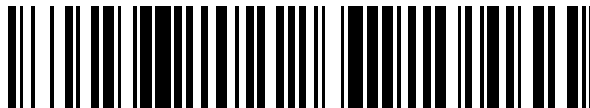


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 768**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2012 PCT/US2012/021585**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2012 WO12099896**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2012 E 12702099 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2665833**

54 Título: **Flujo de trabajo para la detección de ligandos empleando ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

17.01.2011 US 201161433475 P

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

15.09.2017

73 Titular/es:

**LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION (100.0%)
5823 Newton Drive
Carlsbad, CA 92008, US**

72 Inventor/es:

**CHEN, SHIAW-MIN;
SWARTZMAN, ELANA;
RUFF, DAVID;
SHANNON, MARK;
LU, JULIA y
HENDRICKS, STEPHEN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 632 768 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

Flujo de trabajo para la detección de ligandos empleando ácidos nucleicos

Campo de la descripción

5 Esta solicitud se refiere a métodos para acoplar oligonucleótidos que presentan complementariedad con un ácido nucleico diana y amplificar los oligonucleótidos acoplados, en los que el acoplamiento y la amplificación se producen en la misma mezcla de reacción.

Antecedentes de la descripción

10 La correlación de cambios en la expresión de genes y proteínas en sistemas biológicos se ha visto obstaculizada por la necesidad de una manipulación de muestras y plataformas de análisis separadas para los ácidos nucleicos y las proteínas. Por contraste con el flujo de trabajo simple, rápido y flexible de los métodos de PCR cuantitativa (qPCR), que permiten la caracterización de varias clases de biomarcadores de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARNm y microARN), los métodos de análisis de proteínas, tales como la transferencia Western, son incómodos, laboriosos y mucho menos cuantitativos. Los ensayos de acoplamiento de proximidad (PLA) han demostrado eliminar algunos de estos problemas. Sin embargo, los expertos en la técnica desean mejoras en los PLA.

15 Los PLA típicos o convencionales habitualmente implican al menos tres o cuatro etapas. La primera etapa generalmente es la unión de una primera y una segunda sonda (por ejemplo, sondas de anticuerpo) a un ligando (por ejemplo, una proteína de interés) de modo que las sondas se encuentren muy cercanas entre sí. Cada una de las sondas generalmente contiene un oligonucleótido. Los oligonucleótidos se acercan entre sí mediante la unión de la sondas y, en la segunda etapa, se acoplan entre sí (por ejemplo, el acontecimiento de acoplamiento). Los oligonucleótidos acoplados después pueden amplificarse y detectarse para determinar la presencia del ligando con una muestra de ensayo (por ejemplo, una muestra biológica). Esta etapa generalmente se logra añadiendo los componentes del acoplamiento, tales como ligasa, adenosina trifosfato (ATP) y mezcla de tampón-sal, a la reacción de unión. En la tercera etapa, la ligasa generalmente se desactiva (por ejemplo, mediante una digestión con proteasas) para evitar que se produzcan más acoplamientos de oligonucleótidos no unidos. En la cuarta etapa, la mezcla de reacción se traslada a una mezcla de reacción en cadena de polimerasa a tiempo real (PCR) y se determina la cantidad del producto amplificado mediante una PCR cuantitativa (qPCR). Tal como se describe a continuación, se ha descubierto, de forma sorprendente, que la tercera etapa (la digestión con ligasa) puede eliminarse, permitiendo con ello que el acoplamiento y la amplificación se produzcan en la misma mezcla de reacción sin inactivación por la ligasa. Estas y otras características y ventajas de los métodos descritos en la presente serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción.

20 En la técnica anterior se describen diversos ensayos de acoplamiento por proximidad. La publicación de EE. UU. n.º 2002/064779 A1 describe un método para detectar y cuantificar varios analitos en disolución para seleccionar candidatos a fármaco y para detectar agentes infecciosos en los alimentos empleando sondas de proximidad que comprenden un resto de unión con afinidad por los analitos.

35 Gullberg *et al.* (P.N.A.S., 2004, vol. 101, n.º 22, pp. 8420-8424) describen un método de acoplamiento por proximidad basado en anticuerpos, en el que se diseñan sondas de proximidad que contienen extensiones oligonucleotídicas para que se unan, de forma apareada, a proteínas diana y formen secuencias de marcadores amplificables mediante acoplamiento cuando se acercan entre sí.

40 Fredriksson *et al.* (Nature Biotechnology, 2002, vol. 20, pp. 473-477) describen un ensayo para la detección de proteínas que emplea el acoplamiento de ADN dependiente de la proximidad, en la que la unión proximal de una proteína diana por dos aptámeros de ADN estimula el acoplamiento de oligonucleótidos unidos a cada sonda de afinidad de aptámero. El documento WO 01/61037 A1 describe un método de acoplamiento/detección combinado que emplea las sondas de proximidad con aptámeros SELEX.

La invención busca aumentar el rendimiento de los ensayos de PLA según los métodos reivindicados.

45 Resumen de la descripción

En la presente se proporcionan métodos para acoplar y amplificar oligonucleótidos. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos se unen a sondas específicas de ligando, y la amplificación de los oligonucleótidos indica que las sondas se han unido a un ligando en la muestra. En una realización, se proporciona un método para acoplar al menos dos oligonucleótidos para producir un oligonucleótido acoplado, y amplificar el oligonucleótido acoplado, en el que el acoplamiento y la amplificación se producen en una única mezcla de reacción (por ejemplo, pueden considerarse no diluidos). En algunas realizaciones, puede emplearse un tercer oligonucleótido para que forme un puente entre dichos al menos dos oligonucleótidos que están unidos a las sondas. En ciertas realizaciones, el método puede comprender detectar un ligando en una muestra de ensayo (por ejemplo, una muestra biológica) que comprende poner en contacto la proteína con al menos una primera y una segunda sonda, y cada sonda tiene una especificidad de unión por la proteína y está unida al menos a un tipo de oligonucleótido, siendo los oligonucleótidos sobre la primera y la segunda sonda, respectivamente, al menos parcialmente complementarios entre sí; acoplar los

oligonucleótidos sobre la primera y la segunda sonda entre sí empleando una ligasa para producir un ácido nucleico diana y amplificar el ácido nucleico diana; y detectar el ácido nucleico diana amplificado. Por ejemplo, el método puede comprender detectar una proteína en una muestra de ensayo, y el método comprende poner en contacto la proteína con la menos dos sondas que tienen especificidad de unión con ella, y cada uno de los agentes comprende al menos un oligonucleótido; acoplar los oligonucleótidos para producir un oligonucleótido acoplado y amplificar el oligonucleótido acoplado en una única mezcla de reacción; y detectar la amplificación del oligonucleótido acoplado. En algunas realizaciones, una o más de las sondas es un anticuerpo. En ciertas realizaciones, al menos uno de los oligonucleótidos comprende al menos tres nucleótidos. Algunas realizaciones proporcionan los oligonucleótidos que se van a acoplar empleando una ligasa de huella pequeña, que puede ponerse en contacto con la adenosina trifosfato antes del uso. Puede utilizarse cualquier tipo de procedimiento de amplificación tal como, sin limitación, la reacción en cadena de polimerasa (PCR) (por ejemplo, PCR cuantitativa (qPCR)). En algunas realizaciones, puede resultar beneficioso inactivar la ligasa antes de la amplificación (por ejemplo, empleando una proteasa). Otras realizaciones de los métodos descritos en la presente serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción proporcionada en la presente.

15 **Breve descripción de los dibujos**

Los expertos en la técnica entenderán que los dibujos descritos a continuación solo tienen un propósito ilustrativo. Los dibujos no pretenden limitar el alcance de las presentes indicaciones de ninguna manera.

Figura 1. Un diagrama esquemático de un ejemplo de un proceso de PLA típico o convencional.

20 **Figura 2.** Un diagrama esquemático de un ejemplo de un proceso de PLA mejorado (tal como se describe en la presente).

Figura 3. (A) Un diagrama esquemático de un ejemplo de un flujo de trabajo de PLA típico o convencional. **(B)** Un diagrama esquemático de un ejemplo de un flujo de trabajo de PLA mejorado (tal como se describe en la presente).

Figura 4. Un diagrama esquemático de ejemplos de puentes ("splints") oligonucleotídicos ("conectores") **(A)** asimétricos (por ejemplo, 3+6) y **(B)** simétricos (por ejemplo, 4+4).

25 **Figura 5.** Comparación de un proceso de PLA típico o convencional (PLA1) y el proceso mejorado (PLA2) (se muestran los datos de dCT).

Figura 6. Uso del proceso de PLA mejorado con diversos ácidos nucleicos diana.

Figura 7. Comparación de dos longitudes de puente diferentes a concentraciones variables.

Figura 8. Comparación de cinco longitudes de puente diferentes.

30 **Figura 9.** Comparación de la ligasa de T4 con dos ligasas SF diferentes (por ejemplo, SF y DLxD).

Descripción detallada

En la presente se describen métodos para realizar ensayos de acoplamiento por proximidad. En los procesos de ensayo de acoplamiento por proximidad (PLA) típicos o convencionales (**Fig. 1**), una mezcla de sondas y la muestra se combinan en una reacción de unión. Después de la reacción de unión, la mezcla de reacción de acoplamiento se añade para realizar la reacción de acoplamiento. Para preparar la mezcla de reacción de acoplamiento, se diluyen una ligasa y el tampón de acoplamiento. Después de la reacción de acoplamiento, el producto acoplado se estabiliza mediante una digestión con proteasas; la proteasa entonces se inactiva (por ejemplo, empleando calor). Una porción del producto acoplado se traslada a una mezcla de reacción de PCR a tiempo real, y después se coloca en un recipiente de reacción de PCR (por ejemplo, una placa) en un instrumento de qPCR. Entonces se desarrolla la detección y la cuantificación del producto acoplado empleando técnicas convencionales.

En una realización del proceso de PLA mejorado descrito en la presente, puede prepararse un lisado celular y añadirse a este un tampón de acoplamiento. A esta mezcla después puede añadirse una mezcla de sondas de proximidad, una ligasa y una mezcla de PCR (que puede incluir, por ejemplo, una polimerasa termoestable). Esta mezcla de reacción combinada después puede incubarse durante una cantidad de tiempo adecuada (por ejemplo, una hora, 37 °C), la ligasa se inactiva opcionalmente (por ejemplo, empleando calor) y se realiza la PCR directamente sobre la mezcla. En **Fig. 2** se ilustra un diagrama esquemático de un ejemplo de realización del proceso de PLA mejorado. Tal como se muestra en la figura, la reacción de unión es la misma que la mostrada en **Fig. 1**. Sin embargo, en algunas realizaciones de los procesos de mejorados, la ligasa se añade a la mezcla de PCR a tiempo real, que después se añade directamente a la reacción de unión. En algunas realizaciones, esta mezcla de reacción después se deposita sobre una placa de reacción y después se analiza mediante un instrumento de qPCR. Entonces se desarrolla la detección y la cuantificación del producto acoplado empleando técnicas convencionales.

En algunas realizaciones, el menor factor de dilución proporcionado puede provocar una mayor concentración de la sonda de PLA en la reacción de acoplamiento. La mayor concentración de la sonda puede provocar una mayor señal de fondo, que puede minimizarse empleando un puente oligonucleotídico corto a concentración reducida. Por

ejemplo, un puente oligonucleotídico adecuado puede tener una longitud de 14 nucleótidos (por ejemplo, al menos cinco nucleótidos en el extremo 3' y al menos nueve nucleótidos en el extremo 5'; 5+9). Para asegurar la eficacia del acoplamiento, puede emplearse una ligasa de huella pequeña ("small footprint ligase", SFL). En algunas realizaciones, para simplificar aún más la etapa de acoplamiento-PCR, la adición típica de ATP a la reacción de acoplamiento puede omitirse. En su lugar, se puede emplear opcionalmente una SFL enriquecida en ATP (por ejemplo, una SFL que ha sido expuesta o se ha puesto en contacto con un suministro abundante o adicional de ATP durante un periodo de tiempo). Esta etapa de enriquecimiento puede ser especialmente útil cuando se emplean cosustratos para otras ligasas. Por tanto, la reacción de unión puede generarse combinando sondas de proximidad y muestras que contienen la molécula o moléculas diana, e incubando la mezcla de modo que se produce la unión entre las sondas y la molécula o moléculas diana. En algunas realizaciones, después de la reacción de unión, puede añadirse una mezcla de acoplamiento-PCR (por ejemplo, que comprende un puente de oligo de longitud corta (por ejemplo, un oligonucleótido que tiene al menos 6 nucleótidos, por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos), una SFL, y componentes de PCR a tiempo real convencionales). En otras realizaciones, la reacción de acoplamiento después puede realizarse a temperatura ambiente y el producto puede amplificarse y cuantificarse mediante una PCR a tiempo real. En algunas realizaciones, la ligasa puede desactivarse (por ejemplo, empleando calor). El producto acoplado después puede someterse a una PCR a tiempo real inmediatamente o después de la conservación. Así, las diversas realizaciones de los nuevos flujos de trabajo para procesos de PLA mejorados descritos en la presente proporcionan factores de dilución menores que permiten lograr el acoplamiento y la PCR en una única mezcla de reacción (por ejemplo, o en una única etapa sin etapas intermedias). En algunas realizaciones preferidas, también puede emplearse un puente oligonucleotídico corto y una SFL para controlar cualquier aumento en las reacciones de fondo. En otras realizaciones, la SFL puede preenriquecerse empleando ATP.

Se comparan también ejemplos de procesos de PLA típicos y mejorados en **Figs. 3A y 3B**. Tal como se muestra en estas figuras, los procesos típicos incluyen la preparación de la muestra, una reacción de unión, acoplamiento, inactivación de la ligasa empleando una proteasa, inactivación de la proteasa (por ejemplo, empleando calor), seguido de una PCR a tiempo real. Para realizar la etapa de PCR en los procesos de PLA típicos, una porción de la mezcla de reacción que contiene la ligasa y la proteasa inactivadas habitualmente se traslada a una placa de PCR, y se añade a esta la "mezcla de PCR" (por ejemplo, que contiene cebadores, dNTP, polimerasa y similares). Tal como se muestra en **Fig. 3B**, los procesos mejorados descritos pueden eliminar el uso de una proteasa y la dilución de la mezcla de reacción antes de la PCR. Tal como se muestra en la figura, la ligasa puede inactivarse empleando, por ejemplo, calor, y la mezcla de reacción resultante puede colocarse directamente en un instrumento/ensayo de qPCR. Así, los flujos de trabajo de PLA mejorados y simplificados pueden emplear los productos de la reacción de unión completos en un ensayo de PCR a tiempo real (por ejemplo, un pocillo de una placa de múltiples pocillos). Esto proporciona un flujo de trabajo mejorado y una dilución reducida de la mezcla de reacción. Como resultado, en algunas realizaciones de los procesos de PLA mejorados, la mezcla de reacción de PCR contiene una mayor concentración del producto acoplado (por ejemplo, el ácido nucleico diana). En algunas realizaciones, la mejora proporcionada por los procesos de PLA mejorados puede medirse como la dCT de la reacción (por ejemplo, una señal de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más (dCT); véase, por ejemplo, **Fig. 4**). La sensibilidad de los procesos de PLA mejorados, comparada con los procesos de PLA típicos, también puede observarse (por ejemplo, como un cambio en número de veces; véase, por ejemplo, **Fig. 5**).

Los procesos descritos en la presente proporcionan, en algunas realizaciones, la detección de una proteína en una muestra de ensayo, y los métodos comprenden poner en contacto la proteína con la menos dos sondas que tienen especificidad de unión con ella, y cada una de las sondas comprende al menos un oligonucleótido; acoplar los oligonucleótidos para producir un oligonucleótido acoplado; amplificar el oligonucleótido acoplado en una única mezcla de reacción; y detectar la amplificación del oligonucleótido acoplado. En algunas realizaciones, también puede emplearse un tercer oligonucleótido para que forme un puente entre cada uno de los oligonucleótidos que están unidos a las sondas. En algunas realizaciones, una o más de las sondas es un anticuerpo. En ciertas realizaciones, al menos uno de los oligonucleótidos comprende al menos tres nucleótidos. Algunas realizaciones proporcionan el uso de una SFL, que opcionalmente puede ponerse en contacto con adenosina trifosfato (ATP) antes del uso, para el acoplamiento de los oligonucleótidos. Puede utilizarse cualquier tipo de procedimiento de amplificación tal como, sin limitación, la reacción en cadena de polimerasa (PCR) (por ejemplo, PCR cuantitativa). En algunas realizaciones, puede ser beneficioso inactivar la ligasa antes de la amplificación (por ejemplo, empleando una proteasa, calor o cualquier otro método conocido en la técnica). Otras realizaciones de la invención descrita en la presente serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción proporcionada en la presente.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para detectar una diana en una muestra, en el que el método incluye las etapas de unir una primera y una segunda sonda, cada una de las cuales se une específicamente a la diana, y cada una de las sondas comprende una porción oligonucleotídica (o cola); acoplar la primera y la segunda cola oligonucleotídica produciendo, con ello, un molde oligonucleotídico acoplado; y realizar una reacción en cadena de polimerasa (PCR) del molde oligonucleotídico a lo largo de la primera y la segunda cola oligonucleotídica para cuantificar dicho molde. En algunas realizaciones, las etapas de acoplamiento y PCR pueden realizarse en la misma mezcla de reacción. En otras realizaciones, el método puede incluir una primera y una segunda sonda, y cada sonda se une específicamente a la diana, comprendiendo cada una de las sondas una cola oligonucleotídica; acoplar las

colas oligonucleotídicas para producir un molde oligonucleotídico acoplado, y amplificar el molde mediante una PCR en una única etapa para producir un molde amplificado; y cuantificar el molde amplificado. Las sondas pueden comprender anticuerpos que se unen específicamente a la diana. Los oligonucleótidos pueden acoplarse empleando un puente oligonucleotídico corto (por ejemplo, puentes de oligos con una longitud de al menos 6 nucleótidos que tienen proyecciones 3' y 5' de, por ejemplo, 9+9, 9+8, 9+7, 9+6, 9+5, 8+8, 5+3, 4+7, 3+3 nucleótidos, o cualquier otra variación posible en la longitud o la simetría, según se contempla y se describe con más detalle a continuación). En algunas realizaciones, la ligasa puede preenriquecerse empleando ATP y/o puede inactivarse empleando, por ejemplo, una o más proteasas y/o calor. El molde amplificado puede cuantificarse mediante cualquier método adecuado que incluye, por ejemplo, PCR a tiempo real (por ejemplo, un ensayo TaqMan o un ensayo de balizas moleculares).

Los procesos mejorados descritos y/o ejemplificados en la presente proporcionan unos tiempos de trabajo reducidos desde el tiempo de inicio del proceso hasta la recogida de los resultados (por ejemplo, más rápidos), menor tiempo de manipulación (por ejemplo, más sencillos y baratos), menor utilización de equipo de laboratorio de plástico (por ejemplo, más baratos y más respetuosos con el medioambiente ("más verdes")), y señales y sensibilidades más altas (por ejemplo, más sensibles). En algunas realizaciones, estos procesos mejorados proporcionan flujos de trabajo más sencillos combinando las etapas de acoplamiento y de PCR, factores de dilución reducidos desde la etapa de unión hasta la etapa de acoplamiento, menores concentraciones de sondas de unión para permitir unos factores de dilución reducidos, el uso de oligonucleótidos conectores más cortos (por ejemplo, con una longitud de tan solo 6 nucleótidos) para controlar las señales de fondo, el uso de concentraciones más bajas de oligonucleótidos conectores para controlar las señales de fondo, el uso de ligasas SF para permitir el uso de longitudes más cortas de oligonucleótidos conectores, esquemas de purificación de ligasas SF enriquecidas en ATP para omitir el ATP en la etapa de acoplamiento-PCR y/o el posible uso del volumen de reacción completo para mejorar la señal y la sensibilidad del PLA.

Los métodos descritos en la presente son particularmente útiles ya que pueden utilizarse con diversos sistemas para detectar proteínas. Los ejemplos de dichos sistemas incluyen, por ejemplo, los ensayos de proteínas TaqMan[®]. Los ensayos de proteínas TaqMan[®] son una forma adaptada de PLA[™], una tecnología del ensayo de acoplamiento por proximidad que combina la unión de un anticuerpo-proteína con la detección del ácido nucleico indicador mediante PCR a tiempo real. Applied Biosystems ha optimizado esta técnica para su uso con lisados de células y de tejidos brutos y la ha combinado con la química de TaqMan[®] para crear un proceso muy sensible y específico para medir la expresión de proteínas en muestras pequeñas. Se han desarrollado ensayos para la detección de OCT3/4, NANOG, SOX2, y LIN28 en células pluripotenciales embrionarias humanas, así como ICAM1 y CSTB para medir la cuantificación relativa en células humanas. Las etapas básicas de dichos ensayos incluyen la unión de una diana de proteína por sondas de ensayo apareadas, el acoplamiento de los oligonucleótidos por una ADN ligasa, y la amplificación del producto del acoplamiento mediante un ensayo de PCR a tiempo real TaqMan. Las sondas empleadas en la primera etapa generalmente son anticuerpos específicos de diana conjugados con oligonucleótidos a través de un enlace de biotina-estreptavidina (SA). Cada oligonucleótido en la pareja presenta un extremo 5' o 3' que se acercan cuando las sondas del ensayo se unen a dos epitopos diferentes sobre la proteína diana. El sustrato para la ligasa generalmente es una estructura de puente formada por la hibridación de un tercer oligonucleótido con los extremos oligonucleotídicos de la pareja de sondas del ensayo. Esta estructura se forma preferentemente cuando las sondas del ensayo están cerca entre sí. El producto del acoplamiento generalmente actúa como molde en el ensayo de PCR a tiempo real TaqMan[®]. Los sistemas pueden utilizarse, por ejemplo, para realizar el análisis de proteínas en muestras pequeñas (por ejemplo, células pluripotenciales, tumores de células germinales), para correlacionar y/o validar resultados de la cuantificación de ARN y proteínas, para analizar modificaciones postraduccionales, para validar el silenciamiento de genes inducido por ARNsi y/o para validar experimentos de transducción/transfección de genes. Los datos generados empleando estos sistemas pueden analizarse empleando programas informáticos, por ejemplo, el paquete de software ProteinAssist[™] (Applied Biosystems[™]).

Para señalar y describir de modo más claro y conciso el contenido de la presente descripción, se proporcionan las siguientes definiciones de términos específicos, que se emplean en la siguiente descripción y en las reivindicaciones adjuntas. A lo largo de la memoria descriptiva, los ejemplos de términos específicos deben considerarse ejemplos no limitantes.

