

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 509**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2013 PCT/US2013/026180**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13123220**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2013 E 13749841 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2814986**

54 Título: **Método para la cuantificación relativa de la secuencia, la expresión o los cambios de copias de ácidos nucleicos, usando reacciones combinadas de polimerasa, ligadura y nucleasa**

30 Prioridad:

**14.02.2012 US 201261598343 P  
29.02.2012 US 201261605057 P  
08.05.2012 US 201261644405 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.02.2018**

73 Titular/es:

**CORNELL UNIVERSITY (100.0%)  
395 Pine Tree Road Suite 210 Cctec  
Ithaca, NY 14850, US**

72 Inventor/es:

**BARANY, FRANCIS;  
SPIER, EUGENE y  
MIR, ALAIN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 655 509 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método para la cuantificación relativa de la secuencia, la expresión o los cambios de copias de ácidos nucleicos, usando reacciones combinadas de polimerasa, ligadura y nucleasa

### Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para la cuantificación relativa de la secuencia, la expresión o los cambios de copias de ácidos nucleicos, usando reacciones combinadas de polimerasa, ligadura y nucleasa.

### Antecedentes de la invención

Las reacciones de detección de ácidos nucleicos basadas en la ligadura normalmente emplean dos o más oligonucleótidos basados en ácidos nucleicos hibridados con una diana de ácido nucleico complementario. Estos oligonucleótidos inmediatamente se ensamblan entre sí y se emplea una ligasa para generar un enlace fosfodiéster a través de una mella mediante la unión del 5'-fosfato de un oligonucleótido con el 3'-OH del oligonucleótido inmediatamente adyacente. Los ensayos de ligadura por lo general son multiplexados. Sin embargo, las ligaduras no específicas, especialmente las que ligan dos oligonucleótidos en un tercer oligonucleótido en una reacción múltiple, pueden generar resultados positivos falsos indeseables. Además, los métodos de reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR) y reacción de detección de ligasa (LDR)/PCR están limitados por el número de cebadores que pueden combinarse por diversas razones, incluyendo: (i) la propensión de las combinaciones de oligonucleótidos y dianas a formar complejos del tipo "cebador-dímero" colaterales, (ii) el sesgo de la amplificación por PCR derivado de la amplificación usando las secuencias de cebadores que tienen inherentemente un sesgo de hibridación diferente y especificidades de diana variables, (iii) para la LCR y la LDR/PCR, los grupos 5' fosfato abundantes producen un fondo alto de ligadura no deseada y posteriormente productos de amplificación espurios y (iv) cuestiones bioquímicas, informáticas y de costes de materia prima asociadas a reacciones de amplificación de aumento a escala a medida que aumentan los números de dianas múltiples.

Con el fin de mejorar la capacidad de amplificar específicamente dianas de ácido nucleico simple o múltiple de una manera económica y robusta, se necesita desplegar metodologías fuera de la LCR o la PCR simples/múltiples tradicionales.

El documento US2007092880 desvela un ensayo de marcador universal que implica una reacción de escisión invasiva para generar moléculas que tienen marcadores de identificación detectables correspondientes a una secuencia de nucleótidos diana en una muestra. Una sonda de ligadura circular que contiene un "marcador" se muestra hibridada con su secuencia de nucleótidos diana. El extremo 5' de la sonda forma una aleta de solapamiento con el extremo 3' hibridado de la sonda. La escisión de la aleta se produce si el extremo 3' de la sonda es complementario a la secuencia de nucleótidos diana. Tras la escisión, la ligadura de los extremos 5' y 3' de la sonda forma un molde circular que es adecuado para la amplificación por círculo rodante y se detecta la molécula marcada amplificada.

La capacidad de detectar de forma fiable las mutaciones de baja frecuencia para el uso simple y múltiple (por ejemplo, una sola molécula mutada en fondo normal  $10^4$  (especificidad para detectar la señal que es del 0,01 % del ADN con secuencia similar) sería de gran valor, especialmente en el campo del diagnóstico. Conseguir esta especificidad puede permitir la detección de distintivos de cáncer en muestras con cantidades bajas/poco comunes de ADN tumoral, por ejemplo, muestras que contienen células tumorales circulantes y ADN sin células de células tumorales. Se necesitan ensayos simples, específicos y económicos para hacer esto, pero no existen.

La presente invención se refiere a la superación de esta y otras deficiencias en la técnica.

### Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Un primer aspecto de la presente divulgación se refiere a un método de identificación de la presencia de una o más secuencias de nucleótidos diana en una muestra. Este método implica proporcionar una muestra que contiene potencialmente la una o más secuencias de nucleótidos diana y proporcionar uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos. Cada conjunto de sondas comprende (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la diana y (b) una segunda sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la diana. Las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas están configuradas para hibridarse adyacentes en la secuencia de nucleótidos diana con una unión entre las sondas de oligonucleótidos primera y segunda, y, en un conjunto de sondas, la porción específica de la diana de la segunda sonda de oligonucleótidos tiene un nucleótido idéntico de solapamiento en la unión con la primera sonda de oligonucleótidos. El método implica adicionalmente poner en contacto la muestra y el uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos en condiciones eficaces para que las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas se hibriden en posiciones adyacentes de una manera específica de base con sus secuencias de nucleótidos diana correspondientes, si están presentes en la muestra, donde tras la hibridación el nucleótido idéntico de solapamiento de la segunda sonda de oligonucleótidos forma una aleta en la unión que comprende el nucleótido idéntico de solapamiento. El nucleótido idéntico de solapamiento de la segunda sonda de

oligonucleótidos se escinde con una enzima que tiene actividad nucleasa 5', liberando de este modo un fosfato en el extremo 5' de la segunda sonda de oligonucleótidos, y las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas se ligan entre sí en la unión para formar secuencias producto ligadas. Las secuencias producto ligadas en la muestra se detectan y se identifica la presencia de una o más secuencias de nucleótidos diana en la muestra basándose en la detección.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un método de identificación de la presencia de una o más secuencias de nucleótidos diana en una muestra. Este método implica proporcionar una muestra que contiene potencialmente la una o más secuencias de nucleótidos diana y proporcionar uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos. Cada conjunto de sondas comprende (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la diana y (b) una segunda sonda de oligonucleótidos que tiene una porción de aleta 5' no específica de la diana y una porción específica de la diana que contiene una o más bases de nucleótidos modificados con tiofosfato, en la que las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas están configuradas para hibridarse en la secuencia de nucleótidos diana. La muestra y el uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ponen en contacto en condiciones eficaces para que las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas se hibriden de una manera específica de base con sus secuencias de nucleótidos diana correspondientes, si están presentes en la muestra. La porción de aleta 5' no específica de la diana de la segunda sonda de oligonucleótidos se escinde con una enzima que tiene actividad nucleasa 5', liberando de este modo un fosfato 5' en una primera base de nucleótido de la porción específica de la diana del segundo oligonucleótido, y las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de el uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ligan entre sí para formar secuencias producto ligadas que contienen las porciones específicas de la diana con la una o más bases de nucleótidos modificados con tiofosfato. El método comprende adicionalmente la detección de secuencias producto ligadas en la muestra y la identificación de la presencia de la una o más secuencias de nucleótidos diana en la muestra basándose en esta detección.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un método de identificación de la presencia de una o más secuencias de nucleótidos diana en una muestra. Este método implica proporcionar una muestra que contiene potencialmente la una o más secuencias de nucleótidos diana y proporcionar uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos. Cada conjunto de sondas tiene (i) una primera sonda de oligonucleótidos que comprende una porción 5' específica de cebador, una primera porción de una porción zip-code, una primera porción marcadora que está en posición 3' con respecto a la primera porción zip-code, y una porción específica de la diana, y (ii) una segunda sonda de oligonucleótidos que comprende una porción 3' específica de cebador, una segunda porción de la porción zip-code, una segunda porción marcadora que está en posición 5' con respecto a la segunda porción zip-code, y una porción específica de la diana. Las porciones zip-code primera y segunda de un conjunto de sondas de oligonucleótidos, cuando están posicionadas de forma adyacente, forman una porción zip-code de longitud completa y las porciones marcadoras primera y segunda de un conjunto de sondas de oligonucleótidos son complementarias entre sí. La muestra y el uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ponen en contacto en condiciones eficaces para que las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas se hibriden de una manera específica de base con sus secuencias de nucleótidos diana correspondientes, si están presentes en la muestra, y las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de el uno o más conjuntos de sondas se ligan entre sí para formar secuencias producto ligadas. Este método implica adicionalmente proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos, comprendiendo cada conjunto (a) un primer cebador de oligonucleótidos que comprende la misma secuencia de nucleótidos que la porción 5' específica de cebador de la secuencia producto ligada y (b) un segundo cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la porción 3' específica de cebador de la secuencia producto ligada. Las secuencias producto ligadas, el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos y una ADN polimerasa se mezclan para formar una mezcla de reacción en cadena de la polimerasa, y la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa se somete a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa, formando de este modo productos de extensión primarios. Se proporciona una colección de oligonucleótidos de captura que son complementarios a una porción de la primera porción zip-code y una porción de la segunda porción zip-code. Cada oligonucleótido de captura de la colección para cada producto de extensión primario diferente tiene una secuencia de nucleótidos diferente y comprende una molécula inactivadora y un marcador detectable separados entre sí. Los productos de extensión primarios y la colección de oligonucleótidos de captura se someten a condiciones eficaces para (i) que las porciones marcadoras primera y segunda de un producto de extensión primario particular se hibriden entre sí para formar productos de extensión horquillados con porciones zip-code primera y segunda posicionadas de forma adyacente y (ii) los oligonucleótidos de captura de la colección se hibriden con porciones zip-code primera y segunda posicionadas de forma adyacente complementarias de los productos de extensión horquillados. La molécula inactivadora o el marcador detectable se escinden de los oligonucleótidos de captura hibridados y se detecta el marcador detectable separado de la molécula inactivadora. La presencia de la una o más secuencias de nucleótidos diana en la muestra se identifica basándose en esta detección.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un método de identificación de la presencia de una o más secuencias de nucleótidos diana en una muestra. Este método implica proporcionar una muestra que contiene potencialmente la una o más secuencias de nucleótidos diana y proporcionar uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos. Cada conjunto de sondas tiene (i) una primera sonda de oligonucleótidos que comprende una porción 5' específica de cebador, una primera porción de una porción zip-code, una primera porción marcadora que

