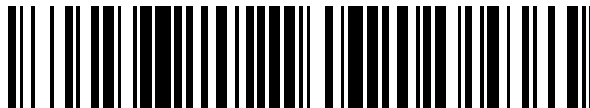


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 642**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2013 PCT/KR2013/012312**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14104818**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2013 E 13868457 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2943586**

54 Título: **Detección de una secuencia de ácido nucleico diana mediante ensayo sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO**

30 Prioridad:

27.12.2012 KR 20120154834

25.01.2013 KR 20130008580

29.03.2013 KR 20130034670

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

08.02.2018

73 Titular/es:

SEEGENE, INC. (100.0%)

8Fl. 9Fl. 91 Ogeum-ro Songpa-gu

Seoul 138-828, KR

72 Inventor/es:

CHUN, JONG YOON y

LEE, YOUNG JO

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 653 642 T3

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

DESCRIPCIÓN

Detección de una secuencia de ácido nucleico diana mediante ensayo sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la detección de una secuencia de ácido nucleico diana mediante un ensayo PCE-NH (sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO).

10

Descripción de la técnica relacionada

La hibridación del ADN es un proceso fundamental en biología molecular y se ve afectado por la fuerza iónica, composición de bases, longitud del fragmento al que se ha reducido el ácido nucleico, el grado de apareamiento erróneo y la presencia de agentes desnaturalizantes. Las tecnologías basadas en hibridación del ADN serían una herramienta muy útil en la determinación de secuencias de ácido nucleico específicas y claramente serían valiosas en diagnóstico clínico, investigación genética y análisis de laboratorio forense. Sin embargo, los métodos y procesos convencionales que dependen principalmente de la hibridación es muy probable que produzcan resultantes falsos positivos debido a la hibridación no específica entre sondas y secuencias no diana. Por tanto, sigue habiendo problemas por solucionar para mejorar su fiabilidad.

15

20

Además de procesos de hibridación de sondas, se han sugerido varios enfoques que usan reacciones enzimáticas adicionales, por ejemplo, el método de sonda TaqMan™.

25

En el método de sonda TaqMan™, la sonda marcada hibridada con una secuencia de ácido nucleico diana se escinde mediante una actividad nucleasa 5' de una ADN polimerasa dependiente de cebador en el sentido de 5', generando una señal que indica la presencia de una secuencia diana (patentes estadounidenses n.ºs 5.210.015, 5.538.848 y 6.326.145). El método de sonda TaqMan™ sugiere dos enfoques para la generación de la señal: escisión dependiente de polimerización y escisión independiente de polimerización. En la escisión dependiente de polimerización, la extensión del cebador en el sentido de 5' debe producirse antes de que una ácido nucleico polimerasa encuentre el extremo 5' de la sonda marcada. A medida que la reacción de extensión continúa, la polimerasa escinde progresivamente el extremo 5' de la sonda marcada. En la escisión independiente de polimerización, el cebador en el sentido de 5' y la sonda marcada se hibridan con una secuencia de ácido nucleico diana en proximidad estrecha de manera que la unión de la ácido nucleico polimerasa al extremo 3' del cebador en el sentido de 5' lo pone en contacto con el extremo 5' de la sonda marcada liberando el marcador. Además, el método de sonda TaqMan™ da a conocer que la sonda marcada en su extremo 5' que tiene una región de cola en 5' que no puede hibridarse con una secuencia diana también se escinde formando un fragmento que comprende la región de cola en 5'.

30

35

40

Se han notificado algunos métodos en los que una sonda que tiene una región de cola en 5' no complementaria a una secuencia diana se escinde mediante una nucleasa 5' liberando un fragmento que comprende la región de cola en 5'.

45

Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.691.142 da a conocer una estructura de escisión que va a digerirse mediante la actividad nucleasa 5' de la ADN polimerasa. La estructura de escisión se ejemplifica porque un oligonucleótido que comprende una porción en 5' no complementaria a y una porción en 3' complementaria a un molde se hibrida con el molde y un oligonucleótido en el sentido de 5' se hibrida con el molde en proximidad estrecha. La estructura de escisión se escinde mediante una ADN polimerasa que tiene actividad nucleasa 5' o una ADN polimerasa modificada con actividad de síntesis reducida liberando la porción en 5' no complementaria al molde. La porción en 5' liberada se hibrida entonces con un oligonucleótido que tiene una estructura en horquilla formando una estructura de escisión, induciendo de ese modo las reacciones de escisión progresivas para detectar una secuencia diana.

50

55

La patente estadounidense n.º 7.381.532 da a conocer un procedimiento en el que la estructura de escisión que tiene el oligonucleótido en el sentido de 5' con el extremo 3' bloqueado se escinde mediante una ADN polimerasa que tiene actividad nucleasa 5' o nucleasa FEN liberando la región de alerón (*flap*) en 5' no complementaria y la región de alerón en 5' liberada se detecta mediante análisis de tamaño o marcador doble interactivo. La patente estadounidense n.º 6.893.819 da a conocer que se producen alerones liberados detectables mediante un método de amplificación secuencial mediado por alerones, dependiente de la síntesis de ácido nucleico. En este método, un alerón liberado de una primera estructura de escisión escinde, de una manera dependiente de la síntesis de ácido nucleico, una segunda estructura de escisión liberando un alerón de la segunda estructura de escisión y los alerones liberados se detectan.

60

65

La patente estadounidense n.º 7.309.573 da a conocer un método que incluye la formación de un alerón liberado producido mediante una síntesis de ácido nucleico; la extensión del alerón liberado; la escisión de un oligonucleótido durante la extensión del alerón y la detección de una señal generada por la escisión del oligonucleótido.

- Mediante hibridación de sondas marcadas por fluorescencia en una fase líquida, puede detectarse simultáneamente una pluralidad de secuencias de ácido nucleico diana usando incluso un único tipo de un marcador fluorescente mediante análisis de la curva de fusión. Sin embargo, las tecnologías convencionales para la detección de
- 5 secuencias diana mediante escisión mediada por nucleasa 5' de sondas doblemente marcadas interactivas requieren diferentes tipos de marcadores fluorescentes para diferentes secuencias diana en detección de dianas múltiple, lo que limita el número de secuencias diana que van a detectarse debido a la limitación del número de tipo de marcadores fluorescentes.
- 10 La publicación de solicitud de patente estadounidense 2008-0241838 da a conocer un método de detección de dianas usando la escisión de una sonda que tiene una porción en 5' no complementaria a una secuencia de ácido nucleico diana e hibridación de una sonda de captura. Está situado un marcador en la porción en 5' no complementaria. La sonda marcada hibridada con la secuencia diana se escinde liberando un fragmento, tras lo cual el fragmento se hibrida entonces con la sonda de captura para detectar la presencia de la secuencia diana. En este
- 15 método, es necesario que una sonda no escindida/intacta no se hibride con la sonda de captura. Para eso, la sonda de captura que tiene una longitud más corta tiene que inmovilizarse sobre un sustrato sólido. Sin embargo, una limitación de este tipo da como resultado menor eficiencia de hibridación sobre un sustrato sólido y también dificultades en la optimización de las condiciones de reacción.
- 20 Por tanto, sigue habiendo necesidades sentidas desde hace mucho tiempo en la técnica de desarrollar enfoques novedosos para la detección de una secuencia diana, preferiblemente múltiples secuencias diana, en una fase líquida y sobre una fase sólida mediante no sólo hibridación sino también reacciones enzimáticas tales como reacción nucleolítica en 5' de una manera más conveniente, fiable y reproducible. Además, también se necesita en la técnica un método de detección de dianas novedoso no limitado por el número de tipos de marcadores
- 25 (particularmente, marcadores fluorescentes).

Sumario de la invención

- Los presentes inventores han realizado investigaciones intensivas para desarrollar enfoques novedosos para
- 30 detectar secuencias diana con conveniencia y precisión más mejoradas, entre otras, de una manera múltiple. Como resultado, han establecido protocolos novedosos para la detección de secuencias diana, en los que la detección de dianas se logra mediante hibridación de sondas, escisión enzimática de sondas, extensión y detección de producto extendido usando HO (oligonucleótido de hibridación). Los presentes protocolos se adaptan bien a reacciones en fase líquida así como reacciones en fase sólida, y garantizan la detección de múltiples secuencias diana con
- 35 conveniencia y precisión más mejoradas.
- Por tanto, un objeto de esta invención es proporcionar un método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana a partir de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo PCE-NH (sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO).
- 40 Otro objeto de esta invención es proporcionar un kit para detectar una secuencia de ácido nucleico diana a partir de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo PCE-NH (sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO).
- 45 Otros objetos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada que sigue tomada conjuntamente con las reivindicaciones y los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

- 50 La figura 1 muestra las estructuras esquemáticas de PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado), CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde) y HO (oligonucleótido de hibridación) usadas en un ensayo PCE-NH (sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO). Particularmente, los extremos 3' del PTO, CTO y HO se bloquean para prohibir su extensión.
- 55 La figura 2 representa esquemáticamente el primer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión. El HO tiene una molécula indicadora y una molécula extintora. La formación del dúplex extendido impide la formación del híbrido entre el CTO y el HO mediante inhibición de la hibridación entre el HO y el CTO.
- La figura 3 representa esquemáticamente el primer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión. El HO tiene una molécula indicadora y una molécula extintora. La formación del dúplex extendido impide la
- 60 formación del híbrido entre el CTO y el HO mediante escisión del HO así como inhibición de la hibridación entre el HO y el CTO.
- La figura 4 representa esquemáticamente el primer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión. El HO tiene una molécula indicadora y el CTO tiene una molécula extintora.
- 65

La figura 5 representa esquemáticamente el primer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión. El HO tiene un único marcador de fluorescencia para mostrar una intensidad de señal diferente dependiendo de su presencia en una única cadena o una doble cadena.

5 La figura 6 representa esquemáticamente el primer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión. El HO tiene una molécula indicadora y una molécula extintora. El HO comprende una secuencia de nucleótidos que es competitiva con el fragmento de PTO en cuanto a la hibridación con el CTO.

10 La figura 7 representa esquemáticamente el primer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión. El HO tiene una molécula indicadora y el CTO tiene una molécula extintora. El HO comprende una secuencia de nucleótidos que es competitiva con el fragmento de PTO en cuanto a la hibridación con el CTO.

15 La figura 8 representa esquemáticamente el segundo aspecto del ensayo PCE-NH que usa un único marcador sobre una fase sólida. El CTO tiene un único marcador y el HO se inmoviliza sobre un sustrato sólido. La formación del dúplex extendido impide la formación del híbrido entre el CTO y el HO mediante inhibición de la hibridación entre el HO y el CTO.

20 La figura 9 representa esquemáticamente el segundo aspecto del ensayo PCE-NH que usa un único marcador sobre una fase sólida. El CTO tiene un único marcador y el HO se inmoviliza sobre un sustrato sólido. La formación del dúplex extendido impide la formación del híbrido entre el CTO y el HO mediante escisión o desplazamiento del HO así como inhibición de la hibridación entre el HO y el CTO.

25 La figura 10 representa esquemáticamente el segundo aspecto del ensayo PCE-NH que usa un único marcador sobre una fase sólida. El HO tiene un único marcador y el CTO se inmoviliza sobre un sustrato sólido. La formación del dúplex extendido impide la formación del híbrido entre el CTO y el HO mediante inhibición de la hibridación entre el HO y el CTO.

30 La figura 11 representa esquemáticamente el segundo aspecto del ensayo PCE-NH que usa un único marcador sobre una fase sólida. El HO tiene un único marcador y el CTO se inmoviliza sobre un sustrato sólido. La formación del dúplex extendido impide la formación del híbrido entre el CTO y el HO mediante escisión o desplazamiento del HO así como inhibición de la hibridación entre el HO y el CTO.

35 La figura 12 representa esquemáticamente el segundo aspecto del ensayo PCE-NH que usa un único marcador sobre una fase sólida. El CTO tiene un único marcador y el HO se inmoviliza sobre un sustrato sólido. El HO comprende una secuencia de nucleótidos que es competitiva con el fragmento de PTO en cuanto a la hibridación con el CTO.

40 La figura 13 representa esquemáticamente el segundo aspecto del ensayo PCE-NH que usa un único marcador sobre una fase sólida. El HO tiene un único marcador y el CTO se inmoviliza sobre un sustrato sólido. El HO comprende una secuencia de nucleótidos que es competitiva con el fragmento de PTO en cuanto a la hibridación con el CTO.

45 La figura 14 representa esquemáticamente el tercer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende detección a una temperatura predeterminada basándose en una reacción novedosa en la que la formación del dúplex extendido inhibe la hibridación del HO con el CTO. El HO tiene una molécula indicadora y una molécula extintora.

50 La figura 15 representa esquemáticamente el tercer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende detección a una temperatura predeterminada basándose en una reacción novedosa en la que la formación del dúplex extendido inhibe la hibridación del HO con el CTO. El HO tiene una molécula indicadora y el CTO tiene una molécula extintora.

55 La figura 16 representa esquemáticamente el tercer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende detección a una temperatura predeterminada basándose en una reacción novedosa en la que la formación del dúplex extendido inhibe la hibridación del HO con el CTO. El HO tiene un único marcador de fluorescencia para mostrar una intensidad de señal diferente dependiendo de su presencia sobre una única cadena o una doble cadena.

60 La figura 17 representa esquemáticamente el tercer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende detección a una temperatura predeterminada basándose en una reacción novedosa en la que la formación del dúplex extendido inhibe la hibridación del HO con el CTO. El HO tiene una molécula indicadora y una molécula extintora. El HO comprende una secuencia de nucleótidos que es competitiva con el fragmento de PTO en cuanto a la hibridación con el CTO.

65 La figura 18 representa esquemáticamente el tercer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende detección a una temperatura predeterminada basándose en una reacción novedosa en la que la formación del dúplex extendido inhibe la hibridación del HO con el CTO. El HO tiene una molécula indicadora y el CTO tiene una molécula extintora. El HO comprende una secuencia de nucleótidos que es competitiva con el fragmento de PTO en cuanto a la hibridación con el CTO.

Las figuras 19A y 19B representan los resultados para evaluar si la hibridación de HO con CTO se inhibe mediante el dúplex extendido. Syn-Es indica cadenas extendidas sintéticas.

5 La figura 20A representa los resultados de la detección de dianas mediante el ensayo PCE-NH de una manera en tiempo real a una temperatura predeterminada (temp. de hibridación de 55°C). Los resultados abordan una detección de dianas usando señales de la inhibición mediante el dúplex extendido.

10 La figura 20B representa los resultados de la detección de dianas mediante el ensayo PCE-NH de una manera en tiempo real a una temperatura predeterminada (temp. de desnaturalización de 95°C). Este resultado muestra que algunos HO pueden escindirse durante la reacción.

15 La figura 20C representa los resultados de la detección de dianas mediante el ensayo PCE-NH de una manera de análisis de fusión.

20 La figura 21A representa los resultados de la detección de dianas mediante el ensayo PCE-NH de una manera en tiempo real a una temperatura predeterminada (temp. de hibridación de 60°C). El HO comprende una secuencia de nucleótidos que es competitiva con el fragmento de PTO en cuanto a la hibridación con el CTO. La señal detectada se produce de la inhibición de la hibridación entre el HO y el CTO. Se excluye la señal producida de la escisión del HO.

25 La figura 21B representa los resultados de la detección de dianas mediante el ensayo PCE-NH de una manera en tiempo real a una temperatura predeterminada (temp. de desnaturalización de 95°C). El HO comprende una secuencia de nucleótidos que es competitiva con el fragmento de PTO en cuanto a la hibridación con el CTO. Este resultado muestra que los HO no se escindieron durante la reacción.

30 La figura 21C representa los resultados de la detección de dianas mediante el ensayo PCE-NH de una manera de análisis de fusión. El HO comprende una secuencia de nucleótidos que es competitiva con el fragmento de PTO en cuanto a la hibridación con el CTO.

La figura 22 representa los resultados de la detección de dianas mediante el ensayo PCE-NH usando un CTO marcado una sola vez y un HO inmovilizado sobre una fase sólida.

35 La figura 23 representa los resultados de la detección de dianas mediante el ensayo PCE-NH usando un CTO marcado una sola vez y un HO inmovilizado sobre una fase sólida en el que la etapa de extensión y la etapa de hibridación de HO se realizaron en tubos separados y el HO no experimentó escisión.

Descripción detallada de esta invención

40 La presente invención se refiere a un método novedoso para detectar una secuencia de ácido nucleico diana mediante un ensayo PCE-NH (sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO) y a un kit para detectar una secuencia de ácido nucleico diana mediante un ensayo PCE-NH. La presente invención se realiza mediante hibridación de sondas, escisión enzimática de sondas, extensión y detección de producto extendido usando HO (oligonucleótido de hibridación). La presente invención puede clasificarse en tres aspectos mediante los modos para la detección de producto extendido usando HO.

I. Primer aspecto del procedimiento de detección de dianas mediante un ensayo PCE-NH

50 En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra de ácido nucleico mediante un ensayo PCE-NH (sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO), que comprende:

55 (a) hibridar la secuencia de ácido nucleico diana con un oligonucleótido en el sentido de 5' y un PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado); en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; el PTO comprende (i) una porción de direccionamiento en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) una porción de etiquetado en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la porción de direccionamiento en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y la porción de etiquetado en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana; el oligonucleótido en el sentido de 5' está ubicado en el sentido de 5' del PTO;

65 (b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una enzima que tiene una actividad nucleasa 5' en condiciones para la escisión del PTO; en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' o su cadena extendida induce la escisión del PTO mediante la enzima que tiene la actividad nucleasa 5' de manera que la escisión libera un fragmento que comprende la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5'

del PTO;

5 (c) hibridar el fragmento liberado del PTO con un CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde); en el que el CTO comprende en una dirección de 3' a 5' (i) una porción de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO y (ii) una porción de formación de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la porción de etiquetado en 5' y la porción de direccionamiento en 3' del PTO; en el que el fragmento liberado del PTO se hibrida con la porción de captura del CTO;

10 (d) realizar una reacción de extensión usando el resultante de la etapa (c) y una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende para producir una cadena extendida complementaria a la porción de formación de molde del CTO y se forma un dúplex extendido; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido;

15 (e) realizar un análisis de fusión o un análisis de hibridación para el resultante de la etapa (d) a lo largo de un intervalo de temperaturas con un HO (oligonucleótido de hibridación) que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido y el CTO y el HO forman un híbrido, proporcionando de ese modo una señal indicativa de la presencia del híbrido entre el CTO y el HO; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente en la muestra de ácido nucleico, se forma el dúplex extendido para impedir la formación del híbrido entre el CTO y el HO, no proporcionando de ese modo la señal; en el que la señal se proporciona mediante (i) un marcador unido al HO, (ii) un marcador unido al CTO, (iii) un marcador unido al HO y un marcador unido al CTO, o (iv) un marcador de intercalación; y

25 (f) detectar la señal indicativa de la presencia del híbrido entre el CTO y el HO; en el que la presencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la ausencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

30 Los presentes inventores han realizado investigaciones intensivas para desarrollar enfoques novedosos para detectar secuencias diana con conveniencia y precisión más mejoradas, entre otras, de una manera múltiple. Como resultado, se han establecido protocolos novedosos para la detección de secuencias diana en los que la detección de dianas se logra mediante hibridación de sondas, escisión enzimática de sondas, extensión y análisis de fusión (o análisis de hibridación) usando el HO (oligonucleótido de hibridación). Los presentes protocolos se adaptan bien a reacciones en fase líquida así como reacciones en fase sólida, y garantizan la detección de múltiples secuencias diana con conveniencia y precisión más mejoradas.

35 La presente invención emplea acontecimientos sucesivos incluyendo hibridación de sondas; escisión del PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado) y extensión; formación de un dúplex extendido; y análisis de fusión o un análisis de hibridación usando el HO. En el análisis de fusión o un análisis de hibridación, la no formación del híbrido con el HO indica la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana. Por tanto, se denomina ensayo PCE-NH (sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO).

45 A medida que se forma el dúplex extendido para impedir la formación del híbrido entre el CTO y el HO sólo si existe el ácido nucleico diana, la ausencia de señal indicativa de la presencia del híbrido entre el CTO indica la presencia del ácido nucleico diana.

50 El término "impedir la formación del híbrido entre el CTO y el HO" con referencia al dúplex extendido significa todos los acontecimientos que se refieren a la no formación del híbrido entre el CTO y el HO mediante el dúplex extendido. Por ejemplo, el término incluye la inhibición de la hibridación entre el HO y el CTO mediante el dúplex extendido, y la escisión del HO (es decir, la escisión del HO durante la extensión del fragmento de PTO) dando como resultado el consumo del HO para formar el híbrido.

55 La presente invención se caracteriza por el uso del valor de T_m del híbrido de CTO/HO como factor de discriminación para la detección de la presencia o ausencia de híbrido de CTO/HO. El híbrido de CTO/HO tiene su valor de T_m distinguible que depende de la secuencia y/o longitud del CTO y el HO. Mediante un análisis de fusión o un análisis de hibridación, se determina la presencia o ausencia del híbrido de CTO/HO basándose en su valor de T_m .

60 En particular, la presente invención puede aplicarse para detectar una secuencia de ácido nucleico diana incluso cuando el HO no se escinde (es decir, la hibridación entre el HO y el CTO se inhibe mediante la formación del dúplex extendido) así como cuando el HO se escinde.

65 Las tecnologías convencionales con generación de la señal a partir de sondas hibridadas con secuencias diana y luego escindidas pueden no dar una curva de fusión. De manera insólita, la presente invención usa la extinción (o disminución) de las señales de fusión proporcionadas por el híbrido entre el CTO y el HO cuyas secuencias son irrelevantes para las secuencias de dianas. Por tanto, la presente invención puede detectar secuencias diana

mediante análisis de fusión incluso cuando el HO se escinde dependiendo de la presencia de secuencias diana.

El primer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión o hibridación se describirá en más detalle tal como sigue:

5 Etapa (a): Hibridación de un oligonucleótido en el sentido de 5' y un PTO con una secuencia de ácido nucleico diana

Según la presente invención, una secuencia de ácido nucleico diana se hibrida en primer lugar con un oligonucleótido en el sentido de 5' y un PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado).

10 El término "ácido nucleico diana", "secuencia de ácido nucleico diana" o "secuencia diana" usado en el presente documento se refiere a una secuencia de ácido nucleico de interés para la detección, que se aparee o se hibrida con una sonda o un cebador en condiciones de hibridación, apareamiento o amplificación.

15 El término "sonda" usado en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico monocatenaria que comprende una porción o porciones que son sustancialmente complementarias a una secuencia de ácido nucleico diana.

20 El término "cebador" tal como se usa en el presente documento se refiere a un oligonucleótido, que puede actuar como punto de inicio de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis del producto de extensión del cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico (molde), es decir, en presencia de nucleótidos y un agente para la polimerización, tal como ADN polimerasa, y a una temperatura y pH adecuados.

25 En una determinada realización, la sonda y el cebador son moléculas de desoxirribonucleótidos monocatenarias. Las sondas o los cebadores usados en esta invención pueden estar compuestos por dNMP que se producen de manera natural (es decir, dAMP, dGM, dCMP y dTMP), nucleótido modificado o nucleótido no natural. Las sondas o los cebadores también pueden incluir ribonucleótidos.

30 El cebador debe ser lo suficientemente largo como para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente para la polimerización. La longitud exacta de los cebadores dependerá de muchos factores, incluyendo la temperatura, la aplicación y la fuente del cebador. El término "apareamiento" o "cebado" tal como se usa en el presente documento se refiere a la aposición de un oligodesoxinucleótido o ácido nucleico a un ácido nucleico molde, mediante lo cual la aposición permite que la polimerasa polimerice nucleótidos para dar una molécula de ácido nucleico que es complementaria al ácido nucleico molde o una porción del mismo.

35 El término "hibridación" usado en el presente documento se refiere a la formación de un ácido nucleico bicatenario a partir de ácidos nucleicos monocatenarios complementarios. La hibridación puede producirse entre dos cadenas de ácido nucleico perfectamente coincidentes o sustancialmente coincidentes con algunos apareamientos erróneos. La complementariedad para la hibridación puede depender de las condiciones de hibridación, particularmente la temperatura.

45 La hibridación de una secuencia de ácido nucleico diana con el oligonucleótido en el sentido de 5' y el PTO puede llevarse a cabo en condiciones de hibridación adecuadas determinadas de manera rutinaria mediante procedimientos de optimización. Condiciones tales como temperatura, concentración de componentes, tiempos de hibridación y lavado, componentes del tampón, y su pH y fuerza iónica pueden variarse dependiendo de diversos factores, incluyendo la longitud y el contenido en GC del oligonucleótido (oligonucleótido en el sentido de 5' y PTO) y la secuencia de nucleótidos diana. Por ejemplo, cuando se usa un oligonucleótido relativamente corto, es adecuado que se adopten condiciones de baja rigurosidad. Las condiciones detalladas para la hibridación pueden encontrarse en Joseph Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); y M.L.M. Anderson, Nucleic Acid Hybridization, Springer-Verlag Nueva York Inc. N.Y. (1999).

50 No hay ninguna distinción pretendida entre los términos "apareamiento" e "hibridación", y estos términos se usarán de manera intercambiable.

55 El oligonucleótido en el sentido de 5' y el PTO tienen secuencias de nucleótidos de hibridación complementarias a la secuencia de ácido nucleico diana. El término "complementario" se usa en el presente documento queriendo decir que las sondas o los cebadores son suficientemente complementarios como para hibridarse selectivamente con una secuencia de ácido nucleico diana en las condiciones rigurosas o condiciones de apareamiento designadas, abarcando los términos "sustancialmente complementario" y "perfectamente complementario", por ejemplo, perfectamente complementario.

60 La porción de etiquetado en 5' del PTO comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana. El término "no complementario" se usa en el presente documento queriendo decir que los cebadores o las sondas son suficientemente no complementarios como para no hibridarse selectivamente con una secuencia de ácido nucleico diana en las condiciones rigurosas o condiciones de apareamiento designadas,

abarcando los términos “sustancialmente no complementario” y “perfectamente no complementario”, por ejemplo, perfectamente no complementario.

5 Por ejemplo, el término “no complementario” conjuntamente con la porción de etiquetado en 5' del PTO significa que la porción de etiquetado en 5' es suficientemente no complementaria como para no hibridarse selectivamente con una secuencia de ácido nucleico diana en las condiciones rigurosas o condiciones de apareamiento designadas, abarcando los términos “sustancialmente no complementario” y “perfectamente no complementario”, por ejemplo, perfectamente no complementario.

10 El término “PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado)” usado en el presente documento significa un oligonucleótido que comprende (i) una porción de direccionamiento en 3' que sirve como sonda y (ii) una porción de etiquetado en 5' con una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana, que se libera nucleolíticamente del PTO tras la hibridación con la secuencia de ácido nucleico diana. La porción de etiquetado en 5' y la porción de direccionamiento en 3' en el PTO tienen que situarse en un orden de 5' a 3'. El PTO se ilustra esquemáticamente en la figura 1.

20 En una realización, la hibridación en la etapa (a) se realiza en condiciones rigurosas de manera que la porción de direccionamiento en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y la porción de etiquetado en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana.

25 El PTO no requiere ninguna longitud específica. Por ejemplo, la longitud del PTO puede ser de 15-150 nucleótidos, 15-100 nucleótidos, 15-80 nucleótidos, 15-60 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 20-150 nucleótidos, 20-100 nucleótidos, 20-80 nucleótidos, 20-60 nucleótidos, 20-50 nucleótidos, 30-150 nucleótidos, 30-100 nucleótidos, 30-80 nucleótidos, 30-60 nucleótidos, 30-50 nucleótidos, 35-100 nucleótidos, 35-80 nucleótidos, 35-60 nucleótidos o 35-50 nucleótidos. La porción de direccionamiento en 3' del PTO puede ser de cualquier longitud siempre que se hibride específicamente con secuencias de ácido nucleico diana. Por ejemplo, la porción de direccionamiento en 3' del PTO puede tener 10-100 nucleótidos, 10-80 nucleótidos, 10-50 nucleótidos, 10-40 nucleótidos, 10-30 nucleótidos, 15-100 nucleótidos, 15-80 nucleótidos, 15-50 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 15-30 nucleótidos, 20-100 nucleótidos, 20-80 nucleótidos, 20-50 nucleótidos, 20-40 nucleótidos o 20-30 nucleótidos de longitud. La porción de etiquetado en 5' puede ser de cualquier longitud siempre que se hibride específicamente con la porción de captura del CTO y luego se extienda. Por ejemplo, la porción de etiquetado en 5' del PTO puede tener 5-50 nucleótidos, 5-40 nucleótidos, 5-30 nucleótidos, 5-20 nucleótidos, 10-50 nucleótidos, 10-40 nucleótidos, 10-30 nucleótidos, 10-20 nucleótidos, 15-50 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 15-30 nucleótidos o 15-20 nucleótidos de longitud.

35 El extremo 3' del PTO puede tener un 3'-OH terminal. En una determinada realización, el extremo 3' del PTO se “bloquea” para prohibir su extensión.

40 El bloqueo puede lograrse según métodos convencionales. Por ejemplo, el bloqueo puede realizarse añadiendo al grupo 3'-hidroxilo del último nucleótido un resto químico tal como biotina, marcadores, un grupo fosfato, grupo alquilo, ligador no nucleotídico, fosforotioato o alcanano-diol. Alternativamente, el bloqueo puede llevarse a cabo eliminando el grupo 3'-hidroxilo del último nucleótido o usando un nucleótido sin grupo 3'-hidroxilo tal como didesoxinucleótido.

45 Alternativamente, el PTO puede diseñarse para que tenga una estructura en horquilla.

La no hibridación entre la porción de etiquetado en 5' del PTO y la secuencia de ácido nucleico diana se refiere a la no formación de una doble cadena estable entre ellos en determinadas condiciones de hibridación. Según una realización de esta invención, la porción de etiquetado en 5' del PTO no implicada en la hibridación con la secuencia de ácido nucleico diana forma una única cadena.

50 El oligonucleótido en el sentido de 5' está ubicado en el sentido de 5' del PTO.

Además, el oligonucleótido en el sentido de 5' o su cadena extendida hibridada con la secuencia de ácido nucleico diana induce la escisión del PTO mediante una enzima que tiene una actividad nucleasa 5'.

55 La inducción de la escisión del PTO mediante el oligonucleótido en el sentido de 5' puede lograrse de dos modos: (i) inducción de escisión independiente de extensión de oligonucleótido en el sentido de 5'; y (ii) inducción de escisión dependiente de extensión de oligonucleótido en el sentido de 5'.

60 Cuando el oligonucleótido en el sentido de 5' se sitúa de manera adyacente al PTO lo suficiente como para inducir la escisión del PTO mediante una enzima que tiene una actividad nucleasa 5', la enzima unida al oligonucleótido en el sentido de 5' digiere el PTO sin reacción de extensión. En cambio, cuando el oligonucleótido en el sentido de 5' se sitúa de manera distante al PTO, una enzima que tiene una actividad polimerasa (por ejemplo, polimerasa dependiente de molde) cataliza la extensión del oligonucleótido en el sentido de 5' (por ejemplo, cebador en el sentido de 5') y una enzima que tiene una actividad nucleasa 5' unida al producto extendido digiere el PTO.

Por tanto, el oligonucleótido en el sentido de 5' puede ubicarse en relación con el PTO de dos modos. El oligonucleótido en el sentido de 5' puede ubicarse de manera adyacente al PTO lo suficiente como para inducir la escisión del PTO de una manera independiente de extensión. Alternativamente, el oligonucleótido en el sentido de 5' puede ubicarse de manera distante al PTO lo suficiente como para inducir la escisión del PTO de una manera dependiente de extensión.

El término "adyacente" usado en el presente documento con referencia a las posiciones o ubicaciones significa que el oligonucleótido en el sentido de 5' está ubicado de manera adyacente a la porción de direccionamiento en 3' del PTO para formar una mella. Además, el término significa que el oligonucleótido en el sentido de 5' está ubicado separado de la porción de direccionamiento en 3' del PTO por 1-30 nucleótidos, 1-20 nucleótidos o 1-15 nucleótidos.

El término "distante" usado en el presente documento con referencia a posiciones o ubicaciones incluye cualquier posición o ubicación suficiente como para garantizar reacciones de extensión.

Según una realización, el oligonucleótido en el sentido de 5' está ubicado de manera distante al PTO lo suficiente como para inducir la escisión del PTO de una manera dependiente de extensión.

Según una realización, el oligonucleótido en el sentido de 5' es un cebador en el sentido de 5' o una sonda en el sentido de 5'. El cebador en el sentido de 5' es adecuado en la inducción de escisión independiente de extensión o la escisión dependiente de extensión, y la sonda en el sentido de 5' es adecuada en la inducción de escisión independiente de extensión.

Alternativamente, el oligonucleótido en el sentido de 5' puede tener una secuencia parcialmente solapada con la parte en 5' de la porción de direccionamiento en 3' del PTO. En una determinada realización, la secuencia solapada tiene 1-10 nucleótidos, 1-5 nucleótidos o 1-3 nucleótidos de longitud. Cuando el oligonucleótido en el sentido de 5' tiene una secuencia parcialmente solapada con la parte en 5' de la porción de direccionamiento en 3' del PTO, la porción de direccionamiento en 3' se digiere parcialmente junto con la porción de etiquetado en 5' en la reacción de escisión de la etapa (b). Además, la secuencia solapada permite que se escinda un sitio deseado de la porción de direccionamiento en 3'.

Según una realización, el cebador en el sentido de 5' induce a través de su cadena extendida la escisión del PTO mediante la enzima que tiene la actividad nucleasa 5'.

Las tecnologías convencionales para las reacciones de escisión mediante oligonucleótidos en el sentido de 5' pueden aplicarse a la presente invención, siempre que el oligonucleótido en el sentido de 5' induzca la escisión del PTO hibridado con la secuencia de ácido nucleico diana para liberar un fragmento que comprende la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO. Por ejemplo, pueden aplicarse las patentes estadounidenses n.ºs 5.210.015, 5.487.972, 5.691.142, 5.994.069 y 7.381.532 y la publicación de solicitud estadounidense n.º 2008-0241838 a la presente invención.

Según una realización, el método se realiza en presencia de un cebador en el sentido de 3'. El cebador en el sentido de 3' genera adicionalmente una secuencia de ácido nucleico diana que va a hibridarse con el PTO, potenciando la sensibilidad en la detección de dianas.

Según una realización, cuando se usan el cebador en el sentido de 5' y el cebador en el sentido de 3', se emplea adicionalmente una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde para la extensión de los cebadores.

Según una realización, el oligonucleótido en el sentido de 5' (cebador en el sentido de 5' o sonda en el sentido de 5'), el cebador en el sentido de 3' y/o la porción de etiquetado en 5' del PTO tienen una estructura de oligonucleótido de cebado doble (DPO) desarrollada por el presente inventor. Los oligonucleótidos que tienen la estructura de DPO muestran una especificidad de diana significativamente mejorada en comparación con cebadores y sondas convencionales (véanse el documento WO 2006/095981; Chun *et al.*, Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene, *Nucleic Acid Research*, 35:6e40(2007)).

Según una realización, la porción de direccionamiento en 3' del PTO tiene una estructura de oligonucleótido de especificidad doble modificado (mDSO) desarrollada por el presente inventor. La estructura de oligonucleótido de especificidad doble modificado (mDSO) muestra una especificidad de diana significativamente mejorada en comparación con sondas convencionales (véase el documento WO 2011/028041).

Etapa (b): Liberación de un fragmento de la escisión del PTO

Después de eso, el resultante de la etapa (a) se pone en contacto con una enzima que tiene una actividad nucleasa 5' en condiciones para la escisión del PTO. El PTO hibridado con la secuencia de ácido nucleico diana se digiere mediante la enzima que tiene la actividad nucleasa 5' liberando un fragmento que comprende la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO.

El término “condiciones para la escisión del PTO” usado en el presente documento significa condiciones suficientes para digerir el PTO hibridado con la secuencia de ácido nucleico diana mediante la enzima que tiene la actividad nucleasa 5', tal como temperatura, pH, fuerza iónica, tampón, longitud y secuencia de oligonucleótidos y enzimas.

