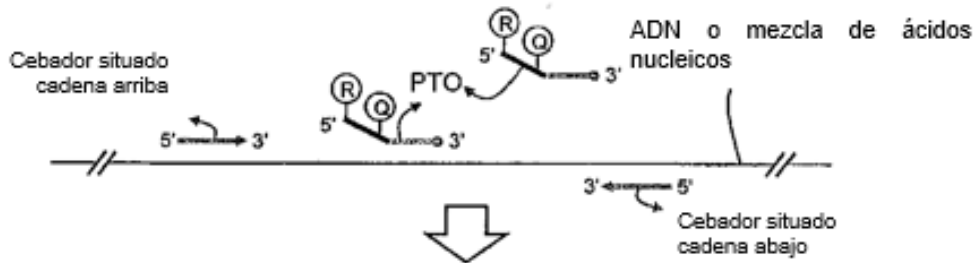


E. Análisis de la fusión

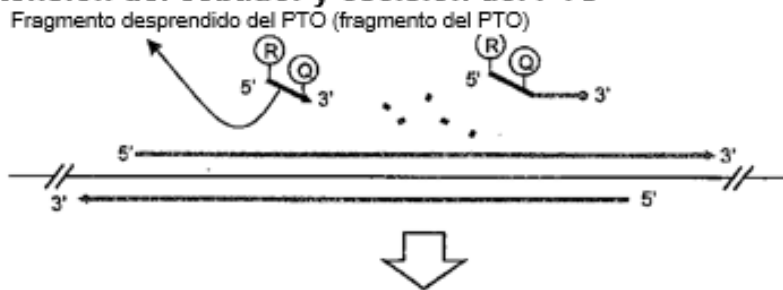


Fig. 6

A. Hibridación



B. Extensión del cebador y escisión del PTO

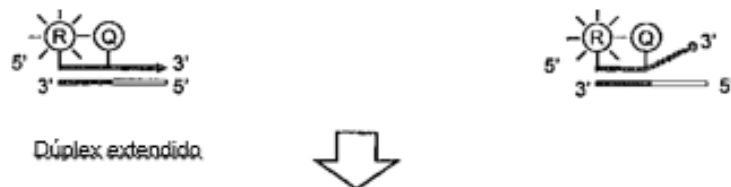


C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO

Fragmento del PTO



D. Extensión del fragmento del PTO

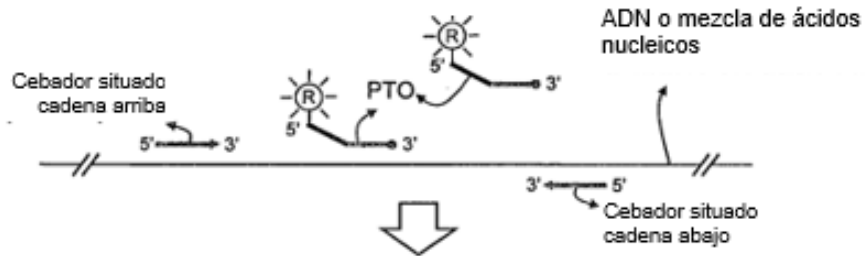


E. Análisis de la fusión

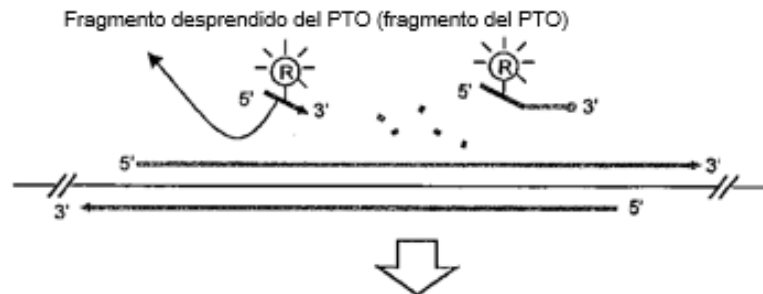


Fig. 7

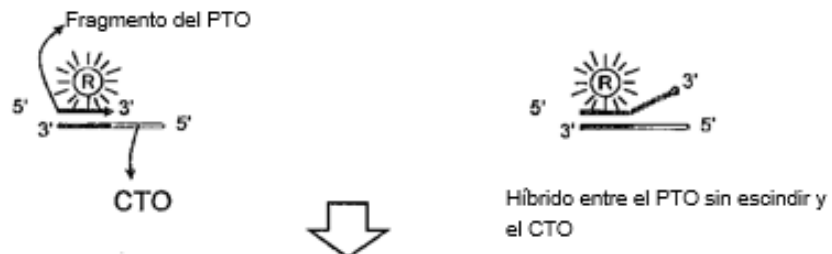
A. Hibridación



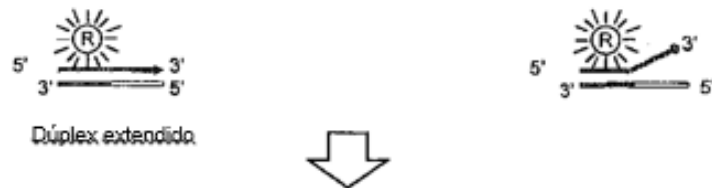
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO

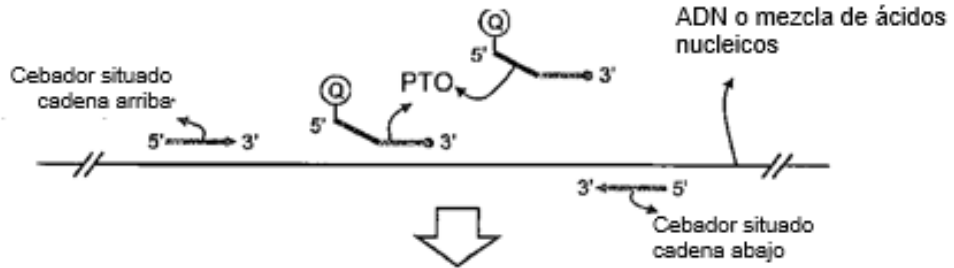


E. Análisis de la fusión

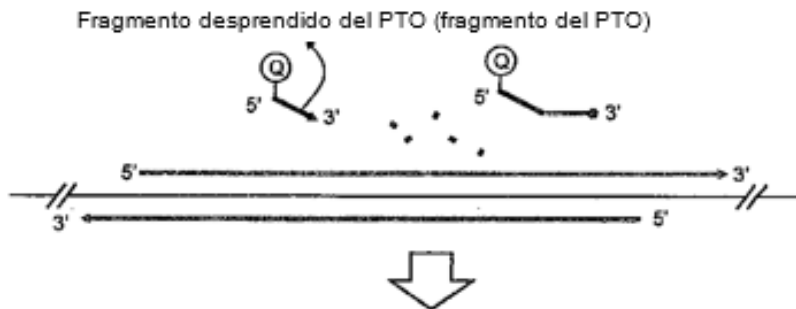


Fig. 8

A. Hibridación



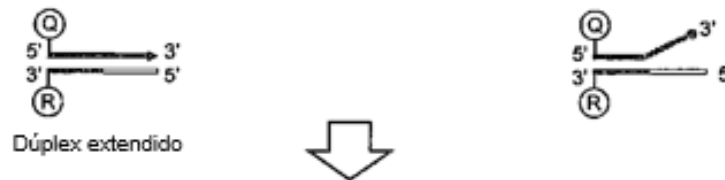
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO

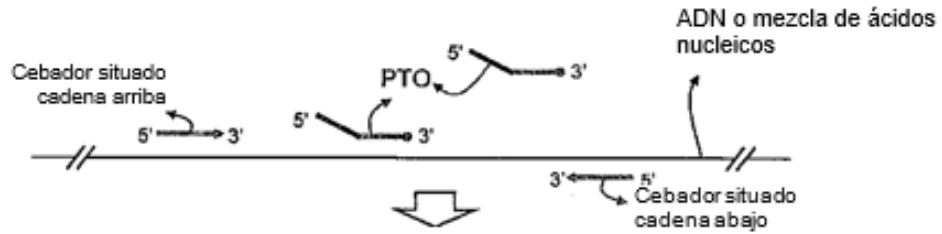


E. Análisis de la fusión



Fig. 9

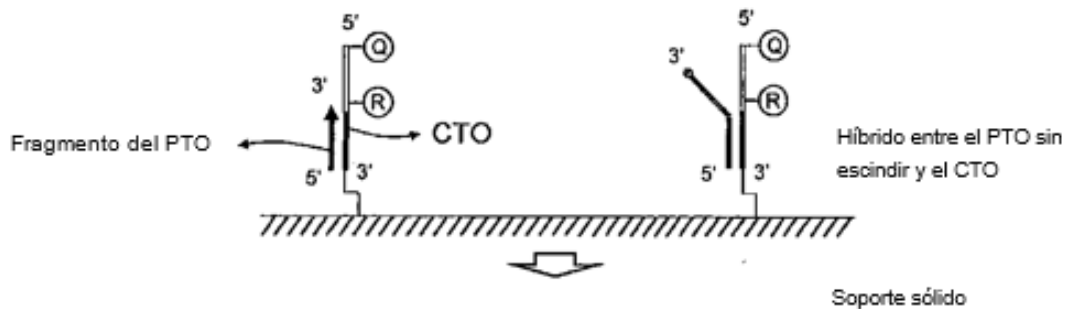
A. Hibridación



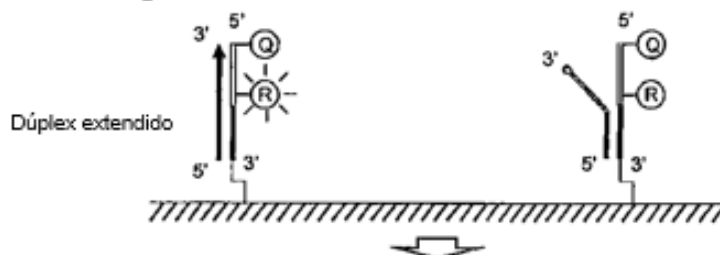
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO

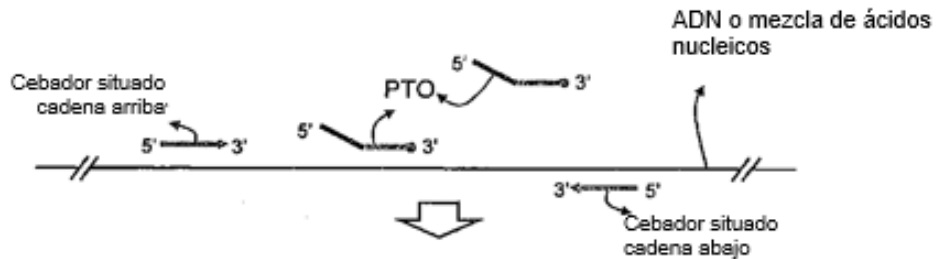


E. Detección a temperatura prefijada

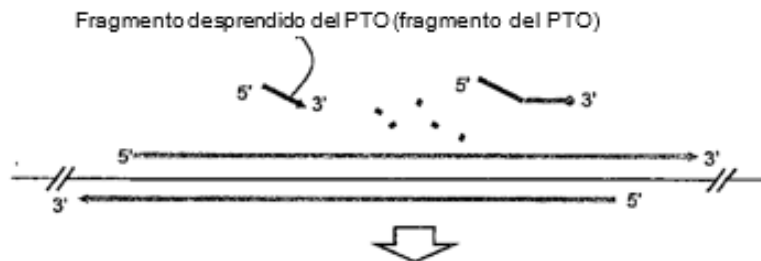


Fig. 10

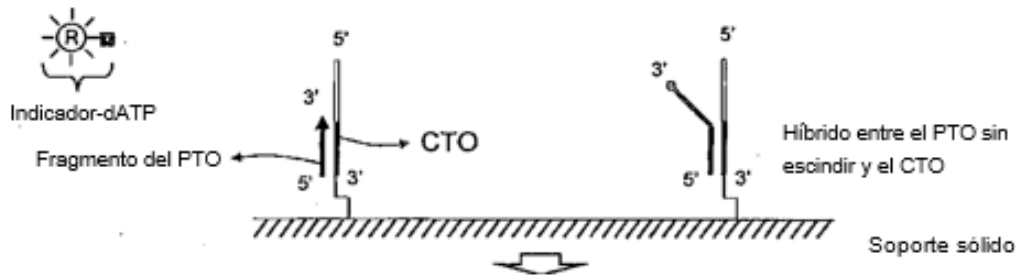
A. Hibridación



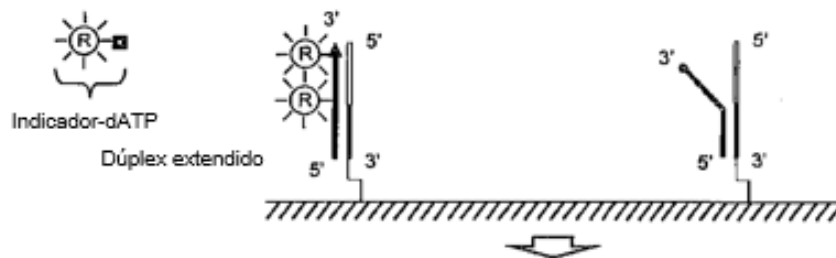
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO

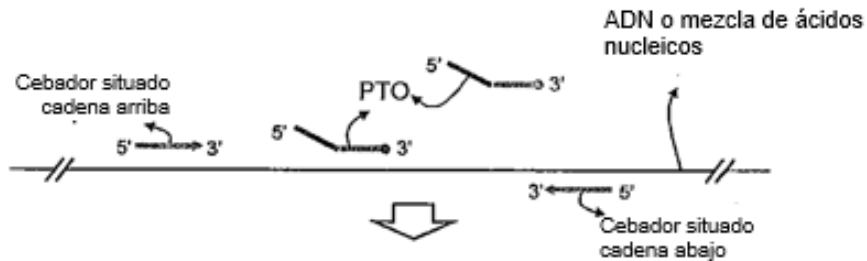


E. Detección a temperatura prefijada



Fig. 11

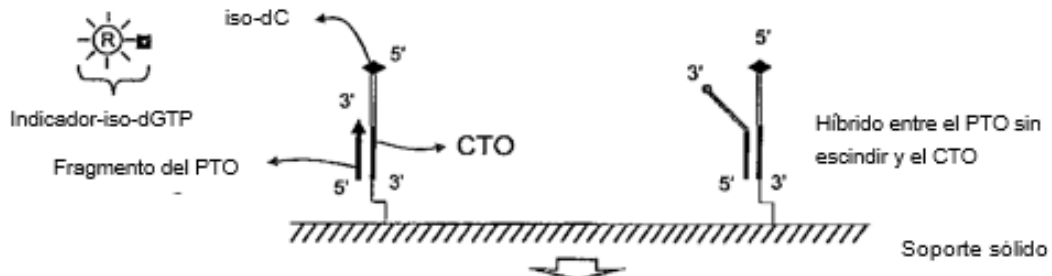
A. Hibridación



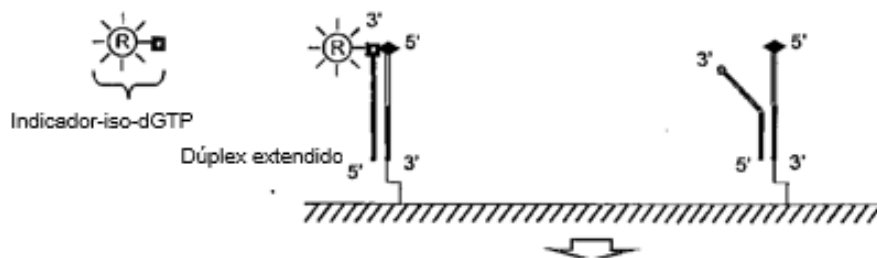
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO

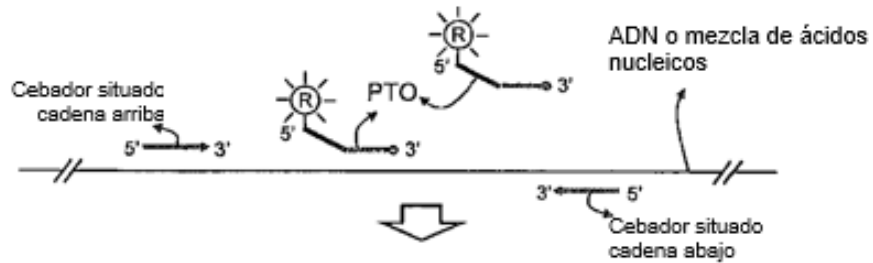


E. Detección a temperatura prefijada

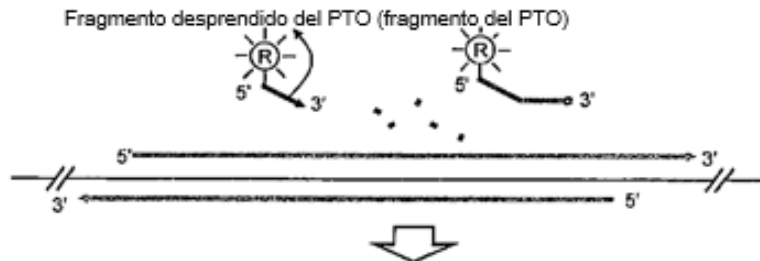


Fig. 12

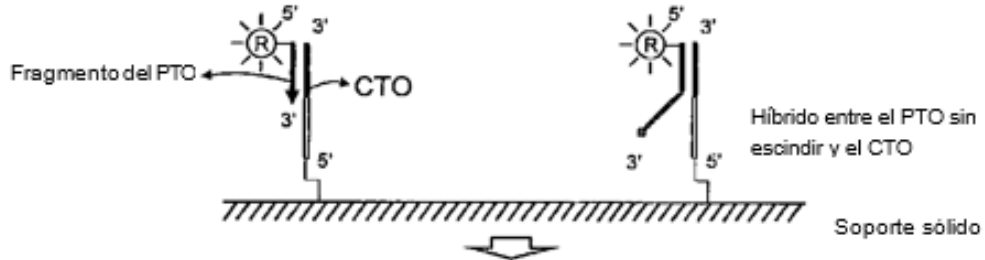
A. Hibridación



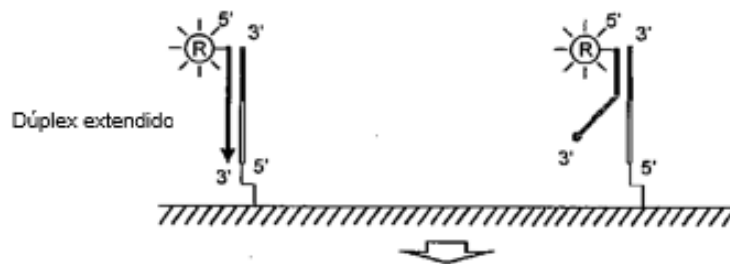
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO



E. Detección a temperatura prefijada

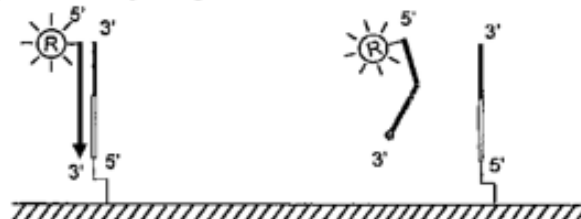
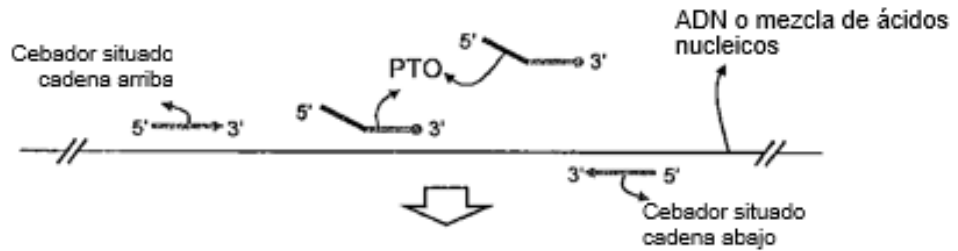


Fig. 13

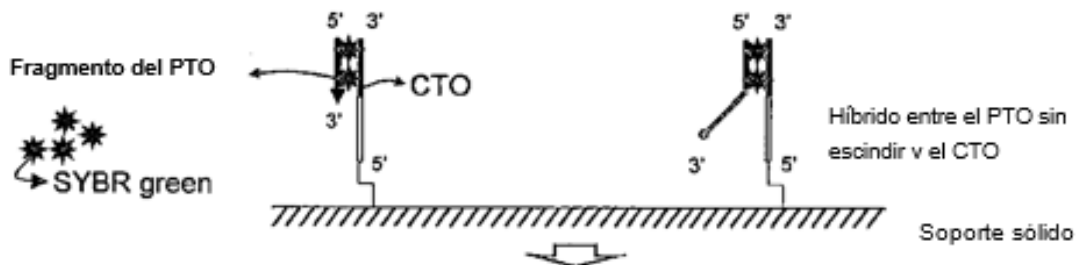
A. Hibridación



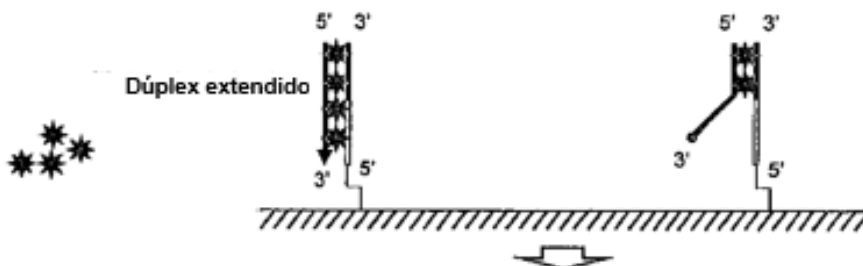
B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO



D. Extensión del fragmento del PTO



E. Detección a temperatura prefijada

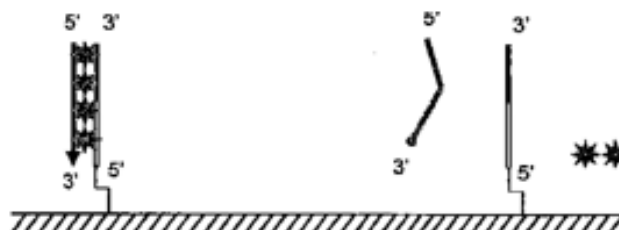
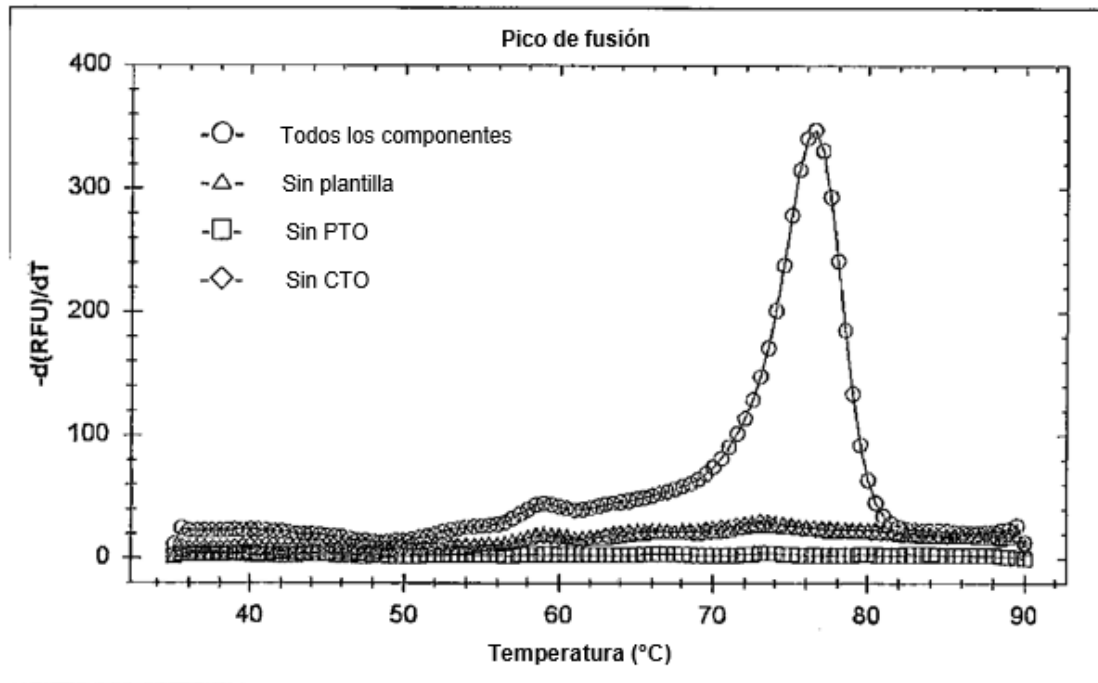


Fig. 14



Plantilla ¹⁾	Cebador situado cadena arriba	PTO ²⁾	CTO ³⁾	T _m (°C)	
				Diana ⁴⁾	No diana ⁵⁾
+	+	+	+	76,5	-
-	+	+	+	-	-
+	+	-	+	-	-
+	+	+	-	-	-

¹⁾ La plantilla es un oligonucleótido sintético para el gen de *Neisseria gonorrhoeae*.

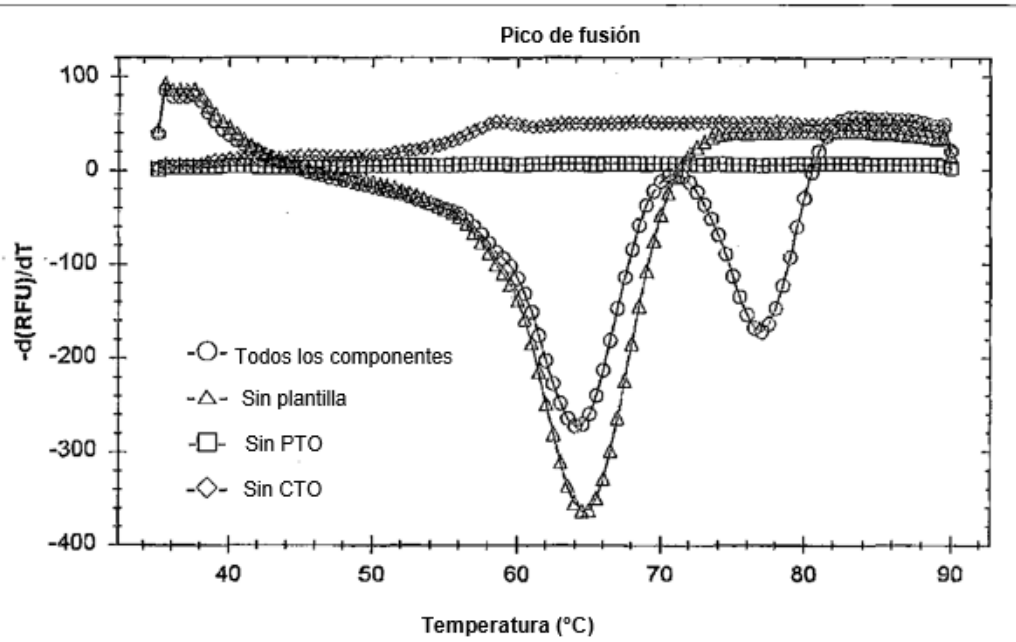
²⁾ El PTO no tiene marcador.

³⁾ El CTO incorpora una molécula amortiguadora y una molécula indicadora fluorescente en su segmento plantilla.

⁴⁾ La diana representa una señal diana que es la T_m del dúplex extendido.

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

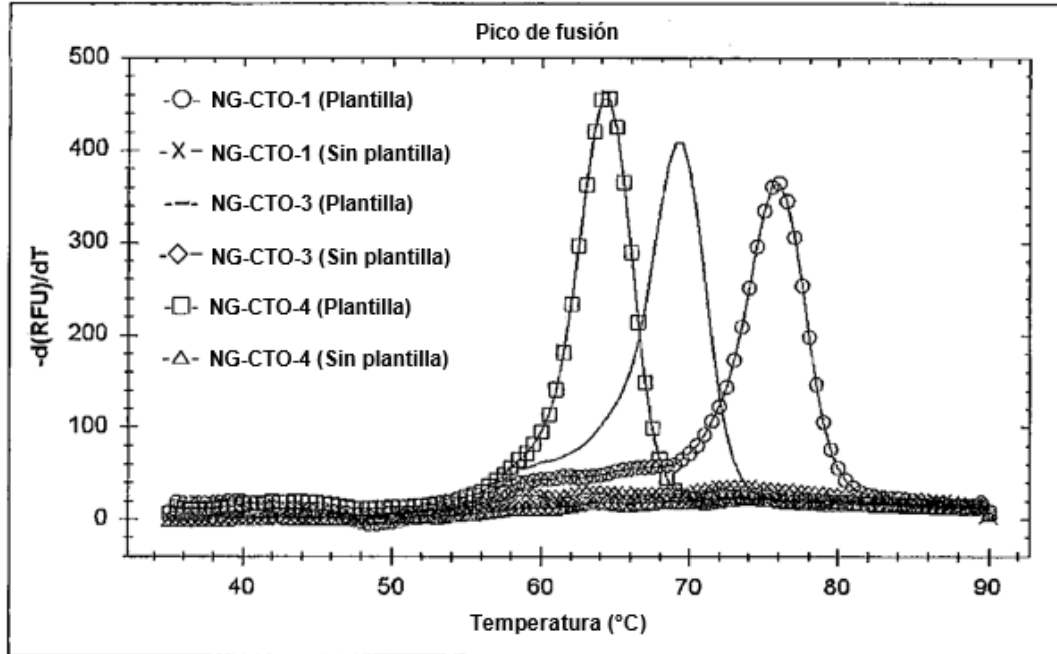
Fig. 15



Plantilla ¹⁾	Cebador situado cadena arriba	PTO ²⁾	CTO ³⁾	T _m (°C)	
				Diana ⁴⁾	No diana ⁵⁾
+	+	+	+	77,0	64,0
-	+	+	+	-	64,5
+	+	-	+	-	-
+	+	+	-	-	-

¹⁾ La plantilla 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 T_m del dúplex extendido.
⁵⁾ La no diana representa una señal no diana que es la T_m del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO.