Tal como se emplean en la presente, el término "nucleótido" o la expresión "base de nucleótido" se refieren a un nucleósido fosfato. Esto incluye, pero no se limita a un nucleótido natural, un nucleótido sintético, un nucleótido modificado, o un resto de sustitución o nucleótido universal (por ejemplo, inosina). El nucleósido fosfato puede ser un nucleósido monofosfato, un nucleósido difosfato o un nucleótido trifosfato. Un "nucleótido" se refiere a un nucleótido, un nucleósido o uno de sus análogos. Opcionalmente, el nucleótido es un N- o C-glicósido de una base de purina o pirimidina (por ejemplo, un desoxirribonucleósido que contiene 2-desoxi-D-ribosa o un ribonucleósido que contiene D-ribosa). Los ejemplos de otros análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metilfosfonatos, metilfosfonatos quirales, 2-O-metil ribonucleótidos. Las bases de nucleótidos habitualmente presentan un anillo o anillo aromáticos centrales sustituidos o no sustituidos. En ciertas realizaciones, el anillo o anillos aromáticos contienen al menos un átomo de nitrógeno. En ciertas realizaciones, la base de nucleótido es capaz de formar enlaces de hidrógeno de Watson-Crick y/o Hoogsteen con una base de nucleótido complementaria apropiada. Los ejemplos de bases de nucleótidos y sus análogos incluyen, pero no se limitan a purinas, tales como 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, adenina (A), etenoadenina, N6- Δ 2-isopenteniladenina (6iA), N6- Δ 2-isopentenil-2-

metiltioadenina (2ms6iA), N6-metiladenina, guanina (G), isoguanina, N2-dimetilguanina (dmG), 7-metilguanina (7 mG), 2-tiopirimidina, 6-tioguanina (6sG) hipoxantina y O6-metilguanina; 7-desaza-purinas, tales como 7-desazaadenina (7-desaza-A) y 7-desazaguanina (7-desaza-G); pirimidinas, tales como citosina (C), 5-propinilcitosina, isocitosina, timina (T), 4-tiotimina (4sT), 5,6-dihidrotimina, O4-metilimina, uracilo (U), 4-tiouracilo (4sU) y 5,6-dihidrouracilo (dihidrouracilo; D); indoles, tales como nitroindol y 4-metilindol; pirroles, tales como nitropirrol; nebularina; base (Y); etc. En ciertas realizaciones, las bases de nucleótidos son bases de nucleótidos universales. Otros ejemplos de bases de nucleótidos pueden encontrarse, por ejemplo, en Fasman, 1989, Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, pp. 385-394, CRC Press, Boca Raton, Fla., y las referencias citadas en este documento. Una "base universal", tal como se emplea en la presente, es una base que es complementaria con más de una base diferente. Las bases totalmente universales pueden aparearse con cualquiera de las bases que se encuentran generalmente en los ácidos nucleicos naturales. No es necesario que la base sea igualmente capaz de aparearse con cada una de las bases naturales. Como alternativa, la base universal puede aparearse solo o aparearse selectivamente con dos o más bases, pero no con todas las bases. Opcionalmente, las bases universales se aparean solo o se aparean selectivamente con purinas o, como alternativa, con pirimidinas. Si se desea, dos o más bases universales pueden incluirse en una posición concreta en una sonda. En la técnica se conocen una serie de bases universales que incluyen, pero no se limitan a hipoxantina, 3-nitropirrol, 4-nitroindol, 5-nitroindol, 4-nitrobenzimidazol, 5-nitroindazol, 8-aza-7-desazaadenina, 6H,8H-3,4-dihidropirimido[4,5-c][1,2]oxazin-7-ona (P. Kong Thoo Lin. y D.M. Brown, Nucleic Acids Res., 1989, 17, 10373-10383), 2-amino-6-metoxiaminopurina (D.M. Brown y P. Kong Thoo Lin, Carbohydrate Research, 1991, 216, 129-139), etc. La hipoxantina es una base totalmente universal preferida. Los nucleósidos que comprenden hipoxantina incluyen, pero no se limitan a inosina, isoinosina, 2'-desoxi-inosina, y 7-desaza-2'-desoxi-inosina, 2-aza-2'-desoxi-inosina. También pueden utilizarse análogos naturales y sintéticos que incluyen, por ejemplo, hipoxantina, 2-aminoadenina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-N⁴ etencitosina, 4-aminopirrazolo[3,4-d]pirimidina y 6-amino-4-hidroxi[3,4-d]pirimidina, entre otros. Las unidades de nucleótidos de los oligonucleótidos también pueden tener una función de entrecruzamiento (por ejemplo, un agente alquilante).

Un nucleósido habitualmente es un compuesto que tiene una base de nucleótido unida covalentemente al carbono C-1' de un azúcar de pentosa. En ciertas realizaciones, el enlace es a través de un nitrógeno del anillo heteroaromático. Los azúcares de pentosa típicos incluyen, pero no se limitan a las pentosas en las que uno o más de los átomos de carbono están cada uno independientemente sustituidos con uno o más de los mismos grupos o de diferentes grupos -R, -OR, -NRR o halógeno, en los que cada R es independientemente hidrógeno, alquilo (C₁-C₆) o arilo (C₅-C₁₄). El azúcar de pentosa puede estar saturado o insaturado. Los ejemplos de azúcares de pentosa y sus análogos incluyen, pero no se limitan a ribosa, 2'-desoxirribosa, 2'-(alcoxi(C₁-C₆))ribosa, 2'-(aril(C₅-C₁₄))oxirribosa, 2',3'-didesoxirribosa, 2',3'-dideshidrorribosa, 2'-desoxi-3'-halorribosa, 2'-desoxi-3'-fluorribosa, 2'-desoxi-3'-clorribosa, 2'-desoxi-3'-aminorribosa, 2'-desoxi-3'-(alquil(C₁-C₆))ribosa, 2'-desoxi-3'-(alcoxi(C₁-C₆))ribosa y 2'-desoxi-3'-(ariloxi(C₅-C₁₄))ribosa. Uno o más de los carbonos de la pentosa de un nucleósido puede estar sustituido con un éster fosfato, tal como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.255.994. En ciertas realizaciones, los nucleósidos son nucleósidos en los que la base de nucleótido es una purina, una 7-desazapurina, un pirimidina, una base de nucleótido universal, una base de nucleótido específica, o uno de sus análogos. Los análogos de nucleótidos incluyen derivados en los que el azúcar de pentosa y/o la base de nucleótido y/o uno o más de los ésteres fosfato de un nucleósido pueden estar sustituidos por su respectivo análogo. Los ejemplos de análogos de azúcares de pentosa y análogos de bases de nucleótidos se han descrito anteriormente. Los ejemplos de análogos de ésteres fosfato incluyen, pero no se limitan a alquifosfonatos, metilfosfonatos, fosforamidatos, fosfotriésteres, fosforotioatos, fosforoditioatos, fosforoselenoatos, fosforodiselenoatos, fosforoanilitioatos, fosforoanildatos, fosforoamidatos, boronofosfatos, etc., y pueden incluir contraiones asociados. Otros análogos de nucleótidos son monómeros de análogos de nucleótidos que pueden polimerizarse para formar análogos polinucleotídicos en los el esqueleto de éster fosfato y/o azúcar fosfato del ADN/ARN está sustituido por un tipo de enlace diferente. Los ejemplos de análogos polinucleotídicos incluyen, pero no se limitan a ácidos nucleicos peptídicos, en los que el esqueleto de azúcar fosfato del polinucleótido está sustituido por un esqueleto peptídico. Los enlaces internucleosídicos pueden ser un enlace fosfodiéster, aunque pueden emplearse otros enlaces (por ejemplo, enlaces escindibles que pueden ser sustancialmente rotos bajo condiciones en las que los enlaces fosfodiéster no se rompen sustancialmente), por ejemplo, un enlace que contenga un sitio sensible a endonucleasa AP, por ejemplo, un resto abásico, un resto que contiene una basa dañada que es un sustrato para la eliminación por una ADN glicosilasa, u otro resto o enlace que sea un sustrato para la ruptura por una endonucleasa AP, o un nucleósido de disacárido.

Tal como se emplea en la presente, el término "oligonucleótido" ("oligo") o "polinucleótido" puede indicar un oligómero de nucleótidos o sus derivados. Los polinucleótidos incluyen ADN bicatenario y monocatenario, así como ARN bicatenario y monocatenario, híbridos de ADN:ARN, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) e híbridos entre PNA y ADN o ARN, y también incluyen tipos de modificaciones conocidas, por ejemplo, marcadores conocidos en la técnica, metilación, "bloqueantes de cadena", sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, modificaciones internucleotídicas, tales como, por ejemplo, con enlaces no cargados (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbonatos, etc.), con enlaces cargados negativamente (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), y con enlaces cargados positivamente (por ejemplo, aminoalquifosforamidatos, aminoalquifosfotriésteres), que contengan grupos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (que incluyen nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), con intercalantes (por ejemplo, acridina,

psoraleno, etc.), que contengan quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), que contengan alquilantes, con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido u oligonucleótido. Los oligómeros también pueden incluir bases y/o esqueletos modificados (por ejemplo, enlace fosfato modificado o resto azúcar modificado). Los ejemplos no limitantes de esqueletos sintéticos que confieren estabilidad y/u otras ventajas a los oligómeros pueden incluir enlaces fosforotioato, ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos bloqueados (Singh, *et al.*, Chem. Comm., 4:455-456 (1998)), ácidos nucleicos de xilosa y/o sus análogos. En otros casos, el polinucleótido puede contener esqueletos no nucleotídicos, por ejemplo, poliamida (por ejemplo, ácidos nucleico peptídicos (PNA)) y polimorfolino (disponible en el mercado en Anti-Virals, Inc., Corvallis, Oregón, como polímeros Neugene™), y otros polímeros de ácidos nucleicos específicos de secuencia sintética, con la condición de que los polímeros contengan nucleobases en una configuración que permita el apareamiento de bases y el apilamiento de bases, tal como se encuentra en el ADN y el ARN.

Los oligonucleótidos y/o polinucleótidos pueden tener cualquier longitud "n." Por ejemplo, n puede ser cualquiera de 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, etc., número de nucleótidos. La estructura polinucleotídica $(N)_n$ representa un oligonucleótido que consiste en un número n de nucleótidos N (por ejemplo, $(I)_8$ representa un oligonucleótido que tiene la secuencia IIIIIII; o $(A)_{12}$ representa un oligonucleótido que tiene la secuencia AAAAAAAAAA). Otros tipos de oligonucleótidos o polinucleótidos también pueden ser adecuados para su uso, tal como entienden los expertos en la técnica a partir de esta descripción.

Los oligonucleótidos y/o polinucleótidos pueden estar unidos opcionalmente a uno o más restos no nucleotídicos, tales como marcadores y otras moléculas pequeñas, moléculas grandes, tales como proteínas, lípidos, azúcares, y soportes sólidos o semisólidos, por ejemplo, a través del extremo 5' o 3'. Los marcadores pueden incluir cualquier resto que pueda detectarse empleando un método de detección seleccionado y que, por tanto, hacen que el nucleótido o polinucleótido unido sea detectable de modo similar empleando un método de detección seleccionado (por ejemplo, empleando un SGC y/o un marcador detectable). Opcionalmente, el marcador emite radiación electromagnética que es ópticamente detectable o visible. En algunos casos, el nucleótido o polinucleótido no está unido a un marcador y la presencia del nucleótido o polinucleótido se detecta directamente.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "ácido nucleico" se refiere a polímeros de nucleótidos o sus derivados. Tal como se emplea en la presente, la expresión "ácido nucleico diana" se refiere a un ácido nucleico que se desea amplificar en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ácido nucleico diana comprende un molde de ácido nucleico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana puede ser el producto del acoplamiento de al menos dos oligonucleótidos entre sí.

Tal como se emplea en la presente, el término "secuencia" se refiere a una secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido o un ácido nucleico. A lo largo de la memoria descriptiva, cuando un oligonucleótido/ácido nucleico se representa mediante una secuencia de letras, los nucleótidos están en el orden de 5' a 3' de izquierda a derecha. Por ejemplo, si el polinucleótido contiene las bases adenina, guanina, citosina, timina o uracilo, la secuencia polinucleotídica puede ser representada mediante una correspondiente sucesión de letras A, G, C, T, o U), por ejemplo, una molécula de ADN o ARN. Y un oligonucleótido representado por la secuencia $(I)_n(A)_n$, en la que n = 1, 2, 3, 4, etc., representa un oligonucleótido en el que el nucleótido o nucleótidos 5' terminales son inosina y el nucleótido o nucleótidos 3' terminales son adenosina.

Opcionalmente, puede considerarse que los oligonucleótidos y/o polinucleótidos tienen secuencias "complementarias" si pueden hibridarse entre sí. El término "hibridación" generalmente se refiere al proceso mediante el cual los oligonucleótidos y/o polinucleótidos se hibridan entre sí. El adjetivo "hibridado" se refiere a dos polinucleótidos que están unidos entre sí por medio de dos o más apareamientos de bases secuencialmente adyacentes. Generalmente, estos términos se refieren a la "hibridación específica". Dos oligonucleótidos y/o polinucleótidos pueden hibridarse selectivamente (o específicamente) entre sí si se unen de modo significativo o detectable entre sí bajo condiciones rigurosas de hibridación cuando están presentes en una mezcla compleja de polinucleótidos, tal como el ADN celular total o ADN de bancos. En algunas realizaciones, para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces la señal de fondo, preferiblemente 10 veces la hibridación de fondo. Opcionalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5-10 °C más bajas que el punto de fusión térmico para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definido. Las condiciones rigurosas son opcionalmente las condiciones en las que la concentración salina es menor que aproximadamente 1,0 M de ion sodio, generalmente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de ion sodio (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, más de 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también pueden lograrse con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Los ejemplos de condiciones rigurosas de hibridación pueden ser los siguientes: formamida al 50%, 5x SSC, y SDS al 1%, incubación a 42 °C, o 5x SSC, SDS al 1%, incubación a 65 °C, con lavado en 0,2x SSC, y SDS al 0,1% a 65 °C. Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí bajo condiciones rigurosas aún son sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Se emplea una "hibridación no específica" para indicar cualquier hibridación no prevista o insignificante, por ejemplo, una hibridación con una secuencia polinucleotídica no prevista distinta de la secuencia polinucleotídica diana prevista. La secuencia polinucleotídica no prevista puede estar sobre el mismo polinucleótido o en un polinucleótido diferente de la diana

prevista. En algunos casos, la única hibridación prevista puede ser un apareamiento de bases de Watson-Crick entre dos polinucleótidos. Otros tipos de apareamientos de bases previstas pueden incluir el apareamiento entre los correspondientes análogos de dichos nucleótidos o entre isocitidina e isoguanina. En algunos casos en los que la hibridación solo se produce entre bases complementarias, cualquier unión entre bases no complementarias se considera una hibridación no específica.

En algunas realizaciones, las secuencias complementarias pueden ser secuencias que, cuando se hibridan entre sí, pueden acoplarse de modo eficaz a un tercer polinucleótido que se ha hibridado en una posición adyacente. De modo similar, los restos nucleótidos pueden considerarse complementarios si, cuando ambos tienen sus bases apareadas entre sí dentro de dos polinucleótidos hibridados, cualquiera de los nucleótidos puede acoplarse en una reacción de acoplamiento dirigida por moldes cuando se sitúa como el nucleótido terminal en su polinucleótido. Los nucleótidos que son incorporados de modo eficaz por las ADN polimerasas en posición opuesta con respecto al otro durante la replicación del ADN bajo condiciones fisiológicas también se consideran complementarios. En una realización, los nucleótidos complementarios pueden formar pares de bases entre sí, tales como las pares de bases A-T/U y G-C formadas mediante enlaces de hidrógeno de tipo Watson-Crick específicos entre las nucleobases de posiciones en los nucleótidos y/o polinucleótidos antiparalelas entre sí. La complementariedad de otros pares de bases artificiales puede basarse en otros tipos de enlaces de hidrógeno y/o en la hidrofobicidad de las bases y/o en la complementariedad de forma entre las bases. En casos apropiados, los polinucleótidos pueden considerarse complementarios cuando pueden experimentar un apareamiento de bases acumulado en dos o más correspondientes posiciones individuales en orientación antiparalela, como en un dúplex hibridado. Opcionalmente, puede existir una complementariedad "completa" o "total" entre una primera y una segunda secuencia polinucleotídica cuando cada nucleótido en la primera secuencia polinucleotídica puede experimentar una interacción de apareamiento de bases estabilizante con un nucleótido en la correspondiente posición antiparalela sobre el segundo polinucleótido. La complementariedad "parcial" describe secuencias polinucleotídicas en las que al menos 20%, pero menos del 100%, de los restos de un polinucleótido son complementarios con restos en el otro polinucleótido. Un "desapareamiento" está presente en cualquier posición en los dos nucleótidos opuestos que no son complementarios. En algunos ensayos de acoplamiento, un polinucleótido puede experimentar un acontecimiento de apareamiento sustancial dependiente de molde incluso si presenta uno o más desapareamientos con su molde hibridado. Opcionalmente, el polinucleótido no presenta más de 4, 3, o 2 desapareamientos, por ejemplo, 0 o 1 desapareamiento, con su molde. En algunos ensayos, el polinucleótido no experimenta un acoplamiento sustancial dependiente de molde a menos que sea al menos 60% complementario, por ejemplo, al menos aproximadamente 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% complementario con su molde.

"Degenerado", con respecto a una posición en un polinucleótido que es un polinucleótido de una población de polinucleótidos, significa que la identidad de la base del nucleósido que ocupa esa posición varía entre diferentes miembros de la población. Una población de polinucleótidos en este contexto es opcionalmente una mezcla de polinucleótidos dentro de una única fase continua (por ejemplo, un fluido). La "posición" puede indicarse mediante un valor numérico asignado a uno o más nucleótidos en un polinucleótido, en general con respecto al extremo 5' o 3'. Por ejemplo, al nucleótido terminal en el extremo 3' de una sonda de extensión se le puede asignar la posición 1. Así, en un agrupamiento de sondas de extensión de estructura 3'-XXXNXXX-5', N está en la posición 4. Se dice que una posición está degenerada en k veces si puede ser ocupada por nucleósidos que tienen cualquiera de k identidades diferentes. Por ejemplo, una posición que puede ser ocupada por nucleósidos que comprenden cualquiera de 2 bases diferentes está degenerada en 2 veces.

Un "soporte sólido", tal como se emplea en la presente, generalmente se refiere a una estructura o matriz sobre la cual o en el interior de la cual pueden inmovilizarse reactivos de acoplamiento y/o amplificación (por ejemplo, moléculas de ácidos nucleicos, micropartículas y/o similares), de modo que se evita, significativa o totalmente, que difundan libremente o se muevan con respecto a los otros. Los reactivos, por ejemplo, pueden colocarse en contacto con el soporte y opcionalmente unirse de modo covalente o no covalente o estar parcial o completamente inmersos. Los términos "micropartícula," "esferas" "microesferas", etc., se refieren a partículas (opcional, pero no necesariamente con forma esférica) que tienen una longitud mínima de sección transversal (por ejemplo, diámetro) de 50 micrómetros o menor, preferiblemente de 10 micrómetros o menor, de 3 micrómetros o menor, de aproximadamente 1 micrómetro o menor, de aproximadamente 0,5 micrómetros o menor, por ejemplo, de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, o 0,4 micrómetros o menor (por ejemplo, por debajo de 1 nanómetro, de aproximadamente 1-10 nanómetros, de aproximadamente 10-100 nanómetros o de aproximadamente 100-500 nanómetros). Las micropartículas (por ejemplo, Dynabeads de Dynal, Oslo, Noruega) pueden estar formadas por una diversidad de materiales inorgánicos u orgánicos que incluyen, pero no se limitan a vidrio (por ejemplo, vidrio de tamaño de poro controlado), sílice, óxido de circonio, poliestireno reticulado, poliacrilato, poli(metacrilato de metilo), dióxido de titanio, látex, poliestireno, etc. La magnetización puede facilitar la recogida y concentración de los reactivos unidos a las micropartículas (por ejemplo, polinucleótidos o ligasas) después de la amplificación, y facilita otras etapas (por ejemplo, lavados, eliminación de reactivos, etc.). En ciertas realizaciones de la invención, puede emplearse una población de micropartículas que tiene diferentes formas, tamaños y/o colores. Las micropartículas opcionalmente pueden estar codificadas, por ejemplo, con puntos cuánticos de modo que cada micropartícula puede identificarse de modo individual o exclusivo.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "mezcla de reacción" se refiere a la combinación de reactivos o disoluciones de reactivos que se emplean para realizar un análisis químico o un ensayo biológico. En algunas

realizaciones, la mezcla de reacción comprende todos los componentes necesarios para realizar una reacción de síntesis/amplificación de un ácido nucleico (ADN). Tal como se describió anteriormente, dichas mezclas de reacción pueden incluir al menos una pareja de cebadores de amplificación adecuados para amplificar una secuencia de ácido nucleico de interés (por ejemplo, un ácido nucleico diana). Tal como se describió anteriormente, una mezcla de reacción adecuada también puede incluir una "mezcla maestra" que contiene los componentes (por ejemplo, generalmente no incluye la pareja de cebadores) necesarios para realizar una reacción de amplificación (por ejemplo, detergente, magnesio, componentes tampón, etc.). Otras realizaciones de mezclas de reacción también se contemplan en la presente, tal como entienden los expertos en la técnica.

Tal como se emplean en la presente, los términos "disolución de reactivos" o "disolución adecuada para realizar una reacción de síntesis de ADN" se refieren a cualquiera o a todas las disoluciones que se emplean generalmente para realizar una reacción de amplificación o la síntesis de ADN. Estas incluyen, pero no se limitan a disoluciones empleadas en métodos de amplificación de ADN, disoluciones empleadas en reacciones de amplificación de PCR o similares. La disolución adecuada para la reacción de síntesis de ADN puede comprender tampón, sales y/o nucleótidos. También puede comprender cebadores y/o moldes de ADN para ser amplificados. Generalmente se incluyen una o más disoluciones de reactivos en las mezclas de reacción o mezclas maestras descritas en la presente.

Tal como se emplea en la presente, el término "cebador" o la expresión "secuencia de cebador" se refiere a un oligonucleótido lineal corto que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, un molde de ADN que se va a amplificar) para cebar una reacción de síntesis de ácidos nucleicos. El cebador puede ser un oligonucleótido de ARN, un oligonucleótido de ADN, o una secuencia quimérica (por ejemplo, que comprende ARN y ADN). El cebador puede contener nucleótidos naturales, sintéticos o modificados. Tanto el límite superior como el límite inferior de la longitud del cebador se determinan de modo empírico. El límite inferior de la longitud del cebador es la longitud mínima necesaria para formar un dúplex estable tras la hibridación con el ácido nucleico diana bajo condiciones de reacción de amplificación de ácidos nucleicos. Los cebadores muy cortos (habitualmente con una longitud menor que 3 nucleótidos) no forman dúplex termodinámicamente estables con el ácido nucleico diana bajo estas condiciones de hibridación. El límite superior a menudo viene determinado por la posibilidad de que se produzca la formación de dúplex en una región distinta a la secuencia del ácido nucleico predeterminada en el ácido nucleico diana. En general, las longitudes adecuadas de los cebadores se encuentran en el intervalo de aproximadamente cualquiera, por ejemplo, de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, etc., nucleótidos de longitud.