está en posición 3' con respecto a la primera porción zip-code y una porción específico de diana, y (ii) una segunda sonda de oligonucleótidos que comprende una porción 3' específica de cebador, una segunda porción de la porción zip-code, una segunda porción marcadora que está en posición 5' con respecto a la segunda porción zip-code y una porción específica de la diana. Las porciones zip-code primera y segunda de un conjunto de sondas de oligonucleótidos, cuando están posicionadas de forma adyacente, forman una porción zip-code de longitud completa y las primera y segunda porciones marcadoras de un conjunto de sondas de oligonucleótidos son complementarias entre sí. La muestra y el uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ponen en contacto en condiciones eficaces para que las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas se hibriden de una manera específica de base con sus secuencias de nucleótidos diana correspondientes, si están presentes en la muestra, y las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de el uno o más conjuntos de sondas se ligan entre sí para formar secuencias producto ligadas. El método implica adicionalmente proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos, comprendiendo cada conjunto (i) un primer cebador de oligonucleótidos que tiene (a) una secuencia de nucleótidos que es la misma que la segunda porción específica de cebador de la primera sonda de oligonucleótidos, (b) una porción de oligonucleótido de captura que es complementaria a porciones zip-code primera y segunda posicionadas de forma adyacente de un conjunto de sondas de oligonucleótidos, (c) una molécula inactivadora y un marcador detectable separados por dicha porción de oligonucleótido de captura, (ii) un segundo cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la porción 3' específica de cebador de la secuencia producto ligada. Las secuencias producto ligadas, el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos y una polimerasa de ADN se mezclan para formar una mezcla de reacción en cadena de la polimerasa y la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa se somete a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa, formando de este modo productos de extensión primarios. Los productos de extensión primarios se someten a condiciones eficaces para que las porciones marcadoras primera y segunda de un producto de extensión primario particular se hibriden entre sí para formar productos de extensión primarios horquillados con porciones zip-code primera y segunda posicionadas de forma adyacente y (ii) la porción de oligonucleótidos de captura de un producto de extensión primario horquillado particular, se hibride con porciones zip-code primera y segunda posicionadas de forma adyacente complementarias del producto de extensión horquillado. La molécula inactivadora o el marcador detectable de los productos de extensión primarios horquillados se escinden y se detecta el marcador detectable separado de la molécula inactivadora. La presencia de la una o más secuencias de nucleótidos diana en la muestra se identifica basándose en esta detección.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un kit para la identificación de la presencia de una o más secuencias de nucleótidos diana en una muestra. El kit contiene una enzima que tiene actividad nucleasa 5', una ligasa y uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos. Los conjuntos de sondas de oligonucleótidos tienen cada uno (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la diana y (b) una segunda sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la diana, en la que las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas están configuradas para hibridarse adyacentes entre sí en la secuencia de nucleótidos diana con una unión entre las sondas de oligonucleótidos primera y segunda, y donde, en un conjunto de sondas, la porción específica de la diana de la segunda sonda de oligonucleótidos tiene un nucleótido idéntico de solapamiento en la unión con la primera sonda de oligonucleótidos.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un kit para la identificación de la presencia de una o más secuencias de nucleótidos diana en una muestra. Este kit contiene una enzima que tiene actividad nucleasa 5', una ligasa y uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos. Los conjuntos de sondas de oligonucleótidos tienen cada uno (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la diana y (b) una segunda sonda de oligonucleótidos que tiene una porción de aleta 5' no específica de la diana y una porción específica de la diana que contiene una o más bases de nucleótidos modificados con tiofosfato, donde las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas están configuradas para hibridarse en la secuencia de nucleótidos diana.

En el presente documento se describen métodos que resuelven la promiscuidad de diana del cebador y la dificultad en el equilibrado de la amplificación entre pares de cebadores en una reacción de amplificación múltiple. El método permite: (a) un aumento fundamental en el número de dianas que pueden examinarse simultáneamente en una sola muestra, (b) disminuye la cantidad de muestra necesaria, y (c) proporciona un método para examinar muestras de ácido nucleico fetal materno circulante o derivado de tumores poco frecuentes, o en baja cantidad/baja calidad/degradadas (por ejemplo, célula única/fijadas con formol, incluidas en parafina (FFPE)).

### Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1D muestran el proceso de ligadura mediante nucleasa 5' (FEN) de la presente invención. En la Figura 1A, una primera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la diana con un OH 3' competente para la ligadura está solapada por el extremo OH 5' inmediatamente flanqueante de la segunda sonda de oligonucleótidos, que también tiene una porción específica de la diana, cuando las sondas de oligonucleótidos primera y segunda se hibridan en posiciones adyacentes en una secuencia de nucleótidos diana. Cuando el nucleótido de aleta de solapamiento de la segunda sonda de oligonucleótidos es el mismo nucleótido que el nucleótido 3' de terminación en la primera sonda de oligonucleótidos, el enlace fosfodiéster inmediatamente corriente arriba del nucleótido coincidente de la segunda sonda de oligonucleótidos puede

escindirse de forma discriminada por una enzima con actividad FEN. En ambas sondas, los nucleótidos de terminación 3' y 5' son iguales, "X". "X" en la molécula de ácido nucleico diana puede ser o bien un nucleótido variable, por ejemplo, un SNP, o conservado. Como se muestra en la Figura 1B, la actividad de aleta de tipo nucleasa genera un PO<sub>4</sub> 5' competente para la ligadura y el producto de escisión de la aleta (X) se libera. Debido a que las sondas de oligonucleótidos primera y segunda se hibridan inmediatamente adyacentes entre sí, una ligasa sella la mella (Figura 1C). Pueden usarse múltiples rondas de calor, hibridación y acciones de nucleasa-ligadura para generar múltiples moléculas ligadas en una sola diana. Los productos de la ligadura (~70-250 nucleótidos de longitud) pueden purificarse fácilmente de un producto de la ligadura de PM inferior, por ejemplo, usando Sephadex. En esta representación, la primera sonda de oligonucleótidos tiene una porción 5' específica de cebador y la segunda sonda de oligonucleótidos tiene una porción 3' específica de cebador que ayudan en la detección corriente abajo del producto de la ligadura. Las sondas de oligonucleótidos pueden contener porciones alternativas relacionados con la detección como se describe en el presente documento. La Figura 1D muestra una reacción doble de ligadura-nucleasa con las sondas de oligonucleótidos primera, segunda y tercera.

Las Figuras 2A-2C muestran ejemplos de diseños de sondas de oligonucleótidos para la detección de mutaciones, inserciones y delecciones mediante la reacción de detección de ligasa. "Z" indica la base en la segunda o tercera posición (no se muestran) desde el extremo 3' de la primera sonda de oligonucleótidos y representa: dG, dA, inosina, Nitroindol, Nitropirrol u otro análogo de nucleótido. Un diseño de sonda adicional implica la inclusión de tiofosfatos en la segunda sonda de oligonucleótidos. El tiofosfato puede estar en la base del nucleótido idéntico de solapamiento de la segunda sonda de oligonucleótidos o en una base en posición 3' o 5' con respecto a la base del nucleótido de solapamiento de la segunda sonda de oligonucleótidos (Figuras 2B y 2C). Como se describe en el presente documento y se representa en esta realización, las sondas de oligonucleótidos de la presente invención también pueden tener porciones específicas de cebador corriente arriba y corriente abajo que son útiles para amplificar el producto de la ligadura en una reacción en cadena de la polimerasa posterior.

La Figura 3 muestra el proceso de nucleasa-ligadura-captura de matriz de zipcode de la presente invención para detectar múltiples mutaciones de una sola base en una secuencia de nucleótidos diana.

Las Figuras 4A-4C son diagramas esquemáticos que muestran diversos diseños de sondas de oligonucleótidos que facilitan la separación de los productos de la ligadura de sondas de oligonucleótidos no ligadas. En la Figura 4A la segunda sonda de oligonucleótidos tiene una cola 3' C<sub>1</sub> que es complementaria a la cola 5' C<sub>1</sub>' en la primera sonda de oligonucleótidos, y en la Figura 4B, la segunda sonda de oligonucleótidos tiene una cola 3' A<sub>1</sub>' que es complementaria a la cola 5' A<sub>1</sub> en la primera sonda de oligonucleótidos. En ambos casos, los productos de la ligadura correctos forman una horquilla a la temperatura utilizada para el tratamiento con exonucleasa I. La exonucleasa 3' específica de cadena monocatenaria escinde oligonucleótidos no ligados monocatenarios, pero no los productos ligados que forman horquillas. En la Figura 4C, las sondas de oligonucleótidos primera y segunda llevan marcadores complementarios específicos de alelo, C<sub>1</sub> y C<sub>1</sub>', y, además, la segunda sonda de oligonucleótidos tiene un marcador universal L<sub>1</sub>. Después de la ligadura, se forma una horquilla tras la hibridación de C<sub>1</sub> y C<sub>1</sub>'. Un oligonucleótido universal biotinilado (L<sub>1</sub>') se liga al producto horquillado en la misma reacción permitiendo la selección de estreptavidina para productos de la ligadura que llevan biotina.