Fig. 16



Plantilla ¹⁾	Cebador situado cadena arriba	PTO ²⁾	CTO ³⁾	T _m (°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	-

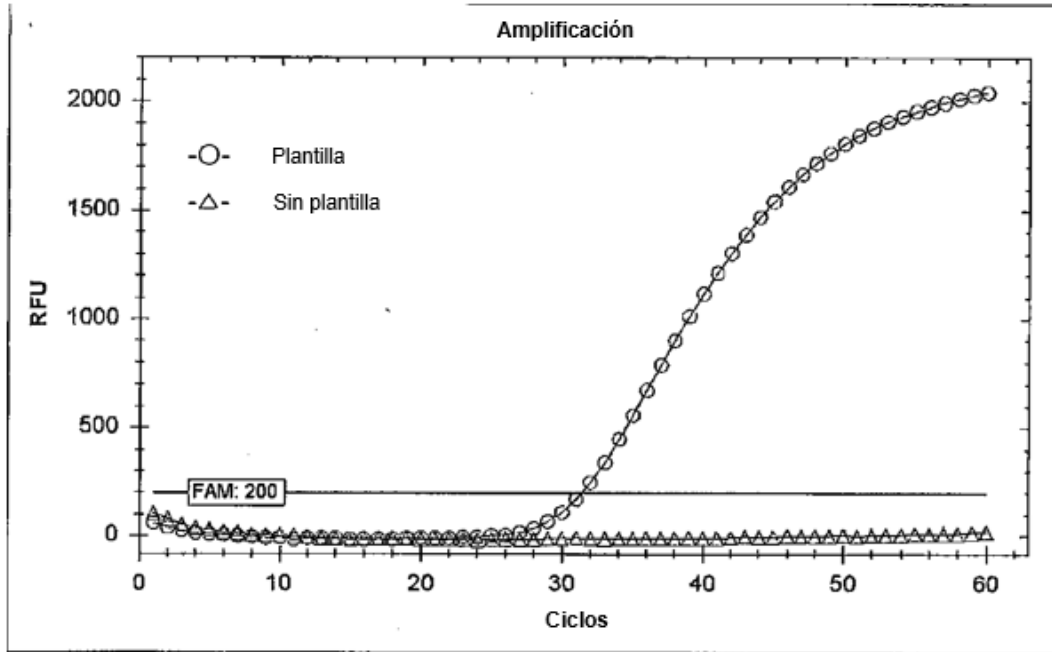
¹⁾ La plantilla es un oligonucleótido sintético para el gen de *Neisseria gonorrhoeae*.

²⁾ El PTO no tiene marcador.

³⁾ El CTO incorpora una molécula amortiguadora y una molécula indicadora fluorescente en su segmento plantilla. Tres CTO tienen secuencias distintas en sus segmentos plantilla.

⁴⁾ La T_m representa la temperatura de fusión del dúplex extendido.

Fig. 17A



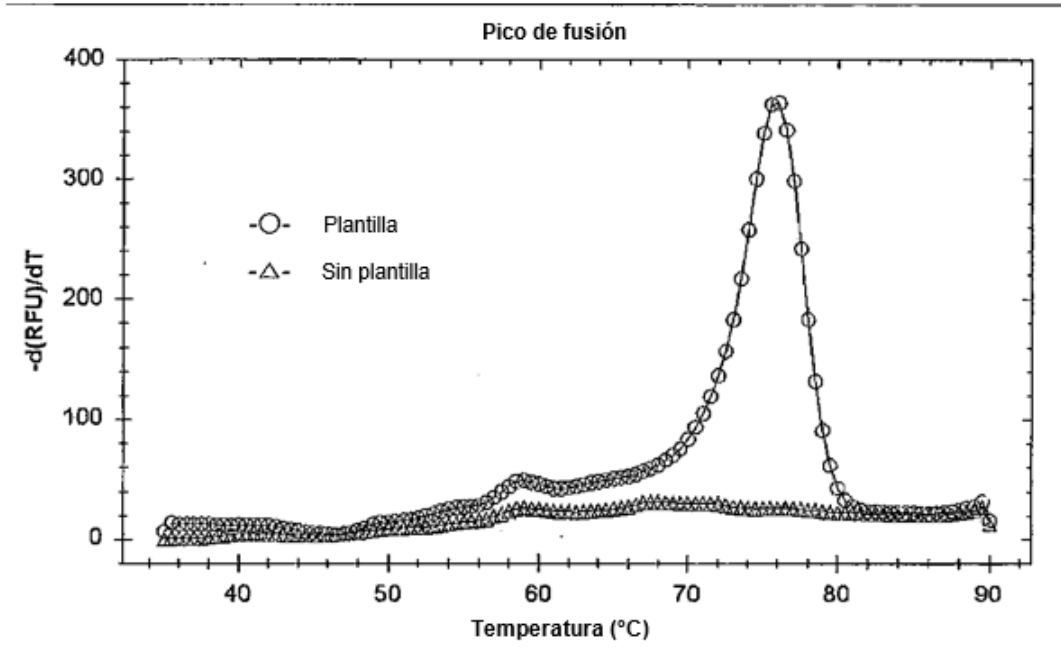
Plantilla ¹⁾	Cebador situado cadena arriba	Cebador situado cadena abajo	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Ct
+	+	+	+	+	31,36
-	+	+	+	+	-

¹⁾ La plantilla 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 plantilla.

Fig. 17B



Plantilla ¹⁾	Cebador situado cadena arriba	Cebador situado cadena abajo	PTO ²⁾	CTO ³⁾	T _m (°C) ⁴⁾
+	+	+	+	+	76,0
-	+	+	+	+	-

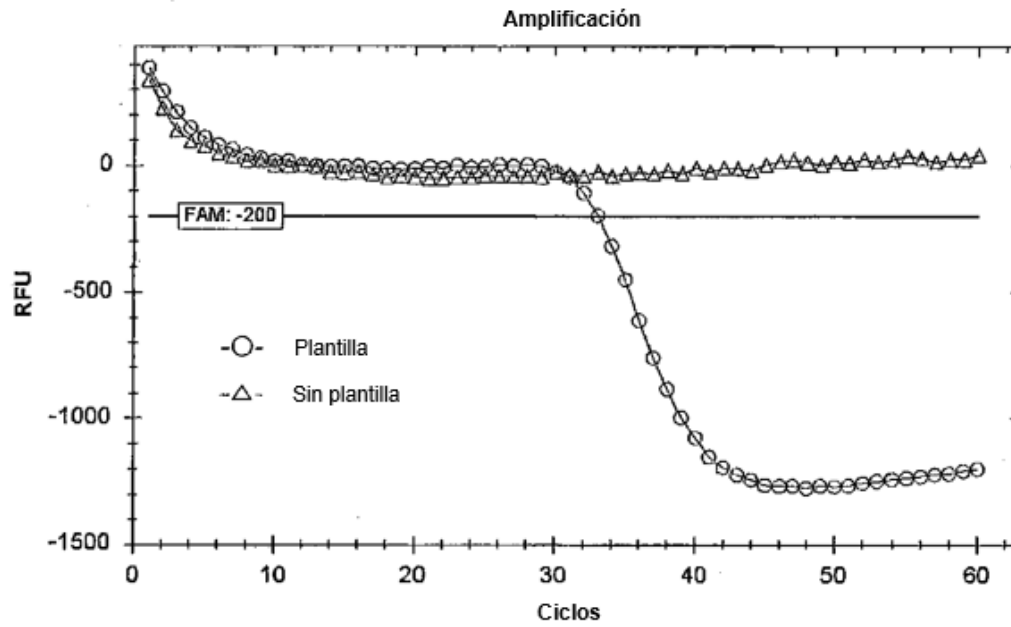
¹⁾ La plantilla es un ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae*.