5 Por ejemplo, cuando se usa la *Taq* ADN polimerasa como enzima que tiene la actividad nucleasa 5', las condiciones para la escisión del PTO incluyen tampón Tris-HCl, KCl, MgCl₂ y temperatura.

10 Cuando el PTO se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana, su porción de direccionamiento en 3' está implicada en la hibridación y la porción de etiquetado en 5' forma una única cadena sin hibridación con la secuencia de ácido nucleico diana (véase la figura 2). Como tal, un oligonucleótido que comprende estructuras tanto monocatenarias como bicatenarias puede digerirse usando una enzima que tiene una actividad nucleasa 5' mediante una variedad de tecnologías conocidas por un experto en la técnica.

15 Los sitios de escisión del PTO varían dependiendo del tipo de oligonucleótidos en el sentido de 5' (sonda en el sentido de 5' o cebador en el sentido de 5'), los sitios de hibridación de oligonucleótidos en el sentido de 5' y las condiciones de escisión (véanse las patentes estadounidenses n.ºs 5.210.015, 5.487.972, 5.691.142, 5.994.069 y 7.381.532 y la publicación de solicitud estadounidense n.º 2008-0241838).

20 Puede emplearse una multitud de tecnologías convencionales para la reacción de escisión del PTO, liberando un fragmento que comprende la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5'.

25 En resumen, puede haber tres sitios de escisión en la etapa (b). El primer lugar, el sitio de escisión es un sitio de unión entre una porción de hibridación del PTO (porción de direccionamiento en 3') y una porción no de hibridación (porción de etiquetado en 5'). El segundo sitio de escisión es un sitio ubicado en una dirección 3' separado del extremo 3' de la porción de etiquetado en 5' del PTO por varios nucleótidos. El segundo sitio de escisión está ubicado en la parte de extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' del PTO. El tercer sitio de escisión es un sitio ubicado en una dirección 5' separado del extremo 3' de la porción de etiquetado en 5' del PTO por varios nucleótidos.

30 Según una realización, el sitio inicial para la escisión del PTO mediante la polimerasa dependiente de molde que tiene la actividad nucleasa 5' tras la extensión del cebador en el sentido de 5' es un punto de comienzo de la doble cadena entre el PTO y la secuencia de ácido nucleico diana o un sitio separado del punto de comienzo por 1-3 nucleótidos.

35 En este sentido, el término “un fragmento que comprende la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO” usado en el presente documento conjuntamente con la escisión del PTO mediante la enzima que tiene la actividad nucleasa 5' se usa para abarcar (i) la porción de etiquetado en 5', (ii) la porción de etiquetado en 5' y la parte de extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' y (iii) una parte de la porción de etiquetado en 5'. En esta solicitud, el término “un fragmento que comprende la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO” también puede describirse como “fragmento de PTO”.

45 Según una realización, el PTO tiene una porción bloqueante que contiene un bloqueante resistente a la escisión mediante la enzima que tiene actividad nucleasa 5' y la porción bloqueante se usa para controlar un sitio de escisión inicial y/o escisiones sucesivas.

Según una realización, el PTO tiene una porción bloqueante que contiene como bloqueante al menos un nucleótido resistente a la escisión mediante la enzima que tiene actividad nucleasa 5'.

50 Por ejemplo, para inducir la escisión en el sitio de unión entre una porción de hibridación del PTO (porción de direccionamiento en 3') y una porción no de hibridación (porción de etiquetado en 5'), la parte de extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' del PTO puede bloquearse con bloqueantes.

55 El número de bloqueantes contenidos en la porción bloqueante puede no estar limitada, incluyendo 1-10, 2-10, 3-8 ó 3-6 bloqueantes. Los bloqueantes presentes en el PTO pueden estar de una manera continua o intermitente, adecuadamente de una manera continua. Los nucleótidos como bloqueantes con una estructura principal resistente a la actividad exonucleasa 5' a 3' incluyen uno cualquiera conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, incluye diversas uniones fosforotioato, uniones fosfonato, uniones fosforoamidato y modificaciones con 2'-hidratos de carbono. Según una realización, los nucleótidos que tienen una estructura principal resistente a la actividad exonucleasa 5' a 3' incluyen unión fosforotioato, unión fosfotriéster alquílico, unión fosfotriéster arílico, unión fosfonato de alquilo, unión fosfonato de arilo, unión hidrogenofosfonato, unión fosforoamidato de alquilo, unión fosforoamidato de arilo, unión fosforoselenato, modificación con 2'-O-aminopropilo, modificación con 2'-O-alquilo, modificación con 2'-O-alilo, modificación con 2'-O-butilo, oligodesoxinucleótido α -anomérico y modificación con 1-(4'-tio- β -D-ribofuranosilo).

65 Según una realización, un nucleótido como bloqueante incluye LNA (ácido nucleico bloqueado).

El término "parte" usado conjuntamente con el PTO o CTO tal como la parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO, la parte de extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' del PTO y la parte de extremo 5' de la porción de captura del CTO se refiere a una secuencia de nucleótidos compuesta por 1-40, 1-30, 1-20, 1-15, 1-10 o 1-5 nucleótidos, adecuadamente 1, 2, 3 ó 4 nucleótidos.

5 Según una realización, la enzima que tiene la actividad nucleasa 5' es ADN polimerasa que tiene una actividad nucleasa 5' o nucleasa FEN, adecuadamente una ADN polimerasa termoestable que tiene una actividad nucleasa 5' o nucleasa FEN.

10 Una ADN polimerasa adecuada que tiene una actividad nucleasa 5' en esta invención es una ADN polimerasa termoestable obtenida de una variedad de especies bacterianas, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermus antranikianii*, *Thermus caldophilus*, *Thermus chliarophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus igniterrae*, *Thermus lacteus*, *Thermus oshimai*, *Thermus ruber*, *Thermus rubens*, *Thermus scotoductus*, *Thermus silvanus*, *Thermus especie Z05*, *Thermus especie sps 17* *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosipho africanus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus barossi*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosipho africanus*, *Pyrococcus woesei*, *Pyrococcus horikoshii*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrodictium occultum*, *Aquifex pyrophilus* y *Aquifex aeolicus*. En una determinada realización, la ADN polimerasa termoestable es Taq polimerasa.

20 Alternativamente, la presente invención puede emplear ADN polimerasas que tienen una actividad nucleasa 5' modificada para tener menos actividades polimerasa.

25 La nucleasa FEN (endonucleasa flap) usada es una nucleasa específica de flap 5'. La nucleasa FEN adecuada en la presente invención comprende nucleasas FEN obtenidas a partir de una variedad de especies bacterianas, incluyendo *Sulfolobus solfataricus*, *Pyrobaculum aerophilum*, *Thermococcus litoralis*, *Archaeoglobus veneficus*, *Archaeoglobus profundus*, *Acidianus brieryi*, *Acidianus ambivalens*, *Desulfurococcus amilyoticus*, *Desulfurococcus mobilis*, *Pyrodictium brockii*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermococcus zilligii*, *Methanopyrus kandleri*, *Methanococcus igneus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeropyrum pernix* y *Archaeoglobus veneficus*.

30 Cuando se usa el cebador en el sentido de 5' en la etapa (a), las condiciones para la escisión del PTO pueden comprender una reacción de extensión del cebador en el sentido de 5'.

35 Según una realización, se usa el cebador en el sentido de 5' en la etapa (a), se usa una polimerasa dependiente de molde para la extensión del cebador en el sentido de 5' y la polimerasa dependiente de molde es idéntica a la enzima que tiene la actividad nucleasa 5'.

Opcionalmente, se usa el cebador en el sentido de 5' en la etapa (a), se usa una polimerasa dependiente de molde para la extensión del cebador en el sentido de 5' y la polimerasa dependiente de molde es diferente de la enzima que tiene la actividad nucleasa 5'.

40 Etapa (c): Hibridación del fragmento liberado del PTO con CTO

El fragmento liberado del PTO se hibrida con un CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde).

45 El CTO comprende en una dirección de 3' a 5' (i) una porción de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO y (ii) una porción de formación de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la porción de etiquetado en 5' y la porción de direccionamiento en 3' del PTO.

50 El CTO actúa como molde para la extensión del fragmento liberado del PTO. El fragmento que sirve como cebador se hibrida con el CTO y se extiende para formar un dúplex extendido.

55 La porción de formación de molde puede comprender cualquier secuencia siempre que no sea complementaria a la porción de etiquetado en 5' y la porción de direccionamiento en 3' del PTO. Además, la porción de formación de molde puede comprender cualquier secuencia siempre que pueda actuar como molde para la extensión del fragmento liberado del PTO.

60 Tal como se describió anteriormente, cuando se libera el fragmento que tiene la porción de etiquetado en 5' del PTO, la porción de captura del CTO puede diseñarse para que comprenda una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en 5'. Cuando se libera el fragmento que tiene la porción de etiquetado en 5' y una parte de extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3', la porción de captura del CTO puede diseñarse para que comprenda una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en 5' y la parte de extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3'. Cuando se libera el fragmento que tiene una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO, la porción de captura del CTO puede diseñarse para que comprenda una secuencia de nucleótidos complementaria a la parte de la porción de etiquetado en 5'.

Además, es posible diseñar la porción de captura del CTO con anticipación a los sitios de escisión del PTO. Por ejemplo, cuando la porción de captura del CTO se diseña para que comprenda una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en 5', o bien el fragmento que tiene una parte de la porción de etiquetado en 5' o bien el fragmento que tiene la porción de etiquetado en 5' puede hibridarse con la porción de captura y luego extenderse. Cuando se libera el fragmento que comprende la porción de etiquetado en 5' y una parte de extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3', puede hibridarse con la porción de captura del CTO diseñada para que comprenda una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en 5' y luego extenderse satisfactoriamente aunque estén presentes nucleótidos apareados erróneamente en la porción de extremo 3' del fragmento. Esto se debe a que los cebadores pueden extenderse dependiendo de las condiciones de reacción aunque su extremo 3' contenga algunos nucleótidos apareados erróneamente (por ejemplo 1-3 nucleótidos apareados erróneamente).

Cuando se libera el fragmento que comprende la porción de etiquetado en 5' y una parte de extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3', la parte de extremo 5' de la porción de captura del CTO (véase la figura 1) puede diseñarse para que tenga una secuencia de nucleótidos complementaria a la parte de extremo 5' escindida de la porción de direccionamiento en 3', superando los problemas asociados con nucleótidos apareados erróneamente.

En una realización, la secuencia de nucleótidos de la parte de extremo 5' de la porción de captura del CTO complementaria a la parte de extremo 5' escindida de la porción de direccionamiento en 3' puede seleccionarse dependiendo de los sitios de escisión anticipados en la porción de direccionamiento en 3' del PTO. La secuencia de nucleótidos de la parte de extremo 5' de la porción de captura del CTO complementaria a la parte de extremo 5' escindida de la porción de direccionamiento en 3' puede tener 1-10 nucleótidos, 1-5 nucleótidos o 1-3 nucleótidos de longitud.

El extremo 3' del CTO puede comprender nucleótidos adicionales no implicados en la hibridación con el fragmento. Además, la porción de captura del CTO puede comprender una secuencia de nucleótidos complementaria sólo a una parte del fragmento (por ejemplo, una parte del fragmento que contiene su porción de extremo 3') siempre que se hibride de manera estable con el fragmento.

El término usado "porción de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5'" se describe en el presente documento que abarca diversos diseños y composiciones de la porción de captura del CTO tal como se comentó anteriormente.

El CTO puede diseñarse para que tenga una estructura en horquilla.

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

El extremo 3' del CTO puede tener un 3'-OH terminal. Específicamente, el extremo 3' del CTO se bloquea para prohibir su extensión. El bloqueo no extensible del CTO puede lograrse según métodos convencionales. Por ejemplo, el bloqueo puede realizarse añadiendo al grupo 3'-hidroxilo del último nucleótido del CTO un resto químico tal como biotina, marcadores, un grupo fosfato, grupo alquilo, ligador no nucleotídico, fosforotioato o alcano-diol. Alternativamente, el bloqueo puede llevarse a cabo eliminando el grupo 3'-hidroxilo del último nucleótido o usando un nucleótido sin grupo 3'-hidroxilo tal como didesoxinucleótido.

El fragmento liberado del PTO se hibrida con el CTO, proporcionando una forma adecuada en extensión del fragmento. Aunque un PTO no digerido también se hibrida con la porción de captura del CTO a través de su porción de etiquetado en 5', su porción de direccionamiento en 3' no se hibrida con el CTO, lo que prohíbe la formación de un dúplex extendido.

La hibridación en la etapa (c) puede describirse en detalle con referencia a las descripciones en la etapa (a).

Etapa (d): Extensión del fragmento

5 La reacción de extensión se lleva a cabo usando el resultante de la etapa (c) y una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde. El fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende para formar una cadena extendida complementaria a la porción de formación de molde del CTO, formando de ese modo el dúplex extendido. En cambio, PTO no escindido hibridado con la porción de captura del CTO no se extiende de manera que no se forma el dúplex extendido.

10 El término "cadena extendida" usado en el presente documento conjuntamente con el fragmento significa una secuencia compuesta por el fragmento y su secuencia extendida. El término "dúplex extendido" usado en el presente documento significa un dúplex formado por una reacción de extensión en la que el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende usando la porción de formación de molde del CTO como molde y la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde.

15 La ácido nucleico polimerasa dependiente de molde usada en la etapa (d) puede incluir cualquier ácido nucleico polimerasa, por ejemplo, fragmento Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli*, una ADN polimerasa termoestable y ADN polimerasa de bacteriófago T7. Específicamente, la polimerasa es una ADN polimerasa termoestable que puede obtenerse de una variedad de especies bacterianas, incluyendo *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermus antranikianii*, *Thermus caldophilus*, *Thermus chliarophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus igniterrae*, *Thermus lacteus*, *Thermus oshimai*, *Thermus ruber*, *Thermus rubens*, *Thermus scotoductus*, *Thermus silvanus*, *Thermus especie Z05*, *Thermus especie sps 17*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosiphon africanus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus barossi*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosiphon africanus*, *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Pyrococcus woesei*, *Pyrococcus horikoshii*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrodictium occultum*, *Aquifex pyrophilus* y *Aquifex aeolicus*. Más específicamente, la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde es Taq polimerasa.

30 Según una realización, la enzima que tiene la actividad nucleasa 5' usada en la etapa (b) es idéntica a la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde usada en la etapa (d). Específicamente, la enzima que tiene la actividad nucleasa 5' usada en la etapa (b), la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde usada para la extensión del cebador en el sentido de 5' y la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde usada en la etapa (d) son idénticas entre sí.

35 Etapa (e): Análisis de fusión o hibridación con HO

Tras la reacción de extensión, se realiza un análisis de fusión o un análisis de hibridación para el resultante de la etapa (d) a lo largo de un intervalo de temperaturas con un HO (oligonucleótido de hibridación) para medir si se genera o no una señal indicativa de la presencia del híbrido entre el CTO y el HO.

40 Cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido y el CTO y el HO forman un híbrido, proporcionando de ese modo una señal indicativa de la presencia del híbrido entre el CTO y el HO. Cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente en la muestra de ácido nucleico, se forma el dúplex extendido para impedir la formación del híbrido entre el CTO y el HO, no proporcionando de ese modo la señal.

La etapa (e) se realiza usando el HO.

50 El HO comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO. Cuando no se forma el dúplex extendido y el CTO está entonces en una única cadena, el HO se hibrida con el CTO para formar el híbrido. El híbrido se forma y/o se funde a lo largo de un intervalo de temperaturas durante el análisis de fusión o hibridación para dar la señal indicativa de la presencia del híbrido entre el CTO y el HO. Cuando se forma el dúplex extendido y el CTO está entonces en una doble cadena, el dúplex extendido impide la formación del híbrido entre el CTO y el HO, no proporcionando de ese modo la señal indicativa de la presencia del híbrido entre el CTO y el HO durante el análisis de fusión o hibridación.

60 La longitud del HO puede variar ampliamente. Por ejemplo, el HO tiene 5-100 nucleótidos, 5-80 nucleótidos, 5-60 nucleótidos, 5-40 nucleótidos, 5-20 nucleótidos, 5-10 nucleótidos, 10-100 nucleótidos, 10-80 nucleótidos, 10-60 nucleótidos, 10-40 nucleótidos, 10-30 nucleótidos, 10-20 nucleótidos, 15-100 nucleótidos, 15-80 nucleótidos, 15-60 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 15-30 nucleótidos, 15-20 nucleótidos, 20-100 nucleótidos, 20-80 nucleótidos, 20-60 nucleótidos, 20-40 nucleótidos o 20-30 nucleótidos de longitud.

65 En la presente invención, el dúplex extendido del CTO/cadena extendida puede ser un dúplex más estable que el híbrido de CTO/HO. Para esto, el valor de T_m del HO puede ser menor que el del CTO. Según una realización, el valor de T_m del híbrido de CTO/HO es al menos 10°C, 20°C, 30°C o 40°C menor que el del dúplex extendido del CTO/cadena extendida.

En una realización de esta invención, el HO se bloquea en su extremo 3' para prohibir su extensión.

5 La prevención de la formación del híbrido entre el CTO y el HO mediante el dúplex extendido puede lograrse de varios modos dependiendo del punto de tiempo de aparición de la oportunidad de contacto entre el CTO y el HO.

10 Por ejemplo, cuando el CTO y el HO se ponen en contacto por primera vez entre sí en la etapa (e) (por ejemplo, realizando las etapas (a)-(d) y (e)-(f) en recipientes de reacción separados), la presente invención puede llevarse a cabo tal como se representa en la figura 2. El HO no se pone en contacto con el CTO antes de la extensión del fragmento de PTO sino que está implicado en la hibridación con el resultante de la reacción de extensión. En la etapa de análisis de fusión, la formación del dúplex extendido impide la formación del híbrido de CTO/HO debido a la inhibición de la hibridación del HO con el CTO.

15 Cuando el CTO y el HO se ponen en contacto entre sí en la etapa (d) (por ejemplo, realizando las etapas (a)-(f) en un único recipiente de reacción), la presente invención puede llevarse a cabo tal como se representa en la figura 3. El HO puede hibridarse con el CTO antes de la extensión y puede estar implicado en la reacción de extensión. Cuando el HO se hibrida con el CTO antes de la extensión del fragmento, la extensión del fragmento escinde o desplaza el HO del CTO. Particularmente, cuando el HO se escinde durante la reacción de extensión, la formación del dúplex extendido impide la formación del híbrido de CTO/HO en la etapa de análisis de fusión debido al consumo del HO mediante la escisión. Cuando el HO se hibrida con el CTO en la etapa (d), la formación del dúplex extendido puede permitir liberar (desplazar) el HO del CTO (desplazamiento de cadena de HO). En tal caso, el HO desplazado puede no formar el híbrido con el CTO en el análisis de fusión o hibridación debido a la inhibición de la hibridación del HO con el CTO.

20 Según una realización, la escisión y/o el desplazamiento de cadena del HO mediante la extensión del fragmento de PTO depende de los tipos de ácido nucleico polimerasa dependiente de molde o las condiciones de reacción.

25 Incluso si el CTO y el HO tienen la posibilidad de entrar en contacto entre sí en la etapa (d), algunos de los HO pueden no hibridarse incluso con el CTO antes de la extensión. En tal caso, los HO pueden no formar el híbrido con el CTO en la etapa (e) debido a la inhibición de la hibridación del HO con el CTO.

30 Según una realización, con el ajuste de las condiciones de reacción (por ejemplo temperatura de reacción y valor de T_m del HO y el fragmento de PTO) en la etapa (d), el HO puede no hibridarse con el CTO antes de la extensión y puede no estar implicado en la reacción de extensión.

35 Sin consideración de la etapa en la que el HO se pone en contacto por primera vez con el CTO, se forma el dúplex extendido para impedir la formación del híbrido entre el CTO y el HO en presencia de la secuencia de ácido nucleico diana mediante los siguientes modos (i) la inhibición de la hibridación del HO con el CTO y/o (ii) el consumo del HO mediante la escisión.

40 En ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana, no se forma el dúplex extendido y se forma por tanto el híbrido entre el CTO y el HO.

45 Según una realización, la etapa (d) se realiza en presencia de los HO y los HO se hibridan con el CTO y/o no se hibridan con el CTO. Según una realización, la etapa (d) se realiza en presencia de los HO; en la que (i) el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende antes de la hibridación del HO y/o (ii) cuando el HO se hibrida con el CTO antes de la extensión del fragmento, la extensión del fragmento escinde o desplaza el HO del CTO, de ese modo la formación del dúplex extendido impide la formación del híbrido entre el CTO y el HO en la etapa (e) debido a la inhibición de la hibridación del HO con el CTO y/o el consumo del HO mediante la escisión.

50 Según una realización, la hibridación entre el HO y el CTO puede ser prevalente con respecto a la no hibridación o no, dependiendo de las condiciones para la reacción de extensión del fragmento hibridado con el CTO.

55 La formación dependiente de la diana del dúplex extendido impide la hibridación del HO con el CTO incluso cuando el HO comprenda una secuencia complementaria al CTO. Incluso cuando el HO se hibride con el CTO antes de la formación del dúplex extendido, se separa, libera o retira del CTO (por ejemplo, mediante escisión o desplazamiento del HO).

60 El HO comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO. La secuencia de nucleótidos del HO puede diseñarse para que comprenda una complementaria a una región de CTO distinta de la región que va a hibridarse con el fragmento de PTO. En este caso, el HO no es competitivo con el fragmento de PTO (o PTO no escindido) en la unión al CTO.

65 Según una realización, el HO comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de formación de molde del CTO.

En una determinada realización, el HO puede diseñarse para que comprenda una secuencia de nucleótidos que es competitiva con el fragmento (o PTO no escindido) en cuanto a la hibridación con el CTO (véanse las figuras 6 y 7). En una determinada realización, tal HO competitivo no se escinde mediante el fragmento o su producto de extensión o no se desplaza durante la reacción de extensión. Por ejemplo, el HO puede diseñarse para que comprenda una

5 secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con la porción de captura del CTO.

El término “una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con la porción de captura del CTO” usado conjuntamente con una secuencia del HO se refiere a una porción del HO para formar una doble cadena con la porción de captura del CTO cuando el HO se hibrida con el CTO. La secuencia de nucleótidos del HO que puede

10 hibridarse con la porción de captura del CTO puede ser toda la secuencia o una secuencia parcial del HO. La secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con la porción de captura del CTO corresponde a toda la secuencia o una secuencia parcial (por ejemplo, el 10%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% el 90% o el 95%) en el HO.

15 Cuando el HO comprende una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con la porción de captura del CTO, puede tener una secuencia solapante con el fragmento de PTO y/o la porción de etiquetado en 5' del PTO no escindido. En este caso, (i) el HO y el fragmento de PTO, o (ii) el HO y la porción de etiquetado en 5' del PTO no escindido son competitivos en cuanto a la hibridación con el CTO.

20 El término “HO competitivo” usado en el presente documento se refiere a un HO que comprende una secuencia competitiva con el fragmento de PTO o el PTO no escindido (por ejemplo, la porción de etiquetado en 5' del PTO no escindido) en cuanto a la hibridación con el CTO. Según una realización, el HO competitivo es menos competitivo que el fragmento de PTO (en la práctica, la cadena extendida del fragmento de PTO) y más competitivo que la porción de etiquetado en 5' del PTO no escindido en cuanto a la hibridación con el CTO.

25 Cuando está presente la secuencia de ácido nucleico diana y está presente el HO competitivo en la etapa (c) y/o (d), la competición entre el HO competitivo y el fragmento de PTO en la hibridación con el CTO puede resultar problemática. En tal caso, es preferible que el fragmento de PTO en vez del HO competitivo se hibride con el CTO y se extienda para producir la cadena extendida. A medida que se extiende el fragmento de PTO hibridado con el

30 CTO, es más ventajoso que el HO competitivo en la hibridación con CTO.

En una determinada realización, la etapa (c) se realiza en condiciones que son más favorable para la hibridación entre el fragmento de PTO y el CTO que la hibridación entre el HO y el CTO. Tales condiciones favorables pueden lograrse mediante diversos métodos. Por ejemplo, el extremo 3' del HO puede bloquearse para lograr las condiciones favorables. El HO con extremo 3' bloqueado se hibrida con el CTO pero no se extiende, lo que aumenta la probabilidad de disociación del CTO debido a la competición con el fragmento de PTO. El fragmento de PTO hibridado con el CTO se extiende para dar la cadena extendida, que puede mantenerse de manera más estable. Por tanto, el dúplex extendido es mucho más prevalente que híbrido de CTO/HO en el resultante tras las etapas (c) y (d). En consecuencia, el número (o la cantidad) del híbrido de CTO/HO disminuye relativamente debido al dúplex

35 extendido en presencia de la secuencia de ácido nucleico diana en comparación con el caso de ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

Cuando la secuencia de ácido nucleico diana está ausente, la escisión del PTO no se produce quedando como PTO no escindido. Cuando existen tanto el PTO no escindido como el HO competitivo, la porción de etiquetado en 5' del

40 PTO no escindido y el HO competitivo son competitivas en la hibridación con el CTO debido a que tienen una secuencia solapante entre sí. Cuando la secuencia de ácido nucleico diana está ausente, el HO competitivo tiene que ser más ventajoso que la porción de etiquetado en 5' del PTO no escindido en hibridación con el CTO debido a que el principio que subyace a la presente invención requiere la hibridación del HO con el CTO.

45 Cuando el valor de T_m del fragmento de PTO es mayor que el del HO competitivo, es más ventajoso que el HO competitivo en la hibridación con el CTO. Considerando la competición entre la porción de etiquetado en 5' del PTO no escindido y el HO competitivo, un valor de T_m mayor del fragmento de PTO no siempre es preferible. Incluso cuando el valor de T_m del fragmento de PTO sea menor que el del HO competitivo, puede ser más ventajoso que el HO competitivo en la hibridación con el CTO debido a la extensión del fragmento de PTO hibridado con el CTO. En

50 tal caso, el HO competitivo puede ser más ventajoso que la porción de etiquetado en 5' del PTO no escindido en la hibridación con el CTO.

Con los considerables factores o cuestiones descritos anteriormente, deben diseñarse HO competitivos adecuados. Según una realización, la diferencia entre los valores de T_m del híbrido de CTO/HO y el fragmento de híbrido de

55 PTO/CTO está dentro de $\pm 40^\circ\text{C}$, $\pm 30^\circ\text{C}$, $\pm 20^\circ\text{C}$, $\pm 15^\circ\text{C}$, $\pm 10^\circ\text{C}$, $\pm 5^\circ\text{C}$ o $\pm 3^\circ\text{C}$.

Según una realización, la diferencia entre los valores de T_m del híbrido de CTO/HO y la porción de etiquetado en 5' del híbrido de PTO no escindido/CTO está dentro de $\pm 40^\circ\text{C}$, $\pm 30^\circ\text{C}$, $\pm 20^\circ\text{C}$, $\pm 15^\circ\text{C}$, $\pm 10^\circ\text{C}$, $\pm 5^\circ\text{C}$ o $\pm 3^\circ\text{C}$.

60 Según una realización, cuando el HO y el PTO no escindido pueden hibridarse con el CTO de una manera competitiva, el valor de T_m de CTO/HO puede ser mayor (por ejemplo, al menos 2°C , 4°C , 6°C , 8°C , 10°C , 15°C o

20°C) que el del CTO/PTO no escindido.

El valor de T_m del híbrido de PTO no escindido/CTO se determina mediante la porción de la secuencia de PTO que va a hibridarse con el CTO. Por ejemplo, cuando la porción de etiquetado en 5' del PTO no escindido va a hibridarse con el CTO, el valor de T_m de la porción de etiquetado en 5' es un factor determinante del valor de T_m del híbrido de PTO no escindido/CTO.

El término "valor de T_m del PTO no escindido" usado en el presente documento significa un valor de T_m determinado por una porción de la secuencia del PTO no escindido que va a hibridarse con el CTO, a menos que se indique otra cosa.

Según una realización, la cadena extendida del fragmento tiene un valor de T_m mayor que el HO y el HO tiene un valor de T_m mayor que la porción de etiquetado en 5' del PTO.

Según una realización, dada la hibridación con CTO, el valor de T_m de la cadena extendida del fragmento de PTO es mayor que el del HO y el valor de T_m del HO es mayor que el del PTO no escindido.

Según una realización, el HO y el fragmento de PTO se diseñan para que no puedan hibridarse con el CTO a través de sólo una porción distinta de la porción solapante. En tal caso, puede impedirse la hibridación simultánea del HO y el fragmento de PTO con el CTO.

El valor de T_m se determina mediante la longitud y el contenido en G/C de los nucleótidos hibridados. Según una realización, el valor de T_m puede calcularse mediante métodos convencionales tales como la regla de Wallace (R.B. Wallace, *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 6:3543-3547(1979)) y el método del vecino más cercano (SantaLucia J. Jr., *et al.*, *Biochemistry*, 35:3555-3562(1996)); Sugimoto N., *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 24:4501-4505(1996)).

Según una realización, el valor de T_m se refiere a valores de T_m reales en condiciones de reacción puestas en práctica realmente.

En el PCE-NH que comprende análisis de fusión o hibridación, la señal indicativa de la presencia del híbrido entre el CTO y el HO puede proporcionarse mediante diversos sistemas de marcaje: (i) un marcador unido al HO, (ii) un marcador unido al CTO, (iii) un marcador unido al HO y un marcador unido al CTO, y (iv) un marcador de intercalación.

Según una realización, siempre que la señal en el caso de la formación del híbrido entre el CTO y el HO sea diferente de la señal en el caso de no formación del híbrido entre el CTO y el HO, pueden adoptarse diversos tipos y ubicaciones de marcadores en la presente invención. La presente invención requiere, en principio, proporcionar una señal adecuada en un análisis de fusión o hibridación. En este sentido, la expresión descrita anteriormente incluye, por ejemplo, el siguiente significado: Siempre que la señal proporcionada en el caso de que el CTO y el HO estén asociados para formar un híbrido sea diferente de la señal proporcionada en el caso de que el CTO y el HO estén disociados uno de otro, pueden adoptarse diversos tipos y ubicaciones de marcadores en la presente invención. La expresión "la señal en el caso de la formación del híbrido entre el CTO y el HO sea diferente de la señal en el caso de no formación del híbrido entre el CTO y el HO" usada en el presente documento incluye, por ejemplo, el siguiente significado: "la señal proporcionada en el caso de que el CTO y el HO estén asociados para formar un híbrido sea diferente de la señal proporcionada en el caso de que el CTO y el HO estén disociados uno de otro". Los marcadores para la señalización descritos a continuación tienen que presentar la siguiente característica: La señal proporcionada en el caso de que el CTO y el HO estén asociados para formar un híbrido es diferente de la señal proporcionada en el caso de que el CTO y el HO estén disociados uno de otro.

Según una realización, la diferencia de señal se proporciona mediante un fenómeno tal como generación de señal y distinción de señal.

Según una realización, la diferencia de señal se proporciona mediante un fenómeno tal como el cambio de intensidad (aumento de señal y disminución de señal).

Los marcadores útiles en la presente invención incluyen una multitud de marcadores conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, incluyendo un único marcador, un marcador doble interactivo y un marcador de intercalación.

El marcador útil en la presente invención incluye un marcador doble interactivo (véanse las figuras 2-4 y 6-7).

Como representante del sistema de marcador interactivo, el sistema de marcador de FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) incluye una molécula indicadora fluorescente (molécula donadora) y una molécula extintora (molécula aceptora). En FRET, el donador de energía es fluorescente, pero el aceptor de energía puede ser fluorescente o no fluorescente. En otra forma de sistemas de marcadores interactivos, el donador de energía no es fluorescente, por ejemplo, un cromóforo, y el aceptor de energía es fluorescente. En aún otra forma de sistemas de marcadores interactivos, el donador de energía es luminiscente, por ejemplo bioluminiscente, quimioluminiscente,

electroquimioluminiscente, y el aceptor es fluorescente. La molécula donadora y la molécula aceptor pueden describirse como molécula indicadora y molécula extintora en la presente invención, respectivamente. El marcador doble interactivo incluye el par de marcadores que proporciona una señal detectable basándose en extinción mediada por contacto (Salvatore *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 2002 (30) n.º 21 e122 y Johansson *et al.*, *J. AM. CHEM. SOC* 2002 (124) págs. 6950-6956). En la presente invención, el sistema de marcador interactivo incluye cualquiera o todos los casos que inducen cambios de señal mediante interacción entre al menos dos moléculas (por ejemplo colorantes).

Según una realización de esta invención, la señal indicativa de la presencia o ausencia del híbrido de CTO-HO se genera mediante sistemas de marcadores interactivos, particularmente el sistema de marcadores de FRET (es decir, sistema de marcador doble interactivo).

Según una realización, el HO o el CTO tiene un marcador doble interactivo que comprende una molécula indicadora y una molécula extintora; en el que el marcador doble interactivo está situado en un sitio tal que una señal del marcador doble interactivo en el caso de la formación del híbrido entre el CTO y el HO es diferente de una señal del marcador doble interactivo en el caso de no formación del híbrido entre el CTO y el HO.

Según una realización, el HO tiene un marcador doble interactivo que comprende una molécula indicadora y una molécula extintora.

Cuando el HO está en un estado monocatenario, la molécula indicadora y la molécula extintora en el HO están adyacentes conformacionalmente entre sí para permitir que la molécula extintora extinga la señal de la molécula indicadora. Cuando la secuencia de ácido nucleico diana está ausente y se forma el híbrido de CTO/HO, la molécula indicadora y la molécula extintora en el HO están separadas conformacionalmente para permitir que la molécula extintora no extinga la señal de la molécula indicadora, provocando de ese modo un cambio de señal para proporcionar una señal indicativa de la presencia del híbrido de CTO/HO durante el análisis de fusión o hibridación (véanse las figuras 2 y 3). Cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente y el híbrido de CTO/HO no se forma, no se produce el cambio de señal no proporcionando señal indicativa de la presencia del híbrido de CTO/HO durante el análisis de fusión o hibridación (véanse las figuras 2 y 3).

La expresión "la molécula indicadora y la molécula extintora están adyacentes conformacionalmente" usada en el presente documento significa que la molécula indicadora y la molécula extintora están adyacentes tridimensionalmente entre sí mediante una estructura conformacional del HO o CTO tal como hélice y estructura en horquilla aleatorias.

La expresión "la molécula indicadora y la molécula extintora están separadas conformacionalmente" usada en el presente documento significa que la molécula indicadora y la molécula extintora están separadas tridimensionalmente mediante cambio de una estructura conformacional del HO o CTO tras la formación de una doble cadena.

Según una realización, la porción de formación de molde del CTO tiene un marcador doble interactivo que comprende una molécula indicadora y una molécula extintora, y el HO comprende una secuencia complementaria a una región unida a marcador del CTO. Cuando el CTO está en una forma monocatenaria, la molécula indicadora y la molécula extintora en el CTO están adyacentes conformacionalmente entre sí para permitir que la molécula extintora extinga la señal de la molécula indicadora. Cuando la secuencia de ácido nucleico diana está ausente y se forma el híbrido de CTO/HO, la molécula indicadora y la molécula extintora en el CTO están separadas conformacionalmente para permitir que la molécula extintora no extinga la señal de la molécula indicadora, provocando de ese modo un cambio de señal para proporcionar una señal indicativa de la presencia del híbrido de CTO/HO durante el análisis de fusión o hibridación. Cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente y no se forma el híbrido de CTO/HO, no se produce el cambio de señal, dando como resultado la ausencia de señal indicativa de la presencia del híbrido de CTO/HO durante el análisis de fusión o hibridación.

Cuando la presente invención usa el CTO con un marcador doble interactivo, el dúplex extendido del CTO/cadena extendida puede proporcionar señales en el análisis de fusión. Como el valor de T_m del dúplex extendido es diferente de el del híbrido de CTO/HO, la señal del híbrido de CTO/HO puede detectarse de manera diferencial de la señal del dúplex extendido. Se apreciaría que la presente invención al usar señales del híbrido de CTO/HO es claramente diferente de las que usan señales de dúplex extendidos.

Según una realización, la molécula indicadora y la molécula extintora pueden ubicarse en cualquier sitio en el HO o CTO, siempre que la señal de la molécula indicadora se extinga y no se extinga dependiendo de la fusión del híbrido de CTO/HO o la hibridación del CTO y HO.