En algunas realizaciones, los términos "sonda", "oligonucleótido" y/o "cebador" pueden ser intercambiables en la presente, de modo que cualquiera de estos puede tomarse como referencia de otro. Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido", "sonda", "cebador", "molde", y la expresión "ácido nucleico" y similares pueden indicar una población o agrupación de moléculas individuales que son sustancialmente idénticas a lo largo de su longitud completa o a lo largo de una porción pertinente de interés. Por ejemplo, el término "molde" puede indicar una pluralidad de moléculas de molde que son sustancialmente idénticas, etc. En el caso de polinucleótidos que están degenerados en una o más posiciones, se apreciará que el polinucleótido degenerado puede comprender una pluralidad de moléculas polinucleotídicas, que tienen secuencias que son sustancialmente idénticas solo en la posición o posiciones no degeneradas y que se diferencia en secuencia en las posiciones degeneradas. Así, la referencia a "un" polinucleótido (por ejemplo, "una" sonda, "un" cebador, oligonucleótido, molde, etc.) puede indicar una población de moléculas polinucleotídicas sustancialmente idénticas, de modo que no es necesario indicar explícitamente la naturaleza plural de una población de moléculas de ácidos nucleicos sustancialmente idénticos, pero sí puede indicarse si se desea. Estos términos también pretenden proporcionar un apoyo adecuado para una reivindicación que especifique explícitamente una única molécula polinucleotídica en sí misma.

Un "acoplamiento" implica la formación de un enlace covalente entre los extremos terminales de dos o más ácidos nucleicos, por ejemplo, oligonucleótidos y/o polinucleótidos, opcionalmente en una reacción dirigida por moldes. Pueden realizarse enzimáticamente ejemplos de acoplamientos para formar un enlace fosfodiéster entre un carbono 5' de un nucleótido terminal de un oligonucleótido con el carbono 3' de otro oligonucleótido (por ejemplo, empleando una ligasa). La naturaleza del enlace puede variar en gran medida y el acoplamiento preferiblemente se logra enzimáticamente. La eficacia del acoplamiento se refiere a la tasa de acoplamiento. Cuando la eficacia relativa del acoplamiento se especifica en términos comparativos o relativos mediante la comparación con un ensayo de acoplamiento de referencia, está implícito que otros reactivos y condiciones (por ejemplo, temperatura, concentración de todos los reactivos, pH, concentración de los iones necesarios, tales como Mg⁺⁺ y Mn⁺⁺, concentración de los cofactores necesarios, tales como NAD y/o ATP, sales, tampones, concentraciones molares de todos los reactivos, incluyendo enzimas, moldes, cebadores, sondas, oligonucleótidos, etc.) se mantienen por lo demás idénticos. Por ejemplo, la condición de que una ligasa (por ejemplo, una SFL (véase a continuación)) pueda acoplarse a una sonda corta (por ejemplo, menor que 6 nucleótidos) al menos X% (por ejemplo, cuando X es 100 o menor; 100, 99, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 50, 25, 10, 1, 0,5, 0,1, etc., o cualquier incremento intermedio) tan eficazmente como la ligasa puede acoplarse a un correspondiente octanucleótido puede entenderse que significa que la tasa de acoplamiento de la sonda más corta se produce a una tasa que es al menos X% de la tasa de acoplamiento del octanucleótido, si todos los reactivos excepto para las sondas (por ejemplo, cebador, molde, enzimas y cualquier otro reactivo) y todas las condiciones de reacción (por ejemplo, temperatura, concentraciones de reactivos, concentraciones de cualquier otro reactivo, etc.) se mantienen invariables para fines prácticos. Se

entiende que la eficacia del acoplamiento, en términos absolutos o relativos, puede aumentar o disminuir dependiente de las condiciones de reacción exactas empleadas.

Opcionalmente, el acoplamiento se realiza bajo condiciones *in vitro* que han sido experimentalmente determinadas por ser adecuadas u óptimas para la actividad ligasa. Preferiblemente, las condiciones de reacción se mantienen sustancialmente similares a las condiciones *in vivo* o fisiológicas en las que la forma natural de la ligasa que se está utilizando es activa en la naturaleza. Lo más preferiblemente, las condiciones de reacción para una ligasa concreta se hacen corresponder lo más cercanamente posible a los ejemplos de condiciones de acoplamiento *in vitro* descritas en la presente para esa ligasa. En otras realizaciones, las condiciones son tales que el ensayo de acoplamiento de referencia produce un acoplamiento significativo o detectable dentro de 30 minutos, dentro de 10 minutos, dentro de 1 minuto, o dentro de diez segundos. Otro ejemplo no limitante de una tasa de acoplamiento significativa o detectable genera el producto del acoplamiento en el intervalo de 100 pM, opcionalmente de aproximadamente 1000 pM o 10.000 pM, en una cantidad apropiada de tiempo (por ejemplo, 10 minutos).

A lo largo de líneas similares, debe entenderse que una afirmación de que se ha producido un resultado (por ejemplo, acoplamiento, unión) pretende indicar que el resultado se ha producido a un nivel significativo o sustancial o a un nivel potenciado comparado cuando el resultado no ha ocurrido. Por ejemplo, se dice que el acoplamiento no se ha producido si no se ha reducido de modo significativo, insustancial o en gran medida (por ejemplo, reducido en al menos 80%, 90 %, 95% o 99%) comparado a cuando el acoplamiento sí se produce (por ejemplo, bajo las condiciones descritas en el último párrafo). En referencia al acoplamiento de dos polinucleótidos, el terminal "proximal" de cualquier polinucleótido es el terminal que está previsto acoplarse con el otro polinucleótido. En general, es el terminal que está más cerca del otro polinucleótido, o el terminal que se pone en contacto con el sitio activo de la ligasa, o el terminal que finalmente se acopla con el otro polinucleótido, mientras que el terminal opuesto es el terminal "distal". El resto nucleótido terminal en el terminal proximal puede denominarse el nucleótido proximal, y la posición del nucleótido proximal opcionalmente se denomina la posición 1, la penúltima posición de nucleótido es la posición 2, etc. En algunos casos no limitantes del acoplamiento dependiente de molde, los terminales proximales de ambos polinucleótidos se hibridan de modo adyacente entre sí.

Un ejemplo de un tipo de acoplamiento enzimático (acoplamiento bicatenario) incluye la formación de un enlace covalente entre los nucleótidos de un polinucleótido (por ejemplo, que produce una circularización) o entre dos o más polinucleótidos (por ejemplo un primer terminal bicatenario de un primer polinucleótido y un segundo terminal bicatenario diferente de un segundo polinucleótido). Los polinucleótidos pueden ser diferentes o pueden ser iguales. Los polinucleótidos también puede acoplarse empleando un puente oligonucleotídico ("splint") que puede emplearse para enlazar los nucleótidos que el usuario desea acoplar (por ejemplo, sobre el mismo polinucleótido u otro diferente). Opcionalmente, los extremos de ambos terminales bicatenarios pueden unirse independientemente de sus secuencias (por ejemplo, acoplamiento de extremos romos, o unión de extremos no homólogos).

En otra variación, pueden acoplarse dos polinucleótidos bicatenarios con extremos monocatenarios salientes que son complementarios entre sí (por ejemplo, acoplamiento de extremos cohesivos). En otros casos, el acoplamiento puede acoplar dos polinucleótidos monocatenarios, cada uno de los cuales o ambos opcionalmente se ha hibridado (asociado) con otra secuencia de nucleótidos. En el acoplamiento dependiente de molde, el acoplamiento entre un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido se produce tras la hibridación de al menos una porción de cualquiera o ambos polinucleótidos con una secuencia diana. La secuencia diana puede ser una porción de cualquiera de los polinucleótidos (por ejemplo, autohibridación o hibridación entre sí) o una secuencia sobre un tercer polinucleótido diferente (por ejemplo un "puente" oligonucleotídico). La porción hibridada del polinucleótido puede tener una longitud, por ejemplo, de no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15 o 20 nucleótidos. La porción hibridada es opcionalmente una porción terminal del nucleótido (por ejemplo, incluye el nucleótido 5' o 3'). Por ejemplo, la porción hibridada puede consistir en el nucleótido 5' o 3' terminal, o los 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15 o 20 nucleótidos terminales del extremo 5' o 3'. Opcionalmente, el acoplamiento se produce cuando no está presente ningún desapareamiento dentro de las porciones hibridadas.

En otros casos, el acoplamiento se produce cuando puedan estar presentes uno, dos o tres desapareamientos dentro de la porción hibridada. En algunos casos, el acoplamiento no se produce cuando el nucleótido terminal y/o el segundo nucleótido más terminal y/o el tercer nucleótido más terminal están desapareados. Tal como se ha mencionado, los nucleótidos terminales pueden ser los nucleótidos 5'- o 3'-terminales del polinucleótido. Un ejemplo de un tipo de ensayo emplea el acoplamiento dependiente de molde entre un primer polinucleótido monocatenario y un segundo polinucleótido monocatenario, en el que el acoplamiento puede realizarse cuando cualquiera o ambos polinucleótidos están hibridados con un tercer polinucleótido monocatenario diferente. En algunos casos, ambas sondas deben hibridarse con el molde para que se produzca un acoplamiento significativo. Para facilitar la denominación, el primer polinucleótido se denomina la "sonda inicializante", el segundo polinucleótido se denomina la "sonda de extensión" y el tercer polinucleótido se denomina el "molde."

En algunas variaciones (por ejemplo, "acoplamiento de mella"), ambas sondas deben hibridarse de modo adyacente entre sí sobre el molde para que se produzca el acoplamiento. En algunos ensayos, las sondas se hibridan de modo adyacente y pueden acoplarse solo cuando un nucleótido terminal de la sonda inicializante se hibrida con un primer nucleótido del molde y un nucleótido terminal de la sonda de extensión se hibrida con un segundo nucleótido del molde, en los que el primer y el segundo nucleótido sobre el molde no están separados por un nucleótido intermedio

del molde. En otras realizaciones, unos pocos nucleótidos intermedios pueden estar presentes entre el primer y el segundo nucleótido sobre el molde (por ejemplo, 1, 2, 3 o más nucleótidos). En estas realizaciones, puede realizarse una etapa de "relleno de hueco" para extender el terminal 3' de una sonda antes de que pueda ser acoplado al terminal 5' de la otra sonda.

- 5 En los métodos descritos en la presente, el nucleótido terminal de la sonda inicializante puede ser el nucleótido 5' terminal y el nucleótido terminal de la sonda de extensión puede ser el nucleótido 3' terminal. Como alternativa, el nucleótido terminal de la sonda inicializante puede ser el nucleótido 3' terminal y el nucleótido terminal de la sonda de extensión puede ser el nucleótido 5' terminal. El producto del acoplamiento de cualquiera de las reacciones puede someterse opcionalmente a otras reacciones de acoplamiento y/o de no acoplamiento a su vez. Por ejemplo, el producto del acoplamiento puede emplearse como la sonda inicializante o la sonda de extensión o el molde en un posterior acoplamiento. También, por ejemplo, puede emplearse como molde o cebador para la extensión con polimerasa, tal como en una reacción en cadena con polimerasa (PCR). Puede escindir-se de modo enzimático o químico (por ejemplo, cuando tiene enlaces escindibles), tratarse con exo- o endonucleasas, quinasas, fosfatasas, etc. Los extremos de un producto bicatenario pueden hacerse romos o rellenarse, bloquearse o adenilarse, etc.
- 10 Tal como se emplea en la presente, un "puente oligonucleotídico," "puente de oligo," o "conector" se refiere a un oligonucleótido que se emplea para proporcionar un sitio de asociación o un "molde de acoplamiento" para unir dos extremos de una molécula o moléculas de ácidos nucleicos empleando una ligasa u otra enzima con actividad ligasa. El puente de acoplamiento mantiene a los extremos adyacentes entre sí y "crea una unión de acoplamiento" entre los extremos 5'-fosforilado y 3'-hidroxilado que se van a acoplar. Por ejemplo, cuando se emplea un puente de oligo de acoplamiento para unir el extremo 3' de una primera sonda de oligo (oligo A) con el extremo 5' de una segunda sonda de oligo, el puente de oligo de acoplamiento tiene una secuencia complementaria con el extremo 3' del oligo A (por ejemplo, una secuencia de cola de oligo), y una segunda secuencia vecina (por ejemplo, una secuencia adyacente) que es complementaria con el extremo 5' del oligo B (**Fig. 4**).

15 En algunas realizaciones de los procesos de PLA mejorados, los puentes de oligos pueden ser simétricos o asimétricos dependiendo del número de nucleótidos que se hibridan con cada una de las dos sondas de oligos que conectan o acoplan. La **Fig. 4** es un diagrama de tipos de puentes asimétricos y simétricos para su uso en los procesos de PLA mejorados descritos en la presente. En algunas realizaciones, los puentes asimétricos (o "conectores") se extienden a través de las dos sondas de oligos separadas (por ejemplo, la sonda de oligo A y B), teniendo uno de los extremos del puente (por ejemplo, cualquiera de los extremos 3' o 5') más nucleótidos que se hibridan con una de las sondas de oligos que el otro extremo del puente que tiene nucleótidos que se hibridan con la sonda de oligo alternativa (**Fig. 4A**). En otras realizaciones, los puentes simétricos se extienden a través de las dos sondas de oligos separadas (por ejemplo, la sonda de oligo A y B), teniendo ambos extremos del puente (por ejemplo, el extremo 3' y el extremo 5') el mismo número de nucleótidos que se hibridan con cada una de las dos sondas de oligos (**Fig. 4BA**).

20 Tanto los puentes asimétricos como los simétricos pueden tener cualquier número de nucleótidos intermedios entre cada uno de sus extremos 3' y 5' que se hibridan con las sondas de oligos separadas. Como alternativa, pueden no existir nucleótidos intermedios entre cada uno de los extremos 3' y 5' que se hibridan con las sondas de oligos. En realizaciones preferidas, los puentes oligonucleotídicos (oligos) tienen una longitud de al menos 6 nucleótidos (por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más). En ciertas otras realizaciones, cada uno de los extremos 3' o 5' del puente de oligo comprende al menos 3 (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) nucleótidos que se hibridan por separado (o se "solapan") con una sonda de oligo, denominados en la presente la región de "proyección".

25 En algunas realizaciones de los procesos de PLA mejorados, el puente de oligo está bloqueado en su extremo 3'. El agente de bloqueo puede ser cualquier resto conectado covalentemente que evita la actividad polimerasa. Así se evita que el puente de oligo 3'-bloqueado interfiera con la parte de reacción de PCR del proceso de PLA mejorado. En algunas realizaciones, por ejemplo, el agente de bloqueo de 3' puede incluir, pero no se limita a un enlace 3'-fluoro-, 3'-bromo-, 3'-yodo-, 3'-desoxi-, 3'-metil-, 3'-metoxi-, 3'-fosfato, 3'-amino, 3'-amidita abásica o cualquier otro grupo de modificación de 3'. Los expertos en la técnica serán capaces de contemplar otros agentes de bloqueo para su uso según se describe en la presente.

30 Puede utilizarse cualquiera de los métodos de acoplamiento proporcionados en la presente en un ensayo de acoplamiento. Los ejemplos no limitantes de ensayos de acoplamiento incluyen un ensayo de acoplamiento de oligonucleótidos (OLA), una reacción en cadena con ligasa (LCR), una reacción de detección con ligasa (LDR) y ensayos de combinación, tales como OLA acoplado con la reacción en cadena con polimerasa (PCR), por ejemplo, OLA-PCR y PCR-OLA, la reacción en cadena combinada ("Combined Chain Reaction", CCR; una combinación de PCR y LCR) y PCR-LDR (véase, por ejemplo, Landegren *et al.*, *Science*, 241:1077-1080, 1988; Barany, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:189-193, 1991; Grossman *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 22(21):4527-4534, 1994; Bi y Stambrook, *Nucl. Acids Res.*, 25(14):2949-2951, 1997; Zirvi *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 27(24):e40, 1999; patente de EE. UU. n.º 4.988.617; y publicaciones PCT n.ºs WO 97/31256 y WO 01/92579. Estos ensayos se han empleado para el análisis de polimorfismos de un único nucleótido (SNP), genotipificación de SNP, detección de mutaciones, identificación de genes de una sola copia, detección de secuencias repetidas de microsatélites, y cartografiado de aductos de ADN, entre otros. Véase también Whitely *et al.*, patente de EE. UU. n.º 4.883.750; Letsinger *et al.*, patente de EE. UU. n.º

5.476.930; Fung *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.593.826; Kool, patente de EE. UU. n.º 5.426.180; Landegren *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.871.921; Xu y Kool, *Nucleic Acids Research*, 27:875-881 (1999); Higgins *et al.*, *Methods in Enzymology*, 68:50-71 (1979); Engler *et al.*, *The Enzymes*, 15-3-29 (1982); y Namsaraev, publicación de patente de EE. UU. 2004/0110213. Se ha indicado la fidelidad de varias ligasas conocidas, basándose, por ejemplo, en la evaluación de las tasas de acoplamiento o de acoplamiento desapareado. Por ejemplo, se ha indicado que la ligasa dependiente de NAD⁺ de la bacteria hipertermófila *Aquifex aeolicus* genera productos de acoplamiento erróneo 3' detectables con desapareamientos de C:A, T:G, y G:T (Tong *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 28(6):1447-1454, 2000); se ha indicado que una preparación parcialmente purificada de la ADN ligasa III bovina genera productos de acoplamiento erróneo 3' detectables con desapareamientos de C:T, G:T, y T:G, mientras que la ligasa I humana genera productos de acoplamiento erróneo 3' detectables con desapareamientos de C:T y G:T, pero no de T:G (Husain *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270(16):9683-9690, 1995); y se ha indicado que la ADN ligasa de la bacteria termófila *Thermus thermophilus* (Tth) genera niveles detectables de productos de acoplamiento erróneo 3' detectables con desapareamientos de T:G y G:T (Luo *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 24(14):3071-3078, 1996). La ADN ligasa del bacteriófago T4 genera productos de acoplamiento erróneo detectables con una amplia gama de sustratos desapareados y parece tener menor fidelidad que las ligasas de especies de *Thermus* en al menos uno a dos órdenes de magnitud (Landegren *et al.*, *Science*, 241:1077-1080, 1988; Tong *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 27(3):788-794, 1999).

Un ensayo particularmente útil es el ensayo de acoplamiento de oligonucleótidos (OLA). El OLA es un método conveniente y altamente riguroso que permite la distinción entre variantes de secuencias de ADN conocidas (Landegren, 1988). Por ejemplo, el análisis múltiplex de loci altamente polimorfos es útil para la identificación de individuos, por ejemplo, para ensayos de paternidad y en la ciencia forense, la correspondencia entre donantes y receptores en trasplantes de órganos, el diagnóstico de enfermedades genéticas, la prognosis, y el asesoramiento prenatal y otros ensayos con base genética que dependen de la discriminación de diferencias de una sola base en múltiples loci (Delahunty, 1996). Los productos de un OLA múltiplex pueden separarse de modo electroforético y de las sondas no acopladas bajo condiciones desnaturalizantes con detección de fluorescencia (Grossman, 1994). Por ejemplo, dos quimeras de PNA-ADN, una quimera de secuencia de tipo salvaje ("wild-type", WT) y una quimera de secuencia mutante pueden llevar diferentes tintes fluorescentes. Solo cuando la secuencia mutante está presente en la muestra diana es cuando la quimera de secuencia mutante se acopla a la segunda sonda (oligo) acoplada en posición adyacente si el par de bases mutante está en el sitio de acoplamiento. Los productos del acoplamiento pueden separarse basándose en: (i) el tamaño, empleando electroforesis y/o cromatografía y/o (ii) marcadores detectables (Grossman, 1994). Con una pluralidad de tintes fluorescentes como marcadores de quimeras con secuencias que se dirigen a secuencias diana exclusivas, pueden realizarse OLA múltiplex en una sola muestra en un único recipiente. Los requisitos para un OLA múltiplex eficaz incluyen sondas que se asocian y se acoplan de una manera muy específica y rápida. Las quimeras y las secuencias de la segunda sonda pueden seleccionarse de modo que la base mutante, o polimorfismo de una sola base, pueda estar en el 5'-fosfato de la segunda sonda o en el 3'-terminal de la quimera. Se contempla que los experimentos de OLA de la presente invención puedan realizarse sobre soportes sólidos, en los que el ácido nucleico molde, la sonda quimérica de PNA-ADN, o la segunda sonda pueden estar inmovilizados sobre una partícula sólida o esfera, o una superficie sólida porosa o no porosa. Cuando están inmovilizados, el molde, la quimera o la segunda sonda preferiblemente están unidos covalentemente al sustrato sólido, por ejemplo, a través de una unidad de monómero terminal. El sustrato sólido puede ser poliestireno, vidrio de tamaño de poro controlado, gel de sílice, sílice, poli(acrilamida), esferas magnéticas, hidroxietilmetacrilato, poliamida, polietileno, polietileno, y copolímeros e injertos de cualquiera de los anteriores sustratos sólidos. La configuración o el formato del sustrato sólido puede ser de pequeñas partículas o esferas con un diámetro de aproximadamente 1 a 50 µm, membranas, fritas, portaobjetos, placas, chips fabricados con micromáquinas, capas de alcantíol-oro, superficies no porosas y medios inmovilizantes de polinucleótidos.

Tal como se describió anteriormente, el acoplamiento enzimático generalmente se logra empleando una ligasa, que puede ser un polipéptido. Las ligasas adecuadas incluyen, por ejemplo, ácido nucleico ligasa, oligonucleótido ligasa, ADN ligasa, ARN ligasa, y similares. Las ARN ligasas adecuadas incluyen las descritas o empleadas, por ejemplo, en cualquiera de las patentes de EE. UU. n.ºs 4.582.802; 5.665.545; 6.194.637; 6.444.429; 6.455.274; 6.576.453; 6.635.425; 6.855.523; 7.811.753; y/o cualquiera de las publicaciones de patente de EE. UU. 2004/0171047A1, 2004/0191871A1, US20050266487A1, 2006/0223098A1, 2007/0037190A1, 20080160526A1; 2009/0061481A1, 2010/0099683A1, y/o 2010/0184618A1. Los ejemplos de ADN ligasas pueden incluir, por ejemplo ADN ligasa de T3, ADN ligasa de T4, ADN ligasa de T5, ADN ligasa de T7, ADN ligasa del virus de vaccinia, ADN ligasa de *E. coli*, ADN ligasa I de mamífero, ADN ligasa II de mamífero, ADN ligasa III de mamífero, ADN ligasa de Tth, ADN ligasa de KOD, una ADN ligasa termoestable y/o sus derivados, fragmentos y/o combinaciones. Las ARN ligasas adecuadas incluyen las descritas o empleadas, por ejemplo, en cualquiera de las patentes de EE. UU. n.ºs 4.661.450; 5.516.664; 5.602.000; 5.807.674; 6.368.801; 6.492.161; 6.635.453; o cualquiera de las publicaciones de patente de EE. UU. n.ºs 2003/0082536A1; 2004/0058330A1; 2005/0266439A1; 2005/0074774A1; 2008/0045418A1; 2010/00159526A1. Los ejemplos de ARN ligasas pueden incluir, por ejemplo, ARN ligasa de T4, ARN ligasa del bacteriófago RB69, ARN ligasa del virus de la polihedrosis nuclear *Autographa californica*, una ARN ligasa termófila, ARN ligasa del bacteriófago RM378, ARN ligasa del bacteriófago TS2126 y/o sus derivados, fragmentos y/o combinaciones.