²⁾ El PTO no tiene marcador.

³⁾ El CTO incorpora una molécula amortiguadora y una molécula indicadora fluorescente en su segmento plantilla.

⁴⁾ La T_m representa la temperatura de fusión del dúplex extendido.

Fig. 18A



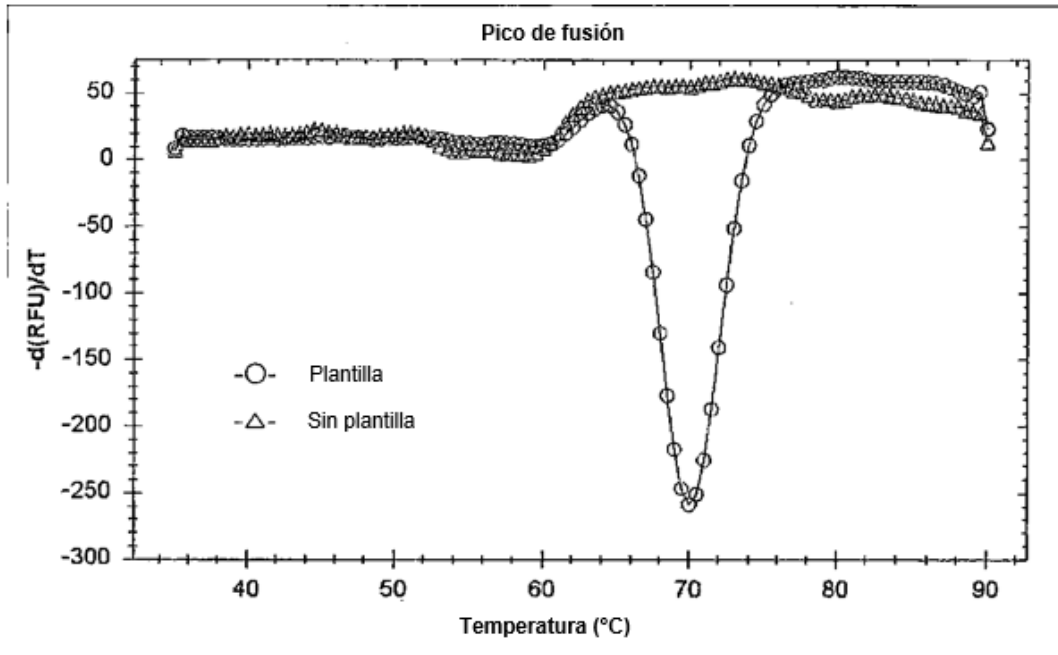
Plantilla ¹⁾	Cebador situado cadena arriba	Cebador situado cadena abajo	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Ct
+	+	+	+	+	33,03
-	+	+	+	+	-

¹⁾ La plantilla 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



Plantilla ¹⁾	Cebador situado cadena arriba	Cebador situado cadena abajo	PTO ²⁾	CTO ³⁾	T _m (°C) ⁴⁾
+	+	+	+	+	70,0
-	+	+	+	+	-

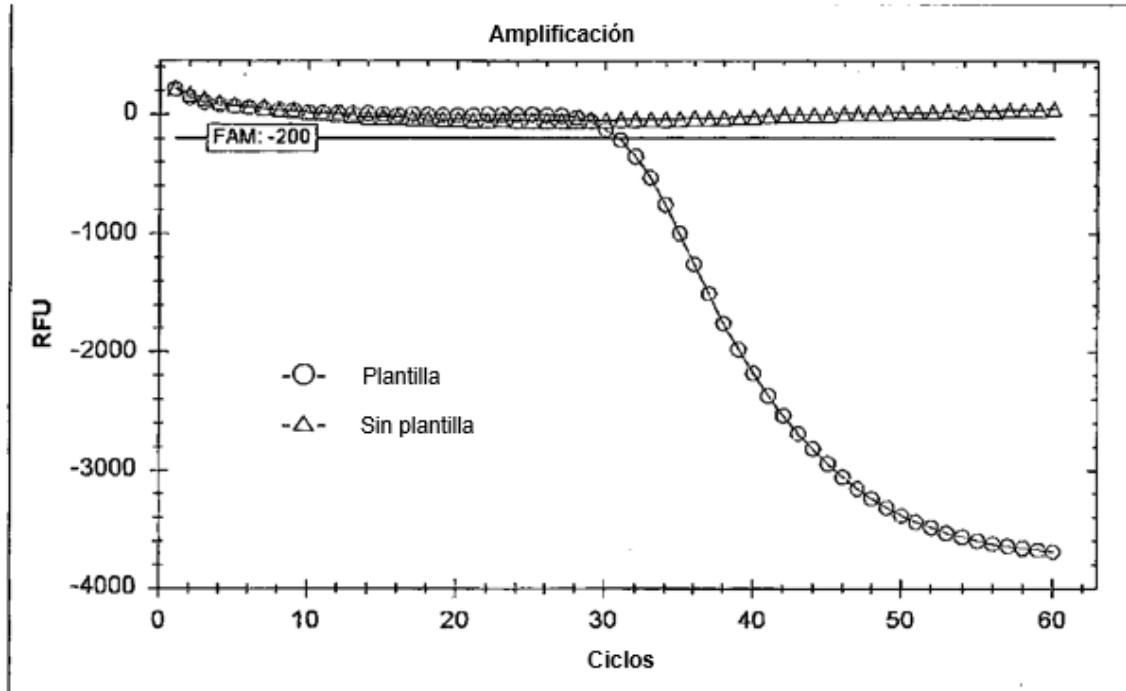
¹⁾ La plantilla es un ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae*.

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 dúplex extendido.

Fig. 19A



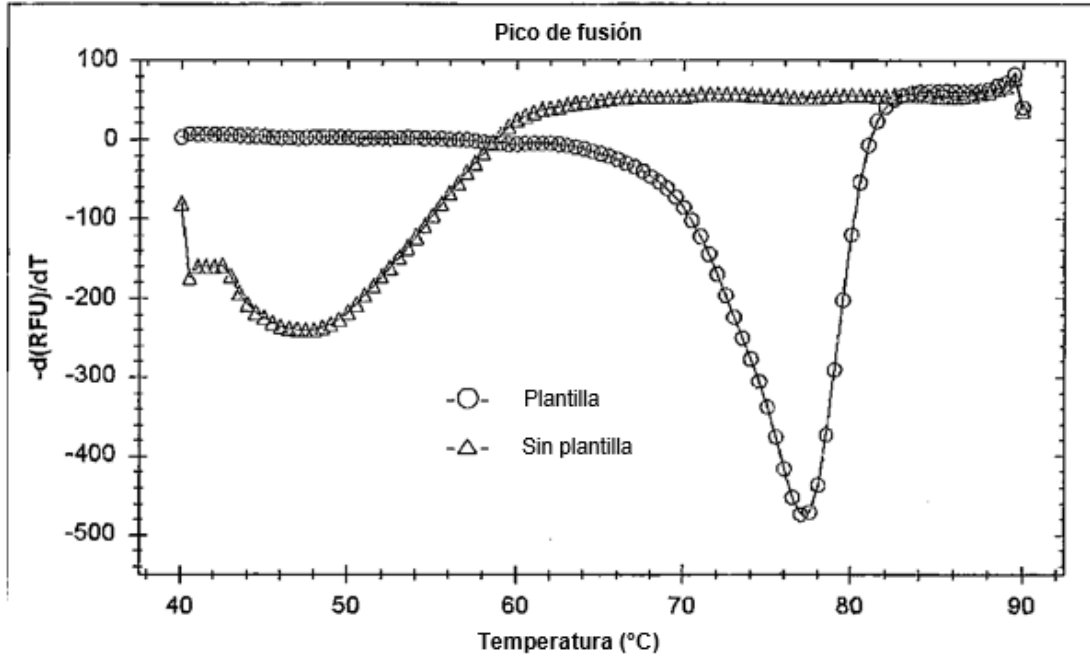
Plantilla ¹⁾	Cebador situado cadena arriba	Cebador situado cadena abajo	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Ct
+	+	+	+	+	29,79
-	+	+	+	+	-