Según una realización, una de la molécula indicadora y la molécula extintora en el HO está ubicada en su extremo 5' o separada de su extremo 5' por 1-5 nucleótidos y la otra está ubicada para extinguir y no extinguir la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del HO. Según una realización, una de la molécula indicadora y la molécula extintora en el HO está ubicada en su extremo 3' o separada de su extremo 3' por 1-5 nucleótidos y la

otra está ubicada para extinguir y no extinguir la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del HO. En una determinada realización, la molécula indicadora y la molécula extintora están ubicadas cada una en ambos extremos del HO.

5 Según una realización, una de la molécula indicadora y la molécula extintora en el CTO está ubicada en su extremo 5' o separada de su extremo 5' por 1-5 nucleótidos y la otra está ubicada para extinguir y no extinguir la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del CTO. Según una realización, una de la molécula indicadora y la molécula extintora en el CTO está ubicada en su extremo 3' o separada de su extremo 3' por 1-5 nucleótidos y la otra está ubicada para extinguir y no extinguir la señal de la molécula indicadora dependiendo de la
10 conformación del CTO.

La molécula indicadora y la molécula extintora útiles en la presente invención pueden incluir el marcador fluorescente descrito en el presente documento.

15 Se dan a conocer pares adecuados de indicador-extintor en una variedad de publicaciones tal como sigue: Pesce *et al.*, editors, Fluorescence Spectroscopy (Marcel Dekker, Nueva York, 1971); White *et al.*, Fluorescence Analysis: A Practical Approach (Marcel Dekker, Nueva York, 1970); Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2ª edición (Academic Press, Nueva York, 1971); Griffiths, Color And Constitution of Organic Molecules (Academic Press, Nueva York, 1976); Bishop, editor, Indicators (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland,
20 Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Molecular Probes, Eugene, 1992); Pringsheim, Fluorescence and Phosphorescence (Interscience Publishers, Nueva York, 1949); Haugland, R. P., Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6ª edición (Molecular Probes, Eugene, Oreg., 1996) patentes estadounidenses n.ºs 3.996.345 y 4.351.760.

25 Es de interés que una molécula extintora negra no fluorescente (o molécula extintora oscura) que puede extinguir la fluorescencia de un amplio intervalo de longitudes de onda o una longitud de onda específica puede usarse en la presente invención. Ejemplos de estos son BHQ y DABCIL0. En el sistema de señalización compuesto por indicador y extintor, el indicador abarca un donador de FRET y el extintor abarca la otra pareja (aceptor) de FRET. Por ejemplo, se usa un colorante de fluoresceína como indicador y un colorante de rodamina como extintor.
30

Según una realización, cuando la molécula extintora es fluorescente, la detección de la señal se realiza midiendo el cambio de señal de la molécula extintora o los cambios de señal de tanto la molécula extintora como la molécula indicadora.

35 Las presentes invenciones pueden usar un sistema de marcador doble interactivo-intercatenario (véase la figura 4).

Según una realización, el HO tiene uno de un marcador doble interactivo que comprende una molécula indicadora y una molécula extintora y el CTO tiene el otro del marcador doble interactivo; en el que el marcador doble interactivo está situado en un sitio tal que una señal del marcador doble interactivo en el caso de la formación del híbrido entre el CTO y el HO es diferente de una señal del marcador doble interactivo en el caso de no formación del híbrido entre el CTO y el HO.
40

El marcador doble interactivo-intercatenario usa la interacción entre el marcador unido al CTO (por ejemplo, molécula donadora) y el marcador unido al HO (por ejemplo, molécula aceptora).
45

El HO tiene uno de un marcador doble interactivo que comprende una molécula indicadora y una molécula extintora y el CTO tiene el otro del marcador doble interactivo. La hibridación entre el CTO y el HO da como resultado un cambio de señal del marcador doble interactivo-intercatenario, proporcionando la señal indicativa de la presencia del híbrido de CTO/HO (véase la figura 4). En una determinada realización, el marcador para el CTO se une a la porción de formación de molde.
50

En una determinada realización, la molécula indicadora y la molécula extintora se unen cada una al extremo 3' del HO y el extremo 5' del CTO.

55 En una determinada realización, el presente método se realiza usando un HO adicional que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO y los dos HO se hibridan con el CTO de una manera adyacente entre sí; en el que uno de los dos HO tiene uno de un marcador doble interactivo que comprende una molécula indicadora y una molécula extintora y el otro de los dos HO tiene el otro del marcador doble interactivo; en el que el marcador doble interactivo está situado en un sitio tal que una señal del marcador doble interactivo en el caso de la formación del híbrido entre el CTO y los dos HO es diferente de una señal del marcador doble interactivo en el caso de no formación del híbrido entre el CTO y los dos HO.
60

Cuando los dos HO no se hibridan con el CTO, están separados uno de otro para separar la molécula indicadora de la molécula extintora, no extinguendo de ese modo la señal de la molécula indicadora. Cuando dos HO se hibridan con el CTO de una manera adyacente entre sí, la hibridación permite que la molécula extintora extinga la señal de la molécula indicadora, provocando de ese modo un cambio de señal para proporcionar una señal indicativa de la
65

presencia del híbrido de CTO/HO durante el análisis de fusión o hibridación. Cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente y no se forma el híbrido de CTO/HO, el cambio de señal no da como resultado la ausencia de señal indicativa de la presencia del híbrido de CTO/HO durante el análisis de fusión o hibridación.

5 Cuando se usa el único marcador, puede unirse o bien al HO o bien al CTO (véase la figura 5).

Según una realización, el HO o el CTO tiene un único marcador; en el que el único marcador está situado en un sitio tal que una señal del único marcador en el caso de la formación del híbrido entre el CTO y el HO es diferente de una señal del único marcador en el caso de no formación del híbrido entre el CTO y el HO.

10 El único marcado tiene que poder proporcionar una señal diferente dependiendo de su presencia en una doble cadena o una única cadena. El único marcador incluye un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador quimioluminiscente, un marcador electroquímico y un marcador de metal. Preferiblemente, el único marcador incluye un marcador fluorescente.

15 En una determinada realización, el único marcador es un marcador fluorescente que puede generar señales de diferentes intensidades dependiendo de si las secuencias de ácido nucleico que tienen el único marcador están en una única cadena o una doble cadena.

20 La figura 5 ilustra la presente invención usando un único marcador. En la figura 5, el HO tiene un único marcador. Cuando el HO se hibrida con el CTO durante el análisis de fusión, la señal del único marcador para el HO cambia. En cambio, cuando el HO no se hibrida con el CTO, la señal del único marcador para el HO no cambia.

25 En una realización, cuando el CTO tiene un único marcador, el HO comprende una secuencia complementaria a una región unida a marcador del CTO. Cuando el HO se hibrida con el CTO durante el análisis de fusión, la señal del único marcador para el CTO cambia. En cambio, cuando el HO no se hibrida con el CTO, la señal del único marcador para el CTO no cambia. En este caso, el dúplex extendido del CTO/cadena extendida puede proporcionar señales en el análisis de fusión. Como el valor de T_m del dúplex extendido es diferente de el del híbrido de CTO/HO, la señal del híbrido de CTO/HO puede detectarse de manera diferencial de la señal del dúplex extendido. Se apreciaría que la presente invención al usar señales del híbrido de CTO/HO es claramente diferente de las que usan señales de dúplex extendidos.

30 En una realización, la porción de formación de molde del CTO tiene un único marcador y el HO comprende una secuencia complementaria a una región unida a marcador del CTO.

35 Los tipos y las posiciones del marcador fluorescente se dan a conocer en las patentes estadounidenses n.^{os} 7.537.886 y 7.348.141.

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

55 Por ejemplo, el marcador fluorescente incluye JOE, FAM, TAMRA, ROX y un marcador basado en fluoresceína.

El marcador puede unirse a o bien el HO o bien el CTO mediante métodos convencionales. Por ejemplo, el marcador se une al HO o el CTO a través de un espaciador que contiene átomos de carbono (por ejemplo, espaciador de 3 carbonos, espaciador de 6 carbonos o espaciador de 12 carbonos).

60 La presente invención puede emplear un marcador de intercalación para proporcionar la señal indicativa de la presencia del híbrido entre el CTO y el HO. Los colorantes de intercalación ejemplificados útiles en esta invención incluyen SYBRTM Green I, PO-PROTM-1, BO-PROTM-1, SYTOTM43, SYTOTM44, SYTOTM45, SYTOXTMBlue, POPOTM-1, POPOTM-3, BOBOTM-1, BOBOTM-3, LO-PROTM-1, JO-PROTM-1, YO-PROTM1, TO-PROTM1, SYTOTM11, SYTOTM13, SYTOTM15, SYTOTM16, SYTOTM20, SYTOTM23, TOTOTM-3, YOYOTM3, GelStarTM y naranja de tiazol.

65 Los colorantes de intercalación se intercalan específicamente en moléculas de ácido nucleico bicatenarias para generar señales.

5 Cuando la presente invención usa colorantes de intercalación, el dúplex extendido del CTO/cadena extendida puede proporcionar señales en el análisis de fusión o hibridación. Como el valor de T_m del dúplex extendido es diferente de el del híbrido de CTO/HO, la señal del híbrido de CTO/HO puede detectarse de manera diferencial de la señal del dúplex extendido. Se apreciaría que la presente invención al usar señales del híbrido de CTO/HO es claramente diferente de las que usan señales de dúplex extendidos.

10 El HO usado en la presente invención puede ser cualquier sonda siempre que pueda generar señales tras la hibridación durante un análisis de fusión o hibridación, incluyendo Molecular beacon™ (documento US 5.925.517), Hybeacons™ (D. J. French, *et al.*, Molecular and Cellular Probes (2001) 13, 363-374 y documento US 7.348.141), sonda autoextinguida doblemente marcada (documento US 5.876.930), LUX™ (I. A. Nazarenko, *et al.* Nucleic Acids Res 2002, 30:2089-2095 y patente estadounidense n.º 7.537.886, sonda de hibridación (Bernard PS, *et al.*, Clin Chem 2000, 46, 147-148 y Deepti Parashar *et al.*, Indian J Med Res 124, artículo de revisión de octubre de 2006 385-398).

15 El análisis de fusión o hibridación en la etapa (e) puede llevarse a cabo mediante diversos procedimientos conocidos por un experto en la técnica.

20 El término "análisis de fusión" usado en el presente documento significa un método en el que se obtiene una señal indicativa de la presencia del híbrido de CTO/HO mediante la fusión de un dúplex, que incluye un método para medir señales a dos temperaturas diferentes, análisis de curvas de fusión, análisis del patrón de fusión y análisis de picos de fusión.

25 El término "análisis de hibridación" (o "análisis de apareamiento") usado en el presente documento significa un método en el que se obtiene una señal diana indicativa de la presencia del híbrido de CTO/HO durante la formación de un dúplex, que incluye un método para medir señales a dos temperaturas diferentes, análisis de curvas de hibridación, análisis del patrón de hibridación y análisis de picos de hibridación.

30 En general, cuando puede generarse una señal diana mediante el análisis de fusión, también puede obtenerse mediante el análisis de hibridación; y viceversa. A menos que se indique otra cosa en el presente documento, el término "análisis de fusión" pretende abarcar el análisis de hibridación.

35 La curva de fusión o curva de hibridación puede obtenerse mediante tecnologías convencionales, por ejemplo, tal como se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 6.174.670 y 5.789.167, Drobyshev *et al.*, Gene 188: 45(1997); Kochinsky y Mirzabekov Human Mutation 19:343(2002); Livehits *et al.* J. Biomol. Structure Dynam. 11:783(1994); y Howell *et al.* Nature Biotechnology 17:87(1999). Por ejemplo, una curva de fusión o curva de hibridación puede consistir en una visualización o representación gráfica de la variación de la señal de salida con el parámetro de rigurosidad de hibridación. La señal de salida puede representarse gráficamente de manera directa frente al parámetro de hibridación. Normalmente, una curva de fusión o curva de hibridación tendrá la señal de salida, por ejemplo fluorescencia, que indica el grado de estructura de dúplex (es decir, la magnitud de la hibridación), representado gráficamente en el eje Y y el parámetro de hibridación en el eje X.

Etapa (f): Detección de la señal que indica la presencia del híbrido de CTO/HO

45 En el análisis de fusión o hibridación, se detecta la señal indicativa de la presencia del híbrido entre el CTO y el HO. La presencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana y la ausencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

50 En una determinada realización, el análisis de fusión se realiza al menos dos veces para el análisis cuantitativo. El área o la altura de los picos de fusión obtenidos en el análisis de fusión se ve afectada por el híbrido de CTO/HO, proporcionando información en cuanto a la cantidad inicial de secuencias de ácido nucleico diana. Se mide el número de ciclos del análisis de fusión al que la altura o el área de pico de fusión cruza un valor umbral para cuantificar la cantidad de secuencias de ácido nucleico diana.

55 Por ejemplo, la presente invención puede llevarse a cabo (i) repitiendo las etapas (a)-(d) con desnaturalización entre los ciclos de repetición (ii) realizando un análisis de fusión para el híbrido de CTO/HO; y (iii) repitiendo al menos dos veces las etapas (i) y (ii). Los datos pueden obtenerse en un intervalo de repetición predeterminado con al menos dos puntos. Entonces, los resultados del análisis de fusión (por ejemplo, la altura o el área del pico de fusión) se representan gráficamente frente a cada número de ciclos (o número de ciclos acumulativo) del análisis de fusión y se comparan, cuantificando de ese modo la cantidad de secuencias de ácido nucleico diana. El número de la repetición de las etapas (a)-(d) puede ajustarse opcionalmente.

65 Alternativamente, los resultados del análisis de fusión (por ejemplo, la altura o el área del pico de fusión) se representan gráficamente frente a cada número de ciclos (o número de ciclos acumulativo) del análisis de fusión y se comparan, cuantificando de ese modo la cantidad de secuencias de ácido nucleico diana.

Según una realización, la señal en el caso de la presencia de secuencias diana es diferente de la señal en el caso de ausencia de secuencias diana. Cuando se detecta la secuencia diana mediante un análisis de fusión o análisis de hibridación, tal diferencia de señal incluye diferencias en las alturas o las áreas de los picos de fusión. En una realización, tal diferencia de señal es de al menos el 10%, al menos el 30%, al menos el 50%, al menos el 70% o al menos el 90%.

Según una realización, el método se realiza usando un grupo de control que no tiene secuencia de ácido nucleico diana o una cantidad predeterminada de la secuencia de ácido nucleico diana. La presente invención se lleva a cabo para la muestra de ácido nucleico de interés junto con el grupo de control y los resultados se comparan, garantizando una determinación más precisa de la presencia o cantidad de la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra de ácido nucleico.

La presente invención puede llevarse a cabo o bien en una fase líquida o bien sobre una fase sólida.

15 Detección de dianas sobre una fase sólida

Según una realización, la presente invención se realiza sobre la fase sólida, y uno del CTO y HO se inmoviliza sobre el sustrato sólido o va a quedar inmovilizado sobre un sustrato sólido antes de la detección de la señal en la etapa (f) y la señal se detecta sobre el sustrato sólido.

La inmovilización del CTO o HO puede hacerse de dos modos.

En el primer modo, o bien el CTO o bien el HO que ya se ha inmovilizado sobre el sustrato sólido está implicado en las etapas (c)-(f). En el segundo modo, o bien el CTO o bien el HO está implicado en una forma no inmovilizada en las etapas (c), (d) o (e) y luego se inmoviliza sobre el sustrato sólido.

Según una realización, uno del CTO y HO se inmoviliza sobre un sustrato sólido entre la etapa (d) y la etapa (e) en el ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión o hibridación.

El sistema de marcaje para la reacción en fase sólida puede ser el mismo que para los sistemas de marcaje descritos anteriormente. Además, el único marcador para la reacción en fase sólida es más versátil que el descrito anteriormente. En la reacción en fase sólida, no se requiere que el único marcador presente la capacidad de generar señales de intensidades diferentes dependiendo de si las secuencias de ácido nucleico que tienen el único marcador están en una única cadena o una doble cadena.

El único marcador incluye, pero no se limita a, un marcador químico (por ejemplo, biotina), un marcador enzimático (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa, β -galactosidasa y β -glucosidasa), un marcador de radioisótopo (por ejemplo, I^{125} y C^{14}), un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador quimioluminiscente y un marcador de metal (por ejemplo, oro).

Para la reacción en fase sólida, la inmovilización del CTO o HO puede hacerse directa o indirectamente (de manera específica, indirectamente) a través de su extremo 5' o extremo 3' (específicamente el extremo 3') sobre la superficie del sustrato sólido. Además, el CTO o HO puede inmovilizarse sobre la superficie del sustrato sólido de una manera covalente o no covalente. Cuando el CTO o HO inmovilizado se inmoviliza indirectamente sobre la superficie del sustrato sólido, se usan ligadores adecuados. Los ligadores útiles en esta invención pueden incluir cualquier ligador utilizado para la inmovilización de sondas sobre la superficie del sustrato sólido. Por ejemplo, compuestos de alquilo o arilo con funcionalidad amina, o compuestos de alquilo o arilo con funcionalidad tiol sirven como ligadores para la inmovilización. Además, una cola de poli (T) o una cola de poli (A) puede servir como ligador y disminuye significativamente el impedimento espacial que es un factor inhibitorio para acciones enzimáticas (por ejemplo, reacciones de escisión enzimática), contribuyendo a aumentar la eficacia de hibridación. La cola de poli (T) o cola de poli (A) como ligadores no se considera una secuencia de sondas.

Según una realización, el CTO o HO puede inmovilizarse sobre el sustrato sólido por medio de interacción entre parejas de unión (por ejemplo, biotina/estreptavidina). Por ejemplo, el CTO o HO con una de las parejas de unión (biotina y estreptavidina) puede inmovilizarse sobre el sustrato sólido cuya superficie se modifica con la otra pareja de unión.

Según una realización, el CTO o HO puede inmovilizarse sobre el sustrato sólido mediante una secuencia de nucleótidos para la inmovilización. Por ejemplo, el sustrato sólido cuya superficie se modifica con la secuencia de nucleótidos para la inmovilización puede usarse para inmovilizar el CTO o HO con una secuencia adicional complementaria a la secuencia de nucleótidos para la inmovilización.

Según una realización, el sustrato sólido usado en la presente invención es una micromatriz. La micromatriz para proporcionar un entorno de reacción en esta invención puede incluir cualquiera de las conocidas por un experto en la técnica. Todos los procesos de la presente invención, es decir, hibridación con secuencias de ácido nucleico diana, escisión, extensión, fusión y detección de fluorescencia, se llevan a cabo sobre la micromatriz. El CTO o HO

inmovilizado sobre la micromatriz sirve como elementos de matriz hibridable. El sustrato sólido para fabricar la micromatriz incluye, pero no se limita a, metales (por ejemplo, oro, aleación de oro y cobre, aluminio), óxido de metal, vidrio, cerámica, cuarzo, silicio, semiconductor, oblea de Si/SiO₂, germanio, arseniuro de galio, carbono, nanotubo de carbono, polímeros (por ejemplo, poliestireno, polietileno, polipropileno y poliacrilamida), sefarosa, agarosa y coloides. El sustrato sólido puede estar en forma de una varilla, una placa, una partícula (por ejemplo, perla), una columna de afinidad y una membrana. Una pluralidad de CTO o HO inmovilizados en esta invención pueden inmovilizarse sobre una región accesible o dos o más regiones accesibles sobre un sustrato sólido que puede comprender 2-1.000.000 de regiones accesibles. Los CTO o HO inmovilizados pueden fabricarse para producir una matriz o matrices para una aplicación dada mediante tecnologías de fabricación convencionales tales como fotolitografía, impresión por chorro de tinta, micropunteado mecánico, y derivados de los mismos.

La presente invención realizada sobre la fase sólida puede detectar simultáneamente una pluralidad de secuencias de ácido nucleico diana incluso usando un único tipo de un marcador porque los marcadores sobre los oligonucleótidos están separados físicamente. En este sentido, el número de secuencias de ácido nucleico diana que van a detectarse mediante la presente invención sobre la fase sólida no está limitado.

Usando dispositivos de detección confocales, puede detectarse la señal sólo sobre el sustrato sólido sin influencia de los marcadores suspendidos en una fase líquida.

Según una realización, el método se realiza sin el uso del oligonucleótido en el sentido de 5' y la escisión del PTO en la etapa (b) se produce sin ayuda del oligonucleótido en el sentido de 5' o su cadena extendida. La realización que usa actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en el sentido de 5' se describe en más detalle tal como sigue:

25 *Detección de dianas mediante un ensayo PCE-NH basado en actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en el sentido de 5'*

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra de ácido nucleico mediante un ensayo PCE-NH (sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO), que comprende:

(a) hibridar la secuencia de ácido nucleico diana con un PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado); en el que el PTO comprende (i) una porción de direccionamiento en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) una porción de etiquetado en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la porción de direccionamiento en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y la porción de etiquetado en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana;

(b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una enzima que tiene una actividad nucleasa 5' en condiciones para la escisión del PTO; en el que el PTO hibridado con el ácido nucleico diana se escinde mediante la enzima que tiene la actividad nucleasa 5' de manera que la escisión libera un fragmento que comprende la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO;

(c) hibridar el fragmento liberado del PTO con un CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde); en el que el CTO comprende en una dirección de 3' a 5' (i) una porción de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO y (ii) una porción de formación de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la porción de etiquetado en 5' y la porción de direccionamiento en 3' del PTO; en el que el fragmento liberado del PTO se hibrida con la porción de captura del CTO;

(d) realizar una reacción de extensión usando el resultante de la etapa (c) y una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende para producir una cadena extendida complementaria a la porción de formación de molde del CTO y se forma un dúplex extendido; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido;

(e) realizar un análisis de fusión o un análisis de hibridación para el resultante de la etapa (d) a lo largo de un intervalo de temperaturas con un HO (oligonucleótido de hibridación) que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido y el CTO y el HO forman un híbrido, proporcionando de ese modo una señal indicativa de la presencia del híbrido entre el CTO y el HO; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente en la muestra de ácido nucleico, se forma el dúplex extendido para impedir la formación del híbrido entre el CTO y el HO, no proporcionando de ese modo la señal; en el que la señal se proporciona mediante (i) un marcador unido al HO, (ii) un marcador unido al CTO, (iii) un marcador unido al HO y un marcador unido al CTO, o (iv) un marcador de intercalación; y

(f) detectar la señal indicativa de la presencia del híbrido entre el CTO y el HO; en el que la presencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la ausencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

5 Puesto que el presente método basado en actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en el sentido de 5' es el mismo que el primer aspecto del ensayo PCE-NH que usa oligonucleótidos en el sentido de 5' excepto por la ausencia de uso de oligonucleótidos en el sentido de 5', las descripciones comunes entre ellos se omiten con el fin de evitar una redundancia excesiva que conduzca a la complejidad de esta memoria descriptiva.

10 De manera interesante, el presente método basado en actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en el sentido de 5' proporciona de manera práctica señales diana mediante el ensayo PCE-NH incluso sin el uso de oligonucleótidos en el sentido de 5'.

15 Para el presente método, pueden usarse enzimas convencionales que tienen actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en el sentido de 5'. Entre las polimerasas dependientes de molde que tienen actividad nucleasa 5', hay varias enzimas que tienen actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en el sentido de 5', por ejemplo, *Taq* ADN polimerasa.

20 Considerando la amplificación de secuencias de ácido nucleico diana y la eficacia de escisión del PTO, el ensayo PCE-NH de la presente invención se realiza preferiblemente usando oligonucleótidos en el sentido de 5'.

Kit para la detección de dianas

25 En todavía otro aspecto de esta invención, se proporciona un kit para detectar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra de ácido nucleico mediante un ensayo PCE-NH (sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO), que comprende:

30 (a) un oligonucleótido en el sentido de 5'; en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana;

35 (b) un PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado); en el que el PTO comprende (i) una porción de direccionamiento en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) una porción de etiquetado en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la porción de direccionamiento en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y la porción de etiquetado en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana; el oligonucleótido en el sentido de 5' está ubicado en el sentido de 5' del PTO; en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' o su cadena extendida induce la escisión del PTO mediante la enzima que tiene la actividad nucleasa 5' de manera que la escisión libera un fragmento que comprende la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO;

40 (c) un CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde); en el que el CTO comprende en una dirección de 3' a 5' (i) una porción de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO y (ii) una porción de formación de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la porción de etiquetado en 5' y la porción de direccionamiento en 3' del PTO; en el que el fragmento liberado del PTO se hibrida con la porción de captura del CTO; en el que el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende para producir una cadena extendida complementaria a la porción de formación de molde del CTO y se forma un dúplex extendido; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido; y

50 (d) un HO (oligonucleótido de hibridación) que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO;

55 en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido y el CTO y el HO forman un híbrido, proporcionando de ese modo una señal indicativa de la presencia del híbrido entre el CTO y el HO; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente en la muestra de ácido nucleico, se forma el dúplex extendido para impedir la formación del híbrido entre el CTO y el HO, no proporcionando de ese modo la señal; en el que el kit comprende además (i) un marcador unido al HO, (ii) un marcador unido al CTO, (iii) un marcador unido al HO y un marcador unido al CTO, o (iv) un marcador de intercalación.

60 Puesto que el kit de esta invención se construye para realizar el método de detección de la presente invención descrito anteriormente, las descripciones comunes entre ellos se omiten con el fin de evitar una redundancia excesiva que conduzca a la complejidad de esta memoria descriptiva.

65 En una realización de esta invención, el kit comprende además una enzima que tiene una actividad nucleasa 5'. En

una realización de esta invención, el kit comprende además una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde.

Otras realizaciones de los presentes kits pueden describirse con referencia a las del presente método descrito anteriormente.

5 Todos los presentes kits descritos anteriormente en el presente documento pueden incluir opcionalmente los reactivos requeridos para realizar reacciones PCR de amplificación de dianas (por ejemplo, reacciones PCR) tales como tampones, cofactores de ADN polimerasa y desoxirribonucleótido-5-trifosfatos. Opcionalmente, los kits pueden incluir también diversas moléculas de polinucleótido, transcriptasa inversa, diversos tampones y reactivos, y anticuerpos que inhiben la actividad ADN polimerasa. Los kits pueden incluir también reactivos necesarios para realizar reacciones de control positivo y negativo. El experto en la técnica puede determinar fácilmente las cantidades óptimas de reactivos que van a usarse en una reacción dada teniendo el beneficio de la divulgación actual. Los kits, normalmente, se adaptan para contener los constituyentes descritos anteriormente en compartimentos o envases separados.

15 II. Segundo aspecto del procedimiento de detección de dianas mediante un ensayo PCE-NH

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra de ácido nucleico sobre una fase sólida mediante un ensayo PCE-NH (sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO), que comprende:

25 (a) hibridar la secuencia de ácido nucleico diana con un oligonucleótido en el sentido de 5' y un PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado); en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; el PTO comprende (i) una porción de direccionamiento en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) una porción de etiquetado en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la porción de direccionamiento en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y la porción de etiquetado en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana; el oligonucleótido en el sentido de 5' está ubicado en el sentido de 5' del PTO;

35 (b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una enzima que tiene una actividad nucleasa 5' en condiciones para la escisión del PTO; en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' o su cadena extendida induce la escisión del PTO mediante la enzima que tiene la actividad nucleasa 5' de manera que la escisión libera un fragmento que comprende la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO;

40 (c) hibridar el fragmento liberado del PTO con un CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde); en el que el CTO comprende en una dirección de 3' a 5' (i) una porción de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO y (ii) una porción de formación de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la porción de etiquetado en 5' y la porción de direccionamiento en 3' del PTO; en el que el fragmento liberado del PTO se hibrida con la porción de captura del CTO;

45 (d) realizar una reacción de extensión usando el resultante de la etapa (c) y una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende para producir una cadena extendida complementaria a la porción de formación de molde del CTO y se forma un dúplex extendido; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido;

50 (e) hibridar el resultante de la etapa (d) con un HO (oligonucleótido de hibridación) que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO en condiciones adecuadas para la hibridación entre el CTO y el HO; en el que uno del CTO y el HO se marca con un único marcador y el otro no marcado se inmoviliza sobre un sustrato sólido o va a quedar inmovilizado sobre un sustrato sólido antes de la detección de la señal en la etapa (f); en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido y el CTO y el HO forman el híbrido, proporcionando de ese modo una señal del único marcador sobre el sustrato sólido; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente en la muestra de ácido nucleico, se forma el dúplex extendido para impedir la formación del híbrido entre el CTO y el HO, no proporcionando de ese modo la señal del único marcador sobre el sustrato sólido; y

60 (f) detectar la señal sobre el sustrato sólido para detectar el híbrido entre el CTO y el HO sobre el sustrato sólido; en el que la presencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la ausencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

El segundo aspecto de esta invención se basa en un enfoque PCE-NH (sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO) como el primer aspecto de esta invención. El segundo aspecto de esta invención se caracteriza porque uno del CTO y el HO se marca con un único marcador y el otro no marcado se inmoviliza sobre un sustrato sólido o va a quedar inmovilizado sobre un sustrato sólido antes de la detección de la señal en la etapa (f), y puede detectarse una señal a una temperatura predeterminada.

El segundo aspecto de esta invención puede considerarse como una versión modificada del enfoque PCE-NH para la realización eficaz de la detección de dianas usando un sustrato sólido y un único marcador en el que la señal del único marcador se genera sobre el sustrato sólido en ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana y la señal del único marcador se extingue o disminuye sobre el sustrato sólido en presencia de la secuencia de ácido nucleico diana mediante el uso de una combinación de dos oligonucleótidos, el CTO y el HO. Para lograr que uno del CTO y el HO se marque con un único marcador y el otro no marcado se inmovilice sobre un sustrato sólido o quede inmovilizado sobre un sustrato sólido antes de la detección de la señal en la etapa (f) y la señal del marcador se detecte a la temperatura adecuada para la hibridación entre el CTO y el HO.

Como el primer aspecto de esta invención, el segundo aspecto también puede aplicarse para detectar una secuencia de ácido nucleico diana incluso cuando el HO no se escinda (es decir, la hibridación entre el HO y el CTO se inhibe mediante la formación del dúplex extendido) así como cuando el HO se escinda.

El segundo aspecto del ensayo PCE-NH sobre una fase sólida se describirá en más detalle tal como sigue:

Etapa (a): Hibridación de un oligonucleótido en el sentido de 5' y un PTO con una secuencia de ácido nucleico diana

La etapa (a) puede describirse con referencia a las descripciones para la etapa (a) del primer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión o hibridación.

Etapa (b): Liberación de un fragmento a partir de la escisión del PTO

La etapa (b) puede describirse con referencia a las descripciones para la etapa (b) del primer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión o hibridación.

Etapa (c): Hibridación del fragmento liberado del PTO con CTO

La etapa (c) puede describirse con referencia a las descripciones para la etapa (c) del primer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión o hibridación.

Etapa (d): Extensión del fragmento

La etapa (d) puede describirse con referencia a las descripciones para la etapa (d) del primer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión o hibridación.

Etapa (e): Hibridación del dúplex extendido con HO

Tras la reacción de extensión, el resultante de la etapa (d) se hibrida con un HO (oligonucleótido de hibridación) que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO en condiciones adecuadas para la hibridación entre el CTO y el HO. Uno del CTO y el HO se marca con un único marcador y el otro no marcado se inmoviliza sobre un sustrato sólido o va a quedar inmovilizado sobre un sustrato sólido antes de la detección de la señal en la etapa (f).

El segundo aspecto de la presente invención se caracteriza porque el oligonucleótido marcado una sola vez no se inmoviliza sobre el sustrato sólido y proporciona señales sobre el sustrato sólido sólo cuando se hibrida con el oligonucleótido inmovilizado sobre el sustrato sólido.

Cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido y el CTO y el HO forman el híbrido, proporcionando de ese modo una señal del único marcador sobre el sustrato sólido. Cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente en la muestra de ácido nucleico, se forma el dúplex extendido para impedir la formación del híbrido entre el CTO y el HO, no proporcionando de ese modo la señal del único marcador sobre el sustrato sólido. Según una realización, la etapa de lavado se realiza entre la etapa (e) para la hibridación del HO con el resultante de la etapa (d) y la etapa (f) para la detección de la señal. Según una realización, es necesario que uno del CTO o HO se inmovilice sobre el sustrato antes del lavado.

Alternativamente, la etapa de lavado no se requiere. Usando dispositivos de detección confocales sobre una fase sólida, puede detectarse la señal que existe sólo sobre el sustrato sólido sin influencia de la señal de los marcadores presentes en una disolución de reacción.

Los detalles del HO pueden describirse con referencia a las descripciones para el HO para el primer aspecto del

ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión o hibridación.

Según una realización, el CTO tiene el único marcador y el HO se inmoviliza sobre el sustrato sólido o va a quedar inmovilizado sobre el sustrato sólido antes de la detección de la señal en la etapa (f) (por ejemplo, las figuras 8-9 y 12). Alternativamente, el HO tiene el único marcador y el CTO se inmoviliza sobre el sustrato sólido o va a quedar inmovilizado sobre el sustrato sólido antes de la detección de la señal en la etapa (f) (por ejemplo, las figuras 10-11 y 13).

Según una realización, el único marcador puede ser cualquier marcador.

El único marcador incluye, pero no se limita a, un marcador químico (por ejemplo, biotina), un marcador enzimático (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa, β -galactosidasa y β -glucosidasa), un marcador de radioisótopo (por ejemplo, I^{125} y C^{14}), un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador quimioluminiscente y un marcador de metal (por ejemplo, oro).

En el presente método, el HO o el CTO tiene un único marcador; en el que el único marcador está situado en un sitio tal que una señal del único marcador en el caso de la formación del híbrido entre el CTO y el HO es diferente de una señal del único marcador en el caso de no formación del híbrido entre el CTO y el HO.

La figura 8 ilustra el segundo aspecto de esta invención que usa el CTO que tiene un único marcador y el HO inmovilizado. Cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente en la muestra de ácido nucleico, se forma el dúplex extendido para impedir la formación del híbrido entre el CTO y el HO, no proporcionando de ese modo la señal del único marcador del CTO sobre el sustrato sólido. Cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido y el CTO y el HO forman el híbrido, proporcionando de ese modo una señal del único marcador del CTO sobre el sustrato sólido.

Los detalles en cuanto a la prevención de la formación del híbrido entre el CTO y el HO mediante el dúplex extendido pueden describirse también con referencia a las descripciones sobre ese tema para el primer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión o hibridación.

Por ejemplo, cuando el CTO y el HO se ponen en contacto por primera vez entre sí en la etapa (e) (por ejemplo, realizando las etapas (a)-(d) y (e)-(f) en recipientes de reacción separados), la presente invención puede llevarse a cabo tal como se representa en las figuras 8 y 10. El HO no se pone en contacto con el CTO antes de la extensión del fragmento de PTO sino que está implicado en la hibridación con el resultante de la reacción de extensión. En la etapa (e), la formación del dúplex extendido impide la formación del híbrido del CTO/HO debido a la inhibición de la hibridación del HO con el CTO.

Cuando el CTO y el HO se ponen en contacto entre sí en la etapa (d) (por ejemplo, realizando las etapas (a)-(f) en un único recipiente de reacción), la presente invención puede llevarse a cabo tal como se representa en las figuras 9 y 11. El HO puede hibridarse con el CTO antes de la extensión y estar implicado en la reacción de extensión. Cuando el HO se hibrida con el CTO antes de la extensión del fragmento, la extensión del fragmento escinde o desplaza el HO del CTO. Particularmente, cuando el HO se escinde durante la reacción de extensión, la formación del dúplex extendido impide la formación del híbrido del CTO/HO en la etapa (e) debido al consumo del HO mediante la escisión.

Incluso si el CTO y el HO tienen la posibilidad de entrar en contacto entre sí en la etapa (d), algunos de los HO pueden no hibridarse incluso con el CTO antes de la extensión. En tal caso, los HO pueden no formar el híbrido con el CTO en la etapa (e) debido a la inhibición de la hibridación del HO con el CTO.

Sin consideración de la etapa en la que el HO se pone en contacto por primera vez con el CTO, se forma el dúplex extendido para impedir la formación del híbrido entre el CTO y el HO en presencia de la secuencia de ácido nucleico diana mediante los siguientes modos (i) la inhibición de la hibridación del HO con el CTO y/o (ii) el consumo del HO mediante la escisión.

En ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana, no se forma el dúplex extendido y se forma por tanto el híbrido entre el CTO y el HO.

Según una realización, la etapa (d) se realiza en presencia de los HO y los HO se hibridan con el CTO y/o no se hibridan con el CTO. Según una realización, la etapa (d) se realiza en presencia de los HO; en el que (i) el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende antes de la hibridación del HO y/o (ii) cuando el HO se hibrida con el CTO antes de la extensión del fragmento, la extensión del fragmento escinde o desplaza el HO del CTO, de ese modo la formación del dúplex extendido impide la formación del híbrido entre el CTO y el HO en la etapa (f) debido a la inhibición de la hibridación del HO con el CTO y/o el consumo del HO mediante la escisión.

El HO comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO. La secuencia de nucleótidos del HO puede diseñarse para que comprenda una complementaria a una región de CTO distinta de la región que va

a hibridarse con el fragmento de PTO. En una determinada realización, el HO puede diseñarse para que comprenda una secuencia de nucleótidos que es competitiva con el fragmento (o PTO no escindido) en cuanto a la hibridación con el CTO (véanse las figuras 12 y 13). Específicamente, tal HO competitivo no se escinde mediante el fragmento o su producto de extensión.

5 Los detalles en cuanto al HO competitivo también pueden describirse con referencia a las descripciones sobre ese tema para el primer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión o hibridación.

10 Según una realización, uno del CTO y HO se inmoviliza sobre un sustrato sólido entre la etapa (d) y la etapa (e) o entre la etapa (e) y la etapa (f).

Etapa (f): Detección de la señal que indica la presencia del híbrido de CTO/HO

15 Finalmente, se detecta la señal sobre el sustrato sólido para detectar el híbrido entre el CTO y el HO sobre el sustrato sólido. La presencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana, y la ausencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

20 Según una realización, una señal en el caso de la presencia de secuencias diana es diferente de una señal en el caso de la ausencia de secuencias diana. Cuando se detecta la secuencia diana mediante el presente método, tal diferencia de señal incluye diferencias en la intensidad de la señal. En una realización, tal diferencia de señal es de al menos el 10%, al menos el 30%, al menos el 50%, al menos el 70% o al menos el 90%.

25 La presente invención se caracteriza porque uno del CTO y el HO se marca con un único marcador y el otro no marcado se inmoviliza sobre un sustrato sólido o va a quedar inmovilizado sobre un sustrato sólido antes de la detección de la señal en la etapa (f). El enfoque de la presente invención de que la señal del único marcador se genera sobre el sustrato sólido en ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana y la señal del único marcador se extingue o disminuye sobre el sustrato sólido en presencia de la secuencia de ácido nucleico diana se hace práctica mediante tal combinación de los dos oligonucleótidos.

30 Según una realización, la detección de la señal sobre el sustrato sólido se realiza midiendo la señal sobre el sustrato sólido a una temperatura predeterminada en la que el híbrido entre el CTO y el HO mantiene su forma bicatenaria.

35 La detección de la etapa (f) puede realizarse de una manera en tiempo real, una manera de punto final o una manera de intervalo de tiempo predeterminado. Cuando la presente invención comprende además la repetición de todas o algunas de las etapas (a)-(f) con desnaturalización entre ciclos de repetición, la detección de la señal puede realizarse para cada ciclo de la repetición a una temperatura predeterminada (es decir, una manera en tiempo real), al final de la repetición a una temperatura predeterminada (es decir, una manera de punto final) o en cada uno de los intervalos de tiempo predeterminados durante la repetición a una temperatura predeterminada.

40 Según una realización, la detección de la señal sobre el sustrato sólido se realiza mediante un análisis de fusión o hibridación a lo largo de un intervalo de temperaturas. Los detalles del análisis de fusión o hibridación pueden describirse con referencia a las descripciones para el análisis de fusión o hibridación para el primer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión o hibridación.

45 La detección de señales puede realizarse según métodos convencionales tales como fluorómetros de sobremesa, lectores de placas de múltiples pocillos de fluorescencia, fluorómetros de fibra óptica, microscopios de fluorescencia y microchips/sistemas microfluídicos acoplados con detección de fluorescencia.

50 Según una realización, el método se realiza sin el uso del oligonucleótido en el sentido de 5' y la escisión del PTO en la etapa (b) se produce sin la ayuda del oligonucleótido en el sentido de 5' o su cadena extendida. La realización que usa actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en el sentido de 5' se describe en más detalle tal como sigue:

55 *Detección de dianas mediante un ensayo PCE-NH basado en actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en el sentido de 5'*

60 En un aspecto adicional de esta invención, se proporciona un método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra de ácido nucleico sobre una fase sólida mediante un ensayo PCE-NH (sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO), que comprende:

65 (a) hibridar la secuencia de ácido nucleico diana con un PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado); en el que el PTO comprende (i) una porción de direccionamiento en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) una porción de etiquetado en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la porción de direccionamiento en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y la porción de etiquetado en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana;

(b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una enzima que tiene una actividad nucleasa 5' en condiciones para la escisión del PTO; en el que el PTO hibridado con el ácido nucleico diana se escinde mediante la enzima que tiene la actividad nucleasa 5' de manera que la escisión libera un fragmento que comprende la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO;

(c) hibridar el fragmento liberado del PTO con un CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde); en el que el CTO comprende en una dirección de 3' a 5' (i) una porción de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO y (ii) una porción de formación de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la porción de etiquetado en 5' y la porción de direccionamiento en 3' del PTO; en el que el fragmento liberado del PTO se hibrida con la porción de captura del CTO;

(d) realizar una reacción de extensión usando el resultante de la etapa (c) y una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende para producir una cadena extendida complementaria a la porción de formación de molde del CTO y se forma un dúplex extendido; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido;

(e) hibridar el resultante de la etapa (d) con un HO (oligonucleótido de hibridación) que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO en condiciones adecuadas para la hibridación entre el CTO y el HO; en el que uno del CTO y el HO se marca con un único marcador y el otro no marcado se inmoviliza sobre un sustrato sólido o va a quedar inmovilizado sobre un sustrato sólido inmediatamente antes de la detección de la señal en la etapa (f); en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido y el CTO y el HO forman el híbrido, proporcionando de ese modo una señal del único marcador sobre el sustrato sólido; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente en la muestra de ácido nucleico, se forma el dúplex extendido para impedir la formación del híbrido entre el CTO y el HO, no proporcionando de ese modo la señal del único marcador sobre el sustrato sólido; y

(f) detectar la señal sobre el sustrato sólido para detectar el híbrido entre el CTO y el HO sobre el sustrato sólido; en el que la presencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la ausencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

Puesto que el presente método basado en actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en el sentido de 5' es el mismo que el segundo aspecto del ensayo PCE-NH que usa oligonucleótidos en el sentido de 5' excepto por la ausencia de uso de oligonucleótidos en el sentido de 5', las descripciones comunes entre ellos se omiten con el fin de evitar una redundancia excesiva que conduzca a la complejidad de esta memoria descriptiva.

Para el presente método, pueden usarse enzimas convencionales que tienen actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en el sentido de 5'. Entre las polimerasas dependientes de molde que tienen actividad nucleasa 5', hay varias enzimas que tienen actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en el sentido de 5', por ejemplo, *Taq* ADN polimerasa.

Kits para la detección de dianas

En un aspecto adicional de esta invención, se proporciona un kit para detectar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra de ácido nucleico sobre una fase sólida mediante un ensayo PCE-NH (sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO), que comprende:

(a) un oligonucleótido en el sentido de 5'; en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana;

(b) un PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado); en el que el PTO comprende (i) una porción de direccionamiento en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) una porción de etiquetado en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la porción de direccionamiento en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y la porción de etiquetado en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana; el oligonucleótido en el sentido de 5' está ubicado en el sentido de 5' del PTO; en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' o su cadena extendida induce la escisión del PTO mediante la enzima que tiene la actividad nucleasa 5' de manera que la escisión libera un fragmento que comprende la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO;

(c) un CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde); en el que el CTO comprende en una dirección de 3' a 5' (i) una porción de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de

etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO y (ii) una porción de formación de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la porción de etiquetado en 5' y la porción de direccionamiento en 3' del PTO; en el que el fragmento liberado del PTO se hibrida con la porción de captura del CTO; en el que el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende para producir una cadena extendida complementaria a la porción de formación de molde del CTO y se forma un dúplex extendido; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido; y

(d) un HO (oligonucleótido de hibridación) que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO;

en el que uno del CTO y el HO se marca con un único marcador y el otro no marcado se inmoviliza sobre un sustrato sólido o va a quedar inmovilizado sobre un sustrato sólido inmediatamente antes de la detección de una señal del único marcador; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente en la muestra de ácido nucleico, se forma el dúplex extendido para impedir la formación del híbrido entre el CTO y el HO, no proporcionando de ese modo la señal del único marcador sobre el sustrato sólido; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido y el CTO y el HO forman el híbrido, proporcionando de ese modo una señal del único marcador sobre el sustrato sólido.

Puesto que el kit de esta invención se construye para realizar el método de detección de la presente invención descrito anteriormente, las descripciones comunes entre ellos se omiten con el fin de evitar una redundancia excesiva que conduzca a la complejidad de esta memoria descriptiva.

III. Tercer aspecto del procedimiento de detección de dianas mediante un ensayo PCE-NH

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra de ácido nucleico mediante un ensayo PCE-NH (sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO), que comprende:

(a) hibridar la secuencia de ácido nucleico diana con un oligonucleótido en el sentido de 5' y un PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado); en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; el PTO comprende (i) una porción de direccionamiento en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) una porción de etiquetado en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la porción de direccionamiento en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y la porción de etiquetado en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana; el oligonucleótido en el sentido de 5' está ubicado en el sentido de 5' del PTO;

(b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una enzima que tiene una actividad nucleasa 5' en condiciones para la escisión del PTO; en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' o su cadena extendida induce la escisión del PTO mediante la enzima que tiene la actividad nucleasa 5' de manera que la escisión libera un fragmento que comprende la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO;

(c) hibridar el fragmento liberado del PTO con un CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde); en el que el CTO comprende en una dirección de 3' a 5' (i) una porción de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO y (ii) una porción de formación de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la porción de etiquetado en 5' y la porción de direccionamiento en 3' del PTO; en el que el fragmento liberado del PTO se hibrida con la porción de captura del CTO;

(d) realizar una reacción de extensión usando el resultante de la etapa (c) y una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende para producir una cadena extendida complementaria a la porción de formación de molde del CTO y se forma un dúplex extendido; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido;

(e) hibridar el resultante de la etapa (d) con un HO (oligonucleótido de hibridación) que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO en condiciones adecuadas para la hibridación entre el CTO y el HO; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido y el CTO y el HO forman un híbrido, proporcionando de ese modo una primera señal indicativa de la presencia del híbrido entre el CTO y el HO; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente en la muestra de ácido nucleico, el dúplex extendido inhibe la hibridación del HO con el CTO, proporcionando de ese modo una segunda señal indicativa de la presencia de HO no hibridado con CTO; en el que las señales se proporcionan mediante (i) un marcador unido al HO, (ii) un

marcador unido al CTO, (iii) un marcador unido al HO y un marcador unido al CTO, o (iv) un marcador de intercalación; y

(f) detectar la primera señal o la segunda señal a una temperatura predeterminada a la que el híbrido entre el CTO y el HO mantiene su forma bicatenaria; en el que la presencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la ausencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la diferencia en la primera señal y la segunda señal permite determinar la presencia o ausencia del híbrido entre el CTO y el HO para indicar la presencia o ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra de ácido nucleico.

El tercer aspecto de esta invención se basa en un enfoque PCE-NH (sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO) como el primer aspecto de esta invención. Sin embargo, el tercer aspecto de esta invención se caracteriza porque se centra en el fenómeno de que el dúplex extendido en presencia de la secuencia de ácido nucleico diana inhibe la hibridación del HO con el CTO y que la señal se detecta a una temperatura predeterminada.

Los presentes inventores han encontrado que la formación del dúplex extendido induce la inhibición de la hibridación del HO con el CTO dando como resultado la no formación del híbrido de CTO/HO incluso cuando el HO no se escinda, lo que puede aplicarse satisfactoriamente a la detección de una secuencia de ácido nucleico diana. Con el uso del principio subyacente, la presente invención requiere que una señal en el caso de que el HO no se escinda para mantenerse como una forma monocatenaria sea diferente de una señal en el caso de que el HO forme el híbrido de CTO/HO.

Debido a que la presente invención no requiere necesariamente la escisión del HO en la extensión del fragmento de PTO, la extensión del fragmento de PTO (es decir, etapas (a)-(d)) y la hibridación entre el HO y el CTO y la detección (es decir, etapas (e)-(f)) pueden realizarse por separado. Cuando se usa el HO que tiene un marcador doble interactivo y está presente una secuencia de ácido nucleico diana, una señal de la escisión del HO muestra un perfil diferente de manera diferencial de una señal de la inhibición de la hibridación de HO intacto con el CTO.

El término "inhibir la hibridación del HO con el CTO" usado en el presente documento con referencia al dúplex extendido significa que la cadena extendida en el dúplex extendido inhibe la unión (o el apareamiento) del HO no escindido o intacto con el CTO. El término "inhibir la hibridación del HO con el CTO" puede considerarse como una realización restringida del término "impedir la formación del híbrido entre el CTO y el HO".

Por consiguiente, el tercer aspecto de esta invención requiere necesariamente la aparición de inhibición de la hibridación del HO con el CTO. Tal como se comenta a continuación, tal requisito no excluye la aparición de impedimento de la formación del híbrido entre el CTO y el HO mediante escisión o desplazamiento del HO mediante la cadena extendida.

El tercer aspecto del ensayo PCE-NH se describirá en más detalle tal como sigue:

Etapa (a): Hibridación de un oligonucleótido en el sentido de 5' y un PTO con una secuencia de ácido nucleico diana

La etapa (a) puede describirse con referencia a las descripciones para la etapa (a) del primer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión o hibridación.

Etapa (b): Liberación de un fragmento a partir de la escisión del PTO

La etapa (b) puede describirse con referencia a las descripciones para la etapa (b) del primer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión o hibridación.

Etapa (c): Hibridación del fragmento liberado del PTO con CTO

La etapa (c) puede describirse con referencia a las descripciones para la etapa (c) del primer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión o hibridación.

Etapa (d): Extensión del fragmento

La etapa (d) puede describirse con referencia a las descripciones para la etapa (d) del primer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión o hibridación.

Etapa (e): Hibridación del dúplex extendido con HO

Tras la reacción de extensión, el resultante de la etapa (d) se hibrida con un HO (oligonucleótido de hibridación) que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO en condiciones adecuadas para la hibridación entre el CTO y el HO.

Cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido y el CTO y el HO forman un híbrido, proporcionando de ese modo una primera señal indicativa de la presencia del híbrido entre el CTO y el HO. Cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente en la muestra de ácido nucleico, el dúplex extendido inhibe la hibridación del HO con el CTO, proporcionando de ese modo una segunda señal indicativa de la presencia de HO no hibridado con CTO.

La hibridación entre el CTO y el HO puede producirse por primera vez en la etapa (e). Alternativamente, la hibridación entre el CTO y el HO puede producirse por primera vez en la etapa (d). En una determinada realización, la etapa (d) se realiza en presencia de los HO; en el que (i) el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende antes de la hibridación del HO y/o (ii) cuando el HO se hibrida con el CTO antes de la extensión del fragmento, la extensión del fragmento escinde o desplaza el HO del CTO.

Se forma el dúplex extendido para impedir la formación del híbrido entre el CTO y el HO en presencia de la secuencia de ácido nucleico diana mediante los siguientes modos (i) la inhibición de la hibridación del HO con el CTO y/o (ii) el consumo del HO mediante la escisión.

El presente método se caracteriza porque usa el cambio de señal proporcionado por la inhibición de la hibridación del HO no escindido o intacto con el CTO. En la presente invención, la señal proporcionada en el caso de que el HO se hibride con el CTO es diferente de la señal proporcionada en el caso de que la hibridación del HO no escindido o intacto con el CTO se inhiba mediante el dúplex extendido a la temperatura predeterminada adecuada para la hibridación entre el CTO y el HO.

Cuando se realiza la etapa (d) en presencia de los HO, algunos HO pueden escindirse durante la extensión del fragmento de PTO y puede coexistir una señal proporcionada de la escisión.

Los detalles del HO pueden describirse con referencia a las descripciones para el HO para el primer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión o hibridación.

El HO comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO. La secuencia de nucleótidos del HO puede diseñarse para que comprenda una región complementaria a una región de CTO distinta de una región que va a hibridarse con el fragmento de PTO. Alternativamente, el HO puede comprender una secuencia de nucleótidos que es competitiva con el fragmento en cuanto a la hibridación con el CTO (véanse las figuras 17 y 18). Específicamente, tal HO competitivo no se escinde mediante el fragmento o su producto de extensión.

Las señales primera y segunda se proporcionan mediante (i) un marcador unido al HO, (ii) un marcador unido al CTO, (iii) un marcador unido al HO y un marcador unido al CTO, o (iv) un marcador de intercalación.

Según una realización de la presente invención, siempre que una señal proporcionada en el caso de que el CTO y el HO estén asociados para formar un híbrido sea diferente de una señal proporcionada en el caso de que el CTO y el HO estén disociados uno de otro, pueden adoptarse diversos tipos y ubicaciones de marcadores en la presente invención.

El término "el HO" usado en el presente documento conjuntamente con la expresión "el CTO y el HO estén disociados uno de otro" se refiere a un HO no escindido o intacto.

Según una realización, el HO o el CTO tiene un marcador doble interactivo que comprende una molécula indicadora y una molécula extintora; en el que el marcador doble interactivo está situado en un sitio tal que una señal del marcador doble interactivo en el caso de que el CTO y el HO estén asociados para formar un híbrido es diferente de una señal del marcador doble interactivo en el caso de que el CTO y el HO estén disociados uno de otro (véanse las figuras 14 y 17).

Cuando se usa el HO que tiene un marcador doble interactivo, una señal de la escisión del HO muestra un patrón diferente de manera diferencial de una señal de la inhibición de la hibridación entre el HO y el CTO.

Cuando el HO está en un estado monocatenario, la molécula indicadora y la molécula extintora en el HO están adyacentes conformacionalmente entre sí para permitir que la molécula extintora extinga la señal de la molécula indicadora. Cuando la secuencia de ácido nucleico diana está ausente y se forma el híbrido de CTO/HO, la molécula indicadora y la molécula extintora en el HO están separadas conformacionalmente para permitir que la molécula extintora no extinga la señal de la molécula indicadora.

Cuando está presente la secuencia de ácido nucleico diana, la formación dependiente de diana del dúplex extendido inhibe la hibridación del HO con el CTO, permitiendo de ese modo que el HO esté en un estado monocatenario, dando como resultado la extinción de la señal de la molécula indicadora. El número de los HO en una única cadena aumenta tras el aumento del número del dúplex extendido, y a su vez la intensidad de señal finalmente detectada muestra patrones disminuidos.

Mientras tanto, cuando está presente la secuencia de ácido nucleico diana, el HO hibridado con el CTO puede escindirse durante la extensión del fragmento de PTO. La escisión provoca que la molécula indicadora y la molécula extintora se separen permanentemente, lo que da como resultado que no se extinga perfectamente la señal de la molécula indicadora. La magnitud de la no extinción mediante escisión del HO es mayor que la magnitud de la no extinción mediante la hibridación del HO con el CTO. Por tanto, cuando se detecta la señal proporcionada mediante escisión del HO, la intensidad de la señal muestra patrones aumentados con el aumento del número de los HO escindidos.

Aunque pueden coexistir ambas situaciones incluyendo la inhibición de la hibridación entre el HO intacto y el CTO y la escisión del HO, el patrón de señal puede proporcionarse dependiendo de una situación prevalente.

Según una realización, el HO tiene uno de un marcador doble interactivo que comprende una molécula indicadora y una molécula extintora y el CTO tiene el otro del marcador doble interactivo; en el que el marcador doble interactivo está situado en un sitio tal que una señal del marcador doble interactivo en el caso de que el CTO y el HO estén asociados para formar un híbrido es diferente de una señal del marcador doble interactivo en el caso de que el CTO y el HO estén disociados uno de otro (véanse las figuras 15 y 18).

En una determinada realización, el presente método se realiza usando un HO adicional que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO y los dos HO se hibridan con el CTO de una manera adyacente entre sí; en el que uno de los dos HO tiene uno de un marcador doble interactivo que comprende una molécula indicadora y una molécula extintora y el otro de los dos HO tiene el otro del marcador doble interactivo; en el que el marcador doble interactivo está situado en un sitio tal que una señal del marcador doble interactivo en el caso de que el CTO y los dos HO estén asociados para formar un híbrido es diferente de una señal del marcador doble interactivo en el caso de que el CTO y los dos HO estén disociados uno de otro.

Según una realización, el HO o el CTO tiene un único marcador; en el que el único marcador está situado en un sitio tal que una señal del único marcador en el caso de que el CTO y el HO estén asociados para formar un híbrido es diferente de una señal del único marcador en el caso de que el CTO y el HO estén disociados uno de otro (véase la figura 16).

Los detalles (incluyendo el mecanismo de señalización y las posiciones del marcador, y así sucesivamente) de los sistemas de marcaje pueden describirse con referencia a las descripciones para los sistemas de marcaje para el primer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión o hibridación.

Etapa (f): Detección de la primera o segunda señal a una temperatura predeterminada

Finalmente, se detecta la primera señal o la segunda señal a una temperatura predeterminada a la que el híbrido entre el CTO y el HO mantiene su forma bicatenaria.

La presencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana y la ausencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana. La diferencia en la primera señal y la segunda señal permite determinar la presencia o ausencia del híbrido entre el CTO y el HO para indicar la presencia o ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra de ácido nucleico.

Según una realización, la primera señal y la segunda señal se discriminan mediante un fenómeno tal como generación de señal y distinción de señal.

Según una realización, la primera señal y la segunda señal se discriminan mediante un fenómeno tal como el cambio de intensidad (aumento de señal y disminución de señal).

Según una realización, la señal en el caso de la presencia de secuencias diana es diferente de la señal en el caso de la ausencia de secuencias diana. Cuando la secuencia diana se detecta mediante el presente método, tal diferencia de señal incluye diferencias en la intensidad de la señal. En una realización, tal diferencia de señal es de al menos el 10%, al menos el 30%, al menos el 50%, al menos el 70% o al menos el 90%.

La temperatura a la que el híbrido entre el CTO y el HO mantiene su forma bicatenaria puede determinarse de manera rutinaria considerando los valores de T_m del CTO y el HO.

La detección de la etapa (f) puede realizarse de una manera en tiempo real, una manera de punto final o una manera de intervalo de tiempo predeterminado. Cuando la presente invención comprende además la repetición de todas o algunas de las etapas (a)-(f) con desnaturalización entre ciclos de repetición, la detección de la señal puede realizarse para cada ciclo de la repetición a una temperatura predeterminada (es decir, una manera en tiempo real), al final de la repetición a una temperatura predeterminada (es decir, una manera de punto final) o en cada uno de los intervalos de tiempo predeterminados durante la repetición a una temperatura predeterminada.

Según una realización, el método se realiza usando un grupo de control que no tiene una secuencia de ácido

nucleico diana o una cantidad predeterminada de la secuencia de ácido nucleico diana.

La presente invención puede llevarse a cabo o bien en una fase líquida o bien sobre una fase sólida.

5 Detección de dianas sobre una fase sólida

Según una realización, la presente invención se realiza sobre la fase sólida, y uno del CTO y HO se inmoviliza sobre el sustrato sólido o va a quedar inmovilizado sobre un sustrato sólido antes de la detección de la señal en la etapa (f) y la señal se detecta sobre el sustrato sólido.

10 Según una realización, uno del CTO y HO se inmoviliza sobre un sustrato sólido entre la etapa (d) y la etapa (e) o entre la etapa (e) y la etapa (f).

15 Los detalles de la detección de la diana sobre una fase sólida para el tercer aspecto se describirán con referencia a las descripciones para el primer aspecto del ensayo PCE-NH que comprende análisis de fusión o hibridación.

20 Según una realización, el método se realiza sin el uso del oligonucleótido en el sentido de 5' y la escisión del PTO en la etapa (b) se produce sin la ayuda del oligonucleótido en el sentido de 5' o su cadena extendida. La realización que usa actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en el sentido de 5' se describe en más detalle tal como sigue:

Detección de dianas mediante un ensayo PCE-NH basado en actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en el sentido de 5'

25 En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra de ácido nucleico mediante un ensayo PCE-NH (sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO), que comprende:

30 (a) hibridar la secuencia de ácido nucleico diana con un PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado); en el que el PTO comprende (i) una porción de direccionamiento en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) una porción de etiquetado en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la porción de direccionamiento en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y la porción de etiquetado en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana;

35 (b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una enzima que tiene una actividad nucleasa 5' en condiciones para la escisión del PTO; en el que el PTO hibridado con el ácido nucleico diana se escinde mediante la enzima que tiene la actividad nucleasa 5' de manera que la escisión libera un fragmento que comprende la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO;

40 (c) hibridar el fragmento liberado del PTO con un CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde); en el que el CTO comprende en una dirección de 3' a 5' (i) una porción de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO y (ii) una porción de formación de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la porción de etiquetado en 5' y la porción de direccionamiento en 3' del PTO; en el que el fragmento liberado del PTO se hibrida con la porción de captura del CTO;

45 (d) realizar una reacción de extensión usando el resultante de la etapa (c) y una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende para producir una cadena extendida complementaria a la porción de formación de molde del CTO y se forma un dúplex extendido; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido;

50 (e) hibridar el resultante de la etapa (d) con un HO (oligonucleótido de hibridación) que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO en condiciones adecuadas para la hibridación entre el CTO y el HO; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido y el CTO y el HO forman un híbrido, proporcionando de ese modo una primera señal indicativa de la presencia del híbrido entre el CTO y el HO; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente en la muestra de ácido nucleico, el dúplex extendido inhibe la hibridación del HO con el CTO, proporcionando de ese modo una segunda señal indicativa de la presencia de HO no hibridado con CTO; en el que las señales se proporcionan mediante (i) un marcador unido al HO, (ii) un marcador unido al CTO, (iii) un marcador unido al HO y un marcador unido al CTO, o (iv) un marcador de intercalación; y

65 (f) detectar la primera señal o la segunda señal a una temperatura predeterminada a la que el híbrido entre el CTO y el HO mantiene su forma bicatenaria; en el que la presencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la

ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la ausencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la diferencia en la primera señal y la segunda señal permite determinar la presencia o ausencia del híbrido entre el CTO y el HO para indicar la presencia o ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra de ácido nucleico.

5 Puesto que el presente método basado en actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en el sentido de 5' es el mismo que el tercer aspecto del ensayo PCE-NH que usa oligonucleótidos en el sentido de 5' excepto por la ausencia de uso de oligonucleótidos en el sentido de 5', las descripciones comunes entre ellos se omiten con el fin de evitar una redundancia excesiva que conduzca a la complejidad de esta memoria descriptiva.

10 Kit para la detección de dianas

En todavía otro aspecto de esta invención, se proporciona un kit para detectar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra de ácido nucleico mediante un ensayo PCE-NH (sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO), que comprende:

- 15 (a) un oligonucleótido en el sentido de 5'; en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana;
- 20 (b) un PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado); en el que el PTO comprende (i) una porción de direccionamiento en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) una porción de etiquetado en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la porción de direccionamiento en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y la porción de etiquetado en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana; el oligonucleótido en el sentido de 5' está ubicado en el sentido de 5' del PTO; en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' o su cadena extendida induce la escisión del PTO mediante la enzima que tiene la actividad nucleasa 5' de manera que la escisión libera un fragmento que comprende la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO;
- 25 (c) un CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde); en el que el CTO comprende en una dirección de 3' a 5' (i) una porción de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO y (ii) una porción de formación de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la porción de etiquetado en 5' y la porción de direccionamiento en 3' del PTO; en el que el fragmento liberado del PTO se hibrida con la porción de captura del CTO; en el que el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende para producir una cadena extendida complementaria a la porción de formación de molde del CTO y se forma un dúplex extendido; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido; y
- 30 (d) un HO (oligonucleótido de hibridación) que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO;
- 35
- 40

en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido y el CTO y el HO forman un híbrido, proporcionando de ese modo una primera señal indicativa de la presencia del híbrido entre el CTO y el HO; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente en la muestra de ácido nucleico, el dúplex extendido inhibe la hibridación del HO con el CTO, proporcionando de ese modo una segunda señal indicativa de la presencia de HO no hibridado con CTO; en el que el kit comprende además (i) un marcador unido al HO, (ii) un marcador unido al CTO, (iii) un marcador unido al HO y un marcador unido al CTO, o (iv) un marcador de intercalación.

50 Descripciones comunes para las presentes invenciones

Las descripciones comunes para los aspectos primero, segundo y tercero de la presente invención se describen tal como sigue:

55 El cebador, PTO, CTO y HO pueden estar compuestos por dNMP y/o NMP que se producen de manera natural. Alternativamente, el cebador, PTO, CTO y HO pueden estar compuestos por un nucleótido modificado o nucleótido no natural tal como PNA (ácido nucleico peptídico, véase la publicación PCT n.º WO 92/20702) y LNA (ácido nucleico bloqueado, véanse las publicaciones PCT n.ºs WO 98/22489, WO 98/39352 y WO 99/14226). El cebador, PTO, CTO y HO pueden comprender bases universales tales como desoxiinosina, inosina, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol y 5-nitroindol. El término "base universal" se refiere a una que puede formar pares de bases con cada una de las bases de ADN/ARN naturales con poca discriminación entre ellas.

65 Tal como se describió anteriormente, el PTO puede escindirse en un sitio ubicado en una dirección 3' separado del extremo 3' de la porción de etiquetado en 5' del PTO. El sitio de escisión puede estar ubicado en la parte de extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' del PTO. Cuando el fragmento de PTO comprende la parte de extremo 5'

de la porción de direccionamiento en 3' del PTO, un sitio del CTO hibridado con la parte de extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' puede comprender una base universal, secuencia degenerada o su combinación. Por ejemplo, si el PTO se escinde en un sitio ubicado en una dirección 3' separado del extremo 3' de la porción de etiquetado en 5' del PTO por un nucleótido, es ventajoso que la parte de extremo 5' de la porción de captura del CTO comprenda una base universal para la hibridación con el nucleótido. Si el PTO se escinde en un sitio ubicado en una dirección 3' separado del extremo 3' de la porción de etiquetado en 5' del PTO por dos nucleótidos, es ventajoso que el extremo 5' de la porción de captura del CTO comprenda una secuencia degenerada y su nucleótido adyacente en dirección 3' comprenda una base universal. Como tal, cuando la escisión del PTO se produce en diversos sitios de la parte de extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3', la utilización de bases universales y secuencias degeneradas en el CTO es útil. Además, cuando se usan los PTO que tienen la misma porción de etiquetado en 5' para examinar múltiples secuencias de ácido nucleico diana bajo inducción de escisión dependiente de extensión de cebador en el sentido de 5', pueden generarse los fragmentos de PTO que tienen diferentes partes de extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3'. En tales casos, se emplean de manera útil bases universales y secuencias degeneradas en el CTO. Las estrategias que usan bases universales y secuencias degeneradas en el CTO garantizan el uso de un tipo o tipos mínimos del CTO para examinar múltiples secuencias de ácido nucleico diana.

Según una realización, el presente método comprende además la repetición de todas o algunas de las etapas (a)-(f) con desnaturalización entre ciclos de repetición. Esta repetición permite amplificar la secuencia de ácido nucleico diana y/o la señal de la diana. Según una realización, pueden repetirse las etapas (a)-(b), (a)-(d) o (a)-(f) con desnaturalización. En una determinada realización, puede ajustarse opcionalmente el número de los ciclos de repetición. La desnaturalización puede llevarse a cabo mediante tecnologías convencionales, incluyendo, pero sin limitarse a, calentamiento, tratamiento con álcali, formamida, urea y glicoxal, métodos enzimáticos (por ejemplo, acción de helicasa), y proteínas de unión. Por ejemplo, la fusión puede lograrse calentando a una temperatura que oscila entre 80°C y 105°C. Se proporcionan métodos generales para lograr este tratamiento por Joseph Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001).

Según una realización, las etapas (a)-(f) se realizan en un recipiente de reacción o en recipientes de reacción separados. Por ejemplo, pueden realizarse las etapas (a)-(b), (c)-(d) y (e)-(f) en un único recipiente de reacción o recipientes de reacción separados. Por ejemplo, cuando las secuencias del PTO y CTO y las condiciones de reacción se determinan de manera que la hibridación entre la porción de direccionamiento en 3' del PTO y la secuencia de ácido nucleico diana puede realizarse en condiciones más rigurosas que la hibridación entre el fragmento de PTO y el CTO, pueden repetirse las etapas (a)-(b) sin emprenderse las etapas (c)-(f). Tras la repetición de las etapas (a)-(b), pueden realizarse las etapas (c)-(f).

En una determinada realización, pueden realizarse las etapas (a)-(d) y (e)-(f) en recipientes de reacción separados.

En una determinada realización, pueden repetirse las etapas (a)-(b) con desnaturalización.

Un experto en la técnica apreciaría que la repetición de determinadas etapas, la intervención de desnaturalización en la repetición, la realización por separado de determinada(s) etapa(s) y el punto de tiempo de la detección pueden variar ampliamente.

Según una realización, cuando se realiza la repetición con desnaturalización usando el cebador en el sentido de 5' para el PTO, la repetición se lleva a cabo en presencia de un cebador en el sentido de 3', particularmente según PCR. El uso del cebador en el sentido de 5' y el cebador en el sentido de 3' para el PTO puede amplificar la secuencia de ácido nucleico diana.

Según una realización, cuando la repetición se realiza con desnaturalización usando la sonda en el sentido de 5' para el PTO, la repetición se lleva a cabo en presencia de un cebador en el sentido de 3' para el PTO.

El término "muestra de ácido nucleico" usado en el presente documento se refiere a una muestra no biológica (por ejemplo, alimento, agua, aire, suelo y residuos) o una muestra biológica que contiene moléculas de ácido nucleico. La muestra biológica puede derivarse de un animal, una planta, un ser humano, un hongo, una bacteria y un virus. La muestra biológica puede ser una célula, tejido o un fluido de una fuente biológica, sangre, plasma, suero, suero, plasma, linfa, leche, orina, heces, fluido ocular, saliva, semen, extractos cerebrales, líquido cefalorraquídeo, extractos de tejido de apéndice, bazo y amígdala.

La presente invención no requiere que las secuencias de ácido nucleico diana que van a detectarse y/o amplificarse tengan ninguna longitud o secuencia particular, incluyendo cualquier molécula de ADN (ADNg y ADNc) y ARN. La secuencia de ácido nucleico diana puede ser mono o bicatenaria.

Cuando se emplea un ARNm como material de partida, es necesaria una etapa de transcripción inversa antes de realizar la etapa de apareamiento, detalles de la cual se encuentran en Joseph Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); y Noonan, K. F. *et al.*,

Nucleic Acids Res. 16:10366 (1988). Para la transcripción inversa, puede usarse un hexámero al azar o un cebador de oligonucleótido dT que puede hibridarse con ARNm.

5 Las secuencias de ácido nucleico diana que pueden detectarse y/o amplificarse incluyen cualquier ácido nucleico procariota, eucariota (por ejemplo, protozoos y parásitos, hongos, levaduras, plantas superiores, animales inferiores y superiores, incluyendo mamíferos y seres humanos) o viral (por ejemplo, virus del herpes, VIH, virus influenza, virus de Epstein-Barr, virus de la hepatitis, virus de la polio, etc.) o de viroide que se produzca de manera natural.