En algunas realizaciones, la ligasa es una "ligasa de huella pequeña" ("small footprint ligase", SFL). Una SFL tiene la capacidad de acoplarse a polinucleótidos cortos (por ejemplo, al menos aproximadamente 3 nucleótidos). Tal como

se describe en la presente, una SFL puede acoplarse a oligonucleótidos que tienen una longitud de conector de oligo de tan solo 3 bases de ADN hibridado adyacentes al 5'-fosfato del ADN hibridado. En algunas realizaciones, la SFL puede emplearse para acoplar oligonucleótidos que comprenden secuencias solapantes cortas (por ejemplo longitud corta de conector de oligo). Por ejemplo, la SFL puede emplearse para acoplar oligonucleótidos con una longitud de diversos nucleótidos, por lo cual cada oligo tiene un solapamiento de al menos 3 nucleótidos con el puente de oligo. Las ligasas típicas son más adecuadas para acoplar oligonucleótidos más largos (por ejemplo, que comprenden 9 o más nucleótidos; que comprenden 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, etc., nucleótidos). De esta forma, también puede reducirse la concentración de oligonucleótidos para minimizar la probabilidad de que se produzca un acoplamiento de no unión al antígeno estimulado por la hibridación en disolución. Para combinar el acoplamiento y la reacción de PCR en una etapa, el ATP (cofactor para la ligasa) puede omitirse de la mezcla de reacción. Para mantener la función ligasa, la SFL puede preenriquecerse con ATP antes de su purificación y uso.

Una SFL puede ser una ligasa natural o no natural (por ejemplo, artificial, sintética). Una SFL puede comprender una secuencia de polipéptido que sea homóloga con una secuencia de ligasa conocida, o cualquier de sus porciones, o ser uno de sus variantes. Los ejemplos de SFL pueden tener una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 70%, opcionalmente al menos 85%, opcionalmente al menos 90 o 95%, con una ligasa conocida, y poseen una o más actividades funcionales de una ligasa. Por tanto, una SFL puede comprender un polipéptido que presente una o más de las siguientes actividades: (1) ataque nucleófilo al ATP o NAD⁺ que provoca la liberación de PPi o NMN y la formación de un intermedio de ligasa-adenilato covalente; (2) trasladar el adenilato hasta el extremo 5' de la hebra de ADN terminada en 5'-fosfato para formar ADN-adenilato (por ejemplo, el oxígeno del 5'-fosfato de la hebra de ADN ataca al fósforo de la ligasa-adenilato); y, (3) formación de un enlace covalente que une los terminales del polinucleótido y la liberación de AMP (por ejemplo, mediante el ataque del 3'-OH al ADN-adenilato). Opcionalmente, la SFL puede mediar en una o más de las siguientes transformaciones de enlace: de fosfoanhídrido (ATP) a fosforamidato (ligasa-adenilato); de fosforamidato (ligasa-adenilato) a fosfoanhídrido (ADN-adenilato); y/o de fosfoanhídrido (ADN-adenilato) a fosfodiéster (ADN bloqueado). La SFL, en un aspecto, es una enzima que puede mediar en la formación de un enlace covalente entre dos terminales de un polinucleótido, por ejemplo, un terminal 3'-OH y un terminal 5'-PO₄ se unen para formar un enlace fosfodiéster. En algunos casos, el acoplamiento de ADN supone una cualquiera o más de las tres etapas de transferencia de nucleotidilo secuencial, analizada a continuación. Las tres etapas químicas dependen de un cofactor de catión divalente. En un aspecto, la SFL es una ligasa dependiente de ATP o una ligasa dependiente de NAD⁺.

Por ejemplo, la SFL puede comprender uno cualquiera o más de los dominios característicos de una ligasa (por ejemplo, un dominio nucleotidiltransferasa N-terminal (NTasa) y/o un dominio OB C-terminal). El dominio OB comprende opcionalmente un beta-barril antiparalelo de cinco hebras más una alfa-hélice. Dentro del dominio de NTasa se encuentra un bolsillo de unión a adenilato compuesto de seis motivos de péptidos que definen la familia de la enzima NTasa covalente de polinucleótido ligasas. Opcionalmente, el dominio de NTasa puede comprender uno cualquiera o más de los motivos de aminoácido ligasa I, III, IIIa, IV, y/o V, y preferiblemente los seis motivos. El motivo I (por ejemplo, KxDGxR o un motivo "KXDG") opcionalmente contienen una lisina. Los ejemplos de secuencias para cada motivo en la ligasa CV son ATPKIDGIR (motivo I) (SEQ ID NO:1), SRT (motivo Ia), EGSDGEIS (motivo III) (SEQ ID NO:2), YWFDY (motivo IIIa) (SEQ ID NO:3), EGV MIR (motivo IV) (SEQ ID NO:4), LLKMK (motivo V) (SEQ ID NO:5). El motivo 1 pfy contiene un resto lisina. Otros ejemplos del motivo I incluyen CELKLDGLA (SEQ ID NO:6), VEHKVDGLS (SEQ ID NO:7), CEPKLDGLA (SEQ ID NO:8), CELKLDGVA (SEQ ID NO:9), AEIKYDGVR (SEQ ID NO:10), CEYKYDGQR (SEQ ID NO:11), VDYKYDGER (SEQ ID NO:12), FEIKYD GAR (SEQ ID NO:13), FEGKWDGYR (SEQ ID NO:14), AREKIHGTN (SEQ ID NO:15), ACEKVHGTN (SEQ ID NO:16), ILTKEDGSL (SEQ ID NO:17), y VEEKVDGYN (SEQ ID NO:18). Los ejemplos del motivo Ia incluyen TRG, SRT, SRR, SRN, SRS, KRT, KRS, SKG y TRG. Los ejemplos del motivo III incluyen LEVRGEVF (SEQ ID NO:19), VEVRGECY (SEQ ID NO:20), LEVRGEVY (SEQ ID NO:21), LEARGEAF (SEQ ID NO:22), FMLDGELM (SEQ ID NO:23), EGSDGEIS (SEQ ID NO:24), FILDTEAV (SEQ ID NO:25), FIIEGEIV (SEQ ID NO:26), AIVEGELV (SEQ ID NO:27), VVL DGEAV (SEQ ID NO:28), YQVFGEFA (SEQ ID NO:29), LVLNGELF (SEQ ID NO:30), FTANFEFV (SEQ ID NO:31) y LILVGEMA (SEQ ID NO:32). Los ejemplos del motivo IIIa incluyen FCYGV (SEQ ID NO:33), FLYTV (SEQ ID NO:34), TFYAL (SEQ ID NO:35), ICHGL (SEQ ID NO:36), NAYGI (SEQ ID NO:37), FVYGL (SEQ ID NO:38), KLYAI (SEQ ID NO:39), YWFDY (SEQ ID NO:40), YAFDI (SEQ ID NO:41), FLFDL (SEQ ID NO:42), NLFDV (SEQ ID NO:43), WAFDL (SEQ ID NO:44), YVFDI (SEQ ID NO:45), FAFDI (SEQ ID NO:46), ILLNA (SEQ ID NO:47), y FLFDV (SEQ ID NO:48). Los ejemplos del motivo IV incluyen DGVVVK (SEQ ID NO:49), DGVIK (SEQ ID NO:50), DGVVVK (SEQ ID NO:51), DGTVLK (SEQ ID NO:52), EGLVK (SEQ ID NO:53), EGV MIR (SEQ ID NO:54), EGLMVK (SEQ ID NO:55), EGV MVK (SEQ ID NO:56), EGLMAK (SEQ ID NO:57), EGVIK (SEQ ID NO:58), EGYVLK (SEQ ID NO:59), EGVVIR (SEQ ID NO:60), EGYVAV (SEQ ID NO:61), y EGIIMK (SEQ ID NO:62). Los ejemplos del motivo V incluyen AVAFK (SEQ ID NO:63), AIAYK (SEQ ID NO:64), ALAYK (SEQ ID NO:65), AIAYK (SEQ ID NO:66), WWKMK (SEQ ID NO:67), LLKMK (SEQ ID NO:68), WLKLK (SEQ ID NO:69), WIKLK (SEQ ID NO:70), WLKIK (SEQ ID NO:71), WVKDK (SEQ ID NO:72), AIKCK (SEQ ID NO:73), IIKLR (SEQ ID NO:74), HFKIK (SEQ ID NO:75) e IVKYV (SEQ ID NO:76). La SFL opcionalmente comprende los seis motivos. Opcionalmente, los seis motivos se encuentran juntos en una ligasa natural, tal como una SFL identificada en la presente. En algunas realizaciones, la SFL no es una enzima de bloqueo de los extremos del ARN. La ligasa comprende opcionalmente cualquier porción funcional de una SFL. La ligasa puede ser homóloga con una SFL, o cualquiera de sus porciones funcionales, por ejemplo, más del 75%, 85%, 90%, 95% o 99% homóloga al nivel de aminoácidos. Un ejemplo de SFL es la ADN ligasa del virus de *Chlorella* (ChVLig) (Ho, *et al.*, J. Virol., 71(3):1931-19374 (1997)) o uno de sus

fragmentos funcionales o variantes. Los ejemplos representativos de SFL incluyen ligasa CV, DLX, DLXd, DLXd2 y ligasa MnM. Una SFL preferida es la ligasa del virus de *Chlorella*. Se identifican algunos ejemplos de ligasas y se indica su GI o número de registro en la siguiente **Tabla 1**:

Tabla 1

PRK08224		
B. Acidobacteria		
<i>Bacteria</i> ; grupo de <i>Fibrobacteres/Acidobacteria</i> ; <i>Acidobacteria</i> ; <i>Acidobacteria</i> no clasificada; <i>Candidatus Koribacter</i> ; <i>Candidatus Koribacter versatilis</i>		
<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellin6076 <i>Candidatus Solibacter</i> (1 proteína)	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_826317
C. Actinobacteria		
<i>Bacteria</i> ; <i>Actinobacteria</i> ; <i>Actinobacteria</i> (clase); <i>Actinobacteridae</i> ; <i>Actinomycetales</i> ; <i>Corynebacterineae</i> ; <i>Mycobacteriaceae</i> ; <i>Mycobacterium</i> ; <i>Mycobacterium marinum</i>		
<i>Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK <i>Mycobacterium</i> (26 proteínas)	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_001132524
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1 <i>Mycobacterium</i> (26 proteínas)	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_956315
<i>Mycobacterium sp. MCS</i> <i>Mycobacterium</i> (26 proteínas)	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_642076
F. Chlamydiae/Verrucomicrobia		
<i>Bacteria</i> ; grupo de <i>Chlamydiae/Verrucomicrobia</i> ; <i>Verrucomicrobia</i> ; <i>Opiritae</i> ; <i>Opiritales</i> ; <i>Opiritaceae</i> ; <i>Opiritus</i> ; <i>Opiritus terrae</i>		
<i>Opiritus terrae</i> PB90-10 <i>piritus</i> (1 proteína)	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_001821013
PRK09125		
Organismo	Nombre de la proteína	n.º de registro
O. Betaproteobacteria		
<i>Neisseria meningitidis</i> Z2491 <i>Neisseria</i> (7 proteínas)	ADN ligasa	YP_002341892
<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259 <i>Thiobacillus</i> (1 proteínas)	ADN ligasa	YP_314570
<i>Variovorax paradoxus</i> S110 <i>Variovorax</i> (1 proteínas)	ADN ligasa	YP_002944627

ES 2 632 768 T3

PRK08224		
B. Acidobacteria		
<i>Verminephrobacter eiseniae</i> EF01-2 <i>Verminephrobacter</i> (1 proteínas)	ADN ligasa	YP_998235
P. Deltaproteobacteria		
	-	-
<i>Desulfobacterium autotrophicum</i> HRM2 <i>Desulfobacterium</i> (1 proteína)	LigA2	YP_002604477
<i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622 <i>Myxococcus</i> (1 proteína)	ADN ligasa	YP_628883
	-	-
Q. Epsilonproteobacteria		
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> NCTC 11168 <i>Campylobacter</i> (10 proteínas)	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_002345037
<i>Sulfurimonas denitrificans</i> DSM 1251 <i>Sulfurimonas</i> (1 proteínas)	ADN ligasa	YP_393098
	-	-
R. Gammaproteobacteria		
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i> NJ8700 <i>Aggregatibacter</i> (2 proteínas)	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_003007537
<i>Haemophilus influenzae</i> PittEE <i>Haemophilus</i> (3 proteínas)	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_001290961
<i>Shewanella baltica</i> OS195 <i>Shewanella</i> (18 proteínas)	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_001554317
<i>Shewanella loihica</i> PV-4 <i>Shewanella</i> (18 proteínas)	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_001093713
<i>Vibrio cholerae</i> M66-2 <i>Vibrio</i> (9 proteínas)	ADN ligasa	YP_002810248
PHA0454		
Organismo	Nombre de la proteína	n.º de registro
b. Virus	-	-
Virus; virus de ADNbc, sin etapa de ARN; <i>Caudovirales</i> ; <i>Podoviridae</i> ; <i>Autographivirinae</i> ; virus similares a phiKMV		
virus similares al fago de LKD16phiKMV de <i>Pseudomonas</i> (7 proteínas)	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_001522807

PRK08224		
B. Acidobacteria		
CLSZ2445448		
Organismo	Nombre de la proteína	n.º de registro
a. Eukaryota		
<i>Eukaryota; Alveolata; Ciliophora; Intramacronucleata; Oligohymenophorea; Peniculida; Parameciidae; Paramecium; Paramecium tetraurelia</i>		
<i>Paramecium tetraurelia strain d4-2Paramecium (5 proteínas)</i>	ADN ligasa	XP_001347270
PRK07636		
Organismo	Nombre de la proteína	n.º de registro
J. Firmicutes		
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus clausii</i>		
<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168Bacillus</i>	ADN ligasa dependiente de ATP	NP_389932
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus</i>		
Geobacillus sp. Y412MC10Geobacillus	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_003240778
CLSK2551528		
Organismo	Nombre de la proteína	n.º de registro
J. Firmicutes		
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus</i>		
Geobacillus sp. Y412MC10Geobacillus (1 proteína)	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_003245332
	-	-
CLSK2470953		
Organismo	Nombre de la proteína	n.º de registro
C. Actinobacteria		

ES 2 632 768 T3

<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria (clase); Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococcineae; Micrococcaceae; Arthrobacter; Arthrobacter chlorophenolicus</i>		
<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6 (plasmid) <i>Arthrobacter</i> (2 proteínas)	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_002478427
CLSK2469924		
Organismo	Nombre de la proteína	n.º de registro
J. Firmicutes		
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Alicyclobacillaceae; Alicyclobacillus; Alicyclobacillus acidocaldarius; Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. acidocaldarius</i>		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. acidocaldarius</i> DSM 446 <i>Alicyclobacillus</i>	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_003185050
CLSK2340991		
Organismo	Nombre de la proteína	n.º de registro
N. Alphaproteobacteria		
<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Caulobacteraceae; Phenylobacterium; Phenylobacterium zucineum</i>		
<i>Phenylobacterium zucineum</i> HLK1 (plásmido) <i>Phenylobacterium</i> (2 proteínas)	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_002128631
CLSK2333706		
Organismo	Nombre de la proteína	n.º de registro
J. Firmicutes		
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptococcaceae; Candidatus Desulforudis; Candidatus Desulforudis audaxviator</i>		
<i>Candidatus Desulforudis audaxviator</i> MP104C <i>Candidatus Desulforudis</i> (1 proteína)	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_001716762
CLSK962101		
Organismo	Nombre de la proteína	n.º de registro

C. Actinobacteria		
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria (clase); Actinobacteridae; Actinomycetales; Micromonosporineae; Micromonosporaceae; Salinispora; Salinispora arenicola</i>	-	-
<i>Salinispora arenicola</i> CNS-205 <i>Salinispora</i> (2 proteínas)	región de la ligasa LigD de ADN polimerasa	YP_001539124
<i>Salinispora tropica</i> CNB-440 <i>Salinispora</i> (2 proteínas)	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_001160776
	-	-
CLSK915249		
Organismo	Nombre de la proteína	n.º de registro
C. Actinobacteria (véase CLSK2303611 anterior)		
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria (clase); Actinobacteridae; Actinomycetales; Streptomycineae; Streptomycetaceae; Streptomyces; Streptomyces coelicolor</i>		
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680 (plásmido) <i>Streptomyces</i> (2 proteínas)	ADN ligasa dependiente de ATP putativa	NP_828839
<i>Streptomyces sp. HK1</i> (plásmido) <i>Streptomyces</i> (2 proteínas)	ADN ligasa dependiente de ATP putativa	YP_001661618
CLSK862724		
Organismo	Nombre de la proteína	n.º de registro
A. Archaea		
<i>Archaea; Euryarchaeota; Archaeoglobi; Archaeoglobales; Archaeoglobaceae; Archaeoglobus; Archaeoglobus fulgidus</i>		
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM 4304 <i>Archaeoglobus</i> (1 proteína)	ADN ligasa, putativa	NP_070553
J. Firmicutes		
<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI <i>Pelotomaculum</i> (1 proteína)	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_001211793
<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i> ATCC 33223 <i>Thermoanaerobacter</i> (2 proteínas)	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_001664477
CLSK820690		
Organismo	Nombre de la proteína	n.º de registro

A. Archaea		
<i>Archaea; Euryarchaeota; muestras ambientales</i>		
muestras ambientales RC-I de arqueas metanogénicas no cultivadas (1 proteína)	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_686457
N. Alphaproteobacteria		
<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium; Bradyrhizobium japonicum</i>		
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110 <i>Bradyrhizobium</i> (2 proteínas)	ADN ligasa	NP_774671
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAil <i>Bradyrhizobium</i> (2 proteínas)	ADN ligasa dependiente de ATP putativa	YP_001243518
CLSK808255		
Organismo	Nombre de la proteína	n.º de registro
N. Alphaproteobacteria		
<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae; grupo de Sinorhizobium/Ensifer; Sinorhizobium; Sinorhizobium medicae</i>		
<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419 <i>Sinorhizobium</i> (2 proteínas)	región de la ligasa LigD de ADN polimerasa	YP_001326990
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 (plásmid) <i>Sinorhizobium</i> (2 proteínas)	proteína de ADN ligasa dependiente de ATP putativa	NP_437750
CLSK806855		
Organismo	Nombre de la proteína	n.º de registro
N. Alphaproteobacteria		
<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae; grupo de Rhizobium/Agrobacterium; Agrobacterium; Agrobacterium tumefaciens</i>		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (plásmido) <i>Agrobacterium</i> (3 proteínas)	ADN ligasa dependiente de ATP	NP_396032
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM1325 (plásmido) <i>Rhizobium</i> (10 proteínas)	proteína del dominio de ligasa LigD de ADN polimerasa	YP_002973496
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM2304 (plásmido) <i>Rhizobium</i> (10 proteínas)	proteína del dominio de ligasa LigD de ADN polimerasa	YP_002278005

PRK08224		
B. Acidobacteria		
CLSK390680		
Organismo	Nombre de la proteína	n.º de registro
N. Alphaproteobacteria		
<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Phyllobacteriaceae; Mesorhizobium; Mesorhizobium loti</i>		
<i>Mesorhizobium loti MAFF303099Mesorhizobium</i> (3 proteínas)	proteína hipotética	NP_108282

Otros ejemplos de SFL pueden incluir, por ejemplo:

- 5 MAITKPLLAATLENIEDVQFPCLATPKIDGIRSVKQTQMLSRFTFKPIRNSV
 MNRLLELLPEGS DGEISIEGATFQD TTSAVMTGHKMYNAKFSYYWFDYV TDDP
 LKKYIDRVEDMKNYITVHPHILEHAQVKIIPVEINNITELLQYERDVLSKGFEG
 VMIRKPDGKYKFRSTLKEGILLKMKQFKDAEATIISMALFKNTNTKTKDNFG
 YSKRSTHKSGKVEEDVMGSIEVDYDGVVFSIGTFDADQRRDFWQNKESYIGK
 MVKFKYFEMGSKDCPRFPVFIGIRHEEDR (ADN ligasa SF, GenBank ID AAC96909.1, de virus 1 de *Paramecium bursaria Chlorella*) (SEQ ID NO:77);
- 10 MSGVPYGFKNLAATLTKELIKFPVWASPKIDGIRCVFFGGVAYSRLKP
 IPNPVVQEFKAYANLLEGLD GELTVGSPTDANCMQNSMAVMSKAAAPDFTFH
 VFDWFHPAQAHIEFWQRSDVVEDRIVQFYDRYPEVDIRAAPQVLCTSLAHLDTN
 EARWLADGYEGMMIRDHCGRYKFRSTEREGGLVKVCRFTDAEAIIGFEEEM
 HNANEAKRDATGRTERSTSKAGLHGKGT LGALVVKNERGIVFNIGTGFTAAQRA
 15 DYWANHPSLFGKMKVFKHFDHGTVDAPRHPVFIGFRHPEDM (ADN ligasa MnM, GenBank ID YP_333052.1, de *Burkholderia pseudomallei 1710b* (secuencia equivalente a ABA50091)) (SEQ ID NO:78);
- 20 MKFYRTL LLLFFASSFAFANS DMLLHTYNNQPIEGWVMSEKLDGVRGYW
 NGKQLLTRQGQRLSPPAYFIKDFPPFAIDGELF SERNHFEEISTITKSFKGDGWEKL
 KLYVFDV PDAEAGNLFERLAKLKAHLL EHPPTYIEIIEQIPVKDKTHLYQFLAQVEN
 LQGEVVVRNP NAPYERKRSSQILKLTAR GEECTVIAHHKGGKGFENVMGALT
 CKNHRGEFKIGSGFNLNERENPPPIG SVITYKYRGITNSGKPRFATYWREKK (ADN ligasa Hin, GenBank ID P44121, de *Haemophilus influenza*) (SEQ ID NO:79);
- 25 MKFYRTL LLLFFASSFAFANS DMLLHTYNNQPIEGWVMSEKLDGVRGYW
 NGKQLLTRQGQRLSPPAYFIKDFPPFAIDGELF SERNHFEEISSITKSFKGDGWEKL
 KLYVFDV PDAEAGNLFERLAKLKAHLL EHPPTYIEIIEQIPVKDKTHLYQFLAQVEN
 LQGEVVVRNP NAPYERKRSSQILKLTAR GEECTVIAHHKGGKGFENVMGALT
 CKNHRGEFKIGSGFNLNERENPPPIG SVITYKYRGITNSGKPRFATYWREKK (ADN ligasa DLX, ligasa artificial derivada de la ADN ligasa Hin de *Haemophilus influenza*) (SEQ ID NO:80);
- 30 MKFYRTL LLLFFASSFAFANS DMLLHTYNNQPIEGWVMSEKLDGVRGYW
 NGKQLLTRQGQRLSPPAYFIKDFPPFAIDGELF SERNHFEEISSITKSFKGDGWEKL
 KLYVFDV PDAEAGNLFERLAKLKAHLL EHPPTYIEIIEQIPVKDKTHLYQFLAQVEN
 LQGEVVVRNP NAPYERKRSSQILKLTAR DEECTVIAHHKGGKGFENVMGALT
 CKNHRGEFKIGSGFNLNERENPPPIG SVITYKYRGITNSGKPRFATYWREKK (ADN ligasa DLXd, ligasa artificial derivada de la ADN ligasa Hin de *Haemophilus influenza*) (SEQ ID NO:81); y,
- 35 MLLHTYNNQPIEGWVMSEKLDGVRGYWNGKQLLTRQGQRLSPPAYFIK
 DFPPFAIDGELF SERNHFEEISSITKSFKGDGWEKLKLYVFDV PDAEAGNLFERLAK
 LKAHLL EHPPTYIEIIEQIPVKDKTHLYQFLAQVENLQGEVVVRNP NAPYERKR
 SSQILKLTAR DEECTVIAHHKGGKGFENVMGALTCKNHRGEFKIGSGFNLNERE
 NPPPIG SVITYKYRGITNSGKPRFATYWREKK (ADN ligasa DLXd2 (*Gammaproteobacteria, Haemophilus influenza*) (modificada)) (SEQ ID NO:82).
- 40