La Figura 5 es un diagrama esquemático que muestra un diseño de sondas de oligonucleótidos que facilita la separación de sondas de oligonucleótidos no ligadas de productos de la ligadura para ocluir la extensión o amplificación de la sonda de oligonucleótidos no ligada en la fase de amplificación posterior a la ligadura. En este diseño, las segundas sondas de oligonucleótidos tienen marcadores complementarios B<sub>1</sub> y B<sub>1</sub>'. Durante la nucleasa-ligadura, las sondas de oligonucleótidos secundarias complementarias no forman horquillas significativas porque la temperatura de hibridación está fijada demasiado alta para permitir la formación de un tallo intramolecular estable. Después de la nucleasa-ligadura, la temperatura se reduce permitiendo que las segundas sondas de oligonucleótidos no ligadas formen una hibridación intramolecular entre B<sub>1</sub> y B<sub>1</sub>'. El extremo 3' del oligonucleótido no ligado B<sub>1</sub> se prolonga formando un tallo altamente estable termodinámicamente. Los oligonucleótidos no ligados forman mangos de sartén que ya no son capaces de participar en la prolongación del cebador de PCR.

La Figura 6 muestra el proceso de nucleasa-ligadura-PCR de la presente invención para detectar mutaciones de una sola base múltiples en una secuencia de nucleótidos diana.

La Figura 7 muestra un sustrato de ligadura generado por FEN usando sondas de oligonucleótidos acopladas (es decir, una sonda circularizable) para LDR/PCR múltiple. Una sonda de oligonucleótidos acoplada que lleva una estructura de aleta que se aparea con el SNP diana (cabeza de flecha) y el nucleótido de terminación OH 3' produce un sustrato escindible por FEN. El OH 3' de la sonda de oligonucleótidos circular se puede ligar con un fosfato 5' generado por FEN generando un producto de la ligadura circular. Las sondas de oligonucleótidos no circularizadas no ligadas pueden digerirse usando, por ejemplo, exonucleasas I, III, V y 1. Opcionalmente, las sondas de oligonucleótidos pueden escindirse internamente en un dominio de escisión (símbolo de estrella), por ejemplo, un tracto dU que es diana de UNG + calor = tramo fosfodiéster abásico lábil. Los rectángulos abiertos y sombreados de la sonda circular representan sitios de cebadores de PCR universales para la amplificación por PCR del producto de la ligadura.

La Figura 8 muestra un ejemplo del proceso de nucleasa-ligadura-PCR de la presente invención usando sondas acopladas. En este ejemplo, solo se muestra una sonda para el alelo mutante, con la base específica de mutación en el extremo 3' de la sonda corriente arriba y en o cerca del extremo 5' de la sonda corriente abajo. La actividad FEN de una polimerasa (♦) escinde solamente una base de solapamiento 5' apareada dejando un fosfato 5' competente para la ligadura y una ligasa (●) sella covalentemente los dos extremos libres de las

sondas de oligonucleótidos acopladas. La PCR amplifica productos de la ligadura, en este caso solo se producen productos de la ligadura mutantes (no se forman productos de la ligadura de tipo silvestre). La sonda acoplada también contiene un segmento (Kr') que es complementario a una región de la porción 3' específica de la diana (Kr). En ausencia de ligadura, la porción 3' específica de la diana de la sonda acoplada se hibrida con el segmento complementario (Kr')

5 para formar una sonda de oligonucleótidos acoplada horquillada que es prolongada por la polimerasa para formar una horquilla estable y ocluida, de este modo, para la extensión o amplificación posteriores.

Las Figuras 9A-9C muestran un ejemplo del proceso de nucleasa-ligadura-PCR de la presente invención donde la detección de los productos resultantes se ve facilitada por una secuencia zip-code. La Figura 9B muestra la detección usando el zipcode en un ensayo de tipo Taqman® (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) tradicional en el que el oligonucleótido de captura actúa como la sonda Taqman®. La Figura 9C muestra la captura mediada por zipcode de los productos en una matriz universal que contiene oligonucleótidos de captura complementarios.

10 La Figura 10 muestra un ejemplo de detección de horquilla zip-code dividida Taqman® universal de los productos formados usando el proceso de nucleasa-ligadura-PCR de la presente invención.

La Figura 11 muestra un ejemplo de detección de horquilla zip-code dividida universal de los productos formados mediante el proceso de nucleasa-ligadura-PCR de la presente invención.

Las Figuras 12A-12B muestran la incorporación de secuencias de detección UniTaq en los ensayos de nucleasa-ligadura y los productos resultantes, y su utilidad para la detección múltiple. Las Figuras 12A-12B muestran que cualquiera de las cadenas de un ácido nucleico diana puede usarse para la ligadura con sondas que contienen porciones de detección UniTaq y de cebadores.

20 Las Figuras 13A-13C muestran tres ejemplos para la detección por PCR de productos de nucleasa-ligasa de la presente invención usando (a) la formación de horquilla mediada por UniTaq, (b) sondas de nucleasa 5' UniTaq (denominadas TaqMan) y (c) detección de círculo de UniTaq.