10 La secuencia de ácido nucleico diana que va a detectarse mediante la presente invención incluye una amplia variedad de secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, secuencias en un genoma, secuencias fragmentadas o aisladas artificialmente y secuencias sintetizadas (por ejemplo, secuencias de ADNc y secuencias de código de barras). Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico diana incluye secuencias de marcador de ácido nucleico para inmuno-PCR (IPCR). IPCR emplea conjugados entre secuencias de marcador de ácido nucleico y anticuerpos junto con PCR, que se aplica ampliamente para detectar diversos tipos de dianas incluyendo proteínas (véanse Sano *et al.*, Science 258 págs.:120-122(1992), patente estadounidense n.º 5.665.539, Niemeyer *et al.*, Trends in Biotechnology 23 págs.:208-216(2005), publicación de patente estadounidense n.º 2005/0239108 y Ye *et al.*, Journal of Environmental Science 22 págs.:796-800(2010)).

20 La molécula de ácido nucleico diana de la presente invención incluye marcadores de ácido nucleico tal como se usan en un método de IPCR y la presente invención puede aplicarse para detectar marcadores de ácido nucleico en un método de IPCR.

25 La presente invención también es útil en la detección de una variación de nucleótido. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico diana comprende una variación de nucleótido. El término "variación de nucleótido" usado en el presente documento se refiere a cualquier sustitución, delección o inserción de un único o múltiples nucleótidos en una secuencia de ADN es una ubicación particular entre segmentos de ADN contiguos que por lo demás son similares en secuencia. Tales segmentos de ADN contiguos incluyen un gen o cualquier otra porción de un cromosoma. Estas variaciones de nucleótido pueden ser variaciones alélicas polimórficas o mutantes. Por ejemplo, la variación de nucleótido detectada en la presente invención incluye SNP (polimorfismo de un solo nucleótido), mutación, delección, inserción, sustitución y translocación. La variación de nucleótido ejemplificada incluye numerosas variaciones en un genoma humano (por ejemplo, variaciones en el gen de MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa)), variaciones implicadas en resistencia a fármacos de patógenos y variaciones que provocan tumorigénesis. El término variación de nucleótido usado en el presente documento incluye cualquier variación en una ubicación particular en una secuencia de ácido nucleico. En otras palabras, el término variación de nucleótido incluye un tipo natural y cualquier tipo mutante del mismo en una ubicación particular en una secuencia de ácido nucleico.

40 En la presente invención para la detección de una variación de nucleótido en una secuencia de ácido nucleico diana, cuando los cebadores o las sondas usados tienen una secuencia complementaria a la variación de nucleótido en la secuencia de ácido nucleico diana, la secuencia de ácido nucleico diana que contiene la variación de nucleótido se describe en el presente documento como molde coincidente. Cuando los cebadores o las sondas usados tienen una secuencia no complementaria a la variación de nucleótido en la secuencia de ácido nucleico diana, la secuencia de ácido nucleico diana que contiene la variación de nucleótido se describe en el presente documento como molde no coincidente.

45 Para la detección de variaciones de nucleótido, el extremo 3' del cebador en el sentido de 5' puede diseñarse para que esté opuesto a un sitio de una variación de nucleótido en una secuencia de ácido nucleico diana. Según una realización, el extremo 3' del cebador en el sentido de 5' tiene una secuencia complementaria a la variación de nucleótido en una secuencia de ácido nucleico diana. El extremo 3' del cebador en el sentido de 5' que tiene una secuencia complementaria a la variación de nucleótido en la secuencia de ácido nucleico diana se aparea con el molde coincidente y se extiende para inducir la escisión del PTO. El fragmento de PTO resultante se hibrida con el CTO y se extiende, y se produce la molécula de ácido nucleico para proporcionar la señal diana. En cambio, cuando el extremo 3' del cebador en el sentido de 5' se aparea de manera errónea con una variación de nucleótido en un molde no coincidente, no se extiende en condiciones en las que el apareamiento del extremo 3' de los cebadores es esencial para la extensión incluso cuando el cebador en el sentido de 5' se hibride con el molde no coincidente, dando como resultado de ese modo la no generación de la señal diana.

60 Alternativamente, es posible usar escisión del PTO dependiendo de la hibridación de PTO que tiene una secuencia complementaria a una variación de nucleótido en una secuencia de ácido nucleico diana. Por ejemplo, en las condiciones controladas, un PTO que tiene una secuencia complementaria a la variación de nucleótido en la secuencia de ácido nucleico diana se hibrida con el molde coincidente y luego se escinde. El fragmento de PTO resultante se hibrida con el CTO y se extiende para formar el dúplex extendido que impide la formación del híbrido entre el CTO y el HO, no proporcionando de ese modo la señal indicativa de la presencia del híbrido de CTO/HO. Mientras, en las condiciones controladas, el PTO no se hibrida con un molde no coincidente que tiene una secuencia no complementaria en la posición de variación de nucleótido y no se escinde. Preferiblemente, en este caso, la secuencia complementaria a la variación de nucleótido en el PTO se sitúa en el medio de la porción de

direccionamiento en 3' del PTO.

Según una realización, el uso de un nucleótido con apareamiento erróneo artificial mejora el potencial de discriminación del PTO con respecto a variaciones de nucleótido.

5 Alternativamente, la presente invención usa el PTO que tiene el sitio de discriminación de variación de nucleótido situado en la parte de extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' para la selectividad del PTO con respecto a una variación de nucleótido específica. La parte de extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' del PTO está situada con respecto a una variación de nucleótido en una secuencia de ácido nucleico diana para la detección de la
10 variación de nucleótido y la parte de extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' del PTO tiene una secuencia complementaria a la variación de nucleótido en una secuencia de ácido nucleico diana.

15 Cuando el PTO se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana (es decir, molde coincidente) que tiene la variación de nucleótido complementaria al sitio de discriminación de variación de nucleótido, la parte de extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' forma una doble cadena con el molde coincidente; sin embargo, cuando el PTO se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana (es decir, molde no coincidente) que tiene una variación de nucleótido no complementaria al sitio de discriminación de variación de nucleótido, la parte de extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' no forma una doble cadena con el molde no coincidente.

20 El término "sitio de discriminación de variación de nucleótido" usado en el presente documento con referencia al PTO es una secuencia complementaria en la parte de extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' del PTO a una variación de nucleótido en una secuencia de ácido nucleico diana.

25 Según una realización preferida, el sitio de discriminación de variación de nucleótido está ubicado separado del extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' del PTO por 10 nucleótidos, más preferiblemente 8 nucleótidos, todavía más preferiblemente 6 nucleótidos, todavía mucho más preferiblemente 4 nucleótidos, 3 nucleótidos, 2 nucleótidos o 1 nucleótido. Preferiblemente, el sitio de discriminación de variación de nucleótido está ubicado en el extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' del PTO.

30 El término "sitio" con referencia a o bien un sitio de discriminación de variación de nucleótido de sonda o bien un sitio de variación de nucleótido en secuencias diana se usa en el presente documento para abarcar no sólo un único nucleótido sino también una pluralidad de nucleótidos.

35 Es de interés que tales patrones de hibridación distintos en la variación de nucleótido de interés son responsables de las diferencias en los sitios de escisión iniciales del PTO, produciendo de ese modo dos tipos de fragmentos de PTO para dar una diferenciación de señales dependiendo de la presencia de la variación de nucleótido de interés.

40 En presencia de la variación de nucleótido de interés, se genera un primer fragmento mediante escisión del híbrido entre el PTO y el molde coincidente, y en ausencia de la variación de nucleótido de interés, se genera un segundo fragmento mediante escisión del híbrido entre el PTO y el molde no coincidente. El segundo fragmento comprende una porción adicional del extremo 3' que hace que el segundo fragmento sea diferente del primer fragmento.

45 En una realización para la detección de una variación de un solo nucleótido, el extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' del PTO tiene una secuencia complementaria a la variación de un solo nucleótido en una secuencia de ácido nucleico diana. Tal como se describió anteriormente, la escisión del PTO hibridado con un molde coincidente puede inducirse en un sitio inmediatamente adyacente en una dirección en 3' al extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' del PTO, por ejemplo, bajo inducción de escisión dependiente de extensión de cebador en el sentido de 5'. El extremo 3' del fragmento de PTO tiene el nucleótido complementario a la variación de un solo nucleótido. El fragmento de PTO se hibrida con un CTO que tiene una porción de captura que comprende una
50 secuencia correspondiente a la variación de nucleótido y luego se extiende para formar el dúplex extendido que impide la formación del híbrido entre el CTO y el HO, no proporcionando de ese modo la señal indicativa de la presencia del híbrido de CTO/HO. Si el mismo PTO se hibrida con un molde no coincidente que tiene la secuencia idéntica al molde coincidente excepto por la variación de un solo nucleótido, la escisión del PTO puede producirse en un sitio separado en una dirección en 3' del extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' del PTO por dos
55 nucleótidos. El extremo 3' del fragmento de PTO tiene el nucleótido escindido adicional que el nucleótido complementario a la variación de un solo nucleótido. Cuando el sitio del CTO hibridado con el nucleótido escindido adicional se diseña para que tenga una secuencia no complementaria al nucleótido escindido adicional, el extremo 3' del fragmento de PTO no se hibrida con el CTO, dando como resultado la no extensión del fragmento de PTO en una condición controlada.

60 Según una realización, el sitio de escisión del PTO que tiene una secuencia complementaria a la variación de nucleótido en su parte de extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' es diferente dependiendo de la hibridación con un molde coincidente o con un molde no coincidente, de manera que el fragmento de PTO liberado de cualquier acontecimiento de hibridación tiene una secuencia diferente preferiblemente, en su parte de extremo 3',
65 más preferiblemente, en su extremo 3'.

Según una realización, la selección de la secuencia de nucleótidos de CTO en consideración de la diferencia en las partes de extremo 3' de los fragmentos de PTO permite discriminar el molde coincidente del molde no coincidente.

5 Según una realización, la producción de cualquiera de los fragmentos de PTO puede detectarse claramente mediante una reacción de extensión en el CTO.

Según una realización, el CTO tiene una secuencia seleccionada de manera que el CTO no se hibrida con la porción de extremo 3' adicional del segundo fragmento para impedir la extensión del segundo fragmento cuando el segundo fragmento se hibrida con la porción de captura del CTO.

10 Tal como se describió anteriormente, la extensión del primer fragmento se detecta mediante la no hibridación con el HO debido a la formación del dúplex extendido.

15 Según una realización, la parte de extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' del PTO comprende un resto sin apareamiento de bases ubicado separado del sitio de discriminación de variación de nucleótido por 1-10 nucleótidos (más preferiblemente 1-5 nucleótidos).

20 El resto sin apareamiento de bases impide que la parte de extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' forme una doble cadena con la secuencia de nucleótidos diana cuando el PTO se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana que tiene la variación de nucleótido no complementaria al sitio de discriminación de variación.

El uso del resto sin apareamiento de bases (por ejemplo, nucleótido con apareamiento erróneo artificial) mejora el potencial de discriminación del PTO con respecto a variaciones de nucleótido.

25 Según una realización, el resto sin apareamiento de bases no inhibe la formación de una doble cadena entre la parte de extremo 5' y la secuencia de ácido nucleico diana cuando el PTO se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana que tiene la variación de nucleótido complementaria al sitio de discriminación de variación de nucleótido.

30 Según una realización, el resto sin apareamiento de bases amplía la distancia entre el sitio de escisión inicial en el híbrido del PTO y el molde coincidente y el sitio de escisión inicial en el híbrido del PTO y el molde no coincidente.

Según una realización, la introducción de una secuencia de resto sin apareamiento de bases permite que se ajuste el sitio de escisión inicial, particularmente el sitio de escisión inicial en el híbrido del PTO y el molde no coincidente.

35 Según una realización, el resto sin apareamiento de bases está ubicado en el sentido de 3' del sitio de discriminación de variación de nucleótido.

40 El resto sin apareamiento de bases incluye cualquier resto que no forma un par de bases entre secuencias de ácido nucleico diana. Preferiblemente, el resto sin apareamiento de bases es (i) un nucleótido que comprende una base con apareamiento erróneo artificial, una base natural/no natural que no puede producir apareamiento de bases, una base modificada para que no pueda producir apareamiento de bases o una base universal, (ii) un nucleótido sin apareamiento de bases modificado para que no pueda producir apareamiento de bases, o (iii) un compuesto químico sin apareamiento de bases.

45 Por ejemplo, el resto sin apareamiento de bases incluye grupo alquileo, ribofuranosilnaftaleno, desoxirribofuranosilnaftaleno, metafosfato, unión fosforotioato, unión fosfotriéster alquílico, unión fosfotriéster arílico, unión fosfonato de alquilo, unión fosfonato de arilo, unión hidrogenofosfonato, unión fosforoamidato de alquilo y unión fosforoamidato de arilo. También se usan espaciadores de carbono convencionales como restos sin apareamiento de bases. Bases universales como restos sin apareamiento de bases son útiles en el ajuste de los sitios de escisión del PTO.

50 Puesto que pares de bases que contienen bases universales tales como desoxiinosina, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol y 5-nitroindol tienen una menor fuerza de unión que aquella entre bases naturales, pueden emplearse bases universales como restos sin apareamiento de bases en determinadas condiciones de hibridación.

55 El resto sin apareamiento de bases introducido en la parte de extremo 5' tiene preferiblemente 1-10, más preferiblemente 1-5, todavía más preferiblemente 1-2 restos. Una pluralidad de restos sin apareamiento de bases en la parte de extremo 5' puede estar presente de una manera consecutiva o intermitente. Preferiblemente, el resto sin apareamiento de bases tiene 2-5 restos consecutivos.

60 Preferiblemente, el resto sin apareamiento de bases es un compuesto químico sin apareamiento de bases.

65 Según una realización, el sitio de discriminación de variación de nucleótido y el resto sin apareamiento de bases del PTO están ubicados separados del extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' por 10 nucleótidos (más preferiblemente 8 nucleótidos, 7 nucleótidos, 6 nucleótidos, 5 nucleótidos, 4 nucleótidos, 3 nucleótidos, 2 nucleótidos o 1 nucleótido, todavía más preferiblemente 1 nucleótido).

Según una realización, el PTO tiene una porción bloqueante que contiene como bloqueante al menos un nucleótido resistente a la escisión mediante la enzima que tiene actividad nucleasa 5' y la porción bloqueante está situada para controlar el sitio de escisión inicial o impedir la escisión en sitio o sitios.

5 Para mejorar la eficacia de detección de variaciones de nucleótido, la presente invención puede realizarse con el método de pinzamiento. El método de pinzamiento representativo usando PNA se da a conocer en Henrik *et al.*, Nucleic Acid Research 21:5332-5336(1993) y Luo *et al.*, Nucleic Acid Research vol. 34, n.º 2 e12 (2006).

10 Por ejemplo, la tecnología de pinzamiento usando PNA permite amplificar una secuencia de ácido nucleico que tiene una variación de nucleótido de tipo mutante pero no amplificar una secuencia de ácido nucleico que tiene una variación de nucleótido de tipo natural, a la que sigue el método dado a conocer en el presente documento, que permite una detección más eficaz de las variaciones de nucleótido. En particular, puesto que la tecnología de pinzamiento permite amplificar sólo una secuencia de ácido nucleico que tiene una variación de nucleótido de tipo específico, su combinación con el presente método permitiría una detección de variantes minoritarias de una manera más eficaz.

En la presente invención, el término "bloqueante de la amplificación" significa un oligonucleótido usado para el pinzamiento.

20 En general, los bloqueantes de la amplificación para el pinzamiento se hibridan sólo con moldes que tienen una secuencia perfectamente complementaria a los bloqueantes de la amplificación en la misma condición, que se diseñan para que no se hibriden con moldes que tienen incluso un único apareamiento erróneo. El molde hibridado con el bloqueante de la amplificación que inhibe el apareamiento del cebador o la elongación de la cadena no se amplifica y sólo se amplifica el que no se hibrida con el bloqueante de la amplificación. Análogos de ácido nucleico tales como PNA y LNA son útiles como bloqueantes de la amplificación en el sentido de que muestran diferencias de T_m significativas incluso para una única diferencia de bases.

30 Según una realización, el bloqueante de la amplificación se usa además en la presente invención particularmente para la detección de variantes minoritarias. Según una realización, el bloqueante de la amplificación impide la extensión del cebador ubicado en el sentido de 5' del bloqueante de la amplificación. Según una realización, el bloqueante de la amplificación y el PTO usados pueden diseñarse para que se hibriden con la misma cadena en una doble cadena o cadenas diferentes una de otra. Según una realización, un bloqueante de la amplificación comprende nucleósidos/nucleótidos que tienen una estructura principal resistente a la actividad nucleasa 5'. Según una realización, el bloqueante de la amplificación comprende ácido nucleico peptídico (PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), morfolino, ácido nucleico glicólico (GNA), ácido nucleico con trehosa (TNA), ácidos nucleicos con puente (BNA), oligómeros de N3'-P5' fosforamidoato (NP), oligonucleótidos con aglutinante unido en el surco menor (oligonucleótidos con MGB unido), oligómeros de fosfortioato (PS), oligómeros de alquilfosfonato C₁-C₄, fosforamidoatos, oligonucleótidos de β-fosfodiéster, oligonucleótidos de α-fosfodiéster o una combinación de los mismos.

40 Cuando una sonda que tiene en su porción de extremo 5' una porción de discriminación de variación de nucleótido se hibrida con un molde no coincidente, su porción de extremo 5' puede formar una única cadena en una determinada condición. La sonda puede corresponder a un PTO. La señal puede generarse mediante el ensayo de PTO de la presente invención. Este enfoque puede ser útil en la detección de una secuencia de ácido nucleico diana que tiene una variación de nucleótido no complementaria al sitio de discriminación de variación de nucleótido de sondas.

50 Según una realización, la secuencia de ácido nucleico diana usada en la presente invención es una secuencia de ácido nucleico amplificada previamente. La utilización de la secuencia de ácido nucleico amplificada previamente permite aumentar significativamente la sensibilidad y especificidad de la detección de dianas de la presente invención.

Según una realización, el método se realiza en presencia de un cebador en el sentido de 3' con respecto al PTO.

55 Las ventajas de la presente invención pueden destacarse en la detección simultánea (múltiple) de al menos dos secuencias de ácido nucleico diana.

60 Según una realización, el método se realiza para detectar al menos dos tipos (más específicamente, al menos tres tipos, todavía más específicamente al menos cinco tipos) de secuencias de ácido nucleico diana.

Según una realización, el método se realiza para detectar al menos dos tipos (más específicamente, al menos tres tipos, todavía más específicamente al menos cinco tipos) de secuencias de ácido nucleico diana; en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' comprende al menos dos tipos (más específicamente al menos tres tipos, todavía más específicamente al menos cinco tipos) de oligonucleótidos, el PTO comprende al menos dos tipos (más específicamente al menos tres tipos, todavía más específicamente al menos cinco tipos) de los PTO, el CTO

comprende al menos dos tipos (específicamente al menos tres tipos, más específicamente al menos cinco tipos) del CTO, y el HO comprende al menos dos tipos (específicamente al menos tres tipos, más específicamente al menos cinco tipos) del HO.

- 5 En una determinada realización, cuando las al menos dos tipos de secuencias de ácido nucleico diana están presentes, se proporcionan sus correspondientes al menos dos tipos de señales.

Según una realización, la presente invención se realiza usando al menos dos tipos de cebadores en el sentido de 3' para el PTO.

- 10 También es posible proporcionar fragmentos adicionales extensibles en el CTO para aumentar el número de las cadenas extendidas mediante una reacción de escisión de la nucleasa 5' adicional usando un PTO adicional que comprende (i) una porción de direccionamiento en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la cadena extendida y (ii) una porción de etiquetado en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la cadena extendida pero complementaria a la porción de captura del CTO. Es posible usar un oligonucleótido en el sentido de 5' adicional que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la cadena extendida y que está ubicado en el sentido de 5' del PTO adicional para la reacción de escisión de la nucleasa 5'. Según una realización, el HO puede desempeñar un papel como PTO adicional.

- 20 La realización preferible anterior tiene la característica de que la formación de los fragmentos adicionales depende de la formación de una cadena extendida.

- 25 Alternativamente, los fragmentos adicionales pueden proporcionarse usando un PTO adicional que comprende (i) una porción de direccionamiento en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO y (ii) una porción de etiquetado en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria al CTO pero complementaria a la porción de captura del CTO.

- 30 Según una realización, se forman dúplex extendidos adicionales mediante la producción adicional de las cadenas extendidas, contribuyendo a la amplificación de la señal diana.

Las características y ventajas de esta invención se resumirán tal como sigue:

- 35 (a) Para la determinación de la presencia de secuencias diana, la presente invención emplea (i) el PTO que va a hibridarse con secuencias diana, (ii) el CTO que puede formar el dúplex extendido de una manera dependiente de diana y (iii) el HO que va a hibridarse con el CTO, aumentando de ese modo drásticamente la especificidad con secuencias diana. Además, las condiciones para la generación de señales pueden ajustarse independientemente de las secuencias diana y por tanto las condiciones de reacción para los presentes métodos pueden establecerse fácilmente. Tal característica permite no sólo determinar fácilmente las condiciones para la generación de señales sino también la prevención de las señales falsas positivas en la detección de dianas múltiples en muestras, entre otras, muestras clínicas versátiles.

- 40 (b) El valor de T_m del híbrido entre el CTO y el HO puede ajustarse mediante la secuencia y/o longitud del HO y por tanto puede predeterminarse arbitrariamente. Usando tal característica, (i) el valor de T_m distinguible del híbrido de CTO/HO puede servir como factor de discriminación para la presencia del híbrido de CTO/HO (por ejemplo, en un análisis de fusión); y (ii) las temperaturas de detección para mantener el híbrido de CTO/HO y las condiciones de reacción para la detección múltiple de al menos dos secuencias diana puede determinarse fácilmente.

- 50 (c) La presente invención adopta la aparición de la inhibición de la hibridación entre el HO intacto con el CTO mediante la formación del dúplex extendido dependiente de diana. Por tanto, la presente invención puede detectar secuencias diana incluso cuando el HO no se escinda. En este sentido, la detección del híbrido entre el CTO y el HO puede realizarse en un recipiente diferente de el de para la extensión del CTO.

- 55 (d) Los aspectos primero y tercero de la presente invención utilizan la inhibición de la hibridación entre el HO intacto con el CTO así como la escisión del HO. Por tanto, el diseño de la porción de etiquetado en 5' de las secuencias de PTO, CTO y HO puede realizarse fácilmente y las condiciones para las reacciones también pueden establecerse fácilmente.

- 60 (e) Los aspectos primero y tercero de la presente invención pueden utilizar diversos marcadores para detectar secuencias diana.

- 65 (f) En el primer aspecto de la presente invención para la detección de al menos dos secuencias diana, cuando los híbridos entre los CTO y los HO tienen valores de T_m diferentes uno de otro, al menos dos secuencias de ácido nucleico diana pueden detectarse mediante análisis de la curva de fusión incluso usando un sistema de marcaje que proporciona señales con las mismas características de fluorescencia. La ventaja permite que esté

libre de las limitaciones asociadas con el número de marcadores de fluorescencia detectables en la detección en tiempo real múltiple.

5 (g) Las tecnologías convencionales en las que se analizan híbridos entre sondas y secuencias diana, o amplicones de PCR de secuencias diana mediante análisis de fusión, es muy probable que muestren desviaciones en el análisis de muestras susceptibles de variación de nucleótido tales como muestras clínicas. Sin embargo, el primer aspecto de la presente invención usa el CTO y el HO cuyas secuencias pueden diseñarse independientemente de las secuencias de las dianas y por tanto pueden proporcionar resultados del análisis sin desviaciones con respecto a las muestras.

10 (h) Las reacciones en fase sólida convencionales para detectar secuencias diana mediante hibridación directa entre secuencias diana y oligonucleótidos inmovilizados puede no mostrar resultados de reacción eficaces debido al entorno de fase sólida restringido. En cambio, la presente invención usa la hibridación entre el CTO y el HO sobre una fase sólida sin implicación de secuencias diana, de manera que incluso condiciones de reacción generales pueden mostrar resultados de reacción más eficaces.

15 (i) En la reacción en fase sólida de la presente invención, al menos dos secuencias diana pueden detectar simultáneamente incluso usando un único marcador.

20 (j) Cuando el HO comprende una secuencia de nucleótidos que es competitiva con el fragmento en cuanto a la hibridación con el CTO, su escisión puede excluirse sustancialmente. En tal caso, la detección de secuencias diana puede llevarse a cabo sin influencia de la escisión del HO.

25 (k) Cuando el HO comprende una secuencia de nucleótidos que es competitiva con el fragmento en cuanto a la hibridación con el CTO, es más probable que el PTO se hibride con una secuencia diana en vez del CTO en un único recipiente de reacción debido a que el HO inhibe la unión del PTO al CTO.

30 (l) En una realización que usa el HO que comprende una secuencia de nucleótidos que es competitiva con el fragmento en cuanto a la hibridación con el CTO, puede usarse un CTO relativamente corto, lo que mejora la eficacia de síntesis y la rentabilidad del CTO.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Evaluación del efecto de la formación del dúplex extendido sobre la hibridación de HO con CTO

35 Se examinó si la hibridación del oligonucleótido de hibridación (HO) con CTO se reducía al aumentar el número de los dúplex extendidos, lo que indica que la formación del dúplex extendido inhibe la hibridación entre HO y CTO. Se preparó una cadena extendida sintética (Syn-ES) que tenía una secuencia de nucleótidos complementaria a CTO para controlar la cantidad del dúplex extendido y se usó una cantidad diversa de Syn-ES para formar el dúplex extendido con una cantidad fija de CTO.

40 La Syn-ES y el CTO no tienen marcador. Se bloquea el CTO con un espaciador de carbono en su extremo 3'. El HO tiene una molécula indicadora fluorescente (Cal Fluor Red 610) en su extremo 5' y tiene una molécula extintora (BHQ-2) en su extremo 3'.

45 En este ejemplo, la presencia del híbrido de CTO-HO se detectó mediante análisis de fusión.

Las secuencias de Syn-ES, CTO y HO usadas en este ejemplo son:

50 NG-Syn-ES 5'-ACGACGGCTTGGCTGAGCGCTGGATACCCTGGACGATATG-3' (SEQ ID NO: 1)

NG-CTO-1 5'-CATATCGTCCAGGGTATCCAGCGCTCAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 2)

55 NG-HO-1 5'-[Cal Fluor Red 610]GCGCTGGATACCCTG[BHQ-2]-3' (SEQ ID NO: 3)

60 Se realizó la reacción en el volumen final de 20 µl que contenía una cantidad de Syn-ES (3, 2, 1, 0,5, 0,1 o 0 pmoles) (SEQ ID NO: 1), 1 pmol de CTO (SEQ ID NO: 2), 1 pmol de HO (SEQ ID NO: 3) y 10 µl de mezcla maestra 2X [que contenía MgCl₂ 2,5 mM, 200 µM de dNTP y 1,6 unidades de H-Taq ADN polimerasa (Solgent, Corea)]; se colocó el tubo que contenía la mezcla de reacción en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); y se desnaturalizó la mezcla de reacción durante 15 min a 95°C. Tras la desnaturalización, se obtuvo una curva de fusión enfriando la mezcla de reacción hasta 40°C, manteniendo a 40°C durante 10 min y calentando lentamente a de 40°C a 85°C. Se midió la fluorescencia de manera continua durante el aumento de temperatura para monitorizar la disociación del híbrido de CTO-HO. Se derivó un pico de fusión a partir de los datos de curvas de fusión.

65 Tal como se muestra en las figuras 19A y 19B, en el intervalo de 0 ~ 0,5 pmoles de Syn-ES, se detectaron picos de fusión a 57,0°C correspondientes al valor de T_m esperado del híbrido de CTO-HO y las alturas de los mismos

disminuían de manera inversamente proporcional a la cantidad de Syn-ES. No se detectaron picos cuando se usó Syn-ES a más de 1 pmol.

5 Este resultado muestra que la hibridación de HO con CTO se reduce a medida que se forma el dúplex extendido, lo que indica que la formación del dúplex extendido inhibe la hibridación entre HO y CTO.

EJEMPLO 2: Detección de una secuencia de ácido nucleico diana usando el ensayo PCE-NH

10 Se examinó adicionalmente si el ensayo PCE-NH puede detectar una secuencia de ácido nucleico diana de una manera de (i) detección en tiempo real a una temperatura predeterminada o (ii) análisis de fusión.

Se usó *Taq* ADN polimerasa que tenía una actividad nucleasa 5' para la extensión del cebador en el sentido de 5' y el cebador en el sentido de 3', la escisión del PTO y la extensión del fragmento de PTO.

15 El PTO y el CTO no tienen marcador. Se bloquean el PTO y el CTO con un espaciador de carbono en sus extremos 3'. Se usó el ADN genómico del gen de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) como diana. El HO tiene una molécula indicadora fluorescente (Cal Fluor Red 610) en su extremo 5' y tiene una molécula extintora (BHQ-2) en su extremo 3'.

20 Las secuencias de cebador en el sentido de 5', cebador en el sentido de 3', PTO, CTO y HO usadas en este ejemplo son:

NG-F-1 5'-TACGCCTGCTACTTTTCACGCTIIIIIGTAATCAGATG-3' (SEQ ID NO: 4)

25 NG-R-1 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGCIIIIICGAGCAAGAAG-3' (SEQ ID NO: 5)

NG-PTO 5'-ACGACGGCTTGGCTGCCCCTCATTGGCGTGTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 6)

30 NG-CTO-1 5'-CATATCGTCCAGGGTATCCAGCGCTCAGCCAAGCGTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 2)

NG-HO-1 5'-[Cal Fluor Red 610]GCGCTGGATACCCTG[BHQ-2]-3' (SEQ ID NO: 3)

(Las letras subrayadas indican la porción de etiquetado en 5' de PTO)

35 2-1. Detección en tiempo real a una temperatura predeterminada durante PCR

Se realizó la reacción en el volumen final de 20 µl que contenía 100 pg de ADN genómico de NG, 10 pmoles de cebador en el sentido de 5' (SEQ ID NO: 4), 10 pmoles de cebador en el sentido de 3' (SEQ ID NO: 5), 5 pmoles de PTO (SEQ ID NO: 6), 0,5 pmoles de CTO (SEQ ID NO: 2), 0,5 pmoles de HO (SEQ ID NO: 3) y 10 µl de mezcla maestra 2X [que contenía MgCl₂ 2,5 mM, 200 µM de dNTP y 1,6 unidades de H-*Taq* ADN polimerasa (Solgent, Corea)]; se colocó el tubo que contenía la mezcla de reacción en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); se desnaturizó la mezcla de reacción durante 15 min a 95°C y se sometió a 50 ciclos de 30 s a 95°C, 60 s a 55°C, y 30 s a 72°C. Se realizó la detección de la señal en la etapa de hibridación (55°C) de cada ciclo en la que se esperaba que el híbrido de CTO-HO mantuviese una forma bicatenaria. Además, se midió una señal en la etapa de desnaturalización (95°C) de cada ciclo.

40

45

El ensayo PCE-NH que comprende detección en tiempo real a una temperatura predeterminada emplea el hecho de que la señal de una doble cadena formada por la hibridación del HO con el CTO es diferente de la señal del HO monocatenario que existe mediante la inhibición de la hibridación entre el HO con el CTO.

50

En este ejemplo, el HO tiene un marcador doble interactivo. Cuando el HO está en un estado monocatenario, la molécula indicadora y la molécula extintora en el HO están adyacentes conformacionalmente entre sí para permitir que la molécula extintora extinga la señal de la molécula indicadora. Cuando la secuencia de ácido nucleico diana está ausente y se forma el híbrido de CTO/HO, la molécula indicadora y la molécula extintora en el HO están separadas conformacionalmente para permitir que la molécula extintora no extinga la señal de la molécula indicadora.

55

Cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente, la formación dependiente de diana del dúplex extendido inhibe la hibridación del HO con el CTO, permitiendo de ese modo que el HO esté en un estado monocatenario, dando como resultado la extinción de la señal de la molécula indicadora. Por tanto, el número de los HO en una única hebra aumenta con el aumento del número del dúplex extendido, y a su vez la intensidad de la señal finalmente detectada muestra patrones disminuidos.

60

Mientras tanto, cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente, el HO hibridado con el CTO puede escindirse durante la extensión del fragmento de PTO. La escisión provoca que la molécula indicadora y la molécula extintora se separen permanentemente, lo que da como resultado que no se extinga perfectamente la señal de la

65

molécula indicadora. La magnitud de la no extinción mediante escisión del HO es mayor que la magnitud de la no extinción mediante hibridación del HO con el CTO. Por tanto, cuando se detecta la señal proporcionada mediante escisión del HO, la intensidad de la señal muestra patrones aumentados con el aumento del número de los HO escindidos. La señal proporcionada mediante la escisión del HO puede detectarse a diversas temperaturas. La

5 detección a temperaturas superiores puede eliminar señales que van a proporcionarse mediante la hibridación entre el HO y CTO.

En este ejemplo, aunque pueden coexistir ambas situaciones que incluyen la inhibición de la hibridación entre el HO intacto y el CTO y la escisión del HO, el patrón de señales puede proporcionarse dependiendo de la situación

10 prevalente.

Tal como se muestra en la figura 20A, la intensidad de la señal fluorescente medida en la etapa de hibridación (55°C) mostró el patrón descendente en presencia de la diana. No se detectó señal en ausencia de la diana. Este resultado muestra que el ensayo PCE-NH puede detectar una secuencia de ácido nucleico diana de una manera de

15 detección en tiempo real y además que la inhibición de la hibridación del HO intacto con el CTO permite detectar la presencia de la secuencia diana mediante el ensayo PCE-NH.

Además, para observar la presencia de la escisión de algunos HO durante la reacción, la detección de la señal se realizó también en la etapa de desnaturalización (95°C) de cada ciclo durante la reacción anterior. Tal como se muestra en la figura 20B, la intensidad de señal fluorescente aumentó en presencia de la diana. No se detectó señal

20 en ausencia de la diana. Este resultado muestra que algunos HO pueden escindirse durante la reacción.

2-2. Análisis de fusión

Tras la reacción en el ejemplo 2-1, se obtuvo la curva de fusión enfriando la mezcla de reacción hasta 40°C, manteniendo a 40°C durante 10 min, y calentando lentamente a de 40°C a 85°C. Se midió la fluorescencia de manera continua durante el aumento de temperatura para monitorizar la disociación del híbrido de CTO-HO. Se derivó un pico de fusión a partir de los datos de la curva de fusión.

25

Tal como se muestra en la figura 20C, se detectó un pico de fusión a 59,0°C correspondiente al valor de T_m esperado del híbrido de CTO-HO en ausencia de la diana. No se detectó pico en presencia de la diana. Este resultado muestra que el ensayo PCE-NH puede detectar una secuencia de ácido nucleico diana de una manera de análisis de fusión.

30

EJEMPLO 3: Evaluación del ensayo PCE-NH usando un HO competitivo para la detección de una secuencia de ácido nucleico diana

35

Se examinó adicionalmente si el ensayo PCE-NH puede detectar una secuencia de ácido nucleico diana usando la señal proporcionada de la inhibición de la hibridación del HO intacto con el CTO sin la señal proporcionada de la escisión del HO de una manera de (i) detección en tiempo real a una temperatura predeterminada o (ii) análisis de fusión. Para excluir el efecto de la escisión del HO durante la extensión del fragmento de PTO, se diseña un HO competitivo para competir con el fragmento de PTO en cuanto al sitio de hibridación en el CTO. El HO competitivo en este ejemplo incluye una secuencia de fragmento de PTO y una secuencia adicional, en su parte de extremo 3', complementaria a la porción de formación de molde de CTO.

40

Se usó *Taq* ADN polimerasa que tenía actividad nucleasa 5' para la extensión del cebador en el sentido de 5' y el cebador en el sentido de 3', la escisión del PTO y la extensión del fragmento de PTO.

45

El PTO y el CTO no tienen marcador. Se bloquean el PTO y el CTO con un espaciador de carbono en sus extremos 3'. Se usó el ADN genómico del gen de NG como diana. El HO competitivo tiene una molécula indicadora fluorescente (Cal Fluor Red 610) en su extremo 5' y tiene una molécula extintora (BHQ-2) en su extremo 3'.