Tal como se emplean en la presente, los términos y la expresión "amplificación", "amplificación de ácidos nucleicos", o "amplificar" se refieren a la producción de múltiples copias de un molde de ácido nucleico, o la producción de múltiples copias de secuencias de ácidos nucleicos que son complementarios con el molde de ácido nucleico. La reacción de amplificación puede ser una reacción de extensión mediada por polimerasa, tal como, por ejemplo, una reacción en cadena con polimerasa (PCR). Sin embargo, cualquiera de las reacciones de amplificación conocidas puede resultar adecuada para su uso según se describe en la presente. El término "amplificar", que generalmente se refiere a un aumento "exponencial" en el ácido nucleico diana, puede emplearse en la presente para describir aumentos lineales y exponenciales en el número de una secuencia diana de ácido nucleico seleccionada. La expresión "mezcla de reacción de amplificación" y/o "mezcla maestra" puede indicar una disolución acuosa que comprende los diversos reactivos (algunos o todos) empleados para amplificar un ácido nucleico diana. Estas reacciones también pueden realizarse empleando soportes sólidos (por ejemplo, una matriz). Las reacciones también pueden realizarse en forma individual o múltiple, según lo desee el usuario. Estas reacciones generalmente incluyen enzimas, tampones acuosos, sales, cebadores de amplificación, ácido nucleico diana y nucleótidos trifosfato. Dependiendo del contexto, la mezcla puede ser una mezcla de reacción de amplificación completa o incompleta. El método empleado para amplificar el ácido nucleico diana puede estar disponible para los expertos en la técnica. Puede utilizarse cualquier medio *in vitro* para multiplicar las copias de una secuencia diana de ácido nucleico. Estos incluyen métodos lineales, logarítmicos y/o cualquier otro método de amplificación. Aunque esta descripción analiza la PCR, en general, como reacción de amplificación de ácidos nucleicos, se espera que también puedan ser adecuados otros tipos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, que incluyen reacciones de amplificación mediadas por polimerasa (tales como HDA, RPA, y RCA), así como reacciones de amplificación mediadas por ligasa (tales como LDR, LCR, y las versiones con huecos de cada una), y combinaciones de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, tales como LDR y PCR (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. 6.797.470). Por ejemplo, además de las reacciones descritas en otro punto en la presente, se emplean diversas reacciones mediadas por acoplamiento, en las que, por ejemplo, se emplean cebadores de acoplamiento, en oposición a los cebadores de PCR. Otros ejemplos de métodos incluyen la reacción en cadena con polimerasa (PCR; véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 4.683.202; 4.683.195; 4.965.188; y/o 5.035.996), procedimientos isotérmicos (empleando una o más ARN polimerasas (véase, por ejemplo, el documento WO 2006/081222), desplazamiento de hebra (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º RE39007E), la destrucción parcial de moléculas de cebador (véase, por ejemplo, el documento WO2006087574)), reacción en cadena con ligasa (LCR) (véase, por ejemplo, Wu, *et al.*, *Genomics*, 4:560-569 (1990)), y/o Barany, *et al.*, *PNAS USA*, 88:189-193 (1991)), sistemas de ARN replicasa Q β (véase, por ejemplo, el documento WO/1994/016108), sistemas basados en la transcripción del ARN (por ejemplo, TAS, 3SR), amplificación de círculo rodante (RCA) (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.854.033; publicación de EE. UU. n.º 2004/265897; Lizardi *et al.*, *Nat. Genet.*, 19:225-232 (1998); y/o Banér *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, 26:5073-5078 (1998)), y amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) (Little, *et al.*, *Clin. Chem.*, 45:777-784 (1999)), entre otros. Estos sistemas, junto con los muchos otros sistemas disponibles para los expertos en la técnica, pueden resultar adecuados para amplificar ácidos nucleicos diana para su uso según se describe en la presente.

La "eficacia de amplificación" puede indicar cualquier producto que pueda cuantificarse para determinar el número de copias (por ejemplo, la expresión puede referirse a un amplicón de PCR, un producto del acoplamiento de LCR y/o un producto similar). Las reacciones pueden compararse realizando al menos dos reacciones de amplificación distintas, llevándose a cabo cada reacción en ausencia y en presencia, respectivamente, de un reactivo y/o etapa, y cuantificando la amplificación que se produce en cada reacción.

También se proporcionan métodos para amplificar un ácido nucleico empleando al menos una polimerasa, al menos un cebador, dNTP, y acoplamiento y amplificando el ácido nucleico diana. En algunas realizaciones de dichos métodos, se utiliza al menos un cebador. En ciertas realizaciones, se proporciona una mezcla o mezclas de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos que comprenden al menos una polimerasa, dNTP, y al menos un cebador. En otras realizaciones, se proporcionan métodos para emplear dicha mezcla o mezclas. Los ácidos nucleicos diana pueden amplificarse empleando cualquiera de una diversidad de reacciones y sistemas. Los ejemplos de métodos para amplificar ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, reacciones de extensión mediadas por polimerasa. Por ejemplo, la reacción de extensión mediada por polimerasa puede ser la reacción en cadena con polimerasa (PCR). En otras realizaciones, la reacción de amplificación de ácidos nucleicos es una reacción múltiple. Por ejemplo, los ejemplos de métodos para amplificar y detectar ácidos nucleicos adecuados para su uso como se describe en la presente están disponibles en el mercado como TaqMan[®] (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 4.889.818; 5.079.352; 5.210.015; 5.436.134; 5.487.972; 5.658.751; 5.210.015; 5.487.972; 5.538.848; 5.618.711; 5.677.152; 5.723.591; 5.773.258; 5.789.224; 5.801.155; 5.804.375; 5.876.930; 5.994.056; 6.030.787; 6.084.102; 6.127.155; 6.171.785; 6.214.979; 6.258.569; 6.814.934; 6.821.727; 7.141.377; y/o 7.445.900). Los ensayos TaqMan[®] generalmente se llevan a cabo realizando una amplificación de ácido nucleico de un polinucleótido diana empleando un ácido nucleico polimerasa que tiene actividad nucleasa 5'-3', un cebador capaz de hibridarse con dicho polinucleótido diana, y una sonda oligonucleotídica capaz de hibridarse con dicho polinucleótido diana en 3' con relación a dicho cebador. En algunas realizaciones, la sonda oligonucleotídica incluye un marcador detectable (por ejemplo, una molécula indicadora fluorescente) y una molécula extintora capaz de extinguir la fluorescencia de dicha molécula indicadora. En ciertas realizaciones, el marcador detectable y la molécula extintora son parte de una única sonda. A medida que avanza la amplificación, la polimerasa digiere la sonda para separar el marcador detectable de la molécula extintora. El marcador detectable (por ejemplo, fluorescencia) puede controlarse durante la

reacción, y la detección del marcador se corresponde con la aparición de una amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, cuanto mayor sea la señal, mayor es la cantidad de amplificación). En la técnica se conocen variaciones de los ensayos TaqMan[®] (por ejemplo, ensayo TaqMan[®] sembrado LNA[™]) y serán adecuados para su uso en los métodos descritos en la presente.

5 Otro ejemplo de sistema adecuado para su uso según se describe en la presente emplea sondas bicatenarias en métodos de hibridación por desplazamiento (véase, por ejemplo, Morrison *et al.*, Anal. Biochem., 18:231-244 (1989); y/o Li, *et al.*, Nucleic Acids Res., 30(2,e5) (2002)). En estos métodos, la sonda generalmente incluye dos oligonucleótidos complementarios de diferente longitud, en los que uno incluye un marcador detectable y el otro incluye una molécula extintora. Cuando no está unido a un ácido nucleico diana, el extintor elimina la señal del
10 marcador detectable. La sonda se convierte en detectable tras la hibridación por desplazamiento con un ácido nucleico diana. Pueden emplearse múltiples sondas, y cada una contiene diferentes marcadores detectables, de modo que pueden interrogarse múltiples ácidos nucleicos diana en una única reacción.

Otros ejemplos de métodos para amplificar y detectar ácidos nucleicos diana adecuados para su uso según se describe en la presente incluyen "balizas moleculares", que son sondas oligonucleotídicas con forma de horquilla monocatenarias. En presencia de la secuencia diana, la sonda se despliega, se une y emite una señal (por ejemplo, fluoresce). Una baliza molecular generalmente incluye al menos cuatro componentes: 1) el "bucle", una región de 18-30 nucleótidos que es complementaria con la secuencia diana; 2) dos "tallos" de 5-7 nucleótidos que se encuentran a cada extremo del bucle y son complementarios entre sí; 3) en el extremo 5', un marcador detectable; y
15 4) en el extremo 3', un tinte extintor que evita que el marcador detectable emita una señal cuando la sonda está en forma de bucle cerrado (por ejemplo, no unida a un ácido nucleico diana). Por tanto, en presencia de una diana complementaria, la porción de "tallo" de la baliza se separa, provocando que la sonda se hibride con la diana. Otros tipos de balizas moleculares también son conocidas y pueden resultar adecuadas para su uso en los métodos descritos en la presente. Las balizas moleculares pueden emplearse en una diversidad de sistemas de ensayo. Uno de estos sistemas es una amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA[®]), un proceso isotermo de una sola etapa para amplificar ARN para producir ADN bicatenario sin ciclos de temperatura. Una reacción
20 NASBA generalmente requiere el virus de la mieloblastosis aviar (AMV), transcriptasa inversa (RT), ARN polimerasa de T7, ARNasa H, y dos sondas oligonucleotídicas. Después de la amplificación, el ácido nucleico diana amplificado puede detectarse empleando una baliza molecular. Otros usos para las balizas moleculares son conocidos en la técnica y serán adecuados para su uso en los métodos descritos en la presente.

30 El sistema Scorpion es otro ejemplo de formato de ensayo que puede utilizarse en los métodos descritos en la presente. Los cebadores de Scorpion son moléculas bifuncionales en las que un cebador está unido covalentemente con la sonda, junto con un marcador detectable (por ejemplo, un fluoróforo) y un extintor. En presencia de un ácido nucleico diana, el marcador detectable y el extintor se separan, lo cual conduce a un aumento en la señal emitida del marcador detectable. Generalmente, un cebador empleado en la reacción de amplificación incluye un elemento de sonda en el extremo 5', junto con un elemento "bloqueante de PCR" (por ejemplo, un monómero de hexetilenglicol (HEG) (Whitcombe, *et al.*, Nat. Biotech., 17:804-807 (1999)) al comienzo del bucle con forma de horquilla. La sonda generalmente incluye una secuencia de tallo autocomplementaria con un marcador detectable en un extremo y un extintor en el otro. En los ciclos de amplificación iniciales (por ejemplo, PCR), el cebador se hibrida con la diana y se produce la extensión debido a la acción de la polimerasa. El sistema Scorpion puede utilizarse para estudiar e
35 identificar mutaciones puntuales empleando múltiples sondas que pueden ser marcadas de modo diferente para distinguir las distintas sondas. Empleando una PCR como ejemplo, después de completar un ciclo de extensión, la región diana recién sintetizada se unirá a la misma hebra que la sonda. Después del segundo ciclo de desnaturalización y reasociación, la sonda y la diana se hibridan. La secuencia de horquilla entonces se hibrida con una parte del producto de PCR recién producido. Esto provoca la separación del marcador detectable del extintor y provoca la emisión de la señal. Otros usos para las balizas moleculares son conocidos en la técnica y serán adecuados para su uso en los métodos descritos en la presente.

Las ácido nucleico polimerasas que pueden emplearse en las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas pueden ser cualquiera que actúe para realizar la reacción deseada e incluyen, por ejemplo, una ácido nucleico polimerasa de procariontes, fúngica, vírica, de bacteriófago, de plantas y/o de eucariotas. Tal como se
40 emplea en la presente, la expresión "ADN polimerasa" se refiere a una enzima que sintetiza una hebra de ADN *de novo* empleando una hebra de ácido nucleico como molde. Las ADN polimerasas emplean un ADN o ARN existente como molde para la síntesis de ADN y catalizan la polimerización de desoxirribonucleótidos a lo largo de la hebra molde, que leen. La hebra de ADN recién sintetizada es complementaria con la hebra molde. La ADN polimerasa puede añadir nucleótidos libres solo al extremo 3'-hidroxilo de la hebra que se está formando. Sintetiza oligonucleótidos por medio de la transferencia de un nucleósido monofosfato desde un desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP) al grupo 3'-hidroxilo de una cadena oligonucleotídica en crecimiento. Esto provoca el alargamiento de la nueva hebra en la dirección 5' a 3'. Puesto que la ADN polimerasa solo puede añadir un nucleótido a un grupo 3'-OH preexistente, para comenzar la reacción de síntesis de ADN, la ADN polimerasa necesita un cebador al que
45 añadir el primer nucleótido. Los cebadores adecuados pueden comprender oligonucleótidos de ARN o ADN, o sus quimeras (por ejemplo, cebadores quiméricos de ARN/ADN). Las ADN polimerasas pueden ser ADN polimerasas naturales o una variante de la enzima natural que tenga la actividad mencionada anteriormente. Por ejemplo, puede incluir una ADN polimerasa que tenga una actividad de desplazamiento de hebra, una ADN polimerasa que carezca

de actividad exonucleasa 5' a 3', una ADN polimerasa que tenga una actividad de transcriptasa inversa, o una ADN polimerasa que tenga actividad endonucleasa.

- Las ácido nucleico polimerasas adecuadas también pueden comprender holoenzimas, porciones funcionales de holoenzimas, polimerasas químicas o cualquier polimerasa modificada que pueda efectuar la síntesis de una molécula de ácido nucleico. Dentro de esta descripción, una ADN polimerasa también puede incluir una polimerasa, transferasa terminal, transcriptasa inversa, telomerasa y/o polinucleótido fosforilasa. Los ejemplos no limitantes de polimerasas pueden incluir, por ejemplo, ADN polimerasa de T7, ADN polimerasa γ de ADN mitocondrial eucariota, ADN polimerasa I, II, III, IV y/o V de procariotas; polimerasa α , β , γ , δ , ϵ , η , ζ , τ y/o κ de eucariotas; ADN polimerasa I de *E. coli*; subunidades alfa y/o épsilon de ADN polimerasa II de *E. coli*; polimerasa IV de *E. coli*, polimerasa V de *E. coli*; ADN polimerasa I de *T. aquaticus*; ADN polimerasa I de *B. stearothermophilus*; polimerasas de *Euryarchaeota*; desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT); polimerasa 4 de *S. cerevisiae*; polimerasas de síntesis de translesión; transcriptasa inversa; y/o telomerasa. Los ejemplos no limitantes de ADN polimerasas termoestables adecuadas que pueden emplearse incluyen las ADN polimerasas Taq, Tfl, Pfu, y VentTM, cualquier ADN polimerasa genéticamente modificada, cualquier polimerasa que tenga una actividad exonucleasa 3' a 5' reducida o insignificante (por ejemplo, ADN polimerasa SuperScriptTM), y/o ADN polimerasas genéticamente modificadas (por ejemplo, las que presentan el sitio de mutación activo F667Y o el equivalente de F667Y (por ejemplo, en Tth), AmpliTaqFS, ThermoSequenaseTM), Terminator I, Terminator II, Terminator III, Terminator Gamma (todas disponibles en NEB) y/o cualquiera de sus derivados y fragmentos. Otras ácido nucleico polimerasas también pueden ser adecuadas, tal como entenderán los expertos en la técnica.
- En otro aspecto, la presente descripción proporciona mezclas de reacción para amplificar una secuencia de ácido nucleico de interés (por ejemplo, una secuencia diana). En algunas realizaciones, la mezcla de reacción puede comprender además un compuesto generador de señales (SGC) y/o un marcador detectable. Los métodos también pueden incluir una o más etapas para detectar el SGC y/o el marcador detectable para cuantificar el ácido nucleico amplificado.
- Un SGC puede ser una sustancia que en sí misma sea detectable en un ensayo elegido, o que es capaz de reaccionar para formar una entidad química o física (por ejemplo, un producto de reacción) que sea detectable en un ensayo elegido. Los ejemplos representativos de productos de reacción incluyen precipitados, señales fluorescentes, compuestos que tienen color, y similares. Los SGC representativos incluyen, por ejemplo, compuestos bioluminiscentes (por ejemplo, luciferasa), fluoróforos (por ejemplo, véase a continuación), compuestos bioluminiscentes y quimioluminiscentes, radioisótopos (por ejemplo, ¹³¹I, ¹²⁵I, ¹⁴C, ³H, ³⁵S, ³²P y similares), enzimas (por ejemplo, véase a continuación), proteínas de unión (por ejemplo, biotina, avidina, estreptavidina y similares), partículas magnéticas, compuestos químicamente reactivos (por ejemplo, tintes coloreados), oligonucleótidos marcados; sondas moleculares (por ejemplo, CY3, Research Organics, Inc.), y similares. Los fluoróforos representativos incluyen isotiocianato de fluoresceína, succinilfluoresceína, rodamina B, lisamina, 9,10-difenilantraceno, perileno, rubreno, pireno y sus derivados fluorescentes, tales como isocianato, isotiocianato, cloruro de ácido o cloruro de sulfonilo, umbeliferona, quelatos de tierras raras de lantánidos, tales como europio (Eu) y similares. Los SGC representativos útiles en un conjugado generador de señales incluyen las enzimas de: IUB clase 1, en especial 1.1.1 y 1.6 (por ejemplo, alcohol deshidrogenasa, glicerol deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y similares); IUB de clase 1.11.1 (por ejemplo, catalasa, peroxidasa, aminoácido oxidasa, galactosa oxidasa, glucosa oxidasa, ascorbato oxidasa, diaforasa, ureasa y similares); IUB de clase 2, en especial 2.7 y 2.7.1 (por ejemplo, hexoquinasa y similares); IUB de clase 3, en especial 3.2.1 y 3.1.3 (por ejemplo, alfa amilasa, celulasa, β -galacturonidasa, amiloglucosidasa, β -glucuronidasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida y similares); IUB de clase 4 (por ejemplo, liasas); IUB de clase 5, en especial 5.3 y 5.4 (por ejemplo, fosfoglucosa isomerasa, triosa fosfato isomerasa, fosfoglucosa mutasa y similares.) Los SGC también pueden generar productos detectables por medio de longitudes de onda fluorescentes y quimioluminiscentes, por ejemplo, tintes de secuenciación, luciferasa, metales emisores de fluorescencia, tales como ¹⁵²Eu, u otros de la serie de los lantánidos; compuestos tales como luminol, isoluminol, sales de acridinio y similares; compuestos bioluminiscentes, tales como luciferina; proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP o sus variantes); y similares. La unión de ciertos SGC a agentes puede realizarse a través de grupos quelantes de metales, tales como EDTA. El SGC concreto comparte la propiedad común de permitir la detección y/o la cuantificación de una molécula unida. Los SGC pueden detectarse opcionalmente empleando un método visual u óptico, preferiblemente, con un método que pueda automatizarse, tal como un método espectrofotométrico, un método de fluorescencia, un método quimioluminiscente, un método nanométrico eléctrico que implique, por ejemplo, un cambio en la conductancia, la impedancia, la resistencia y similares, y un método de campo magnético. Algunos SGC pueden detectarse opcionalmente con el ojo desnudo o con un aparato de detección de señales. Algunos SGC no son en sí mismos detectables, pero se convierten en detectables cuando se someten a un posterior tratamiento. El SGC puede unirse de cualquier modo (por ejemplo, a través de enlaces covalentes o no covalentes) a un agente de unión de interés (por ejemplo, un anticuerpo o un polipéptido PDZ). Los SGC adecuados para la unión a agentes, tales como anticuerpos, incluyen oro coloidal, anticuerpos fluorescentes, europio, partículas de látex y enzimas. Los agentes que se unen a NS1 y NP pueden comprender, cada uno, SGC diferenciados. Por ejemplo, pueden conjugarse partículas de látex rojo con anticuerpos anti-NS1, y pueden conjugarse partículas de látex azul a anticuerpos anti-NP. Otros SGC detectables adecuados para su uso en un formato de flujo lateral incluyen cualquier resto que sea detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos,

inmunoquímicos, eléctricos, ópticos, químicos u otros medios. Por ejemplo, los SGC adecuados incluyen biotina para la tinción con un conjugado de estreptavidina marcado, tintes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rojo de Texas, rodamina, proteína fluorescente verde y similares), radiomarcadores, enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y otras empleadas habitualmente en un ELISA), y SGC colorimétricos, tales como oro coloidal o vidrio o plástico coloreado (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, esferas de látex). Las patentes que describen el uso de dichos marcadores incluyen las patentes de EE. UU. n.ºs 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241. Véase también Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6ª ed., Molecular Probes, Inc., Eugene Oreg.). Los radiomarcadores pueden detectarse empleando una película fotográfica o contadores de centelleo, y los marcadores fluorescentes pueden detectarse empleando un fotodetector para detectar luz emitida.