¹⁾ La plantilla 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



Plantilla ¹⁾	Cebador situado cadena arriba	Cebador situado cadena abajo	PTO ²⁾	CTO ³⁾	T _m (°C)	
					Diana ⁴⁾	No diana ⁵⁾
+	+	+	+	+	76,5	-
-	+	+	+	+	-	48,0

¹⁾ La plantilla es un ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae*.

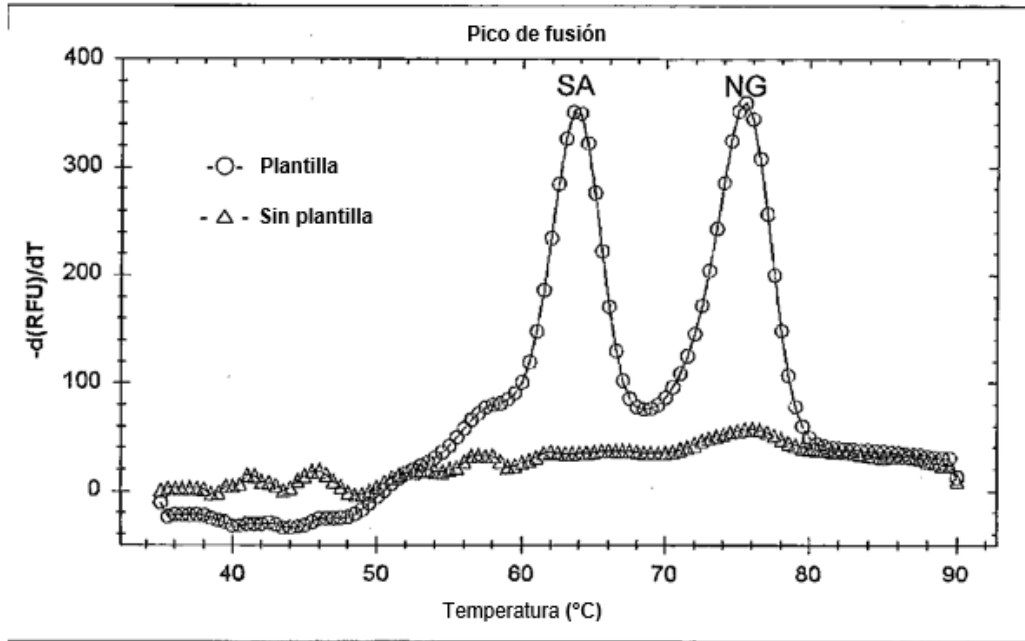
²⁾ El PTO tiene una molécula amortiguadora en su extremo 5'.

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

⁴⁾ La diana representa una señal diana que es la T_m del dúplex extendido.

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

Fig. 20



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

¹⁾ Las plantillas 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 plantilla. 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 dúplex extendido.

Fig. 21A

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

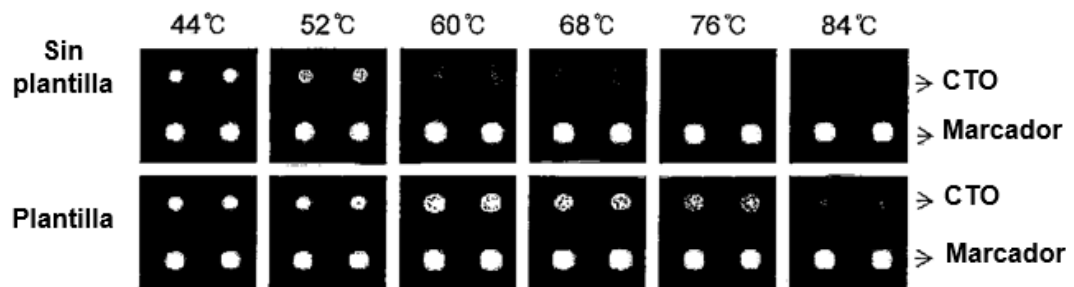


Fig. 21B

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

Plantilla ¹⁾	Cebador situado cadena arriba	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Unidades de fluorescencia relativa (RFU)					
				44°C	52°C	60°C	68°C	76°C	84°C
-	+	+	+	65.384 (±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⁾ La plantilla 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'.

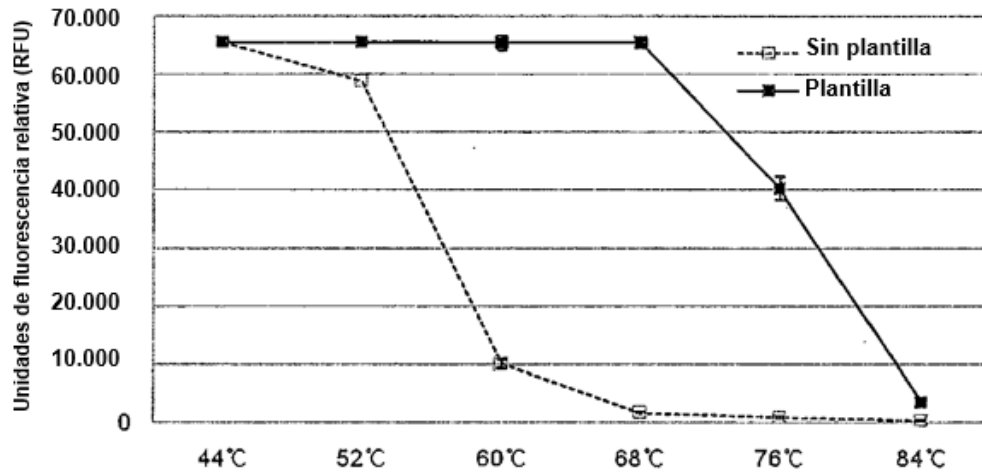


Fig. 22A

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

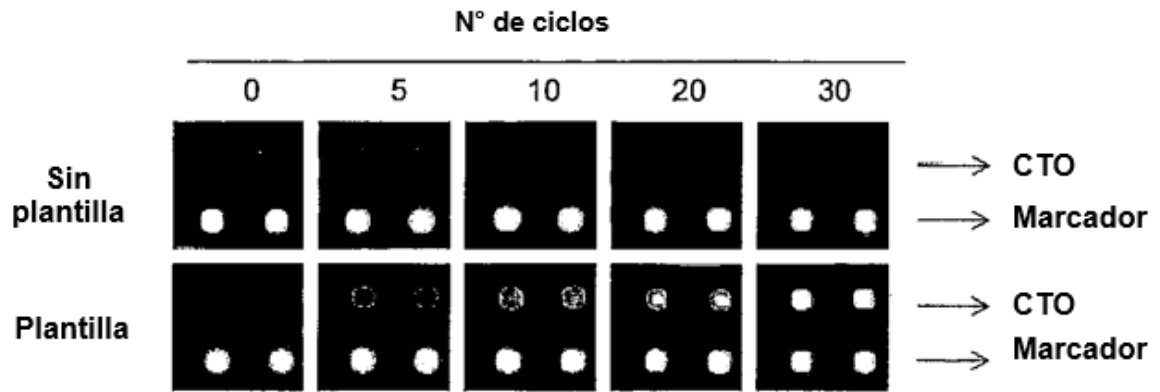


Fig. 22B

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

Plantilla ¹⁾	Cebador situado cadena arriba	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Unidades de fluorescencia relativa (RFU)				
				N° de ciclos:	0	5	10	20
-	+	+	+	1.216 (±86,3)	3.012 (±929,1)	1.889 (±276,5)	1.961 (±25,5)	3.261 (±279,3)
+	+	+	+	1.304 (±0,7)	18.939 (±1.342,1)	30.619 (±285,0)	56.248 (±2.208,3)	64.645 (±1.110,2)