50

Las secuencias de cebador en el sentido de 5', cebador en el sentido de 3', PTO, CTO y HO usadas en este ejemplo son:

55

NG-F-2 5'-TACGCCTGCTACTTTACGCT-3' (SEQ ID NO: 7)

NG-R-2 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 8)

60 NG-PTO 5'-ACGACGGCTTGGCTGCCCTCATTGGCGTGTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 6)

NG-CTO-1 5'-CATATCGTCCAGGGTATCCAGCGCTCAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 2)

65 NG-HO-2 5'-[Cal Fluor Red 610]ACGACGGCTTGGCTGAGCGC[BHQ-2]-3' (SEQ ID NO: 9)

(Las letras subrayadas indican la porción de etiquetado en 5' de PTO)

3-1. Detección en tiempo real a una temperatura predeterminada

5 Se realizó la reacción en el volumen final de 20 µl que contenía 100 pg de ADN genómico de NG, 10 pmoles de cebador en el sentido de 5' (SEQ ID NO: 7), 10 pmoles de cebador en el sentido de 3' (SEQ ID NO: 8), 5 pmoles de PTO (SEQ ID NO: 6), 0,5 pmoles de CTO (SEQ ID NO: 2), 1 pmol de HO competitivo (SEQ ID NO: 9) y 10 µl de mezcla maestra 2X [que contenía MgCl₂ 2,5 mM, 200 µM de dNTP y 1,6 unidades de H-*Taq* ADN polimerasa (Solgent, Corea)]; se colocó el tubo que contenía la mezcla de reacción en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); se desnaturalizó la mezcla de reacción durante 15 min a 95°C y se sometió a 50 ciclos de 30 s a 95°C, 60 s a 60°C y 30 s a 72°C. Se realizó la detección de la señal en la etapa de hibridación (60°C) en la que se esperaba que el híbrido de CTO-HO mantuviese la forma bicatenaria. Además, se midió una señal en la etapa de desnaturalización (95°C) de cada ciclo.

15 Tal como se muestra en la figura 21A, se obtuvo el patrón de disminución de la intensidad de la señal fluorescente medida en la etapa de hibridación (60°C) en presencia de la diana. No se detectó señal en ausencia de la diana.

Este resultado muestra que el ensayo PCE-NH puede detectar una secuencia de ácido nucleico diana usando la inhibición de la hibridación del HO intacto con el CTO sin la escisión del HO.

20 Además, para observar la presencia de la escisión de algunos HO durante la reacción, también se realizó la detección de la señal en la etapa de desnaturalización (95°C) de cada ciclo durante la reacción anterior. Tal como se muestra en la figura 21B, no se detectó señal en presencia de la diana así como en ausencia de la diana. Este resultado muestra que los HO no se escindían durante la reacción.

25 3-2. Análisis de fusión

Tras la reacción en el ejemplo 4-1, se obtuvo una curva de fusión enfriando la mezcla de reacción hasta 55°C, manteniendo a 55°C durante 30 s y calentando lentamente a de 55°C a 85°C. Se midió la fluorescencia de manera continua durante el aumento de la temperatura para monitorizar la disociación del híbrido de CTO-HO. Se derivó un pico de fusión a partir de los datos de la curva de fusión.

30 Tal como se muestra en la figura 21C, se detectó un pico de fusión a 70,0°C correspondiente al valor de T_m esperado del híbrido de CTO-HO en ausencia de la diana. No se detectó pico en presencia de la diana.

35 Este resultado muestra que PCE-NH que comprende análisis de fusión puede detectar una secuencia de ácido nucleico diana usando la inhibición de la hibridación del HO intacto con el CTO sin escisión del HO.

EJEMPLO 4: Evaluación del ensayo PCE-NH usando un CTO marcado una sola vez y un HO inmovilizado sobre una micromatriz

40 Se examinó adicionalmente el ensayo PCE-NH usando el CTO marcado una sola vez y el HO inmovilizado sobre una micromatriz. La escisión del PTO y la extensión del fragmento de PTO, la hibridación de CTO con HO inmovilizado se realizaron simultáneamente sobre la micromatriz. Tras la reacción, se analizó la presencia o ausencia del dúplex CTO-HO. Cuando el fragmento de PTO se extiende en presencia del HO, la formación del híbrido entre el CTO y el HO puede impedirse mediante (i) la inhibición de la hibridación entre HO y CTO y/o (ii) la escisión del HO durante la extensión del fragmento de PTO.

50 Se usó *Taq* ADN polimerasa que tenía actividad nucleasa 5' para la extensión del cebador en el sentido de 5' y el cebador en el sentido de 3', la escisión y la extensión del fragmento de PTO. Se bloquea el PTO con un espaciador de carbono en su extremo 3'. El CTO tiene una molécula indicadora fluorescente (Quasar670) en su extremo 3'. El HO tiene poli(T)₁₀ como brazo ligador y se inmovilizó sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio usando un grupo amino (amino C7) en su extremo 3'. Se inmovilizó una sonda de marcador que tenía una molécula indicadora fluorescente (Quasar670) en su extremo 5' sobre la superficie del portaobjetos de vidrio usando un grupo amino en su extremo 3'.

55 Las secuencias de cebador en el sentido de 5', cebador en el sentido de 3', PTO, CTO, HO y marcador usadas en este ejemplo son:

60 NG-F-2 5'-TACGCCTGCTACTTTTCAGCT-3' (SEQ ID NO: 7)

NG-R-2 5'-CAATGGATCGGTACTACTCGC-3' (SEQ ID NO: 8)

NG-PTO 5'-ACGACGGCTTGGCTGCCCTCATTGGCGTGTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 6)

65 NG-CTO-2 5'-CATATCGTCCAGGGTATCCAGCGCTCAGCCAAGCCGTCGT[Quasar670]-3' (SEQ ID NO: 10)

NG-HO-3 5'-GCGCTGGATACCTGGACGATATGTTTTTTTTTT[*Amino C7*]-3' (SEQ ID NO: 11)

Marcador 5'-[Quasar670]ATATATATAT[*AminoC7*]-3' (SEQ ID NO: 12)

5 (Las letras subrayadas indican la porción de etiquetado en 5' de PTO)

Se usaron portaobjetos NSB9 NHS (NSBPOSTECH, Corea) para la fabricación del HO y el marcador (SEQ ID NO: 11 y 12). Se imprimieron el HO y el marcador disueltos en tampón de colocación en puntos NSB a la concentración final de 50 μ M sobre los portaobjetos NSB9 NHS con un dispositivo de colocación en puntos de micromatrices PersonalArrayer™16 (CapitalBio, China). El HO y el marcador se colocaron en puntos lado a lado en un formato de 2x1 (puntos duplicados), y se incubó la micromatriz resultante en una cámara mantenida a una humedad de ~85% durante la noche. Entonces se lavaron los portaobjetos en una disolución tampón que contenía 2xSSPE (cloruro de sodio 0,3 M, hidrogenofosfato de sodio 0,02 M y EDTA 2,0 mM), pH 7,4 y SDS 7,0 mM a 37°C durante 30 min para eliminar CTO y marcador no unidos específicamente y se enjuagaron con agua destilada. Entonces, se secaron los portaobjetos funcionalizados con ADN usando una centrifuga de portaobjetos y se almacenaron en la oscuridad a 4°C hasta su uso.

Se realizó la reacción de PCE-NH en el volumen final de 30 μ l que contenía 100 pg de ADN genómico del gen de NG, 10 pmoles de cebador en el sentido de 5' (SEQ ID NO: 7), 10 pmoles de cebador en el sentido de 3' (SEQ ID NO: 8), 5 pmoles de PTO (SEQ ID NO: 6), 0,5 pmoles de CTO (SEQ ID NO: 10) y 15 μ l de mezcla maestra 2X [que contenía MgCl₂ 2,5 mM, 200 μ M de dNTP y 2,4 unidades de H-*Taq* ADN polimerasa (Solgent, Corea)]; se aplicó la mezcla completa a una cámara ensamblada sobre la superficie del portaobjetos de vidrio NSB sobre el que se reticuló el HO (SEQ ID NO: 11). Se colocó el portaobjetos sobre el bloque *in situ* en un termociclador (GenePro B4I, China). Se llevó a cabo la reacción PCE-NH tal como sigue: 15 min de desnaturalización a 95°C y 40 ciclos de 30 s a 95°C, 60 s a 60°C, 30 s a 72°C y 5 min de hibridación a 55°C.

Tras la reacción, se lavaron los portaobjetos en agua destilada durante 1 min. Se llevó a cabo la adquisición de imágenes mediante el uso de un escáner de láser confocal, Axon GenePix4300A (Molecular Device, EE.UU.) con exploración a una resolución de píxeles de 5 μ m. Se analizó la intensidad de fluorescencia mediante el uso de software de análisis de micromatrices cuantitativo, software GenePix pro7.0 (Molecular Device, EE.UU.). Se expresó la intensidad de fluorescencia como medianas de puntos tras la resta del fondo local. Se duplicó cada punto para la prueba de reproducibilidad. La intensidad de fluorescencia indica el valor promedio de los puntos duplicados.

Tal como se muestra en la figura 22, la intensidad fluorescente disminuyó aparentemente en presencia de la diana en comparación con la intensidad en ausencia de la diana. Este resultado muestra que el ensayo PCE-NH que usa CTO marcado una sola vez y HO inmovilizado sobre una micromatriz puede detectar una secuencia de ácido nucleico diana.

EJEMPLO 5: Evaluación del ensayo de PCE-NH usando un CTO marcado una sola vez y un HO inmovilizado sobre una micromatriz sin escisión del HO

Se examinó adicionalmente el ensayo PCE-NH usando el CTO marcado una sola vez y el HO inmovilizado sobre una micromatriz. La escisión del PTO y la extensión del fragmento de PTO se realizaron en un recipiente y el resultante se tomó en la micromatriz en donde el HO estaba inmovilizado, lo que permitió excluir la escisión del HO durante la extensión del fragmento de PTO. Tras la reacción de hibridación, se analizó la presencia o ausencia del dúplex de CTO-HO.

Se usaron la misma *Taq* ADN polimerasa, PTO, CTO, HO y marcador que en el ejemplo 4.

50 Se realizó la preparación de portaobjetos con el mismo protocolo usado en el ejemplo 4.

La escisión del PTO y la extensión del fragmento de PTO se realizaron en el volumen final de 30 μ l que contenía 100 pg de ADN genómico de NG, 10 pmoles de cebador en el sentido de 5' (SEQ ID NO: 7), 10 pmoles de cebador en el sentido de 3' (SEQ ID NO: 8), 5 pmoles de PTO (SEQ ID NO: 6), 0,5 pmoles de CTO (SEQ ID NO: 10) y 15 μ l de mezcla maestra 2X [que contenía MgCl₂ 2,5 mM, 200 μ M de dNTP y 2,4 unidades de H-*Taq* ADN polimerasa (Solgent, Corea)]; se colocó el tubo que contenía la mezcla de reacción en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); se desnaturalizó la mezcla de reacción durante 15 min a 95°C y se sometió a 40 ciclos de 30 s a 95°C, 60 s a 60°C, 30 s a 72°C.

60 Se aplicó la mezcla resultante a una cámara ensamblada sobre la superficie del portaobjetos de vidrio NSB sobre el que se reticuló el HO (SEQ ID NO: 11). Se colocó el portaobjetos sobre el bloque *in situ* en un termociclador (GenePro B4I, China). Se llevó a cabo la reacción de hibridación durante 30 min a 55°C. Finalmente se lavó el portaobjetos en agua destilada durante 1 min. Se llevó a cabo la adquisición de imágenes mediante el uso de un escáner de láser confocal, Axon GenePix4300A (Molecular Device, EE.UU.) con exploración a una resolución de píxeles de 5 μ m. Se analizó la intensidad de fluorescencia mediante el uso de software de análisis de micromatrices

ES 2 653 642 T3

cuantitativo, software GenePix pro7.0 (Molecular Device, EE.UU.). Se expresó la intensidad de fluorescencia como medianas de puntos tras la resta del fondo local. Se duplicó cada punto para la prueba de reproducibilidad. La intensidad de fluorescencia indica el valor promedio de los puntos duplicados.

- 5 Tal como se muestra en la figura 23, la intensidad de fluorescencia disminuyó aparentemente en presencia de la diana en comparación con la intensidad en ausencia de la diana. Este resultado muestra que el ensayo PCE-NH que usa CTO marcado una sola vez y HO inmovilizado sobre una micromatriz puede detectar una secuencia de ácido nucleico diana sin implicar la etapa de escisión del HO.
- 10 <110> SEEGENE, INC.
<120> DETECCIÓN DE UNA SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO DIANA MEDIANTE ENSAYO SIN HIBRIDACIÓN DEPENDIENTE DE ESCISIÓN Y EXTENSIÓN DE PTO
- 15 <130> PP130149
<150> Documento KR 10-2012-0154834
<151> 27-12-2012
- 20 <150> Documento KR 10-2013-0008580
<151> 25-01-2013
<150> Documento KR 10-2013-0034670
<151> 29-03-2013
- 25 <160> 12
<170> KopatentIn 2.0
- 30 <210> 1
<211> 40
<212> ADN
<213> NG-Syn-ES
- 35 <400> 1
acgacggcct ggctgagcgc tggataccct ggacgatatg 40
<210> 2
<211> 40
- 40 <212> ADN
<213> NG-CTO-1
<400> 2
catatcgtcc aggtatcca gcgctcagcc aagccgtcgt 40
- 45 <210> 3
<211> 15
<212> ADN
<213> NG-HO-1
- 50 <400> 3
gcgctggata ccctg 15
<210> 4
<211> 37
<212> ADN
<213> NG-F-1
- 60 <220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(26)
<223> n indica desoxiinosina
<400> 4
- 65 tacgcctgct acttcacgc tnnnnngtaa tcagatg 37

ES 2 653 642 T3

<210> 5
<211> 37
<212> ADN
<213> NG-R-1
5
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(26)
<223> n indica desoxiinosina
10
<400> 5
caatggatcg gtatcactcg cnnnnncgag caagaac 37

<210> 6
<211> 35
<212> ADN
<213> NG-PTO
15

<400> 6
20 acgacggctt ggctgccct cattggcgtg tttcg 35

<210> 7
<211> 21
<212> ADN
25 <213> NG-F-2

<400> 7
tacgcctgct actttcacgc t 21
30

<210> 8
<211> 21
<212> ADN
<213> NG-R-2
35

<400> 8
caatggatcg gtatcactcg c 21
40

<210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> NG-HO-2

<400> 9
45 acgacggctt ggctgagcgc 20

<210> 10
<211> 40
<212> ADN
<213> NG-CTO-2
50

<400> 10
catactgtcc aggtatcca gcgctcagcc aagccgtcgt 40
55

<210> 11
<211> 34
<212> ADN
<213> NG-HO-3

<400> 11
60 gcgctggata ccctggacga tatgttttt tttt 34

<210> 12
<211> 10
<212> ADN
65 <213> Marcador

<400> 12
atatatatat 10

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra de ácido nucleico mediante un ensayo PCE-NH (sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO), que comprende:

5 (a) hibridar la secuencia de ácido nucleico diana con un oligonucleótido en el sentido de 5' y un PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado); en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; el PTO comprende (i) una porción de direccionamiento en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la
10 secuencia de ácido nucleico diana y (ii) una porción de etiquetado en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la porción de direccionamiento en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y la porción de etiquetado en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana; el oligonucleótido en el sentido de 5' está ubicado en el sentido de 5' del PTO;

15 (b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una enzima que tiene una actividad nucleasa 5' en condiciones para la escisión del PTO; en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' o su cadena extendida induce la escisión del PTO mediante la enzima que tiene la actividad nucleasa 5' de manera que la escisión libera un fragmento que comprende la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO;

20 (c) hibridar el fragmento liberado del PTO con un CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde); en el que el CTO comprende en una dirección de 3' a 5' (i) una porción de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO y (ii) una porción de formación de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la porción de etiquetado en 5' y la porción de direccionamiento en 3' del PTO; en el que el fragmento liberado del PTO
25 se hibrida con la porción de captura del CTO;

(d) realizar una reacción de extensión usando el resultante de la etapa (c) y una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende para producir una cadena extendida complementaria a la porción de formación de molde del CTO y se forma un dúplex extendido;
30 en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido;

(e) realizar un análisis de fusión o un análisis de hibridación para el resultante de la etapa (d) a lo largo de un intervalo de temperaturas con un HO (oligonucleótido de hibridación) que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido y el CTO y el HO forman un híbrido, proporcionando de ese modo una señal indicativa de la presencia del híbrido entre el CTO y el HO; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente en la muestra de ácido nucleico, se forma el dúplex extendido para impedir la formación del híbrido entre el CTO y el HO, no proporcionando de ese modo la señal; en el que la señal se proporciona mediante (i) un marcador unido al HO, (ii) un marcador unido al CTO, (iii) un marcador unido al HO y un marcador unido al CTO, o (iv) un marcador de intercalación; y
35 40

(f) detectar la señal indicativa de la presencia del híbrido entre el CTO y el HO; en el que la presencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la ausencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.
45

2. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa (d) se realiza en presencia de los HO; en el que (i) el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende antes de la hibridación del HO y/o (ii) cuando el HO se hibrida con el CTO antes de la extensión del fragmento, la extensión del fragmento escinde o desplaza el HO del CTO, de ese modo la formación del dúplex extendido impide la formación del híbrido entre el CTO y el HO en la etapa (e) debido a la inhibición de la hibridación del HO con el CTO y/o el consumo del HO mediante la escisión.
50

3. Método según la reivindicación 1, en el que el HO o el CTO tiene un marcador doble interactivo que comprende una molécula indicadora y una molécula extintora; en el que el marcador doble interactivo está situado en un sitio tal que una señal del marcador doble interactivo en el caso de la formación del híbrido entre el CTO y el HO es diferente de una señal del marcador doble interactivo en el caso de no formación del híbrido entre el CTO y el HO.
55

4. Método según la reivindicación 1, en el que el HO tiene uno de un marcador doble interactivo que comprende una molécula indicadora y una molécula extintora y el CTO tiene el otro del marcador doble interactivo; en el que el marcador doble interactivo está situado en un sitio tal que una señal del marcador doble interactivo en el caso de la formación del híbrido entre el CTO y el HO es diferente de una señal del marcador doble interactivo en el caso de no formación del híbrido entre el CTO y el HO.
60

5. Método según la reivindicación 1, en el que el método se realiza usando un HO adicional que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO y los dos HO se hibridan con el CTO de una manera adyacente entre sí; en el que uno de los dos HO tiene uno de un marcador doble interactivo que comprende
65

una molécula indicadora y una molécula extintora y el otro de los dos HO tiene el otro del marcador doble interactivo; en el que el marcador doble interactivo está situado en un sitio tal que una señal del marcador doble interactivo en el caso de la formación del híbrido entre el CTO y los dos HO es diferente de una señal del marcador doble interactivo en el caso de no formación del híbrido entre el CTO y los dos HO.

5 6. Método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra de ácido nucleico sobre una fase sólida mediante un ensayo PCE-NH (sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO), que comprende:

10 (a) hibridar la secuencia de ácido nucleico diana con un oligonucleótido en el sentido de 5' y un PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado); en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; el PTO comprende (i) una porción de direccionamiento en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) una porción de etiquetado en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la porción de direccionamiento en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y la porción de etiquetado en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana; el oligonucleótido en el sentido de 5' está ubicado en el sentido de 5' del PTO;

15 (b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una enzima que tiene una actividad nucleasa 5' en condiciones para la escisión del PTO; en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' o su cadena extendida induce la escisión del PTO mediante la enzima que tiene la actividad nucleasa 5' de manera que la escisión libera un fragmento que comprende la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO;

20 (c) hibridar el fragmento liberado del PTO con un CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde); en el que el CTO comprende en una dirección de 3' a 5' (i) una porción de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO y (ii) una porción de formación de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la porción de etiquetado en 5' y la porción de direccionamiento en 3' del PTO; en el que el fragmento liberado del PTO se hibrida con la porción de captura del CTO;

25 (d) realizar una reacción de extensión usando el resultante de la etapa (c) y una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende para producir una cadena extendida complementaria a la porción de formación de molde del CTO y se forma un dúplex extendido; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido;

30 (e) hibridar el resultante de la etapa (d) con un HO (oligonucleótido de hibridación) que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO en condiciones adecuadas para la hibridación entre el CTO y el HO; en el que uno del CTO y el HO se marca con un único marcador y el otro no marcado se inmoviliza sobre un sustrato sólido o va a quedar inmovilizado sobre un sustrato sólido antes de la detección de la señal en la etapa (f); en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido y el CTO y el HO forman el híbrido, proporcionando de ese modo una señal del único marcador sobre el sustrato sólido; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente en la muestra de ácido nucleico, se forma el dúplex extendido para impedir la formación del híbrido entre el CTO y el HO, no proporcionando de ese modo la señal del único marcador sobre el sustrato sólido; y

35 (f) detectar la señal sobre el sustrato sólido para detectar el híbrido entre el CTO y el HO sobre el sustrato sólido; en el que la presencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la ausencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

40 7. Método según la reivindicación 6, en el que la etapa (d) se realiza en presencia de los HO; en el que (i) el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende antes de la hibridación del HO y/o (ii) cuando el HO se hibrida con el CTO antes de la extensión del fragmento, la extensión del fragmento escinde o desplaza el HO del CTO, de ese modo la formación del dúplex extendido impide la formación del híbrido entre el CTO y el HO en la etapa (e) debido a la inhibición de la hibridación del HO con el CTO y/o el consumo del HO mediante la escisión.

45 8. Método según la reivindicación 6, en el que (i) el CTO tiene el único marcador y el HO se inmoviliza sobre el sustrato sólido o va a quedar inmovilizado sobre un sustrato sólido antes de la detección de la señal en la etapa (f) o (ii) el HO tiene el único marcador y el CTO se inmoviliza sobre el sustrato sólido o va a quedar inmovilizado sobre un sustrato sólido antes de la detección de la señal en la etapa (f).

50 9. Método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra de ácido nucleico mediante un ensayo PCE-NH (sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO), que comprende:

55 (a) hibridar la secuencia de ácido nucleico diana con un oligonucleótido en el sentido de 5' y un PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado); en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; el PTO comprende (i) una

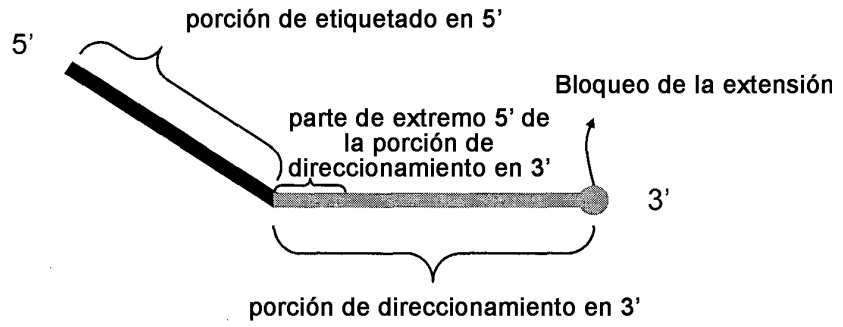
- 5 porción de direccionamiento en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) una porción de etiquetado en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la porción de direccionamiento en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y la porción de etiquetado en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana; el oligonucleótido en el sentido de 5' está ubicado en el sentido de 5' del PTO;
- 10 (b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una enzima que tiene una actividad nucleasa 5' en condiciones para la escisión del PTO; en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' o su cadena extendida induce la escisión del PTO mediante la enzima que tiene la actividad nucleasa 5' de manera que la escisión libera un fragmento que comprende la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO;
- 15 (c) hibridar el fragmento liberado del PTO con un CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde); en el que el CTO comprende en una dirección de 3' a 5' (i) una porción de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO y (ii) una porción de formación de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la porción de etiquetado en 5' y la porción de direccionamiento en 3' del PTO; en el que el fragmento liberado del PTO se hibrida con la porción de captura del CTO;
- 20 (d) realizar una reacción de extensión usando el resultante de la etapa (c) y una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende para producir una cadena extendida complementaria a la porción de formación de molde del CTO y se forma un dúplex extendido; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido;
- 25 (e) hibridar el resultante de la etapa (d) con un HO (oligonucleótido de hibridación) que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO en condiciones adecuadas para la hibridación entre el CTO y el HO; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido y el CTO y el HO forman un híbrido, proporcionando de ese modo una primera señal indicativa de la presencia del híbrido entre el CTO y el HO; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente en la muestra de ácido nucleico, el dúplex extendido inhibe la hibridación del HO con el CTO, proporcionando de ese modo una segunda señal indicativa de la presencia de HO no hibridado con CTO; en el que las señales se proporcionan mediante (i) un marcador unido al HO, (ii) un marcador unido al CTO, (iii) un marcador unido al HO y un marcador unido al CTO, o (iv) un marcador de intercalación; y
- 30 (f) detectar la primera señal o la segunda señal a una temperatura predeterminada a la que el híbrido entre el CTO y el HO mantiene su forma bicatenaria; en el que la presencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la ausencia del híbrido entre el CTO y el HO indica la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la diferencia en la primera señal y la segunda señal permite determinar la presencia o ausencia del híbrido entre el CTO y el HO para indicar la presencia o ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra de ácido nucleico.
- 35 10. Método según la reivindicación 9, en el que la etapa (d) se realiza en presencia de los HO; en el que (i) el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende antes de la hibridación del HO y/o (ii) cuando el HO se hibrida con el CTO antes de la extensión del fragmento, la extensión del fragmento escinde o desplaza el HO del CTO.
- 40 11. Método según la reivindicación 9, en el que el HO o el CTO tiene un marcador doble interactivo que comprende una molécula indicadora y una molécula extintora; en el que el marcador doble interactivo está situado en un sitio tal que una señal del marcador doble interactivo en el caso de que el CTO y el HO estén asociados para formar un híbrido es diferente de una señal del marcador doble interactivo en el caso de que el CTO y el HO estén disociados uno de otro.
- 45 12. Método según la reivindicación 9, en el que el HO tiene uno de un marcador doble interactivo que comprende una molécula indicadora y una molécula extintora y el CTO tiene el otro del marcador doble interactivo; en el que el marcador doble interactivo está situado en un sitio tal que una señal del marcador doble interactivo en el caso de que el CTO y el HO estén asociados para formar un híbrido es diferente de una señal del marcador doble interactivo en el caso de que el CTO y el HO estén disociados uno de otro.
- 50 13. Método según la reivindicación 9, en el que el método se realiza usando un HO adicional que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO y los dos HO se hibridan con el CTO de una manera adyacente entre sí; en el que uno de los dos HO tiene uno de un marcador doble interactivo que comprende una molécula indicadora y una molécula extintora y el otro de los dos HO tiene el otro del marcador doble interactivo; en el que el marcador doble interactivo está situado en un sitio tal que una señal del marcador doble interactivo en el caso de que el CTO y los dos HO estén asociados para formar un híbrido es diferente de una señal del marcador doble interactivo en el caso de que el CTO y los dos HO estén disociados uno de otro.
- 55 60 65

14. Método según la reivindicación 9, en el que uno del CTO y HO se inmoviliza sobre el sustrato sólido o va a quedar inmovilizado sobre un sustrato sólido antes de la detección de la señal en la etapa (f) y la señal se detecta sobre el sustrato sólido.
- 5 15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 6 y 9, en el que el HO comprende una secuencia de nucleótidos que es competitiva con el fragmento en cuanto a la hibridación con el CTO.
16. Método según la reivindicación 15, en el que el HO no se escinde mediante el fragmento o su producto de extensión.
- 10 17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 6 y 9, en el que el PTO, el CTO y/o el HO se bloquea en su extremo 3' para prohibir su extensión.
- 15 18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 6 y 9, en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' es un cebador en el sentido de 5' o una sonda en el sentido de 5'.
19. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 6 y 9, en el que el método comprende además repetir todas o algunas de las etapas (a)-(f) con desnaturalización entre los ciclos de repetición.
- 20 20. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 6 y 9, en el que el método se realiza para detectar al menos dos tipos de secuencias de ácido nucleico diana; en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' comprende al menos dos tipos de oligonucleótidos, el PTO comprende al menos dos tipos de los PTO, el CTO comprende al menos dos tipos de los CTO y el HO comprende al menos dos tipos de los HO.
- 25 21. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 6 y 9, en el que la secuencia de ácido nucleico diana comprende una variación de nucleótido.
22. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 6 y 9, en el que el método se realiza en presencia de un cebador en el sentido de 3'.
- 30 23. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 6 y 9, en el que el método se realiza sin el uso del oligonucleótido en el sentido de 5' y la escisión del PTO en la etapa (b) se produce sin la ayuda del oligonucleótido en el sentido de 5' o su cadena extendida.
- 35 24. Kit para detectar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra de ácido nucleico mediante un ensayo PCE-NH (sin hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO), que comprende:
- (a) un oligonucleótido en el sentido de 5'; en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana;
- 40 (b) un PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado); en el que el PTO comprende (i) una porción de direccionamiento en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) una porción de etiquetado en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; en el que la porción de direccionamiento en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y la porción de etiquetado en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana; el oligonucleótido en el sentido de 5' está ubicado en el sentido de 5' del PTO; en el que el oligonucleótido en el sentido de 5' o su cadena extendida induce la escisión del PTO mediante la enzima que tiene la actividad nucleasa 5' de manera que la escisión libera un fragmento que comprende la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO;
- 45 50 (c) un CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde); en el que el CTO comprende en una dirección de 3' a 5' (i) una porción de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la porción de etiquetado en 5' o una parte de la porción de etiquetado en 5' del PTO y (ii) una porción de formación de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la porción de etiquetado en 5' y la porción de direccionamiento en 3' del PTO; en el que el fragmento liberado del PTO se hibrida con la porción de captura del CTO; en el que el fragmento hibridado con la porción de captura del CTO se extiende para producir una cadena extendida complementaria a la porción de formación de molde del CTO y se forma un dúplex extendido; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido; y
- 55 60 (d) un HO (oligonucleótido de hibridación) que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al CTO;
- 65 en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en la muestra de ácido nucleico, no se forma el dúplex extendido y el CTO y el HO forman un híbrido, proporcionando de ese modo una señal indicativa de la presencia del híbrido entre el CTO y el HO; en el que cuando la secuencia de ácido nucleico diana está presente

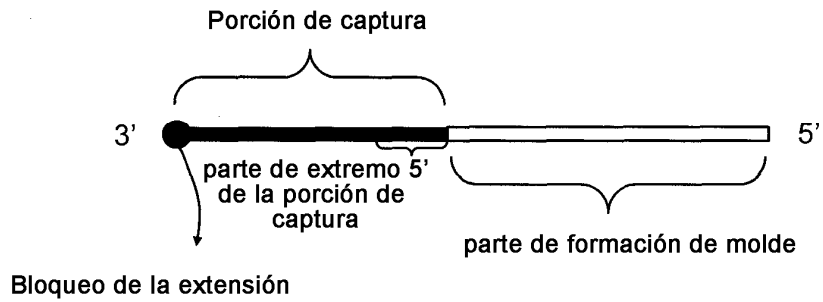
en la muestra de ácido nucleico, se forma el dúplex extendido para impedir la formación del híbrido entre el CTO y el HO, no proporcionando de ese modo la señal; en el que el kit comprende además (i) un marcador unido al HO, (ii) un marcador unido al CTO, (iii) un marcador unido al HO y un marcador unido al CTO, o (iv) un marcador de intercalación.