La Figura 14 muestra la detección de dos alelos "X" y "O", por ejemplo, se muestra para un SNP. En la Figura 14, Etapa 1, se usan sondas de oligonucleótidos primeras específicas de alelo con colas 5' Aix y Aio y sondas de oligonucleótidos segundas específicas de alelo, donde i = de 1 a N, para la reacción de nucleasa-ligasa multiplexada. Se usan cebadores universales con colorantes D1 y D2, que son específicos para cada alelo (Figura 14, Etapa 2), para generar una señal en los colores D1 y/o D2 dependiendo de la presencia de los dos alelos en el ácido nucleico diana (Figura 14, Etapa 3) usando la formación de horquilla mediada por UniTaq.

25 La Figura 14 muestra la detección de dos alelos "X" y "O", por ejemplo, se muestra para un SNP. En la Figura 14, Etapa 1, se usan sondas de oligonucleótidos primeras específicas de alelo con colas 5' Aix y Aio y sondas de oligonucleótidos segundas específicas de alelo, donde i = de 1 a N, para la reacción de nucleasa-ligasa multiplexada. Se usan cebadores universales con colorantes D1 y D2, que son específicos para cada alelo (Figura 14, Etapa 2), para generar una señal en los colores D1 y/o D2 dependiendo de la presencia de los dos alelos en el ácido nucleico diana (Figura 14, Etapa 3) usando la formación de horquilla mediada por UniTaq.

30 Las Figuras 15A-15D muestran la detección de dos conjuntos de dianas, por ejemplo, para la aneuploidía fetal para T21 como ejemplo. La Figura 15A muestra una reacción de codificación por nucleasa-ligasa de codificación múltiple para dianas N en el cromosoma 21. Todas las dianas se han seleccionado para que tuvieran un marcador universal corto B1 y el punto de ligadura se selecciona en algún lugar dentro del marcador o dentro de uno de los oligonucleótidos de ligadura. Para la región de control, se muestra un método de doble ligadura con un oligonucleótido intermedio: todos los productos de la ligadura tienen un marcador universal B2. En la Figura 15B, los productos de la ligadura tienen marcadores universales en los extremos y marcadores intermedios cortos B1 y B2. En las Figuras 15C y 15D, se muestra un ejemplo de detección usando el método UniTaq y un marcador universal corto. Puede usarse el recuento de pocillos con señal D1 y D2 para detectar la aneuploidía fetal. También puede usarse una sonda universal corta, por ejemplo, en la Figura 15B. C1 y C2 pueden ser el mismo cebador.

35 La Figura 16 muestra la detección de mutaciones desconocidas mediante prolongación del cebador, desplazamiento de la cadena de una sola base, escisión por nucleasa 5' para generar 5'-fosfato, ligadura y amplificación por PCR. La segunda sonda de oligonucleótidos contiene uno o más nucleótidos modificados por tiofosfato ("S") que son resistentes a la escisión por nucleasa 5'.

### Descripción detallada de la invención

Un primer aspecto de la presente divulgación se refiere a un método de identificación de la presencia de una o más secuencias de nucleótidos diana en una muestra. Este método implica proporcionar una muestra que contiene potencialmente la una o más secuencias de nucleótidos diana y proporcionar uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos. Cada conjunto de sondas comprende (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la diana y (b) una segunda sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la diana. Las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas están configuradas para hibridarse adyacentes en la secuencia de nucleótidos diana con una unión entre las sondas de oligonucleótidos primera y segunda, y, en un conjunto de sondas, la porción específica de la diana de la segunda sonda de oligonucleótidos tiene un nucleótido idéntico de solapamiento en la unión con la primera sonda de oligonucleótidos. El método implica adicionalmente poner en contacto la muestra y el uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos en condiciones eficaces para que las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas se hibriden en posiciones adyacentes de una manera específica de base con sus secuencias de nucleótidos diana correspondientes, si están presentes en la muestra, donde tras la hibridación el nucleótido idéntico de solapamiento de la segunda sonda de oligonucleótidos forma una aleta en la unión que comprende el nucleótido idéntico de solapamiento. El nucleótido idéntico de solapamiento de la segunda sonda de oligonucleótidos se escinde con una enzima que tiene actividad nucleasa 5', liberando de este modo un fosfato en el extremo 5' de la segunda sonda de oligonucleótidos, y las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas se ligan entre sí en la unión para formar secuencias producto ligadas. Las secuencias producto ligadas en la

muestra se detectan y se identifica la presencia de una o más secuencias de nucleótidos diana en la muestra basándose en la detección.