De modo similar, la expresión "marcador detectable" puede indicar cualquiera de una diversidad de moléculas de señalización que indican una amplificación. Por ejemplo, SYBR GREEN y otros tintes de unión al ADN son marcadores detectables. Estos marcadores detectables pueden comprender o pueden ser, por ejemplo, agentes intercalantes de ácidos nucleicos o agentes no intercalantes. Tal como se emplean en la presente, un agente intercalante es un agente o resto capaz de realizar una inserción no covalente entre pares de bases apiladas de una molécula de ácido nucleico bicatenaria. Un agente no intercalante es un agente que no se inserta en una molécula de ácido nucleico bicatenaria. El agente de unión al ácido nucleico puede producir una señal detectable directa o indirectamente. La señal puede detectarse directamente empleando, por ejemplo, fluorescencia y/o absorbancia, o indirectamente empleando, por ejemplo, cualquier resto o ligando adecuado cuya detección se ve afectada por la proximidad a un ácido nucleico bicatenario, tal como un resto marcador sustituido o ligando de unión unido al agente de unión al ácido nucleico. Generalmente, es necesario que el agente de unión al ácido nucleico produzca una señal detectable cuando esté unido a un ácido nucleico bicatenario que pueda distinguirse de la señal producida cuando ese mismo agente está en disolución o unido a un ácido nucleico monocatenario. Por ejemplo, agentes intercalantes, tales como bromuro de etidio, fluorescen con más intensidad cuando se intercalan en ADN bicatenario que cuando están unidos a ADN monocatenario, ARN o están en disolución (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.994.056; 6.171.785; y/o 6.814.934). De modo similar, la actinomicina D fluoresce con fluorescencia roja cuando está unida a ácidos nucleicos monocatenarios, y verde cuando está unida a ácidos nucleicos bicatenarios. En otro ejemplo, se ha indicado que el psoraleno fotorreactivo 4-aminometil-4'-5'-8-trimetilpsoraleno (AMT) muestra menor absorción a longitudes de onda larga y fluoresce tras intercalarse en ADN bicatenario (Johnson *et al.*, Photochem. & Photobiol., 33:785-791 (1981)). Por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.257.774 indica la unión directa de intercalantes fluorescentes en el ADN (por ejemplo, sales de etidio, daunomicina, mepacrina y naranja de acridina, 4'-6-diamidino- α -fenilindol). También pueden ser adecuados agentes no intercalantes (por ejemplo, ligantes del surco menor según se describe en la presente, tales como Hoechst 33258, distamicina, netropsina) para su uso. Por ejemplo, Hoechst 33258 (Searle, *et al.*, Nuc. Acids Res., 18(13):3753-3762 (1990)) muestra una fluorescencia alterada a medida que aumenta la cantidad de diana. Los ligantes del surco menor se describen con más detalle en otro punto en la presente.

Los expertos en la técnica pueden acceder a otros tintes de unión al ADN y estos pueden utilizarse por sí solos o en combinación con otros agentes y/o componentes de un sistema de ensayo. Los ejemplos de tintes de unión al ADN pueden incluir, por ejemplo, acridinas (por ejemplo, naranja de acridina, acriflavina), actinomicina D (Jain, *et al.*, J. Mol. Biol., 68:21 (1972)), antramicina, BOBOTM-1, BOBOTM-3, BO-PROTM-1, cromomicina, DAPI (Kapuseinski, *et al.*, Nuc. Acids Res., 6(112):3519 (1979)), daunomicina, distamicina (por ejemplo, distamicina D), los tintes descritos en la patente de EE. UU. n.º 7.387.887, elipticina, sales de etidio (por ejemplo, bromuro de etidio), fluorcumanina, intercalantes fluorescentes según se describen en la patente de EE. UU. n.º 4.257.774, GelStar[®] (Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, Me.), Hoechst 33258 (Searle y Embrey, 1990, Nuc. Acids Res., 18:3753-3762), Hoechst 33342, homidio, JO-PROTM-1, tintes LIZ, LO-PROTM-1, mepacrina, mitramicina, tintes NED, netropsina, 4'-6-diamidino- α -fenilindol, proflavina, POPOTM-1, POPOTM-3, PO-PROTM-1, yoduro de propidio, polipiridilos de rutenio, S5, SYBR[®] oro, SYBR[®] verde I (patentes de EE. UU. n.ºs 5.436.134 y 5.658.751), SYBR[®] verde II, SYTOX azul, SYTOX verde, SYTO[®] 43, SYTO[®] 44, SYTO[®] 45, SYTOX[®] azul, TO-PRO[®]-1, SYTO[®] 11, SYTO[®] 13, SYTO[®] 15, SYTO[®] 16, SYTO[®] 20, SYTO[®] 23, naranja de tiazol (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis.), TOTOTM-3, YO-PRO[®]-1, y YOYO[®]-3 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), entre otros. Por ejemplo, se ha empleado SYBR[®] verde I (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.436.134; 5.658.751; y/o 6.569.927), para controlar reacciones de PCR. Otros tintes de unión al ADN también pueden ser adecuados, tal como entenderán los expertos en la técnica.

Para su uso según se describe en la presente, uno o más marcadores detectables y/o agentes extintores pueden unirse a uno o más cebadores y/o sondas (por ejemplo, un marcador detectable). El marcador detectable puede emitir una señal cuando está libre o cuando está unido a uno de los ácidos nucleicos diana. El marcador detectable también puede emitir una señal cuando está próximo a otro marcador detectable. Los marcadores detectables también pueden emplearse con moléculas extintoras, de modo que la señal solo pueda detectarse cuando no están suficientemente cerca de la molécula extintora. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sistema de ensayo puede provocar que el marcador detectable se libere de la molécula extintora. Puede emplearse cualquiera de varios marcadores detectables para marcar las sondas y los cebadores empleados en los métodos descritos en la presente. Tal como se mencionó anteriormente, en algunas realizaciones, el marcador detectable puede estar unido a una sonda, que puede incorporarse en un cebador, o puede unirse de otro modo al ácido nucleico diana

amplificado (por ejemplo, un agente de unión a un ácido nucleico detectable, tal como tinte intercalante o no intercalante). Cuando se emplea más de un marcador detectable, cada uno debe diferir en sus propiedades espectrales, de modo que los marcadores puedan distinguirse entre sí, o de modo que, juntos, los marcadores detectables emitan una señal que no es emitida por cada uno de los marcadores detectables por sí solos. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen, por ejemplo, un tinte fluorescente o fluoróforo (por ejemplo, un grupo químico que pueda ser excitado por la luz para que emita fluorescencia o fosforescencia), "tintes aceptores" capaces de extinguir una señal fluorescente de un tinte donador fluorescente, y similares. Los marcadores detectables adecuados pueden incluir, por ejemplo, fluoresceínas (por ejemplo, 5-carboxi-2,7-diclorofluoresceína; 5-carboxifluoresceína (5-FAM); 5-HAT (hidroxitriptamina); 5-hidroxitriptamina (HAT); 6-JOE; 6-carboxifluoresceína (6-FAM); FITC; 6-carboxi-1,4-dicloro-2',7'-diclorofluoresceína (TET); 6-carboxi-1,4-dicloro-2',4',5',7'-tetraclorofluoresceína (HEX); 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE); Alexafluors (por ejemplo, 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 635, 647, 660, 680, 700, 750); fluoróforos BODIPY (por ejemplo, 492/515, 493/503, 500/510, 505/515, 530/550, 542/563, 558/568, 564/570, 576/589, 581/591, 630/650-X, 650/665-X, 665/676, FL, FL ATP, FI-ceramida, R6G SE, TMR, conjugado de TMR-X, TMR-X, SE, TR, TR ATP, TR-X SE), cumarinas (por ejemplo, 7-amino-4-metilcumarina, AMC, AMCA, AMCA-S, AMCA-X, ABQ, CPM metilcumarina, cumarinfaloidina, hidroxycumarina, CMFDA, metoxicumarina), calceína, calceína AM, azul de calceína, tintes de calcio (por ejemplo, escarlata de calcio, verde de calcio, naranja de calcio, blanco de calcoflúor), azul cascada, amarillo cascada; tintes CyTM (por ejemplo, 3, 3.18, 3.5, 5, 5.18, 5.5, 7), GFP cian, fluorodetector de AMP cíclico (FiCRhR), proteínas fluorescentes (por ejemplo, proteína fluorescente verde (por ejemplo, GFP, EGFP), proteína fluorescente azul (por ejemplo, BFP, EBFP, EBFP2, azulita, mKalamal), proteína fluorescente cian (por ejemplo, ECFP, ceruleano, CyPet), proteína fluorescente amarilla (por ejemplo, YFP, citrina, Venus, YPet), parejas de donante/aceptor de FRET (por ejemplo, fluoresceína/tetrametilrodamina, IAEDANS/fluoresceína, EDANS/dabcilo, fluoresceína/fluoresceína, BODIPY FL/BODIPY FL, fluoresceína/QSY7 y QSY9), LysoTracker y LysoSensor (por ejemplo, LysoTracker azul DND-22, LysoTracker azul-blanco DPX, LysoTracker amarillo HCK-123, LysoTracker verde DND-26, LysoTracker rojo DND-99, LysoSensor azul DND-167, LysoSensor verde DND-189, LysoSensor verde DND-153, LysoSensor amarillo/azul DND-160, LysoSensor amarillo/azul, dextrano de 10.000 PM), verde de Oregón (por ejemplo, 488, 488-X, 500, 514); rodaminas (por ejemplo, 110, 123, B, B 200, BB, BG, B extra, 5-carboxitetrametilrodamina (5-TAMRA), 5 GLD, 6-carboxi-rodamina 6G, lisamina, lisamina rodamina B, falicidina, faloidina, rojo, Rhod-2, ROX (6-carboxi-X-rodamina), 5-ROX (carboxi-X-rodamina), sulforrodamina B can C, sulforrodamina G Extra, TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina), tetrametilrodamina (TRITC), WT), rojo de Texas, rojo de Texas-X, VIC y otros marcadores descritos, por ejemplo, en la publicación de EE. UU. n.º 2009/0197254, entre otros, según sabrán los expertos en la técnica. También pueden emplearse otros marcadores detectables (véase, por ejemplo, la publicación de EE. UU. n.º 2009/0197254), según sabrán los expertos en la técnica. Puede utilizarse cualquiera de estos sistemas y marcadores detectables, así como muchos otros, para detectar ácidos nucleicos diana amplificados.

Algunos marcadores detectables pueden basarse en la secuencia (también denominados en la presente "marcadores detectables específicos de locus"), por ejemplo, sondas de 5' nucleasa. Estas sondas pueden comprender uno o más marcadores detectables. En la técnica se conocen diversos marcadores detectables, por ejemplo, las sondas TaqMan[®] descritas en la presente (véase también la patente de EE. UU. n.º 5.538.848), diversas balizas moleculares de tallo-bucle (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 6.103.476 y 5.925.517, y Tyagi y Kramer, 1996, *Nature Biotechnology*, 14:303-308), balizas sin tallo o lineales (véase, por ejemplo, el documento WO 99/21881; patente de EE. UU. n.º 6.485.901), PNA Molecular BeaconsTM (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 6.355.421 y 6.593.091), balizas de PNA lineales (véase, por ejemplo, Kubista *et al.*, 2001, *SPIE* 4264:53-58), sondas no FRET (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.150.097), sondas Sunrise[®]/Amplifluor[®] (patente de EE. UU. n.º 6.548.250), sondas de tallo-bucle y dúplex de ScorpionTM (Solinas *et al.*, 2001, *Nucleic Acids Research*, 29:E96 y patente de EE. UU. n.º 6.589.743), sondas de bucle protuberante (patente de EE. UU. n.º 6.590.091), sondas de seudonudo (patente de EE. UU. n.º 6.589.250), cicliconas (patente de EE. UU. n.º 6.383.752), sonda MGB EclipseTM (Epoch Biosciences), sondas de horquilla (patente de EE. UU. n.º 6.596.490), sondas de ácido nucleico peptídico (PNA) de encendido (Svanvik, *et al.*, *Anal. Biochem.*, 281:26-35 (2001)), sondas de nanopartículas de autoensamblaje, sondas modificadas con ferroceno descritas, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.485.901; Mhlanga *et al.*, 2001, *Methods*, 25:463-471; Whitcombe *et al.*, 1999, *Nature Biotechnology*, 17:804-807; Isacson *et al.*, 2000, *Molecular Cell Probes*, 14:321-328; Svanvik *et al.*, 2000, *Anal. Biochem.*, 281:26-35; Wolffs *et al.*, 2001, *Biotechniques*, 766:769-771; Tsourkas *et al.*, 2002, *Nucleic Acids Research*, 30:4208-4215; Riccelli *et al.*, 2002, *Nucleic Acids Research*, 30:4088-4093; Zhang *et al.*, 2002, *Shanghai*, 34:329-332; Maxwell *et al.*, 2002, *J. Am. Chem. Soc.*, 124:9606-9612; Brude *et al.*, 2002, *Trends Biotechnol.*, 20:249-256; Huang *et al.*, 2002, *Chem. Res. Toxicol.* 15:118-126; y Yu *et al.*, 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 14:11155-11161; QuantiProbes (www.qiagen.com), HyBeacons (French, *et al.*, *Mol. Cell. Probes*, 15:363-374 (2001)), sondas de desplazamiento (Li, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 30:e5 (2002)), HybProbes (Cardullo, *et al.*, *PNAS*, 85:8790-8794 (1988)), MGB Alert (www.nanogen.com), Q-PNA (Fiandaca, *et al.*, *Genome Res.*, 11:609-611 (2001)), Plexor (www.Promega.com), cebadores LUX (Nazarenko, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 30:e37 (2002)), cebadores DzyNA (Todd, *et al.*, *Clin. Chem.*, 46:625-630 (2000)). Los marcadores detectables también pueden comprender extintores de agujero negro (Biosearch), Iowa Black (IDT), extintor QSY (Molecular Probes), y extintores de sulfonato/carboxilato de dabsilo y dabcil (Epoch). Los marcadores detectables también pueden comprender dos sondas en las que, por ejemplo, en una sonda haya flúor y en la otra un extintor, en los que la hibridación de las dos sondas entre sí sobre una diana extingue la señal, o en los que la hibridación sobre una diana altera la firma de

señal por un cambio en la fluorescencia. Los ejemplos de sistemas también pueden incluir FRET, sistemas de salicilato/ligando de DTPA (véase, por ejemplo, Oser *et al.*, *Angew. Chem. Int. Engl.*, 29(10):1167 (1990)), hibridación por desplazamiento, sondas homólogas y/o ensayos descritos en el documento EP 070685 y/o en la patente de EE. UU. n.º 6.238.927. Los marcadores detectables también pueden comprender derivados de sulfonato de tintes de fluoresceína con SO₃ en lugar del grupo carboxilato, formas de fosforamidita de fluoresceína, formas de fosforamidita de CY5 (disponible en Amersham).

Los términos "polipéptido," "péptido" y "proteína" se emplean de modo intercambiable en la presente para indicar un polímero de restos aminoácidos o cualquiera de sus variantes o fragmentos funcionales. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos, en los que uno o más restos aminoácidos son un mimético químico artificial de un correspondiente aminoácido natural, así como a los polímeros de aminoácidos naturales y polímeros de aminoácidos no naturales. El término "aminoácido" incluye los aminoácidos naturales y sintéticos, así como a los análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que actúan de una manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son los que están codificados por el código genético, así como los aminoácidos que son posteriormente modificados, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, por ejemplo, un carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Estos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que actúan de una manera similar a un aminoácido natural.

Con respecto a las secuencias de aminoácidos, los expertos en la técnica reconocerán que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que alteran, añaden o deleciónan un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada forman un "variante modificado de modo conservativo", en el que la alteración produce la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido similar desde el punto de vista químico. En la técnica se conocen tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos con una funcionalidad similar. Estos variantes modificados de forma conservativa son, además de los siguientes y sin excluirlos, variantes polimórficos, homólogos interespecíficos y alelos de la invención. Los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) alanina (A), glicina (G); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (K); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W); 7) serina (S), treonina (T); y 8) cisteína (C), metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984)). Los variantes de una secuencia de nucleótidos o secuencia de polipéptido concreta son opcionalmente variantes modificados de forma conservativa. Con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos concretas, los variantes modificados de forma conservativa se refieren a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o fundamentalmente idénticas o, cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias fundamentalmente idénticas.

El término "anticuerpo" o "anticuerpos" puede incluir anticuerpos completos y/o fragmentos y/o derivados de anticuerpos en forma no purificada o parcialmente purificada (por ejemplo, sobrenadante de hibridoma, fluido de ascitis, antisuero policlonal) o en forma purificada. Un anticuerpo "purificado" puede ser un anticuerpo que está separado de al menos aproximadamente 50% de las proteínas con las que se encuentra en un principio (por ejemplo, como parte de un sobrenadante de hibridoma o preparación de fluido de ascitis). Preferiblemente, un anticuerpo purificado está separado de al menos aproximadamente 60%, 75%, 90%, o 95% de las proteínas con las que se encuentra en un principio. Los derivados adecuados pueden incluir fragmentos (por ejemplo, Fab, Fab₂ o anticuerpos monocatenarios (Fv, por ejemplo)), tal como se conocen en la técnica. Los anticuerpos pueden tener cualquier forma u origen adecuado que incluye, por ejemplo, murino (por ejemplo, producidos por células de hibridoma murino), o pueden expresarse como anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos y similares. Los métodos para preparar y utilizar diversos tipos de anticuerpos son muy conocidos por los expertos en la técnica y son adecuados para su uso (véase, por ejemplo, Harlow, *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Harlow, *et al.*, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, protocolo portátil n.º 1, 1998; Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975)); Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); Presta (Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992); Verhoeyen *et al.* (*Science*, 239:1534-1536 (1988); Hoogenboom *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991); Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991); Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10, 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature*, 368, 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368, 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology*, 14, 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13, 65-93 (1995); así como las patentes de EE. UU. n.ºs 4.816.567; 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016).

En ciertas aplicaciones, los anticuerpos pueden estar contenidos dentro de un sobrenadante de hibridoma o fluido de ascitis y utilizarse directamente o después de una concentración empleando técnicas convencionales. En otras aplicaciones, los anticuerpos pueden purificarse aún más empleando, por ejemplo, fraccionamiento de sales y cromatografía de intercambio iónico, o cromatografía de afinidad empleando ligandos de proteína A, proteína G, proteína A/G, y/o proteína L acoplados covalentemente a un soporte sólido, tal como esferas de agarosa, o

combinaciones de estas técnicas. Los anticuerpos pueden conservarse en cualquier formato adecuado, que incluye como una preparación congelada (por ejemplo, aproximadamente -20 °C o -70 °C), en forma liofilizada, o bajo condiciones de refrigeración normales (por ejemplo, aproximadamente 4 °C). Cuando se conservan en forma líquida, se prefiere utilizar un tampón adecuado, tal como disolución salina tamponada con Tris (TBS) o disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Los anticuerpos y sus derivados pueden incorporarse en composiciones (por ejemplo, unirse a oligonucleótidos) descritas en la presente para su uso *in vitro* o *in vivo*. Los anticuerpos también pueden modificarse mediante el uso, por ejemplo, de una biotilación. También pueden ser adecuados para su uso otros métodos para fabricar y emplear anticuerpos disponibles para los expertos en la técnica.

Los métodos descritos en la presente pueden ser útiles para detectar y/o cuantificar una diversidad de ácidos nucleicos diana de una muestra de ensayo (por ejemplo, una muestra biológica). Un ácido nucleico diana es cualquier ácido nucleico para el cual se diseña un sistema de ensayo para identificar o detectar su presencia (o ausencia) y/o para su cuantificación en una muestra de ensayo. Estos ácidos nucleicos pueden incluir, por ejemplo, ácidos nucleicos de agentes infecciosos (por ejemplo, virus, bacterias, parásitos y similares), un proceso de enfermedad, tal como cáncer, diabetes, o similares, o para medir una respuesta inmunológica. Los ejemplos de "muestra de ensayo" incluyen diversos tipos de muestras, tales como muestras biológicas. Los ejemplos de muestras biológicas incluyen, por ejemplo, un fluido corporal (por ejemplo, sangre, saliva, fluido espinal), una muestra de tejido, un producto alimentario (por ejemplo, carne) o bebida (por ejemplo, leche) o similares. Otros ejemplos de muestras biológicas pueden incluir sangre completa, suero, plasma, orina, fluido sinovial, saliva, fluido cerebroespinal, infiltrado de tejidos, exudado cervical o vaginal, efusión pleural, fluido de lavado bronquioalveolar, fluido de lavado gástrico, contenidos del intestino delgado o grueso, y especímenes de frotis de diversos orificios corporales dispersos en un medio adecuado. Los ácidos nucleicos expresados pueden incluir, por ejemplo, genes cuya expresión (o falta de expresión) está asociada con trastornos médicos, tales como enfermedades infecciosas (por ejemplo, infecciones bacterianas, víricas, fúngicas, protozoarias) o cáncer. Los métodos descritos en la presente también pueden utilizarse para detectar contaminantes (por ejemplo, bacterias, virus, hongos y/o protozoos) en productos farmacéuticos, alimentarios o bebidas. Los métodos descritos en la presente también pueden utilizarse para detectar alelos raros en presencia de alelos de tipo salvaje (por ejemplo, un alelo mutante en presencia de 10^6 - 10^9 alelos de tipo salvaje). Los métodos son útiles, por ejemplo, para detectar una enfermedad residual mínima (por ejemplo, células de cáncer raras remanentes durante la remisión, en especial mutaciones en el gen p53 u otros genes supresores de tumores previamente identificados dentro de los tumores) y/o medir la carga de mutación (por ejemplo, la frecuencia de mutaciones somáticas específicas presentes en tejidos normales, tales como sangre u orina).

También se proporcionan kits para realizar los métodos descritos en la presente. El kit puede comprender una o más sondas (por ejemplo, un anticuerpo conjugado con un oligonucleótido), una pareja de oligonucleótidos para amplificar al menos un ácido nucleico diana a partir de una muestra, un biocatalizador (por ejemplo, ADN polimerasa) y/o las correspondientes una o más sondas marcadas con un marcador detectable. El kit también puede incluir muestras que contengan ácidos nucleicos diana predefinidos para ser empleados en reacciones de control. El kit también puede incluir opcionalmente disoluciones madre, tampones, enzimas, marcadores detectables o reactivos necesarios para la detección, tubos, membranas y similares que pueden utilizarse para completar la reacción de amplificación. En algunas realizaciones, se incluyen múltiples conjuntos de cebadores. También se contemplan otras realizaciones de sistemas y kits concretos, tal como entienden los expertos en la técnica.