Fig. 1

A. Oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado (PTO)



B. Oligonucleótido de captura y formación de molde (CTO)



C. Oligonucleótido de hibridación (HO)

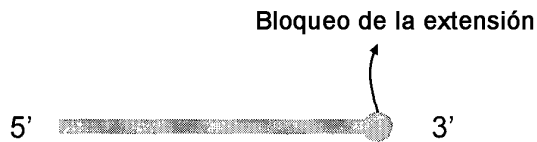
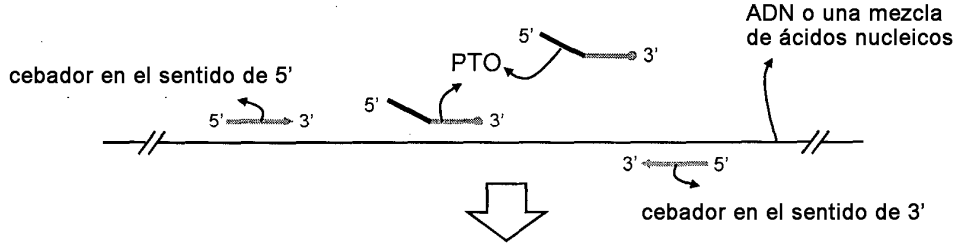
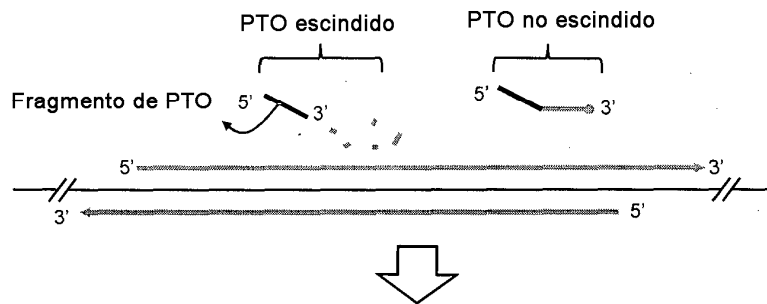


Fig. 2

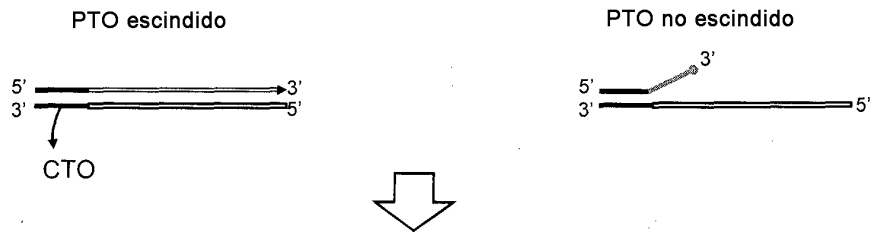
A. Hibridación



B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento de PTO con CTO y extensión

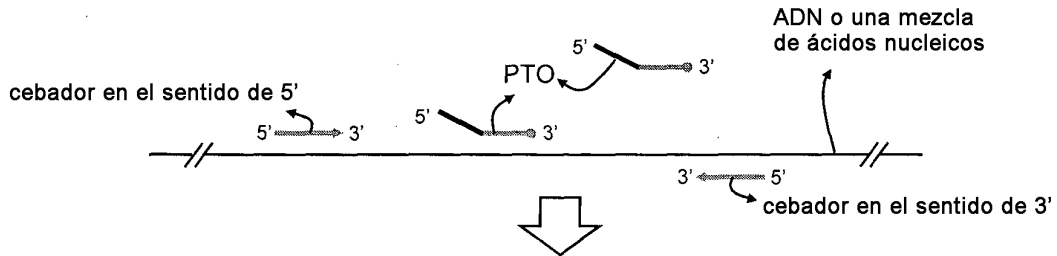


D. Análisis de fusión del híbrido de CTO-HO

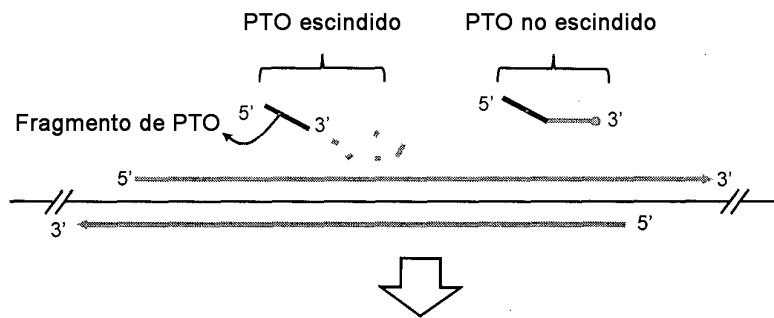


Fig. 3

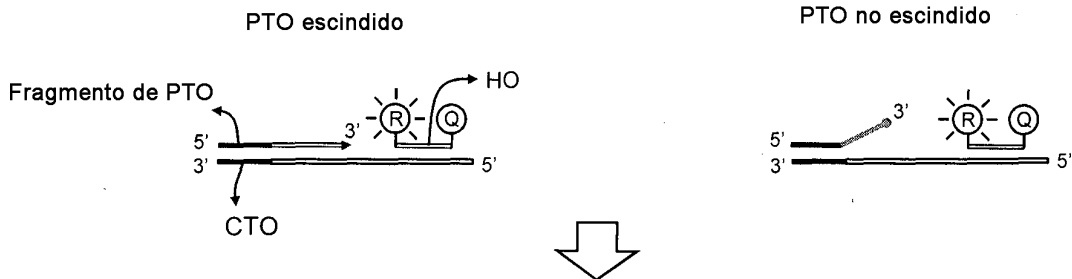
A. Hibridación



B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento de PTO con CTO y extensión del fragmento de PTO y desplazamiento o escisión de HO

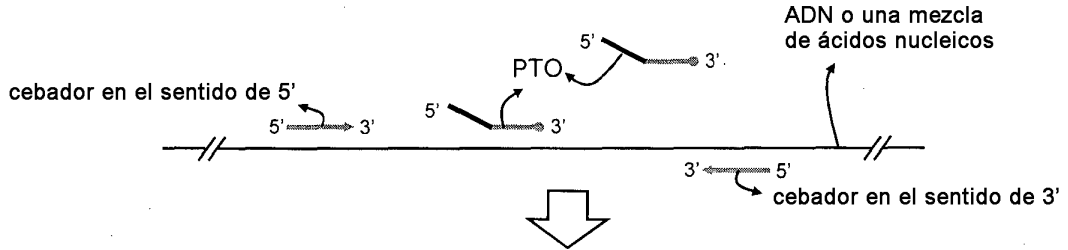


D. Análisis de fusión del híbrido de CTO-HO

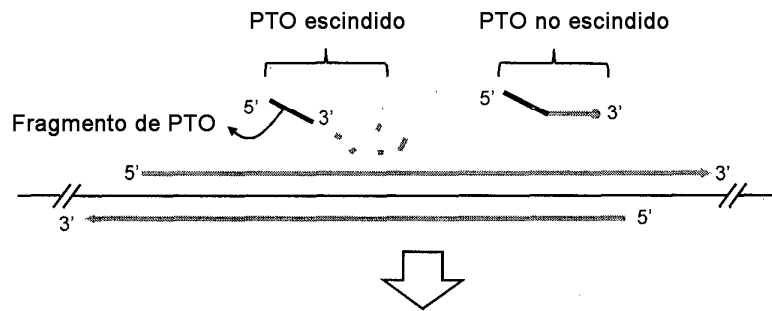


Fig. 4

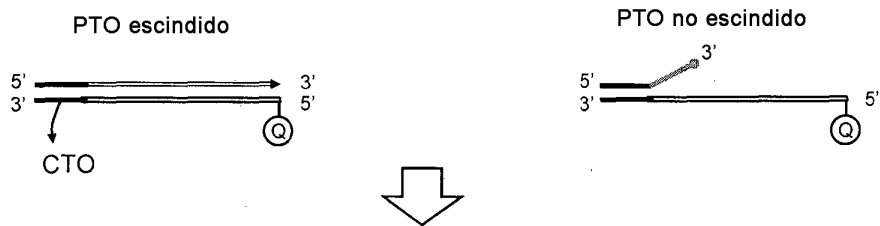
A. Hibridación



B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento de PTO con CTO y extensión

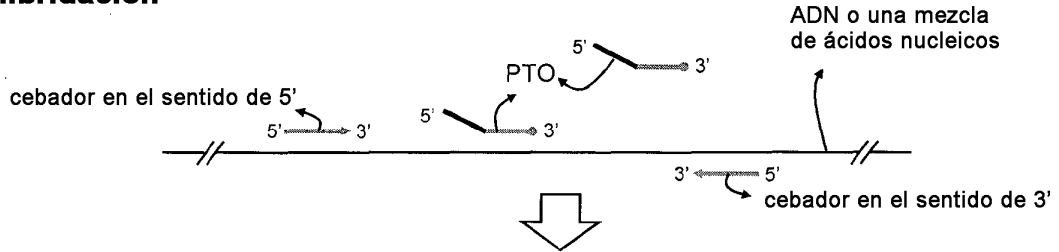


D. Análisis de fusión del híbrido de CTO-HO

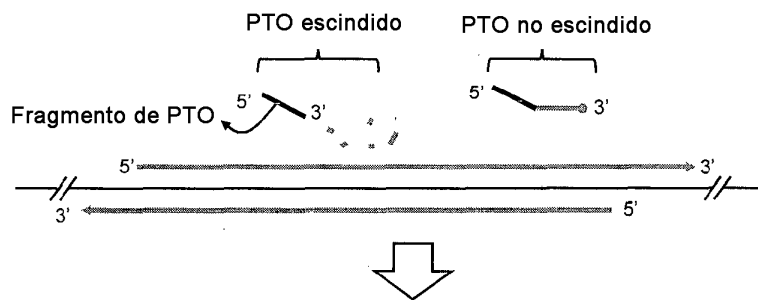


Fig. 5

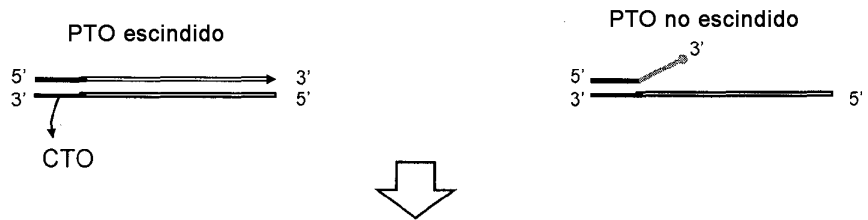
A. Hibridación



B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento de PTO con CTO y extensión

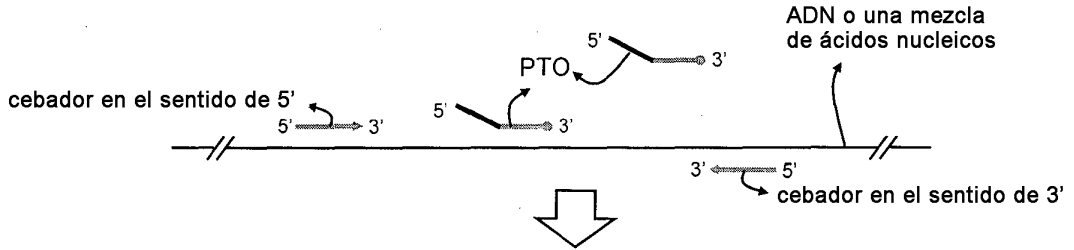


D. Análisis de fusión del híbrido de CTO-HO

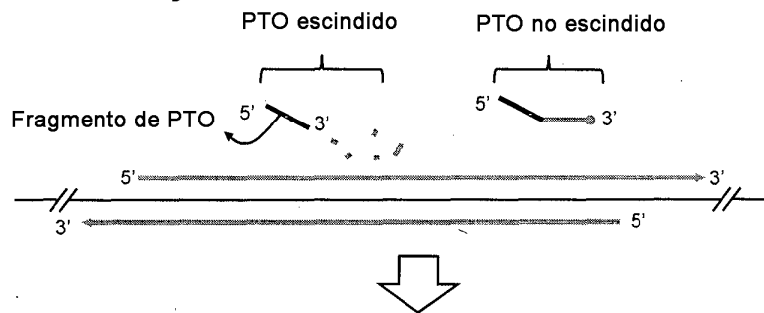


Fig. 6

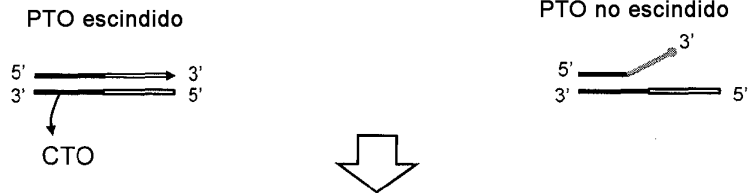
A. Hibridación



B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento de PTO con CTO y extensión



D. Análisis de fusión del híbrido de CTO-HO

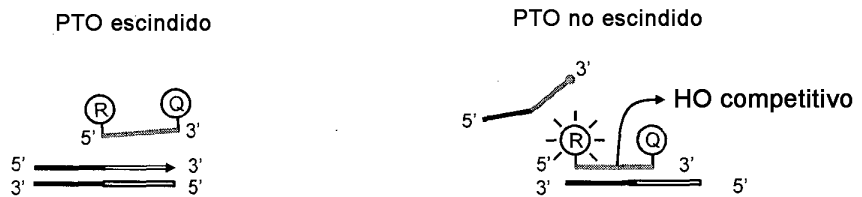
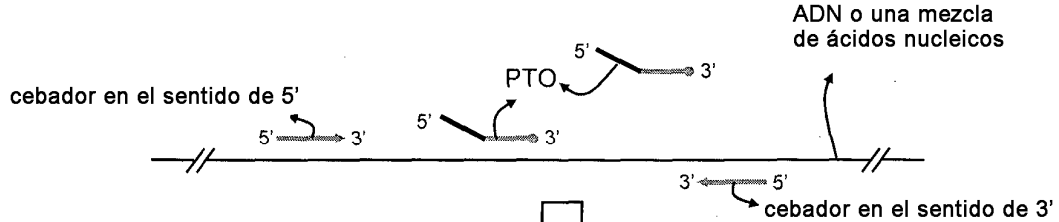
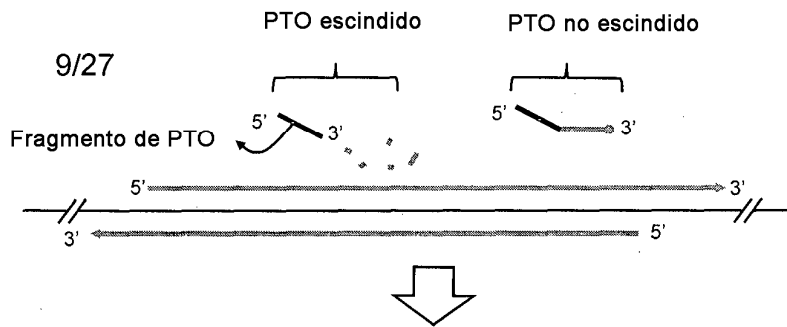


Fig. 7

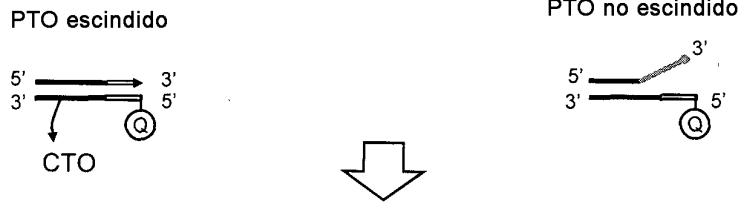
A. Hibridación



B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento de PTO con CTO y extensión



D. Análisis de fusión del híbrido de CTO-HO

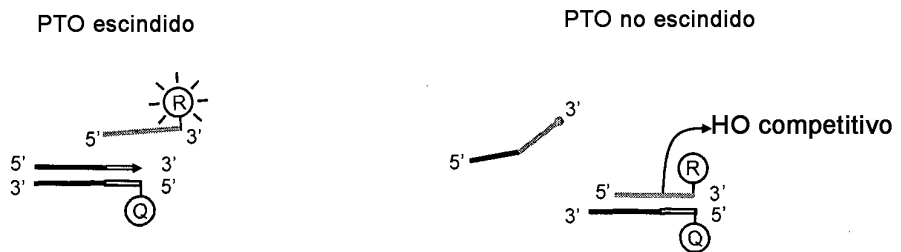
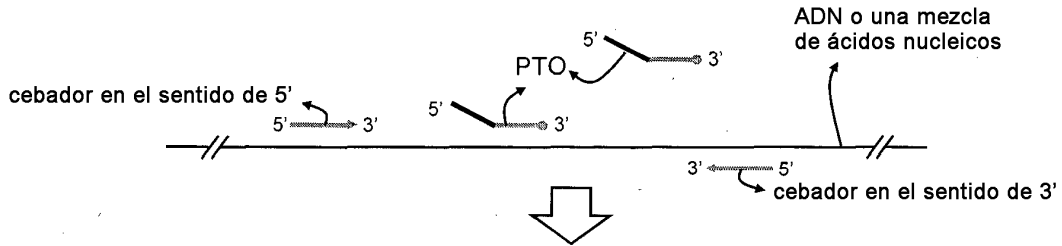
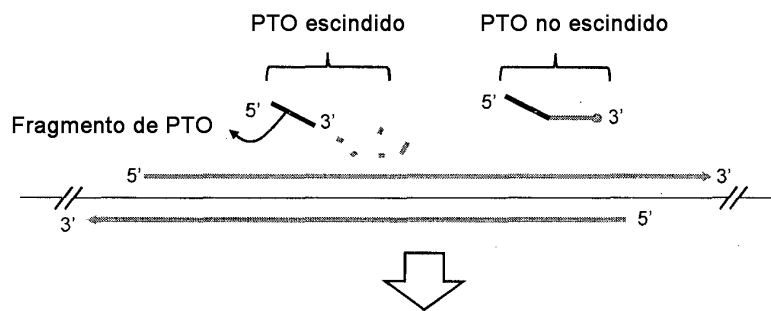


Fig. 8

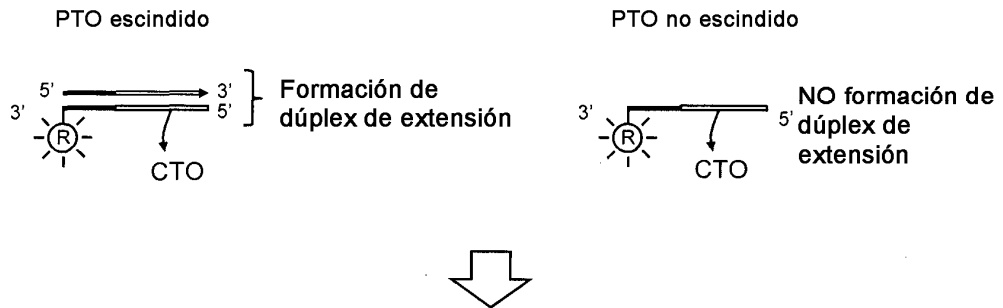
A. Hibridación



B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento de PTO con CTO y extensión



D. Hibridación del HO con CTO y detección

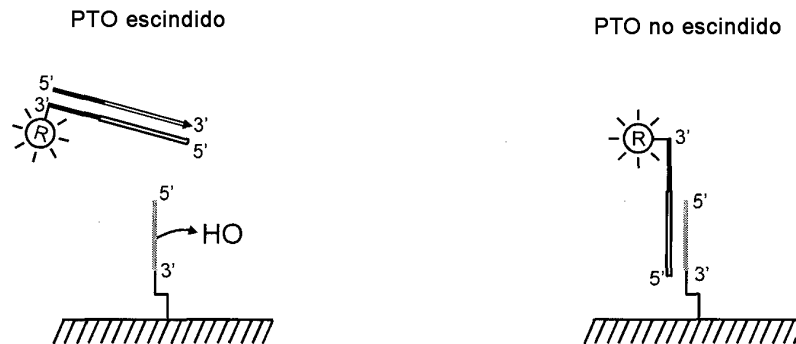
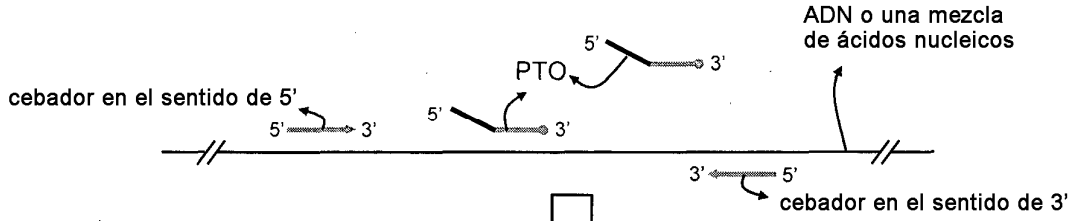
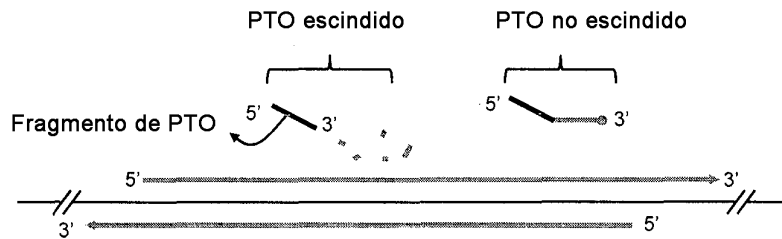


Fig. 9

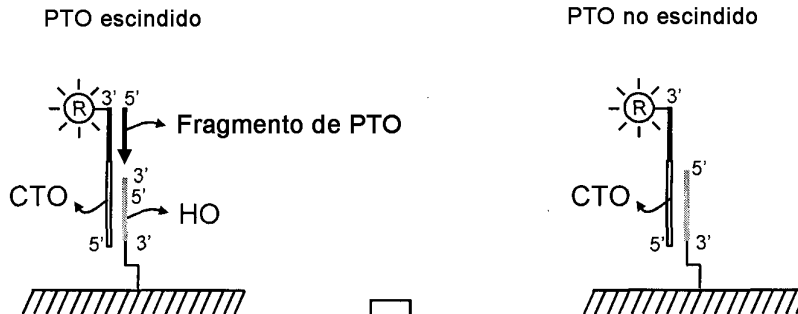
A. Hibridación



B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento de PTO con CTO y extensión del fragmento de PTO y desplazamiento o escisión de HO



D. Hibridación del HO con CTO y detección

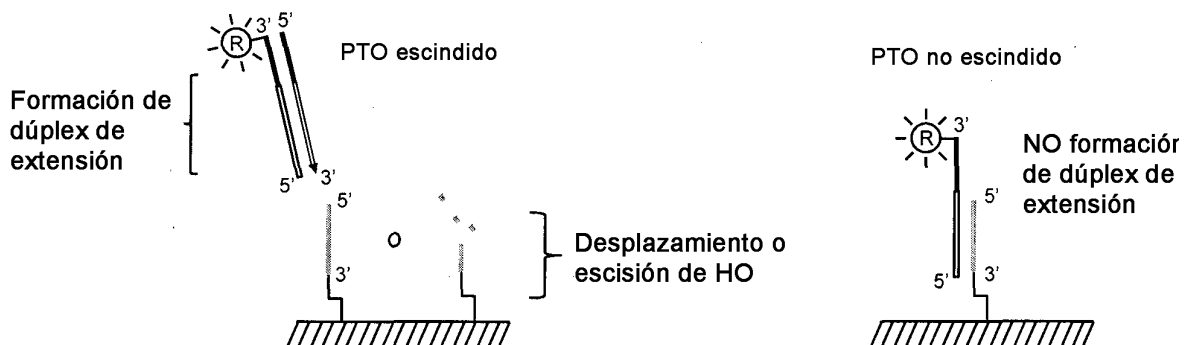
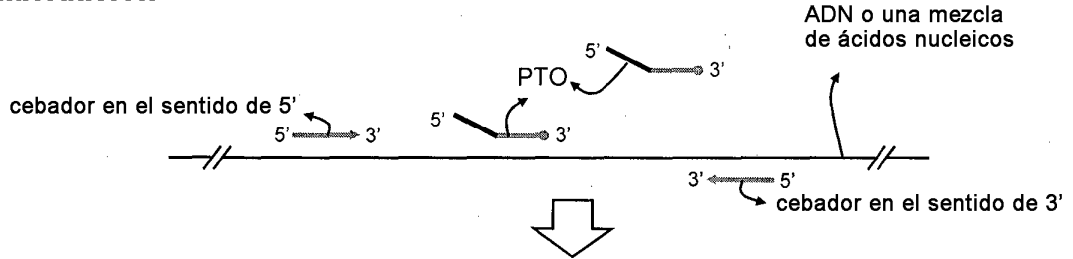
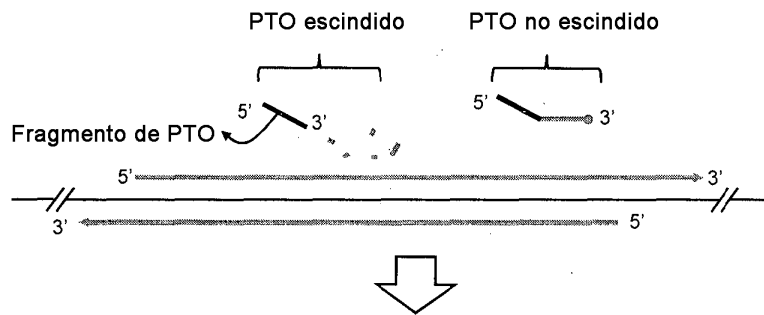


Fig. 10

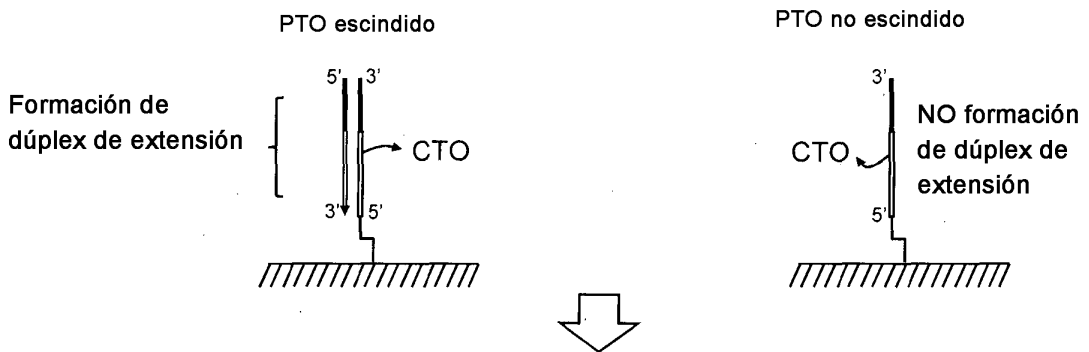
A. Hibridación



B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento de PTO con CTO y extensión



D. Hibridación del HO con CTO y detección

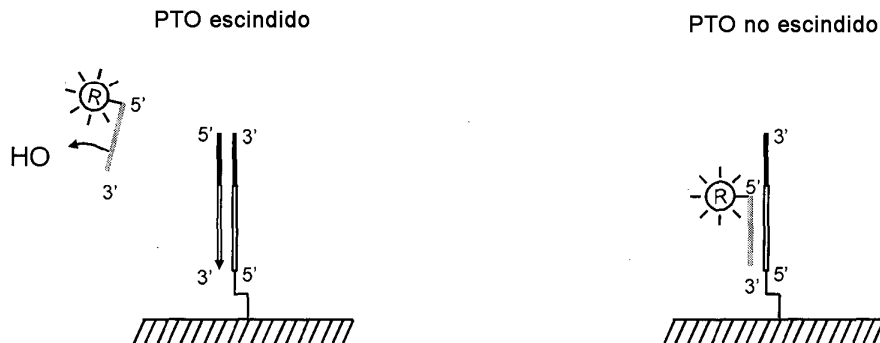
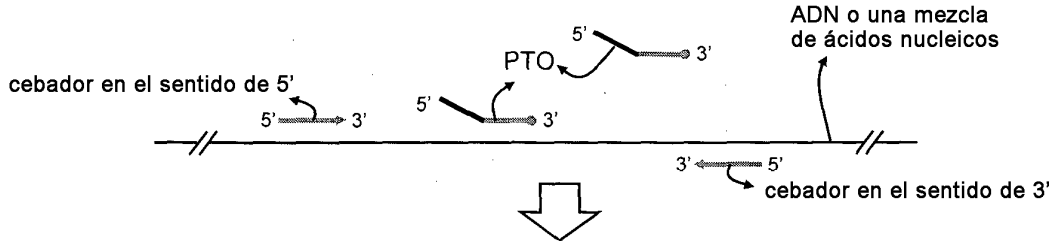
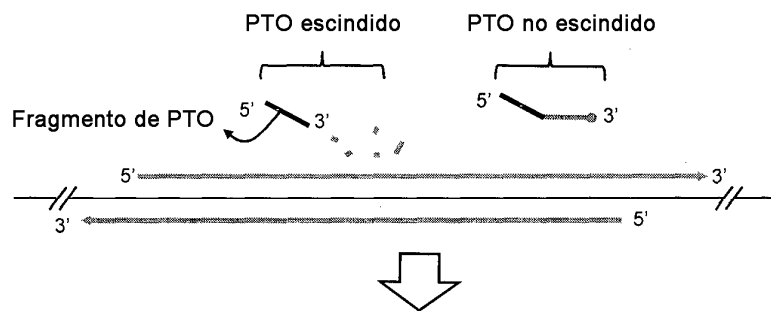


Fig. 11

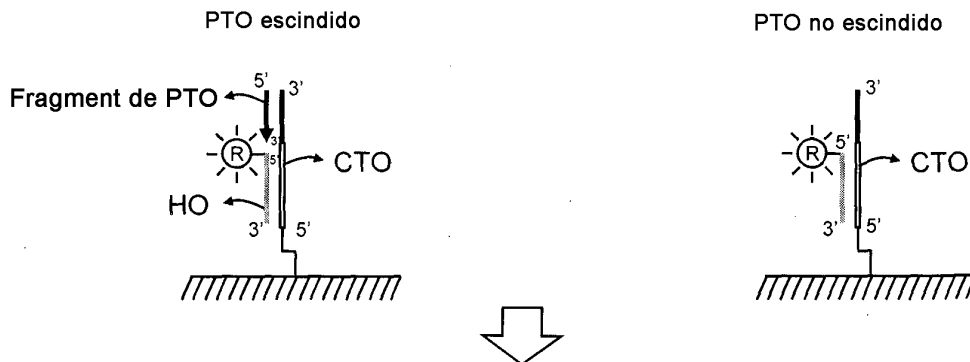
A. Hibridación



B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento de PTO con CTO y extensión del fragmento de PTO y desplazamiento o escisión de HO



D. Hibridación del HO con CTO y detección

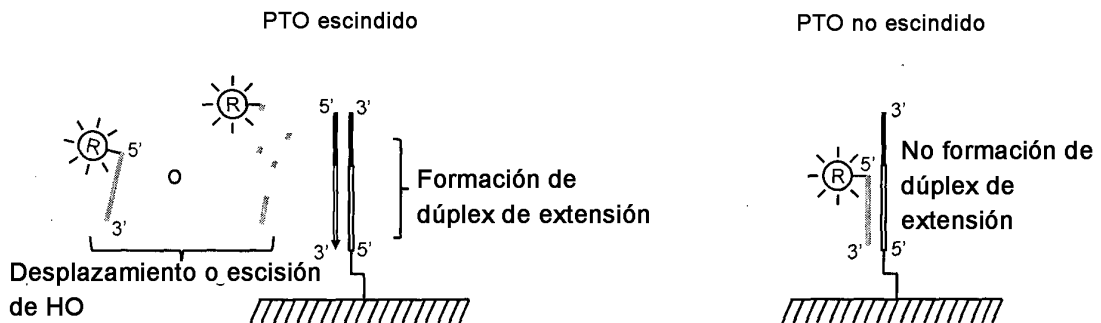
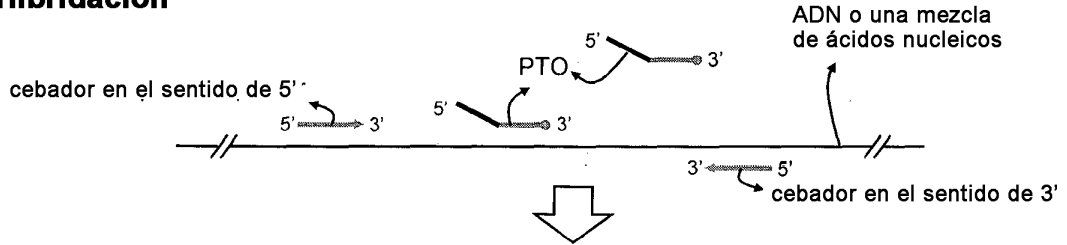
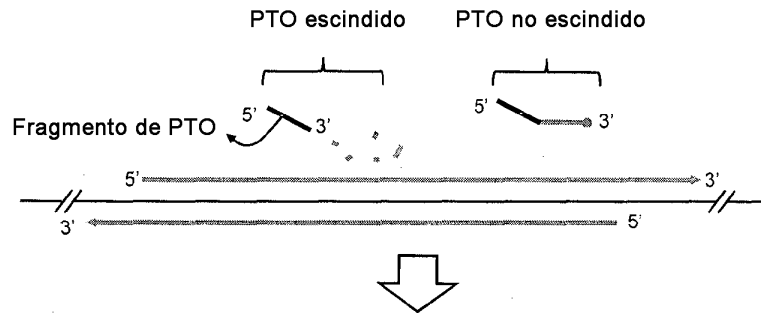


Fig. 12

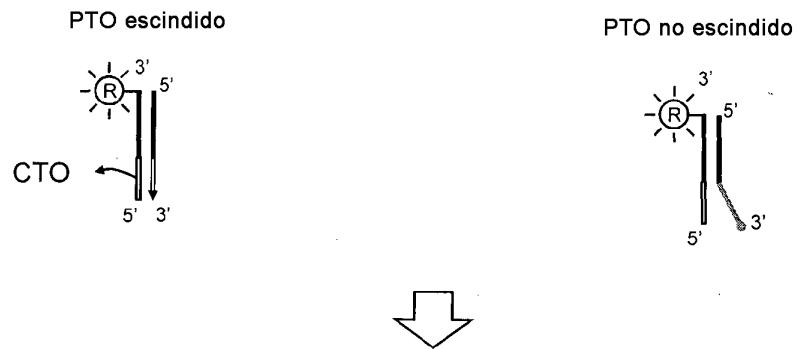
A. Hibridación



B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento de PTO con CTO y extensión



D. Hibridación del HO con CTO y detección

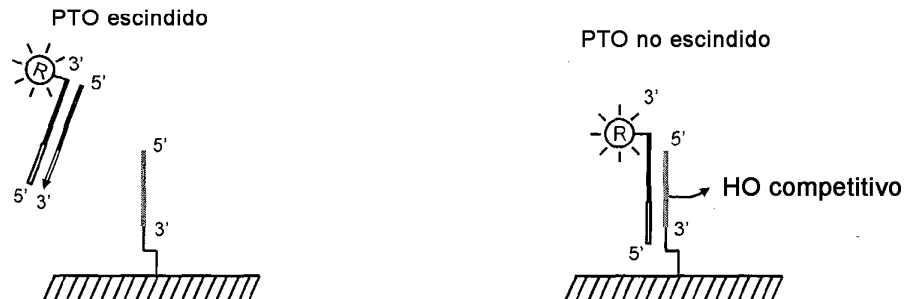
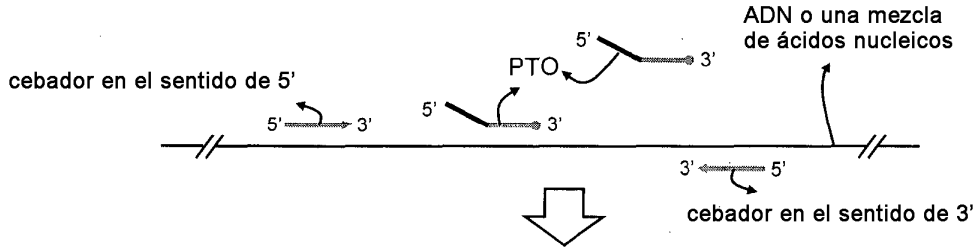
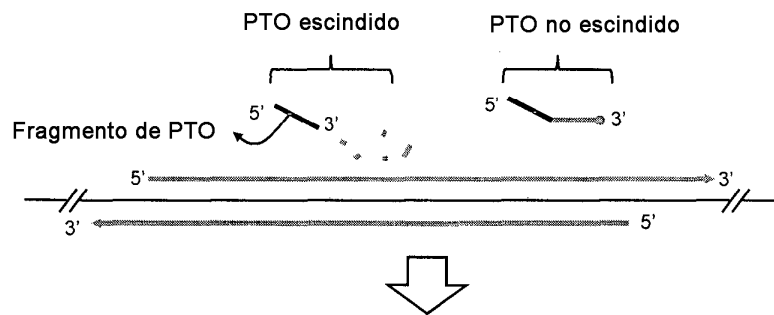


Fig. 13

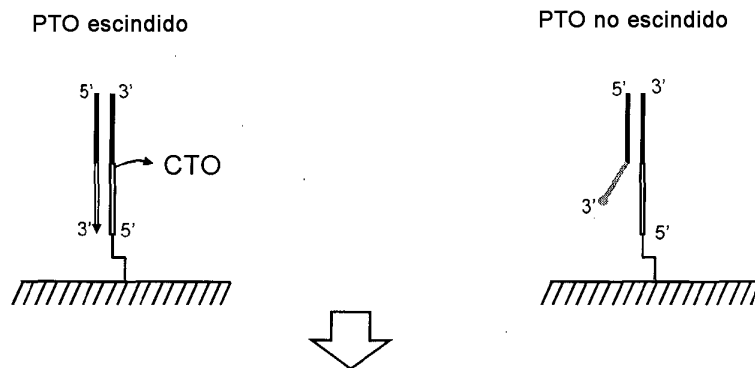
A. Hibridación



B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento de PTO con CTO y extensión



D. Hibridación del HO con CTO y detección

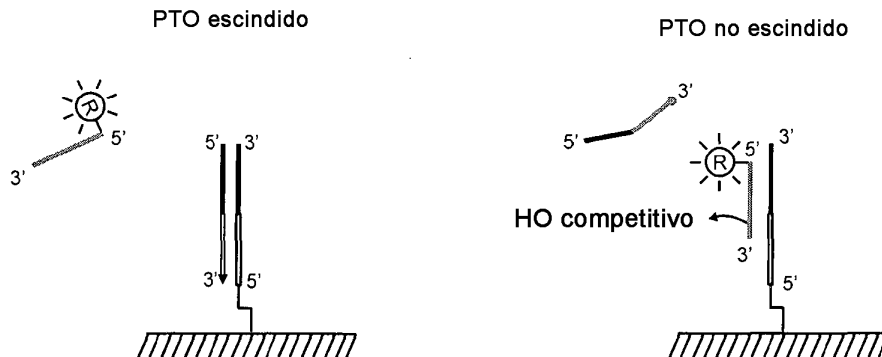
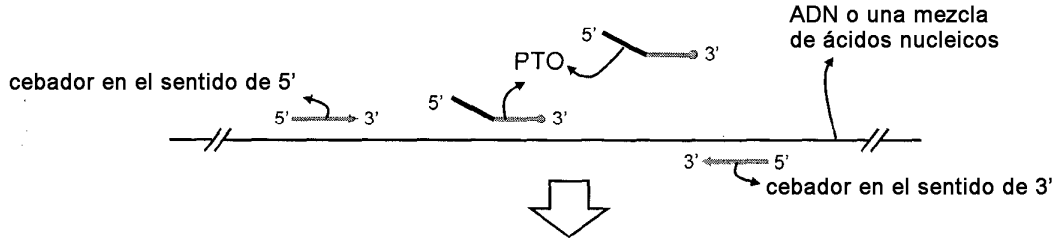
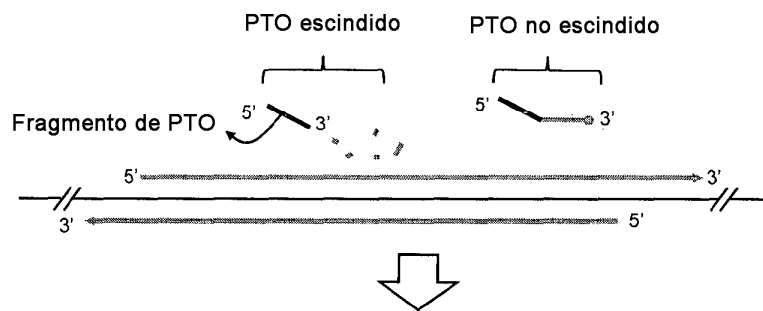


Fig. 14

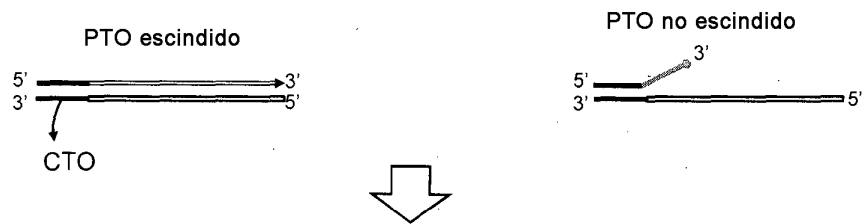
A. Hibridación



B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento de PTO con CTO y extensión