Las Figuras 1A-1D muestran el proceso de detección de una molécula de ácido nucleico diana usando la reacción acoplada por nucleasa-ligasa de la presente invención. La reacción utiliza una pluralidad de conjuntos de sonda, 5  
consistiendo cada conjunto de sondas en al menos una primera y una segunda sonda de oligonucleótidos. Cada sonda de oligonucleótidos tiene una porción específica de la diana que es complementaria a una región de una 10  
secuencia de molécula de ácido nucleico diana. La primera sonda de oligonucleótidos lleva un grupo OH 3' competente para la ligadura, mientras que la segunda sonda de oligonucleótidos lleva un extremo 5' incompetente para la ligadura (es decir, una sonda de oligonucleótidos sin un fosfato 5'). De acuerdo con el método de la presente 15  
invención, las sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas están diseñadas de manera que la base más hacia el extremo 3' de la primera sonda de oligonucleótidos se solapa por la base más hacia el extremo 5' inmediatamente flanqueante de la segunda sonda de oligonucleótidos que es complementaria a la molécula de ácido 20  
nucleico diana. El nucleótido de solapamiento se denomina una "aleta". Cuando el nucleótido aleta de solapamiento de la segunda sonda de oligonucleótidos es complementario a la secuencia de molécula de ácido nucleico diana y es la misma secuencia que el nucleótido de terminación 3' de la primera sonda de oligonucleótidos, el enlace 25  
fosfodiéster inmediatamente corriente arriba del nucleótido aleta de la segunda sonda de oligonucleótidos es escindido de forma discriminada por una enzima que tiene actividad endonucleasa de la aleta (FEN) o nucleasa 5'. Esa actividad específica FEN produce un nuevo extremo fosfato 5' competente para la ligadura en la segunda sonda 30  
de oligonucleótidos que está colocado con precisión junto al OH 3' adyacente de la primera sonda de oligonucleótidos. Como consecuencia de (a) la hibridación específica de la diana de las sondas de oligonucleótidos adyacentes entre sí, (b) la generación selectiva de fosfatos 5' solo cuando el nucleótido aleta escindido coincide con el molde y (c) la adición de una ligasa que discrimina frente al apareamiento no de Watson-Crick para la base 3' de 35  
la primera sonda de oligonucleótidos, el método de la presente invención es capaz de conseguir una especificidad y una sensibilidad de detección de la diana muy altas. También pueden emplearse enfoques cinéticos, tales como la alteración de los tiempos y las condiciones de los ciclos para potenciar la discriminación entre las moléculas de 40  
ácido nucleico diana de tipo silvestre y mutantes.

La discriminación por la ligasa puede potenciarse adicionalmente mediante el empleo de diversas características del 30  
diseño de sondas. Por ejemplo, puede incorporarse un desapareamiento intencionado o un nucleótido análogo (por ejemplo, inosina, Nitroindol o Nitropirrol) en la primera sonda de oligonucleótidos en la 2ª o la 3ª base desde el extremo de unión 3' para desestabilizar ligeramente la hibridación del extremo 3' si está apareada perfectamente en el extremo 3', pero desestabilizar significativamente la hibridación del extremo 3' si está desapareada en el extremo 3' (Figura 2A). Este diseño reduce las ligaduras erróneas inapropiadas cuando las sondas mutantes se hibridan con 35  
una diana de tipo silvestre. Como alternativa, pueden incorporarse bases de ARN que pueden ser escindidas por AARNasas en las sondas de oligonucleótidos para garantizar la formación de producto dependiente del molde. Por ejemplo, Dobosy et. al. "*RNase H-Dependent PCR (rhPCR): Improved Specificity and Single Nucleotide Polymorphism Detection Using Blocked Cleavable Primers*", *BMC Biotechnology* 11 (80): 1011 (2011) describe el uso de una base de ARN cerca del extremo 3' de una sonda de oligonucleótidos con el extremo 3' bloqueado y el 40  
corte con una AARNasa H2 generando un OH 3' ligable y prolongable por PCR. Este enfoque puede usarse para generar ya sea OH 3' o P 5' competentes para la ligadura, o ambos, a condición de que se use una ligasa que pueda ligar una base de ARN 5'.

Para las inserciones o deleciones, la incorporación de una base apareada o análogos de nucleótidos (por ejemplo, - 45  
amino-dA o 5-propinil-dC) en la primera sonda de oligonucleótidos en la 2ª o 3ª posición desde la unión mejora la estabilidad y puede mejorar la discriminación de dichas mutaciones de desplazamiento del marco de lectura de las secuencias de tipo silvestre (Figuras 2B-2C). Para las inserciones, el uso de uno o más nucleótidos modificados con tiofosfato corriente abajo del enlace fosfato escindible deseado de la segunda sonda de oligonucleótidos evitará la escisión inapropiada por la enzima nucleasa 5' cuando las sondas se hibridan con ADN de tipo silvestre y, por tanto, 50  
reduce ligadura positiva falsa en la diana de tipo silvestre (Figura 2B). Análogamente, para las deleciones, el uso de uno o más nucleótidos modificados con tiofosfato corriente arriba del enlace fosfato escindible deseado de la segunda sonda de oligonucleótidos evitará la escisión inapropiada por la enzima nucleasa 5' cuando las sondas se hibridan con ADN de tipo silvestre y, por tanto, reduce la ligadura positiva falsa en la diana de tipo silvestre (Figura 2C).