Los expertos en la técnica reconocerán, o pueden determinar, sin emplear más que la experimentación habitual, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descrita en la presente. El alcance de la presente invención no pretende estar limitado a esta descripción.

A menos que sea evidente por el contexto, cualquier característica puede ser reivindicada en combinación con cualquier otra, o puede ser reivindicada como no presente en combinación con otra característica. Una característica puede ser cualquier información que pueda caracterizar una invención o que pueda limitar el alcance de una reivindicación, por ejemplo, cualquier variación, etapa, característica, propiedad, composición, método, etapa, grado, nivel, componente, material, sustancia, elemento, modo, variable, aspecto, medición, cantidad, opción, realización, cláusula, término descriptivo, elemento de reivindicación o limitación.

Las formas en singular "un/una" y "el/la" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Pueden emplearse expresiones de aproximación, tal como se emplean en la presente a lo largo de la memoria descriptiva y reivindicaciones, para modificar cualquier representación cuantitativa que pueda variar permisivamente sin provocar un cambio en la función básica con la que se relacionada. Por consiguiente, un valor modificado con un término tal como "aproximadamente" no se limita al valor concreto especificado. Cuando sea necesario, se suministran intervalos, y estos intervalos incluyen todos los subintervalos incluidos en ellos.

En esta descripción, el uso del singular puede incluir el plural, a menos que se indique específicamente lo contrario, o a menos, tal como entenderán los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción, que el singular sea la única realización funcional. Así, por ejemplo, "un/una" puede significar más de uno o una, y "una realización" puede significar que la descripción se aplica a múltiples realizaciones. La expresión "y/o" indica una manera abreviada de indicar que la combinación específica se contempla en combinación y por separado, en la alternativa.

Se apreciará que existe un "aproximadamente" implícito antes de las temperaturas, concentraciones, tiempos, etc., analizados en las presentes indicaciones, de modo que las desviaciones ligeras e insustanciales están dentro del alcance de las presentes indicaciones. Además, el uso de "comprende", "que comprende", "comprendiendo", "contiene", "que contiene", "conteniendo", "incluye", "que incluye", e "incluyendo" no pretende ser limitante. Se entenderá que tanto la anterior descripción general como la descripción detallada son solo ejemplos y explicaciones, y no son restringen la invención.

A menos que se indique específicamente en la anterior memoria descriptiva, las realizaciones en la anterior memoria descriptiva que indiquen que "comprenden" diversos componentes también se contemplan como que "consisten" o "consisten fundamentalmente" en los componentes indicados; las realizaciones en la anterior memoria descriptiva que indiquen que "consisten" en diversos componentes también se contemplan como que "comprenden" o "comprenden fundamentalmente" los componentes indicados; y las realizaciones en la anterior memoria descriptiva que indiquen que "consisten fundamentalmente" en diversos componentes también se contemplan como que "consisten en" o "comprenden" los componentes indicados (este intercambio no se aplica al uso de estos términos en las reivindicaciones).

En general, las características descritas en la presente pretenden ser opcionales a menos que se indique explícitamente que sean necesarias en la memoria descriptiva. Los ejemplos no limitantes de expresiones que indican que una característica se considera opcional en la memoria descriptiva incluyen términos y expresiones tales como "variación," "en el/la que," "aunque," "cuando," "opcionalmente," "incluye," "preferido," "especial," "recomendado," "aconsejable," "particular," "debe," "alternativa," "típico," "representativo," "diversos," "tal como," "similares," "puede," "ejemplo," "realización," o "aspecto," "en algunos/algunas," "como ejemplo," "caso", "si" o cualquier combinación y/o variación de estos términos o expresiones.

"Aislado" o "purificado" se refiere, en general, al aislamiento de una sustancia (compuesto, polinucleótido, proteína, polipéptido, composición de polipéptidos), de modo que la sustancia comprende un porcentaje significativo (por ejemplo, más del 2%, más del 5%, más del 10%, más del 20%, más del 50%, o más, a veces más del 90%, 95% o 99%) de la muestra en que reside. En ciertas realizaciones, un componente sustancialmente purificado comprende al menos 50%, 80%-85%, o 90-95% de la muestra. Las técnicas para purificar polinucleótidos y polipéptidos de interés son muy conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y sedimentación según la densidad. En general, una sustancia está purificada cuando existe en una muestra en una proporción mayor que la que se encuentra en la naturaleza.

La identidad de secuencia (también llamada homología) se refiere a la similitud en secuencia de dos o más secuencias (por ejemplo, secuencias de nucleótidos o de polipéptido). En el contexto de dos o más secuencias homólogas, el porcentaje de identidad u homología de las secuencias o sus subsecuencias indica el porcentaje de todas las unidades monoméricas (por ejemplo, nucleótidos o aminoácidos) que son iguales (por ejemplo, una identidad de aproximadamente 70%, preferiblemente una identidad de 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%). El porcentaje de identidad puede indicarse con respecto a una región especificada, cuando se compara y se alinea para su máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación, o una región designada, medida empleando algoritmos de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con los parámetros por defecto descritos a continuación, o mediante alineamiento manual e inspección visual. Se dice que las secuencias son "sustancialmente idénticas" cuando existe al menos 90% de identidad al nivel de aminoácidos o al nivel de nucleótidos. Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de ensayo. Preferiblemente, la identidad existe a lo largo de una región que tiene una longitud de al menos aproximadamente 25, 50, o 100 restos, o a lo largo de la longitud completa de al menos una secuencia comparada. Un algoritmo preferido para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y de similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 25:3389-3402 (1977). Otros métodos incluyen los algoritmos de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), y Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 (1970), etc. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí bajo condiciones rigurosas.

Cualquier indicación de que una característica sea opcional pretende proporcionar un apoyo adecuado (por ejemplo, art. 83 y 84 de EPC) para las reivindicaciones que incluyen expresiones cerradas o exclusivas o negativas con referencia a la característica opcional. Las expresiones exclusivas excluyen específicamente la característica concreta enunciada de incluir cualquier otra cuestión. Por ejemplo, si se indica que A puede ser un fármaco X, esta expresión pretende proporcionar apoyo para una reivindicación que explícitamente especifica que A solo consiste en X, o que A no incluye ningún otro fármaco aparte de X. Las expresiones "negativas" explícitamente excluyen la propia característica opcional del alcance de las reivindicaciones. Por ejemplo, si se indica que el elemento A puede incluir a X, esta expresión pretende proporcionar apoyo para una reivindicación que explícitamente especifica que A no incluye a X. Los ejemplos no limitantes de expresiones y términos exclusivos o negativos incluyen "solo," "solamente," "consiste en," "consiste fundamentalmente en," "por sí solo/sola," "sin," "en ausencia de (por ejemplo, otros artículos del mismo tipo, estructura y/o función)" "excluyendo," "no incluye", "no", "no puede," o cualquier combinación y/o variación de dichas expresiones.

De modo similar, los referentes tales como "un," "una," "dicho," o "el/la," pretenden apoyar tanto el singular como el plural, a menos que el contexto indique lo contrario. Por ejemplo "un perro" pretende apoyar un perro, no más de un

perro, al menos un perro, una pluralidad de perros, etc. Los ejemplos no limitantes de expresiones y términos calificativos que indican singularidad incluyen "un único", "uno," "solo", "solo uno," "no más de uno", etc. Los ejemplos no limitantes de expresiones y términos calificativos que indican pluralidad (potencial o real) incluyen "al menos uno," "uno o más," "más de uno," "dos o más," "una multiplicidad," "una pluralidad," "cualquier combinación de," "cualquier permutación de," "uno/una cualquiera o más de," etc. Las reivindicaciones o las descripciones que incluye "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno o más de uno o todos los miembros del grupo están presentes, son empleados o resultan pertinentes de otra forma en un producto o proceso concreto a menos que se indique lo contrario o que sea evidente de otro modo a partir del contexto.

En las reivindicaciones, cualquier verbo activo (o su gerundio) pretende indicar la correspondiente acción real o intentada, aunque no se produzca ninguna acción real. Por ejemplo, el verbo "hibridar" y su forma en gerundio "hibridando" y similares se refieren a la hibridación real o al intento de hibridación poniendo en contacto secuencias de ácidos nucleicos bajo condiciones adecuadas para la hibridación, aunque no se produzca una hibridación real. De forma similar, "detectar" y "detección", cuando se emplean en las reivindicaciones, se refieren a la detección real o al intento de detección, aunque no se detecte realmente ninguna diana.

Cuando en la presente se mencionan intervalos, se incluyen los límites finales. Además, debe entenderse que, a menos que se indique lo contrario o que sea evidente de otro modo a partir del contexto y comprensión de los expertos en la técnica, los valores que se expresan como intervalos pueden asumir cualquier valor específico o subintervalo dentro de los intervalos mencionados en diferentes realizaciones de la invención, hasta una décima parte de la unidad del límite inferior del intervalo, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Ciertas realizaciones se describen más fondo en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

En un ejemplo de una realización de procesos de ensayo de acoplamiento por proximidad (PLA) típicos (**Fig. 1**), la mezcla de sondas (por ejemplo, que comprende dos sondas, A y B (cada sonda comprende un componente de oligo de estreptavidina "SAO" y un componente de anticuerpo "Ab") en un tampón de dilución de sondas "PDB") y una muestra de ensayo (en tampón de dilución de muestra "SDB") se reúnen en una reacción de unión. Después de la reacción de unión (por ejemplo, a 37 °C durante 1 hora), la mezcla de reacción de acoplamiento se añade para realizar la reacción de acoplamiento. Para preparar la mezcla de reacción de acoplamiento, se diluyen una ligasa y el tampón de acoplamiento. Después de la reacción de acoplamiento (por ejemplo, a 37 °C durante 10 minutos), el producto acoplado se estabiliza mediante una digestión con proteasas; la proteasa después se inactiva (por ejemplo, empleando calor mediante una incubación a 37 °C durante 10 minutos, seguido de 95 °C durante 5 minutos). Habitualmente, una porción del producto acoplado se traslada a la mezcla de reacción de PCR a tiempo real (que comprende cebadores de PCR y la mezcla de sondas de proximidad "PCR-PP"), y después se coloca en la placa de reacción de PCR en un instrumento de qPCR. Entonces puede desarrollarse la detección y la cuantificación del producto acoplado empleando técnicas convencionales.

Se ilustra un diagrama esquemático de un ejemplo de un proceso de PLA mejorado en **Fig. 2**. Tal como se muestra en la figura, la reacción de unión es la misma que la mostrada en **Fig. 1**. Sin embargo, en algunas realizaciones de los procesos mejorados descritos en la presente, tal como se muestra en **Fig. 2**, se añade ligasa a la mezcla de PCR a tiempo real (que comprende una mezcla de cebadores de PCR, sondas de proximidad y puentes "PCR-PPS") que entonces se añade directamente a la reacción de unión. En ciertas realizaciones de los procesos de PLA mejorados, se prepara una muestra de ensayo (por ejemplo, un lisado celular), se deja que se desarrolle una reacción de unión y después se añade directamente a esta un tampón de acoplamiento. A esta mezcla después se le añade una mezcla de sondas de proximidad y una mezcla de PCR. Esta mezcla de reacción combinada después se incuba durante una cantidad de tiempo adecuada (por ejemplo, a temperatura ambiente durante 20 minutos y después a 96 °C durante 5 min) y se realiza una PCR. La mezcla de reacción de PCR después se deposita sobre la placa de reacción en un instrumento de qPCR y entonces puede desarrollarse la detección y la cuantificación del producto acoplado empleando técnicas convencionales (como en los procesos de PLA típicos).

Ejemplo 2

También se comparan ejemplos de realizaciones de procesos de PLA típicos y mejorados en **Figs. 3A y 3B**. Tal como se muestra en las realizaciones ilustradas en estas figuras, los procesos típicos incluyen la preparación de la muestra, una reacción de unión, acoplamiento, inactivación de la ligasa empleando una proteasa, inactivación de la proteasa (por ejemplo, empleando calor), seguido de una PCR a tiempo real. Para realizar la etapa de PCR, una porción de la mezcla de reacción que contiene la ligasa y la proteasa inactivadas se traslada a una placa de PCR, y se añade a esta la "mezcla de PCR" (por ejemplo, que contiene cebadores, dNTP, polimerasa y similares).

Tal como se muestra en **Fig. 3B**, el proceso mejorado puede eliminar el uso de una proteasa y la dilución de la mezcla de reacción antes de la PCR. Tal como se muestra en la figura, la ligasa puede inactivarse empleando calor, y la mezcla de reacción resultante puede colocarse directamente en el ensayo de qPCR. Así, algunas realizaciones del flujo de trabajo de PLA mejorado emplean los productos de la reacción de unión completos en el pocillo de la

PCR a tiempo real. Esto proporciona un flujo de trabajo simplificado y una dilución reducida de la mezcla de reacción. Como resultado, en algunas realizaciones preferidas de los procesos de PLA mejorados, la mezcla de reacción de PCR contiene una mayor concentración del producto acoplado (por ejemplo, el ácido nucleico diana).

5 Para reducir el acoplamiento de sondas de no unión, puede reducirse la concentración de las sondas. También puede reducirse la longitud del puente (por ejemplo, conector) de oligo y la concentración para minimizar la probabilidad de una hibridación en disolución estimulada por un acoplamiento de no unión al antígeno (por ejemplo, una longitud de los oligonucleótidos conectores de al menos 14 bases (por ejemplo, 9 bases que se solapan con una primera sonda de oligo y 5 bases que se solapan con una segunda sonda de oligo (9+5)) frente a una longitud de los oligonucleótidos conectores de al menos 18 bases (por ejemplo, 9 bases que se solapan con una primera sonda de oligo y 9 que se solapan con una segunda sonda de oligo (9+9)). En estas realizaciones, puede emplearse una ligasa de huella pequeña (SFL). Tal como se describe en la presente, una SFL puede acoplarse a oligonucleótidos que tienen una longitud de conector de oligo de tan solo 3 bases de ADN hibridado adyacentes al 5'-fosfato del ADN hibridado. Para combinar el acoplamiento y la reacción de PCR en una etapa, en algunas realizaciones el ATP (cofactor para la ligasa) puede omitirse opcionalmente de la mezcla de reacción. Para mantener la función ligasa, en otras realizaciones, la SFL puede preenriquecerse con ATP antes de su purificación y uso.

En algunas realizaciones de los procesos de PLA mejorados, pueden utilizarse puentes de oligos considerados como puentes simétricos o puentes asimétricos dependiendo del número de nucleótidos que se hibridan con cada una de las dos sondas de oligos que conectan. La **Fig. 4** es un diagrama de tipos de puentes asimétricos y simétricos para su uso en los procesos de PLA mejorados descritos en la presente. Los puentes asimétricos (o "conectores") se extienden a través de las dos sondas de oligos separadas (por ejemplo, la sonda de oligo A y B), teniendo uno de los extremos del puente (por ejemplo, cualquiera de los extremos 3' o 5') más nucleótidos que se hibridan con una de las sondas de oligos que el otro extremo del puente que tiene nucleótidos que se hibridan con la sonda de oligo alternativa (**Fig. 4A**). Los puentes simétricos se extienden a través de las dos sondas de oligos separadas (por ejemplo, la sonda de oligo A y B), teniendo ambos extremos del puente (por ejemplo, el extremo 3' y el extremo 5') el mismo número de nucleótidos que se hibridan con cada una de las dos sondas de oligos (**Fig. 4BA**).

Tanto los puentes asimétricos como los simétricos pueden tener cualquier número de nucleótidos intermedios entre cada uno de sus extremos 3' y 5' que se hibridan con las sondas de oligos separadas. Como alternativa, pueden no existir nucleótidos intermedios entre cada uno de los extremos 3' y 5' que se hibridan con las sondas de oligos.

30 Ejemplo 3

Fig. 5 proporciona una comparación entre los resultados obtenidos empleando ejemplos de realizaciones de un proceso típico (kit abierto de ensayos de proteínas TaqMan de Life Technologies, Inc.; "PLA1") y un proceso mejorado (empleando los métodos descritos en la presente; "PLA2"). Ambos ensayos se diseñaron para detectar CSTB en un lisado de células Ntera2. La reacción de unión es idéntica para PLA1 y PLA2 empleando el protocolo y los reactivos recomendados por el fabricante (Life Technologies, Inc.) en reacciones de unión con un volumen de 4 µl. Después de la reacción de unión, PLA1 avanza siguiendo el protocolo y con los reactivos del fabricante. La reacción de PLA2 se combinó con 16 µl de la mezcla de reacción de acoplamiento-PCR. La mezcla de reacción de acoplamiento-PCR consiste en 10 µl de la mezcla maestra rápida de ensayo de proteínas TaqMan (Life Technologies, Inc.), 1 µl de ensayo de PCR universal y el oligonucleótido conector 9+5 y la ligasa SFL, y 5 µl de agua destilada. Se dejó que la reacción de acoplamiento se desarrollase durante 10 minutos. El producto acoplado después se colocó en un instrumento de PCR a tiempo real (Step1Plus) y se utiliza según las instrucciones del fabricante.

Tal como se describió anteriormente, en algunas realizaciones, el proceso mejorado (PLA2) introduce más moléculas diana en la etapa de PCR (por ejemplo, lo cual provoca que se generen más amplicones). La mejora proporcionada con ello se muestra en **Fig. 5**. Tal como se muestra en la figura, la dCt del proceso mejorado (PLA2) es mucho mejor comparada con el proceso típico (PLA1). En este ejemplo de realización, el proceso mejorado proporciona una mejora de al menos aproximadamente una a tres veces en dCt frente al proceso típico.

El proceso mejorado también proporciona una mayor sensibilidad de ensayo. Tal como se muestra en el ejemplo de realización en **Fig. 6**, el proceso mejorado proporciona un aumento en aproximadamente dos a diez veces en la sensibilidad frente al proceso típico (**Fig. 6**). La sensibilidad se calcula como el cambio en número de veces de la cuantificación relativa (RQ) empleando los resultados del proceso típico como calibrador. La dCt del proceso mejorado se calcula como la mejora en número de veces frente al proceso típico. Puesto que la RQ se calcula a partir de un umbral de dCt de 2, el cambio en número de veces es, por tanto, indicativo de la mejora en la sensibilidad. Los datos demuestran que la sensibilidad del ensayo mejora en al menos 2 veces, determinada empleando cinco dianas diferentes (GFP, hCSTB, hICAM1, hLIN28, y hOCT3/4). Los datos de GFP se generaron utilizando los procesos típico (por ejemplo, PLA1) y mejorado (por ejemplo, PLA2) según se describió anteriormente, empleando un lisado de células al cual se le añadió rGFP (por ejemplo, un lisado de células "sembrado") y usando una sonda de GFP.

Ejemplo 4

En este ejemplo, se ensayaron dos longitudes de puente diferentes a diversas concentraciones.

Los experimentos de PLA se realizaron empleando condiciones de PLA típicas (kit abierto de ensayo de proteínas TaqMan de Life Technologies, Inc.) según las instrucciones del fabricante empleando una ligasa de T4, excepto que se variaron las concentraciones del puente dentro del intervalo de 3,1 nM a 1000 nM. También se diseñaron puentes que tienen dos longitudes de puente diferentes de 18 (9+9; "99") o 16 (8+8; "88"). Se emplearon sondas de ensayo de cistatina B (CSTB) (del kit de ensayo de expresión de proteínas TaqMan (Human CSTB); Life Technologies, Inc.) para detectar 1000 pM o 0 pM (sin control de proteínas; "NPC") de proteína CSTB recombinante en el tampón. Los valores de Ct se representaron gráficamente para cada concentración de puente y los valores de delta Ct (valores de NPC Ct menos los valores de CSTB Ct) y se representaron gráficamente para cada concentración usada.

Tal como se muestra en **Fig. 7**, se observó una reducción en delta Ct para el puente 99 a una concentración baja de 3,1 nM, comparado con las concentraciones más altas usadas. También se observó una delta Ct para el puente 88 a una concentración de 25 nM comparado con concentraciones más altas. De modo global, estos datos demuestran que se reducen los productos acoplados cuando la longitud del puente disminuye cuando se emplea la ligasa de T4.

Ejemplo 5

En este ejemplo, se ensayaron cinco longitudes de puente diferentes empleando una única concentración.

Los experimentos de PLA se realizaron empleando métodos similares al descrito en el ejemplo 4, excepto que se empleó la ligasa SF en lugar de la ligasa de T4. Brevemente, se diseñaron puentes para que tuvieran diferentes longitudes de puente de 12 (3+9), 13 (4+9), 14 (5+9 o 7+7), 17 (8+9), o 18 (9+9). La concentración utilizada para cada uno de estos puentes fue de 100 nM. Se preparó un lisado de Raji (kit de control de lisados de expresión de proteínas de Life Technologies, Inc.) a 500 células/reacción o 0 células/reacción ("NPC") y se emplearon sondas de ensayo de CSTB (del kit de ensayo de expresión de proteínas TaqMan (CSTB humana); Life Technologies, Inc.) según las instrucciones del fabricante. Los valores de Ct se representaron gráficamente para cada tipo de puente y los valores de delta Ct (valores de NPC Ct menos los valores de Ct de 500 células de entrada) y se representaron gráficamente para cada uno.

Tal como se muestra en **Fig. 8**, se observó un aumento en dCT para los puentes con una longitud de 12 nucleótidos hasta 14 nucleótidos (que incluyen tipos de puentes asimétricos y simétricos). Esto demuestra que la ligasa SF es capaz de acoplar puentes asimétricos y simétricos de longitudes más cortas y más largas.

Ejemplo 6

En este ejemplo se comparó la ligasa de T4 con dos ligasas SF diferentes (por ejemplo, SF y DLxD).

Se realizaron experimentos de PLA empleando métodos similares al descrito en el ejemplo 5, empleando las ligasas indicadas y los puentes de longitud variable, según se indica. Brevemente, se diseñaron puentes que tienen dos longitudes de puente diferentes de 14 (5+9; "95") o 18 (9+9; "99"). La concentración utilizada para cada uno de estos puentes fue de 100 nM. Se preparó un lisado de Raji (kit de control de lisados de expresión de proteínas de Life Technologies, Inc.) a 500 células/reacción o 0 células/reacción ("NPC") y se emplearon sondas de ensayo de CSTB (del kit de ensayo de expresión de proteínas TaqMan (CSTB humana); Life Technologies, Inc.) según las instrucciones del fabricante. Los valores de Ct se representaron gráficamente para cada tipo de ligasa y de puente y los valores de delta Ct (valores de NPC Ct menos los valores de Ct de 500 células de entrada) y se representaron gráficamente para cada uno.