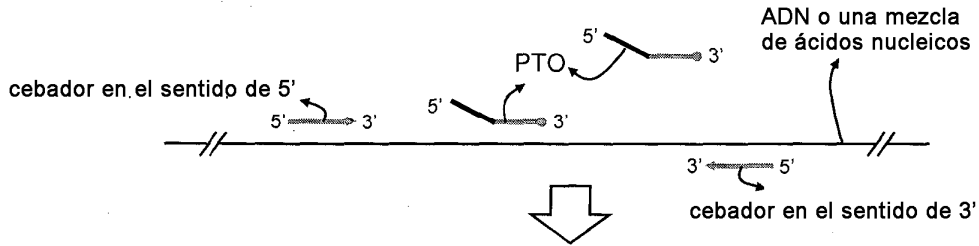


D. Hibridación del HO con CTO y detección

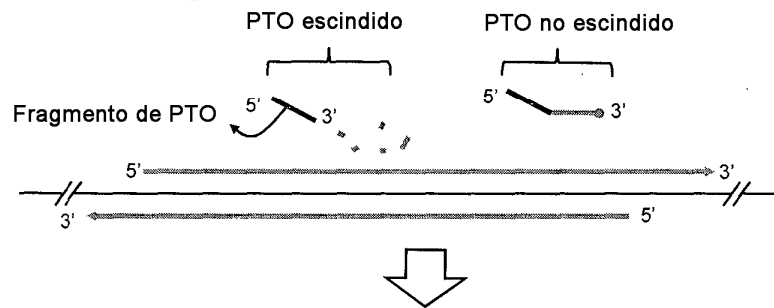


Fig. 15

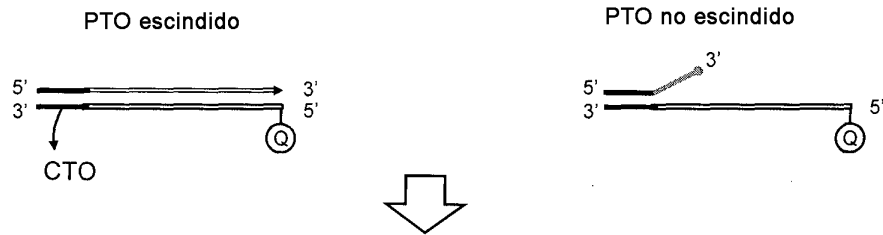
A. Hibridación



B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento de PTO con CTO y extensión

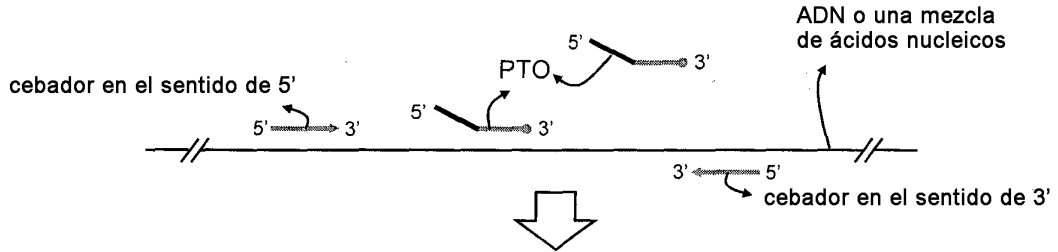


D. Hibridación del HO con CTO y detección

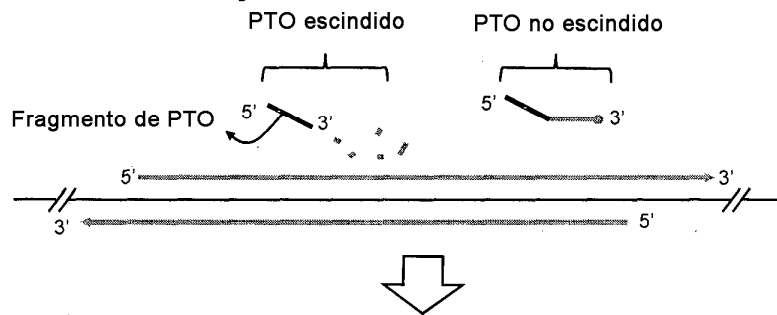


Fig. 16

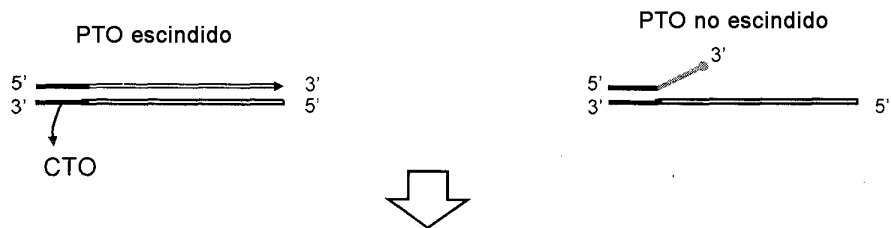
A. Hibridación



B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento de PTO con CTO y extensión

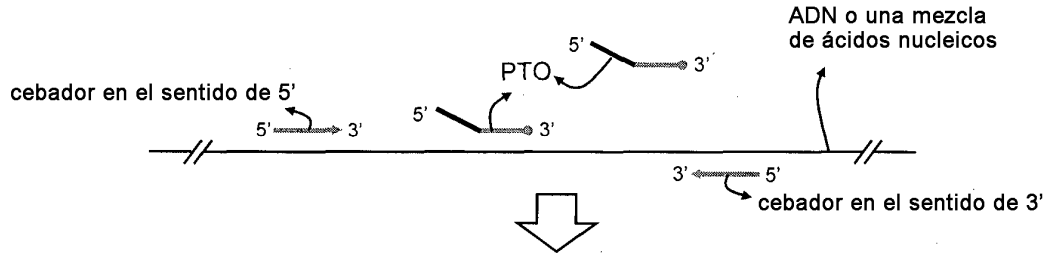


D. Hibridación del HO con CTO y detección

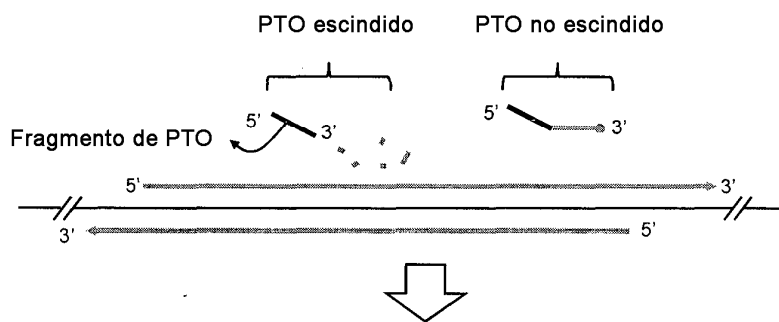


Fig. 17

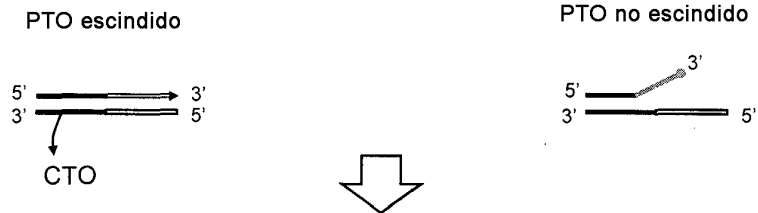
A. Hibridación



B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento de PTO con CTO y extensión



D. Hibridación del HO con CTO y detección

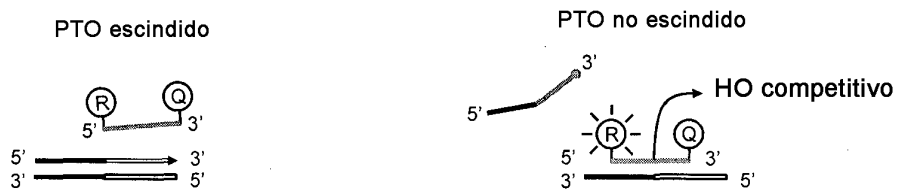
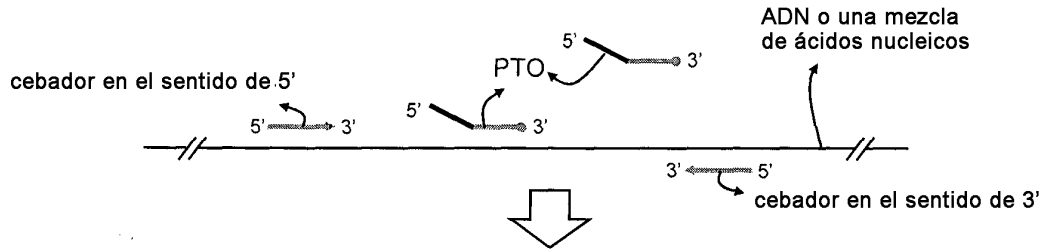
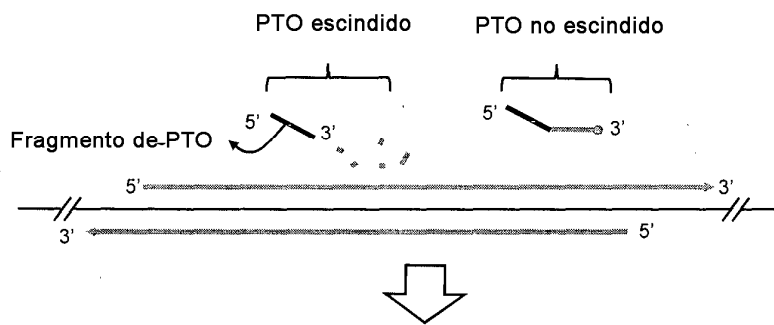


Fig. 18

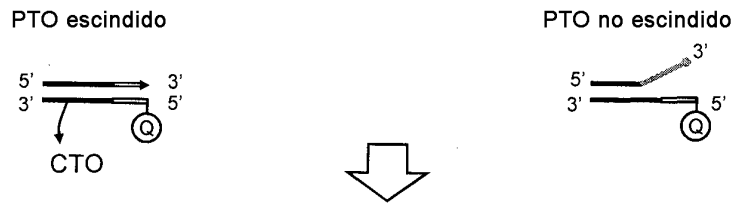
A. Hibridación



B. Extensión del cebador y escisión del PTO



C. Hibridación del fragmento de PTO con CTO y extensión



D. Hibridación del HO con CTO y detección

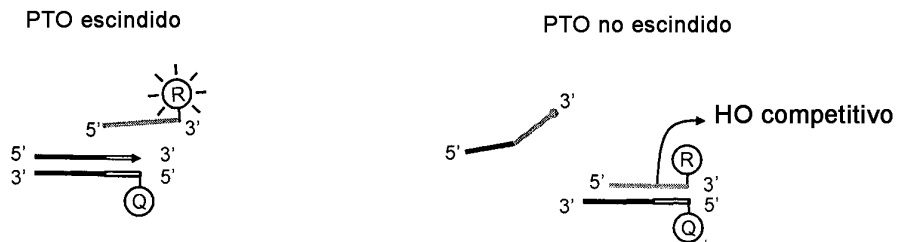
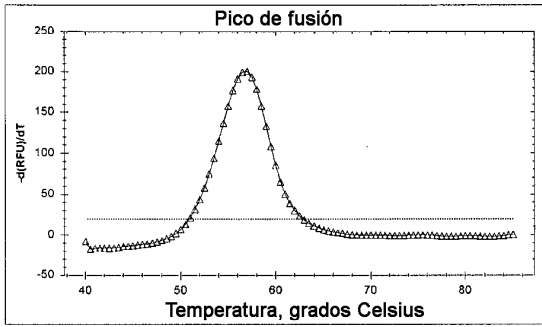
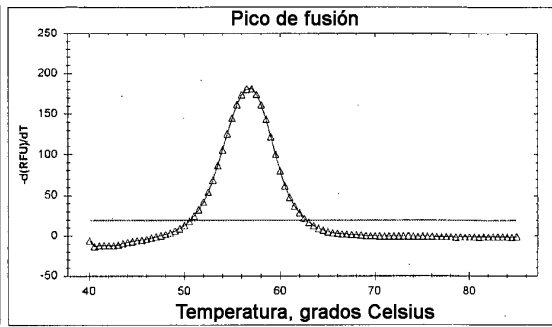


Fig. 19A

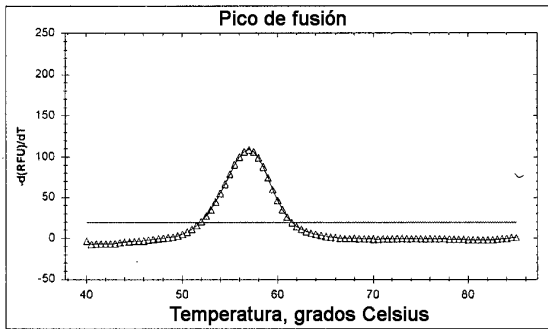
Syn-ES 0 pmoles



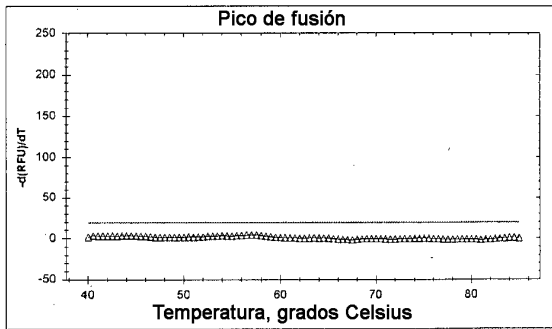
Syn-ES 0.1 pmoles



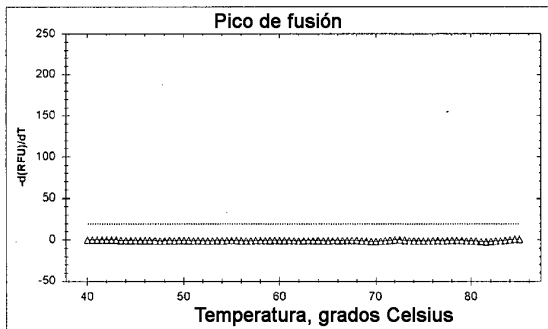
Syn-ES 0.5 pmoles



Syn-ES 1 pmol



Syn-ES 2 pmoles



Syn-ES 3 pmoles

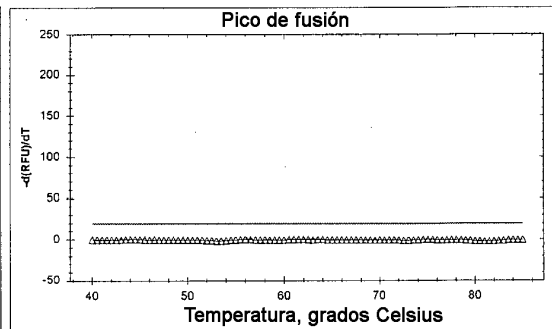
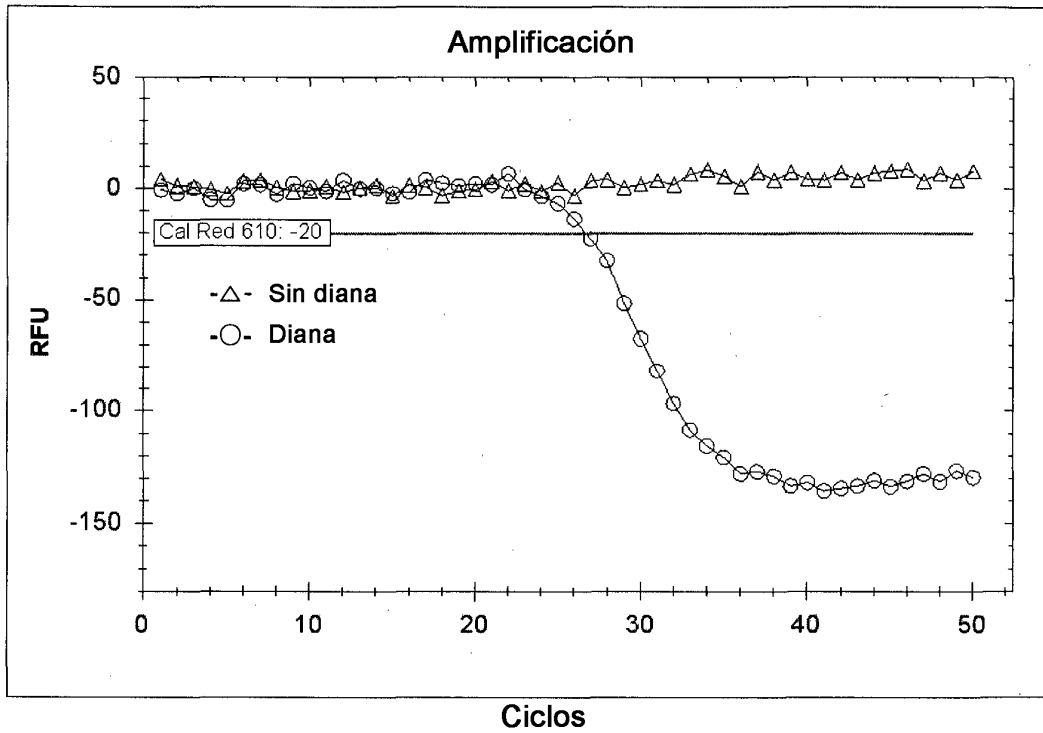


Fig. 19B

Syn-ES ¹⁾ (pmol)	CTO ²⁾ (pmol)	HO ³⁾ (pmol)	Tm ⁴⁾ (°C)	-d(RFU)/dT ⁵⁾
0	1	1	57.0	192.12
0.1	1	1	57.0	180.68
0.5	1	1	57.0	92.49
1	1	1	57.0	-
2	1	1	57.0	-
3	1	1	57.0	-

- 1) Syn-ES (cadena extendida sintética) tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a CTO formando un dúplex extendido.
- 2) CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde) se bloquea con un espaciador de carbono en su extremo 3'.
- 3) HO (oligonucleótido de hibridación) tiene una molécula fluorescente en su extremo 5' y una molécula extintora en su extremo 3'.
- 4) Tm representa la temperatura de fusión del híbrido de CTO-HO.
- 5) RFU representa las unidades de fluorescencia relativa.

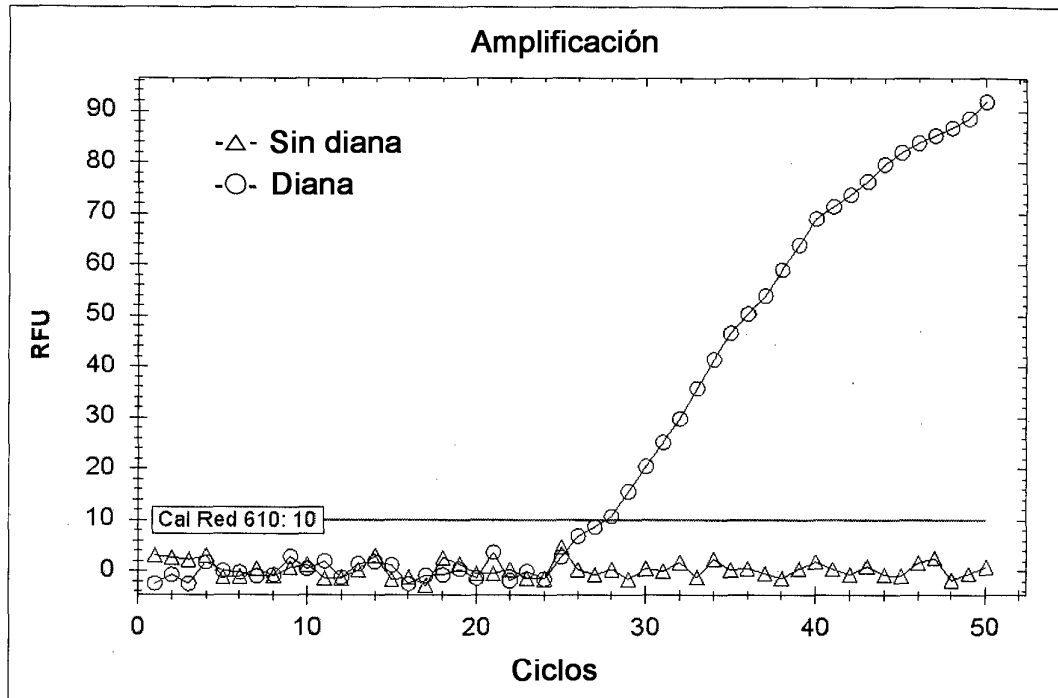
Fig. 20A



Diana ¹⁾	Cebador ²⁾	PTO ³⁾	CTO ⁴⁾	HO ⁵⁾	Ct
+	+	+	+	+	26.0
-	+	+	+	+	-

- 1) La diana es ADN genómico de gen de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) Los cebadores son un cebador en el sentido de 5' y un cebador en el sentido de 3' para PCR.
- 3) PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado) se bloquea con un espaciador de carbono en su extremo 3'.
- 4) CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde) se bloquea con un espaciador de carbono en su extremo 3'.
- 5) HO (oligonucleótido de hibridación) tiene una molécula fluorescente en su extremo 5' y una molécula extintora en su extremo 3'.

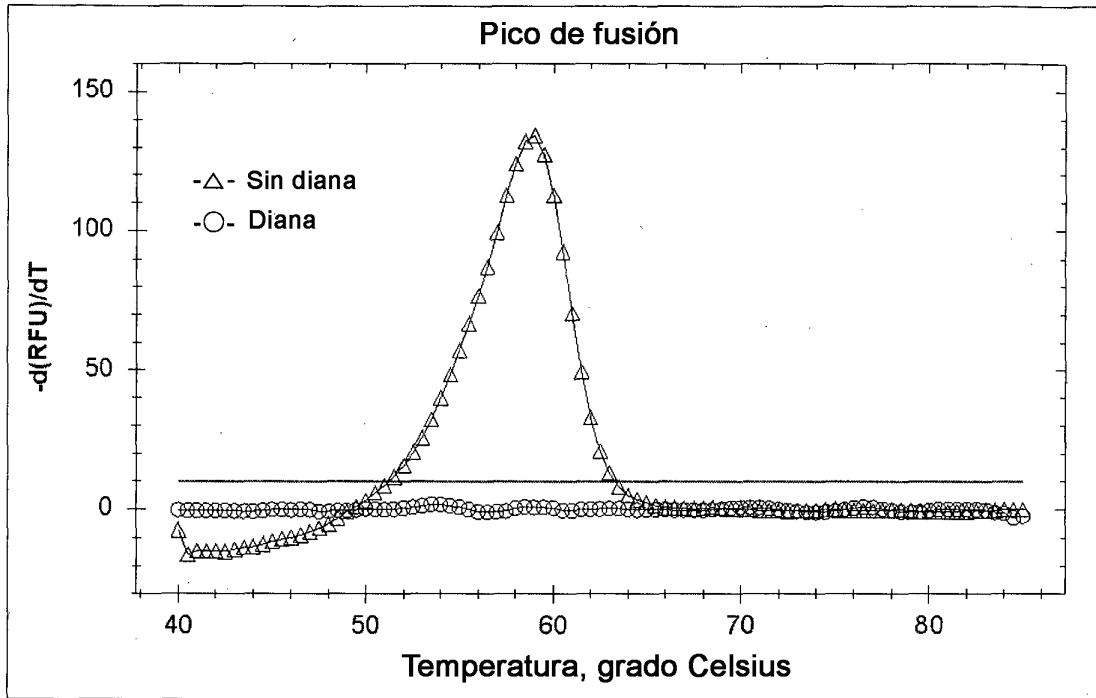
Fig. 20B



Diana ¹⁾	Cebador ²⁾	PTO ³⁾	CTO ⁴⁾	HO ⁵⁾	Ct
+	+	+	+	+	27.6
-	+	+	+	+	-

- 1) La diana es ADN genómico de gen de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) Los cebadores son un cebador en el sentido de 5' y un cebador en el sentido de 3' para PCR.
- 3) PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado) se bloquea con un espaciador de carbono en su extremo 3'.
- 4) CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde) se bloquea con un espaciador de carbono en su extremo 3'.
- 5) HO (oligonucleótido de hibridación) tiene una molécula fluorescente en su extremo 5' y una molécula extintora en su extremo 3'.

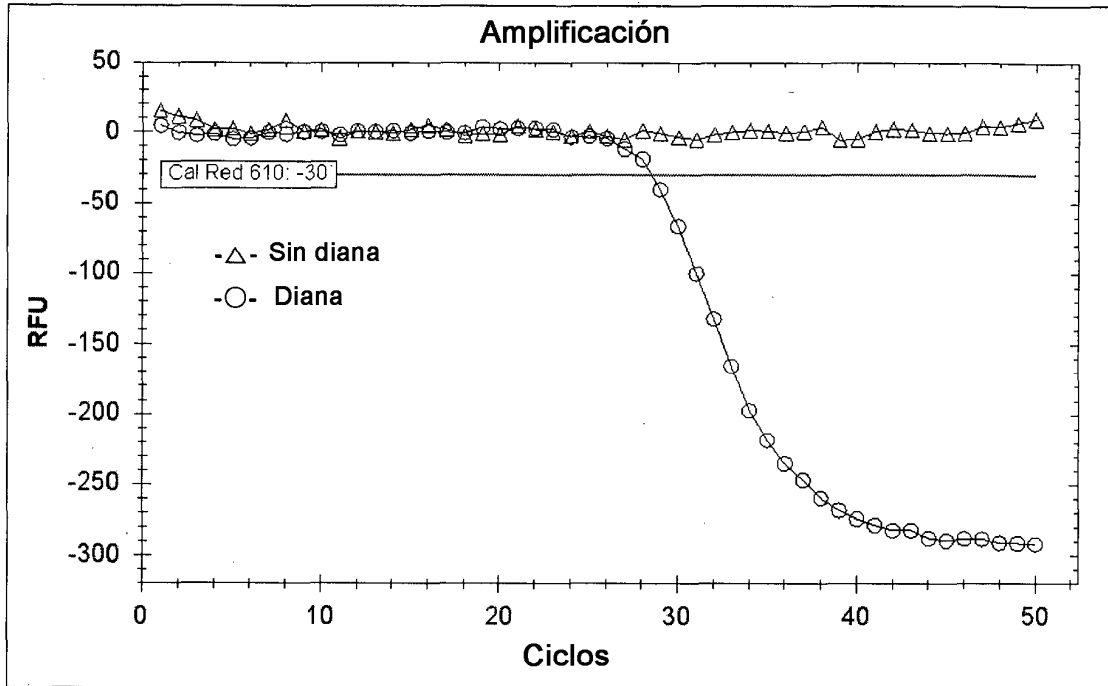
Fig. 20C



Diana ¹⁾	Cebador ²⁾	PTO ³⁾	CTO ⁴⁾	HO ⁵⁾	Tm ⁶⁾ (°C)
+	+	+	+	+	-
-	+	+	+	+	59.0

- 1) La diana es ADN genómico de gen de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) Los cebadores son un cebador en el sentido de 5' y un cebador en el sentido de 3' para PCR.
- 3) PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado) se bloquea con un espaciador de carbono en su extremo 3'.
- 4) CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde) se bloquea con un espaciador de carbono en su extremo 3'.
- 5) HO (oligonucleótido de hibridación) tiene una molécula fluorescente en su extremo 5' y una molécula extintora en su extremo 3'.
- 6) Tm representa la temperatura de fusión del híbrido de CTO-HO.

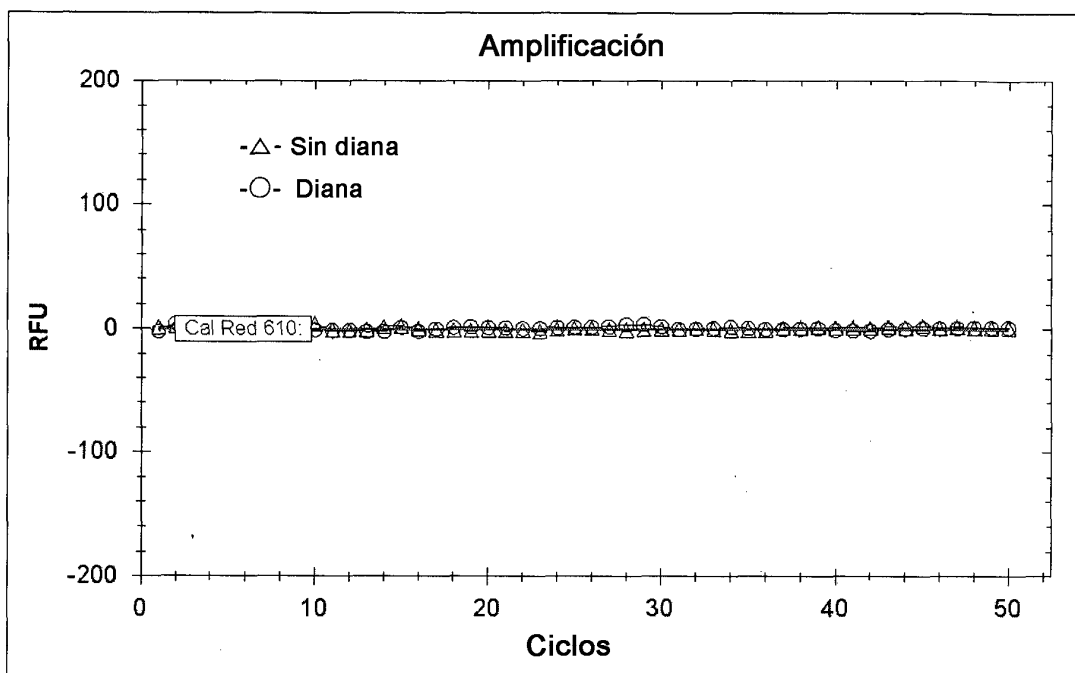
Fig. 21A



Diana ¹⁾	Cebador ²⁾	PTO ³⁾	CTO ⁴⁾	HO ⁵⁾	Ct
+	+	+	+	+	28.2
-	+	+	+	+	-

- 1) La diana es ADN genómico de gen de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) Los cebadores son un cebador en el sentido de 5' y un cebador en el sentido de 3' para PCR.
- 3) PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado) se bloquea con un espaciador de carbono en su extremo 3'.
- 4) CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde) se bloquea con un espaciador de carbono en su extremo 3'.
- 5) HO (oligonucleótido de hibridación) tiene una molécula fluorescente en su extremo 5' y una molécula extintora en su extremo 3'.

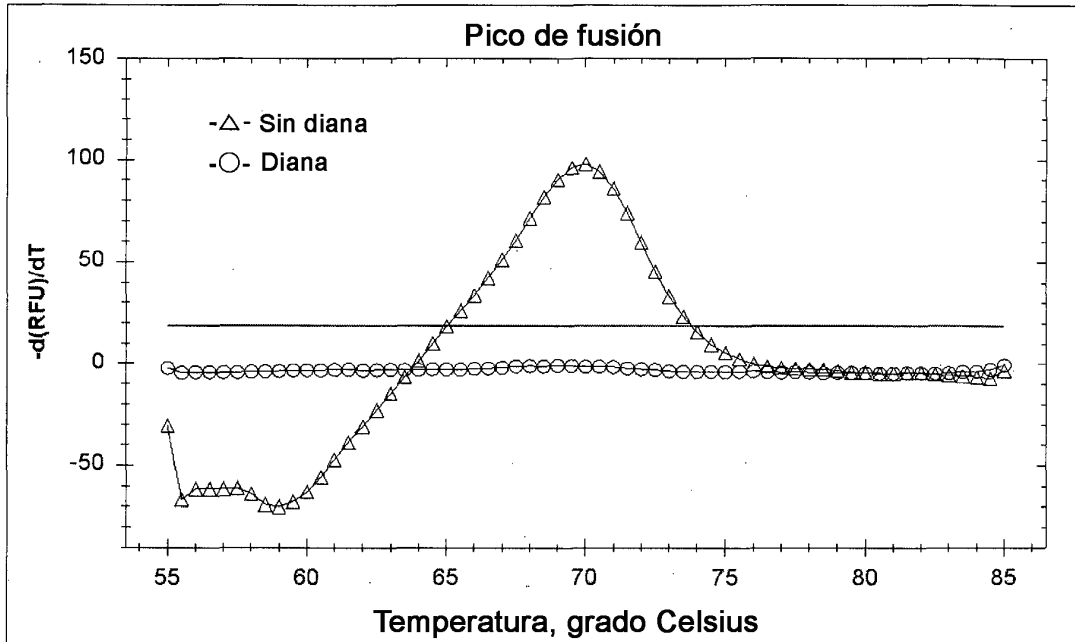
Fig. 21B



Diana ¹⁾	Cebador ²⁾	PTO ³⁾	CTO ⁴⁾	HO ⁵⁾	Ct
+	+	+	+	+	-
-	+	+	+	+	-

- 1) La diana es ADN genómico de gen de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) Los cebadores son un cebador en el sentido de 5' y un cebador en el sentido de 3' para PCR.
- 3) PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado) se bloquea con un espaciador de carbono en su extremo 3'.
- 4) CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde) se bloquea con un espaciador de carbono en su extremo 3'.
- 5) HO (oligonucleótido de hibridación) tiene una molécula fluorescente en su extremo 5' y una molécula extintora en su extremo 3'.

Fig. 21C

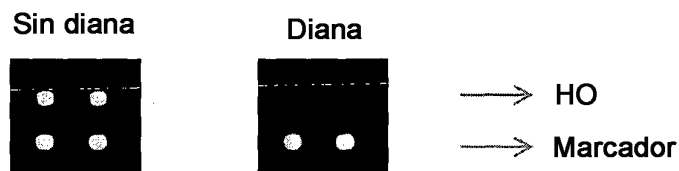


Diana ¹⁾	Cebador ²⁾	PTO ³⁾	CTO ⁴⁾	HO ⁵⁾	Tm ⁶⁾ (°C)
+	+	+	+	+	-
-	+	+	+	+	70.0

- 1) La diana es ADN genómico de gen de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) Los cebadores son un cebador en el sentido de 5' y un cebador en el sentido de 3' para PCR.
- 3) PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado) se bloquea con un espaciador de carbono en su extremo 3'.
- 4) CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde) se bloquea con un espaciador de carbono en su extremo 3'.
- 5) HO (oligonucleótido de hibridación) tiene una molécula fluorescente en su extremo 5' y una molécula extintora en su extremo 3'.
- 6) Tm representa la temperatura de fusión del híbrido de CTO-HO.

Fig. 22

A. Imagen fluorescente



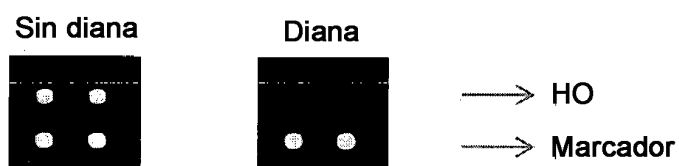
B. Intensidad de fluorescencia

Diana ¹⁾	Cebadores ²⁾	PTO ³⁾	CTO ⁴⁾	RFU ⁵⁾
-	+	+	+	65,441.5 (±2.1)
+	+	+	+	829.5 (±58.7)

- 1) La diana es ADN genómico de gen de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) Los cebadores son un cebador en el sentido de 5' y un cebador en el sentido de 3' para PCR.
- 3) PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado) se bloquea con un espaciador de carbono en su extremo 3'.
- 4) CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde) tiene una molécula fluorescente en su extremo 3'.
- 5) RFU representa las unidades de fluorescencia relativa.

Fig. 23

A. Imagen fluorescente



B. Intensidad de fluorescencia

Diana ¹⁾	Cebadores ²⁾	PTO ³⁾	CTO ⁴⁾	RFU ⁵⁾
-	+	+	+	65,467.5 (± 0.7)
+	+	+	+	34.5 (± 2.1)

¹⁾ La diana es ADN genómico de gen de *Neisseria gonorrhoeae*.

²⁾ Los cebadores son un cebador en el sentido de 5' y un cebador en el sentido de 3' para PCR.

³⁾ PTO (oligonucleótido de estudio con sonda y etiquetado) se bloquea con un espaciador de carbono en su extremo 3'.

⁴⁾ CTO (oligonucleótido de captura y formación de molde) tiene una molécula fluorescente en su extremo 3'.

⁵⁾ RFU representa las unidades de fluorescencia relativa.