¹⁾ La plantilla 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'.

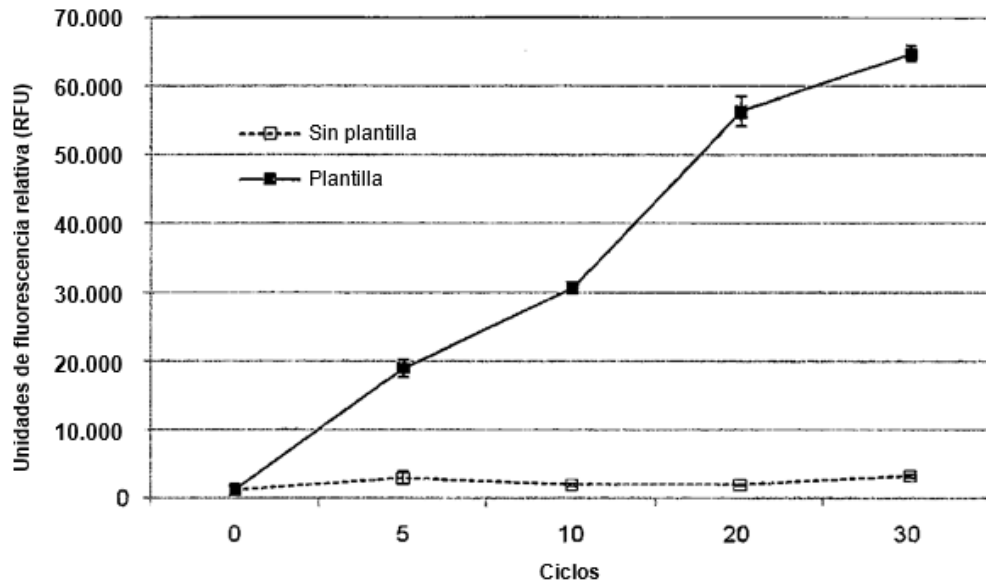


Fig. 23A

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

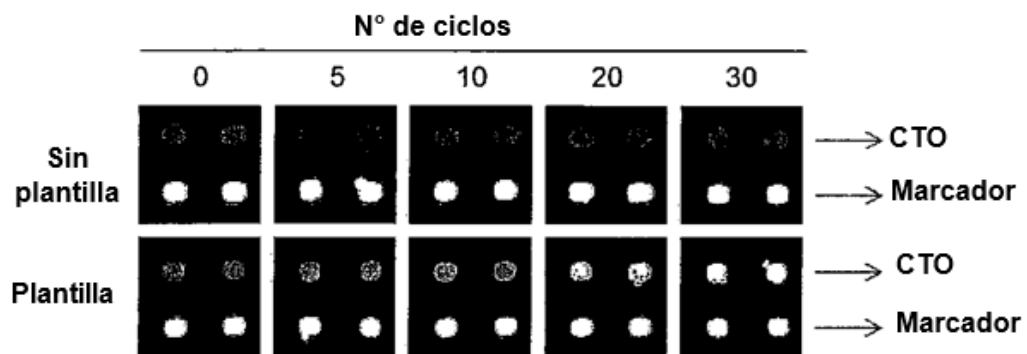


Fig. 23B

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

Plantilla ¹⁾	Cebador situado cadena arriba	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Unidades de fluorescencia relativa (RFU)					
				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⁾ La plantilla 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 plantilla. El CTO permanece inmovilizado sobre la superficie de un sustrato sólido a través de un grupo amino ubicado en su extremo 3'.

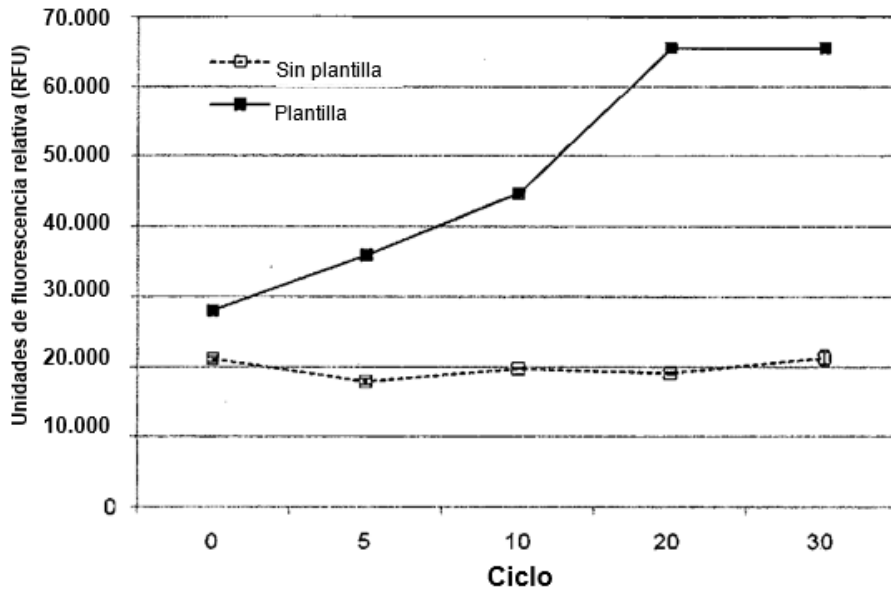
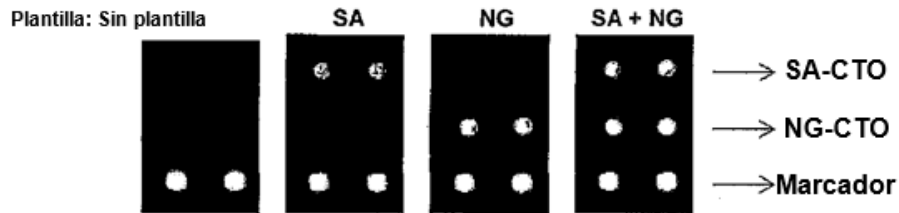


Fig. 24

Imagen de fluorescencia en una micromatriz



Intensidad de la fluorescencia sobre micromatriz

Plantilla ¹⁾	Cebadores ²⁾	PTO ³⁾	CTO ⁴⁾	Unidades de fluorescencia relativa	
				SA	NG
-	+	+	+	448 (±29,7)	2.522 (±116,0)
SA	+	+	+	65.192 (±198,7)	4.183 (±323,9)
NG	+	+	+	603 (±36,8)	65.332 (±1,4)
SA y NG	+	+	+	65.302 (±0,7)	65.302 (±0,7)

¹⁾ La plantilla 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'.