Tal como se muestra en **Fig. 9**, la ligasa de T4 no produjo una dCt perceptible empleando el puente de 5+9. Sin embargo, ambas ligasas SF, SF y DLxD, fueron capaces de acoplar el ADN diana empleando tipos de puentes más cortos. En este experimento, la SF empleada con el puente de 5+9 produjo la dCt más alta.

Los procesos mejorados descritos en la presente y ejemplificados a lo largo de los anteriores ejemplos, proporcionan unos tiempos más rápidos desde el inicio del proceso hasta la obtención de resultados (más rápidos), reducen el tiempo de manipulación (más sencillos y más baratos), reducen la utilización de equipo de laboratorio de plástico (más baratos y más verdes), y aumentan las señales y las sensibilidades. Estos procesos mejorados proporcionan un flujo de trabajo simplificado combinando las etapas de acoplamiento y PCR, reducen el factor de dilución desde la etapa de unión a la del acoplamiento, reducen la concentración de sonda de unión para permitir un factor de dilución reducido, el uso de oligos conectores más cortos para controlar la señal de fondo, el uso de una concentración más baja de oligos conectores para controlar la señal de fondo, el uso de una ligasa SF para poder utilizar una longitud de oligo conector más corta, un esquema de ligasa SF enriquecido en ATP para omitir el ATP en la etapa de acoplamiento-PCR, y permiten el uso del volumen de reacción completo para mejorar la señal y la sensibilidad del PLA.

REIVINDICACIONES

1. Un método para acoplar al menos dos oligonucleótidos para producir un oligonucleótido acoplado y amplificar el oligonucleótido acoplado, en el que el acoplamiento y la amplificación se producen en una única mezcla de reacción, comprendiendo dicho método las etapas, en combinación, de:
- 5 a) poner en contacto una proteína diana o analito con al menos una primera y una segunda sonda, teniendo cada sonda una especificidad de unión por la proteína o el analito y estando unida al menos a un tipo de oligonucleótido;
- b) acoplar entre sí los oligonucleótidos sobre la primera y la segunda sonda empleando
- 10 (i) una ligasa seleccionada del grupo que consiste en la ligasa de SEQ ID NO:77, la ligasa de SEQ ID NO:78, la ligasa de SEQ ID NO:79, la ligasa de SEQ ID NO:80, la ligasa de SEQ ID NO:81, la ligasa de SEQ ID NO:82, y sus combinaciones, y
- (ii) un puente oligonucleotídico, en el que dicho puente oligonucleotídico comprende un extremo 3' de cuatro a nueve bases de longitud, y un extremo 5' de cuatro a nueve bases de longitud,
- para producir un ácido nucleico diana y amplificar el ácido nucleico diana; y,
- c) detectar el ácido nucleico diana amplificado.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que al menos uno de dichos oligonucleótidos comprende al menos tres nucleótidos.
3. El método de la reivindicación 1, en el que dichos oligonucleótidos sobre dicha primera y segunda sonda son al menos parcialmente complementarios entre sí.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho oligonucleótido acoplado se amplifica empleando la reacción en cadena con polimerasa (PCR), y en el que dicho oligonucleótido acoplado amplificado se detecta empleando una PCR cuantitativa (qPCR).
5. Un método para detectar una diana en una muestra, en el que:
- a) se une una primera y una segunda sonda, cada una de las cuales se une específicamente a la diana, en las que cada una de las sondas comprende una cola oligonucleotídica;
- 25 b) se acoplan la primera y la segunda cola oligonucleotídica empleando
- (i) una ligasa seleccionada del grupo que consiste en la ligasa de SEQ ID NO: 77, la ligasa de SEQ ID NO: 78, la ligasa de SEQ ID NO: 79, la ligasa de SEQ ID NO: 80, la ligasa de SEQ ID NO: 81, la ligasa de SEQ ID NO: 82, y sus combinaciones, y
- 30 (ii) un puente oligonucleotídico, en el que dicho puente oligonucleotídico comprende un extremo 3' de cuatro a nueve bases de longitud, y un extremo 5' de cuatro a nueve bases de longitud,
- produciendo con ello un molde oligonucleotídico acoplado; y,
- c) se realiza una reacción en cadena de polimerasa (PCR) del molde oligonucleotídico a lo largo del primer y el segundo oligonucleótido para cuantificar el molde, en el que las etapas b) y c) se realizan en la misma mezcla de reacción.
- 35 6. El método de la reivindicación 5, en el que la longitud de dicha primera y segunda cola oligonucleotídica es de al menos 3 nucleótidos.
7. El método de la reivindicación 6, en el que dicho extremo 3' de dicho puente oligonucleotídico se solapa con al menos 3 nucleótidos de dicha primera cola oligonucleotídica y/o dicho extremo 5' de dicho puente oligonucleotídico se solapa con al menos 3 nucleótidos de dicha segunda cola oligonucleotídica.
- 40 8. El método de las reivindicaciones 6 o 7, en el que los extremos 3' y 5' de dicho puente oligonucleotídico son simétricos o asimétricos entre sí.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5 a 8, en el que dicha primera y/o segunda sonda comprende además un anticuerpo o una porción de anticuerpo específicos para dicha diana.
- 45 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho puente oligonucleotídico está bloqueado en su extremo 3'.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que se omite el ATP de la mezcla de reacción en la etapa b), y en el que dicha ligasa se pone en contacto con adenosina trifosfato antes del uso en la etapa b).

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que dicha ligasa se inactiva después del acoplamiento empleando calor.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que dicho molde se cuantifica empleando una PCR a tiempo real.
- 5 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en el que dicho ensayo de PCR a tiempo real es un ensayo TaqMan.

FIGURA 1

PLA típico/convencional

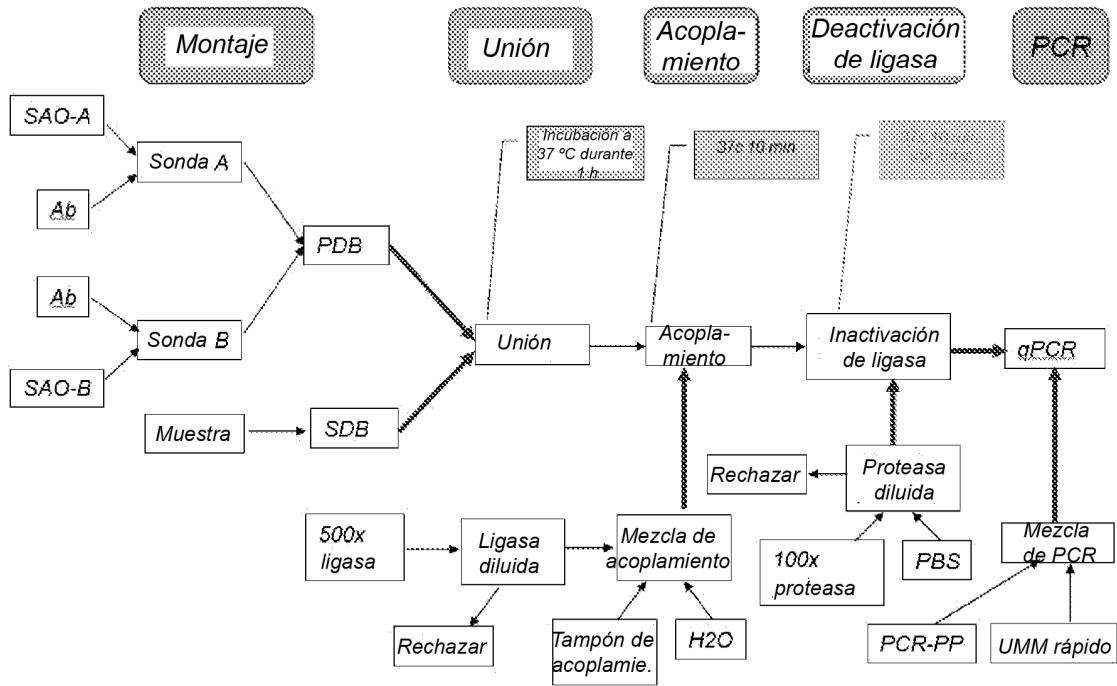


FIGURA 2
PLA mejorado

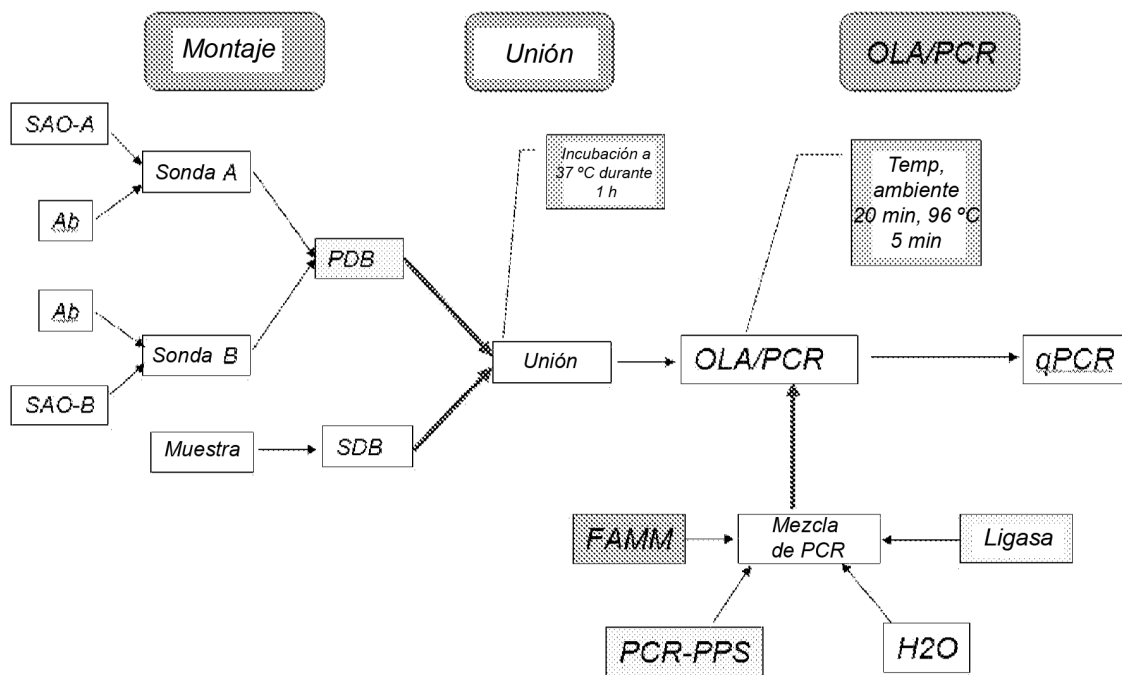
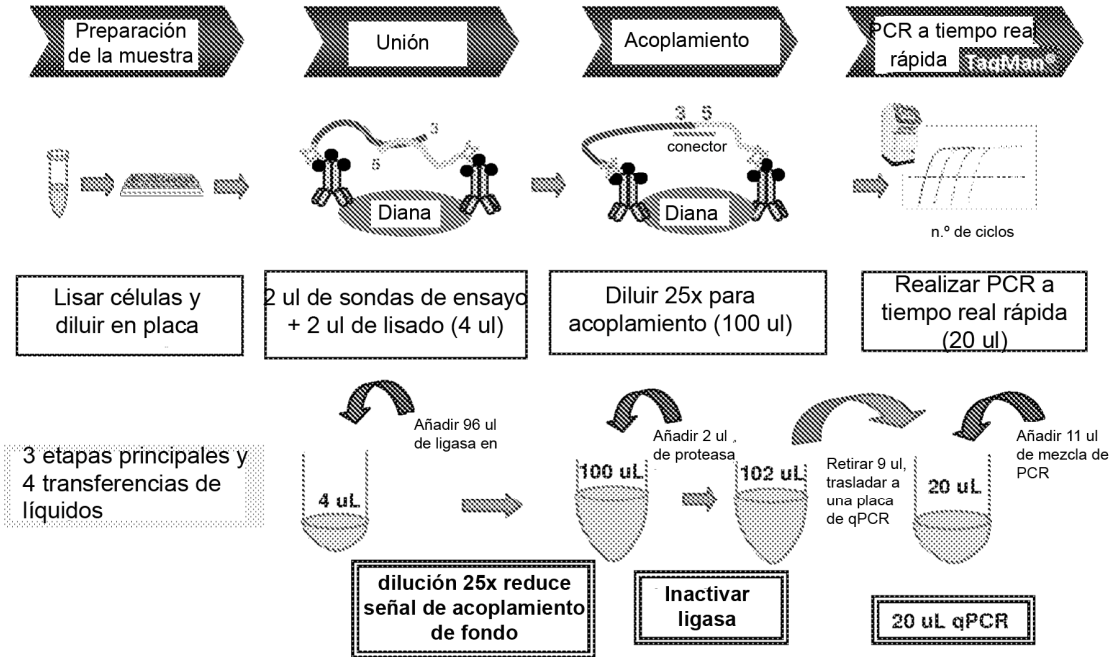


FIGURA 3

A. PLA típico



B. PLA mejorado

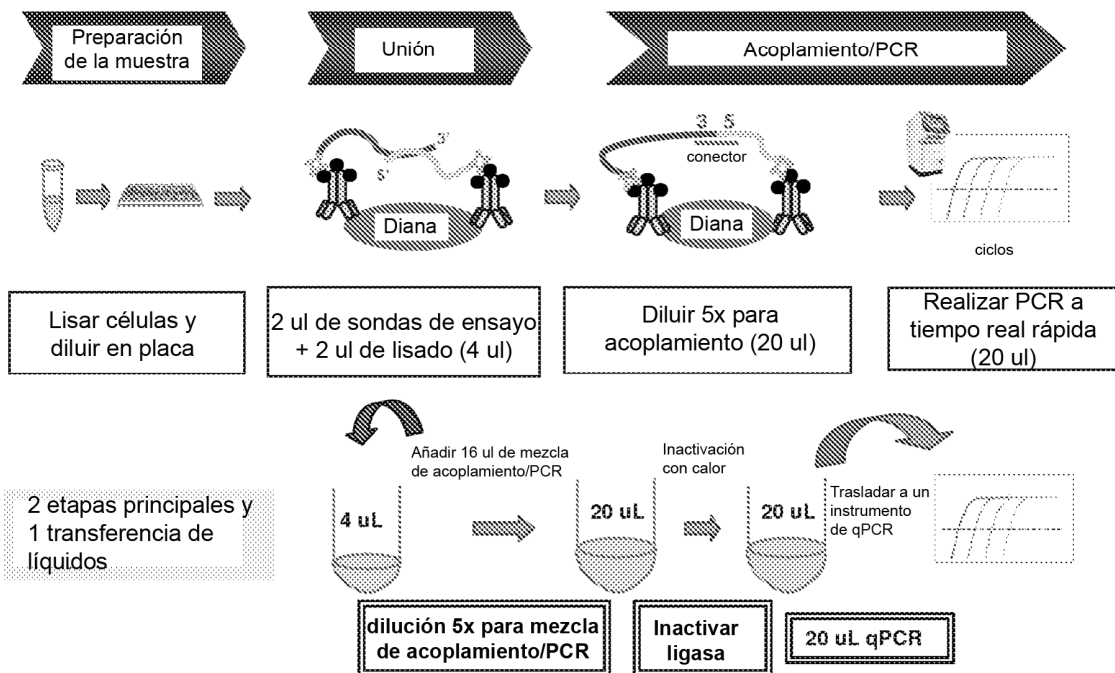


FIGURA 5

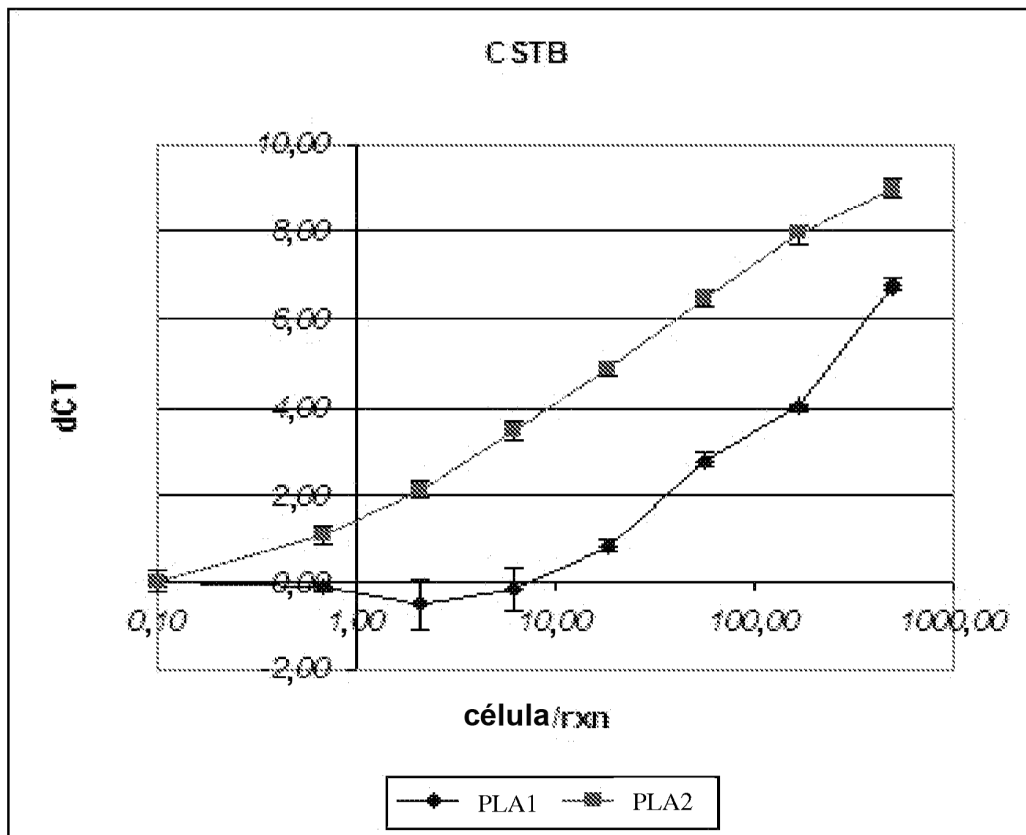


FIGURA 6

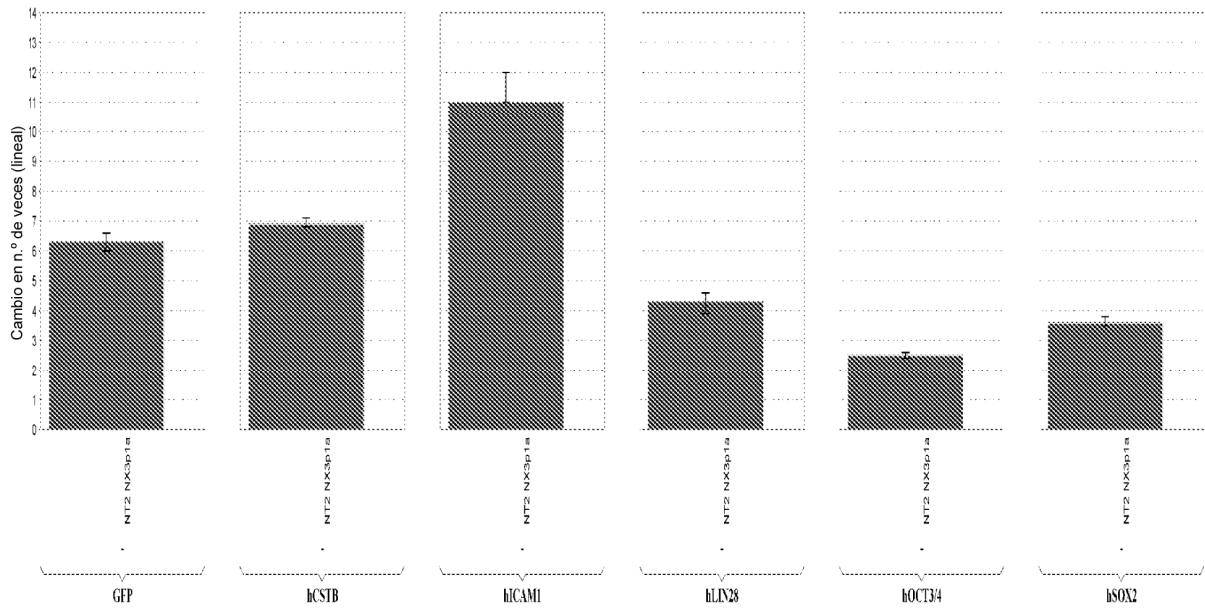


FIGURA 8

Efecto de la longitud del puente con ligasa SF

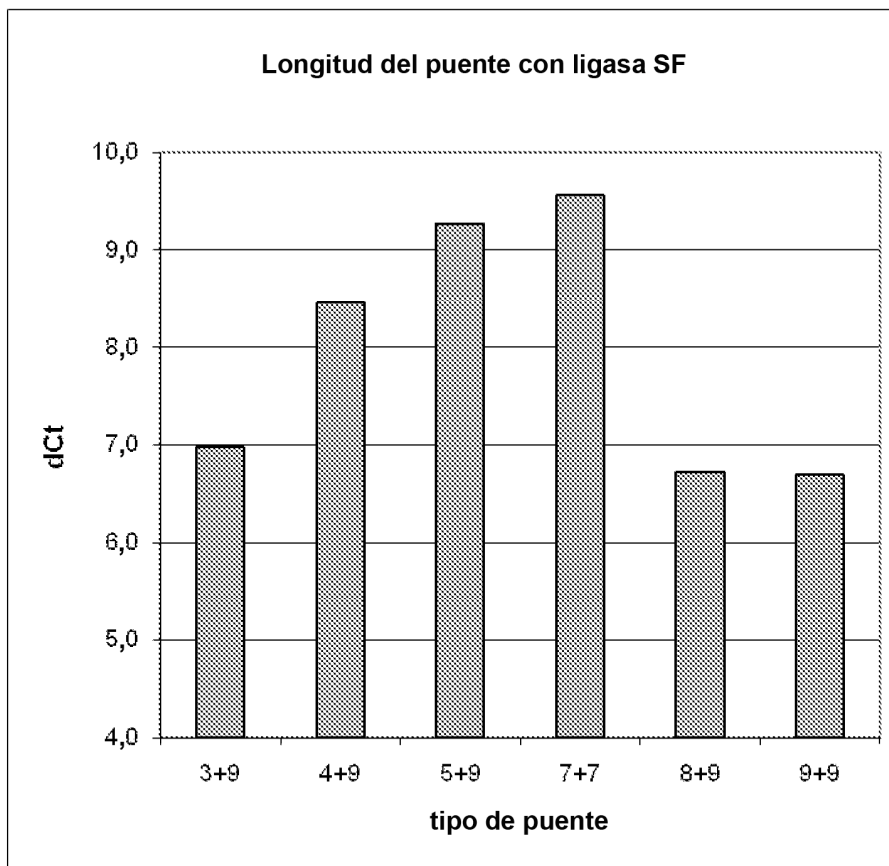


FIGURA 9

3 ligasas comparadas