Otras posibles modificaciones incluyeron sitios abásicos, por ejemplo, dSpacer (también conocido como THF tetrahidrofurano) o oxo-G. Estas "bases" anormales tienen enzimas específicas que eliminan la base anormal y 55  
generan sitios OH 3' o P 5' competentes para la ligadura. La endonucleasa IV, Tth EndoIV (NEB) eliminará los residuos abásicos después de que los oligonucleótidos de ligadura se hibriden con el ácido nucleico diana, pero no de un ADN monocatenario. De forma similar, puede usarse oxo-G con Fpg o inosina/uracilo con EndoV o Timina glicol con EndoVIII. 60

Como se muestra en la Figura 1D, un conjunto de sondas de la presente invención puede comprender 65  
adicionalmente una tercera sonda de oligonucleótidos que también tiene una porción específica de la diana que es complementaria a una región de la molécula de ácido nucleico diana. En esta realización, las sondas de oligonucleótidos segunda y tercera de un conjunto de sondas están configuradas para hibridarse adyacentes entre sí

en la secuencia de nucleótidos diana con una unión entre ellos. La porción específica de la diana de la tercera sonda de oligonucleótidos tiene una aleta de nucleótidos idénticos de solapamiento en la unión con la segunda sonda de oligonucleótidos en un conjunto de sondas que es eliminada por una enzima que tiene actividad FEN cuando es complementaria a la secuencia de nucleótidos diana y es la misma secuencia que la del nucleótido de terminación 3' de la segunda sonda de oligonucleótidos. La escisión de la aleta libera un fosfato 5' competente para la ligadura en la tercera sonda de oligonucleótidos que permite la ligadura entre las sondas de oligonucleótidos segunda y tercera en la unión para formar una secuencia producto ligada. La utilización de tres sondas en un conjunto de cebadores permite la detección de regiones diana más largas con una especificidad aumentada.

Las endonucleasas de la aleta o las nucleasas 5' que son adecuados para escindir la aleta 5' de la segunda sonda de oligonucleótidos antes de la ligadura incluyen, sin limitación, las polimerasas que llevan actividad nucleasa 5', tales como la ADN polimerasa de *E. coli* y las polimerasas de *Taq* y *T. thermophilus*, así como la ARNasa H T4 y *TaqExo*.

La reacción de ligadura utilizada en el método de la presente invención es bien conocida en la técnica. Las ligasas adecuadas para ligar sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas juntas después de la escisión de la aleta 5' en la segunda sonda de oligonucleótidos incluyen, sin limitación, ligasa de *Thermus aquaticus*, ligasa de *E. coli*, ADN ligasa T4, ARN ligasa T4, *Taq* ligasa, ligasa 9 N y ligasa de *Pyrococcus*, o cualquier otra ligasa termoestable conocida en la técnica. De acuerdo con la presente invención, el proceso de nucleasa-ligadura de la presente invención puede realizarse mediante el empleo de una reacción de ensayo de ligadura de oligonucleótidos (OLA) (véase Landegren, et al., "A Ligase-Mediated Gene Detection Technique", *Science* 241: 1077-80 (1988); Landegren, et al., "DNA Diagnostics -- Molecular Techniques and Automation", *Science* 242:229-37 (1988); y la Patente de los EE.UU. N.º 4.988.617 de Landegren, et al.), una reacción de detección de ligadura (LDR) que utiliza un conjunto de sondas de oligonucleótidos complementarias (véase, por ejemplo, el documento WO 90/17239 de Barany et al.) o una reacción en cadena de ligadura (LCR), que utiliza dos conjuntos de sondas de oligonucleótidos complementarias (véase, por ejemplo, el documento WO 90/17239 de Barany et al.).

Las sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas pueden estar en forma de ribonucleótidos, desoxinucleótidos, ribonucleótidos modificados, desoxirribonucleótidos modificados, análogos de nucleótidos de péptidos, análogos de nucleótidos de péptidos modificados, oligonucleótidos de cadena principal de fosfato-azúcar modificados, análogos de nucleótidos y mezclas de los mismos.

La etapa de hibridación en la reacción de detección por ligasa, que es preferentemente un tratamiento de hibridación térmica discrimina entre las secuencias de nucleótidos basándose en un nucleótido de distinción en las uniones de la ligadura. La diferencia entre las secuencias de nucleótidos diana puede ser, por ejemplo, una diferencia de una única base de ácido nucleico, una deleción de ácido nucleico, una inserción de ácido nucleico o un reordenamiento. Dichas diferencias de secuencia que implican más de una base también pueden detectarse. Preferentemente, los conjuntos de sondas de oligonucleótidos tienen sustancialmente la misma longitud de manera que se hibriden con secuencias de nucleótidos diana en condiciones de hibridación sustancialmente similares.

Los productos de nucleasa-ligadura de la presente invención pueden detectarse usando diversos métodos de detección conocidos en la técnica. Por ejemplo, los productos de la ligadura pueden detectarse mediante la secuenciación del producto de la ligadura usando métodos bien conocidos en la técnica. Como alternativa, los productos de la ligadura pueden separarse por tamaño y detectarse. Para facilitar la detección a través de la secuenciación o la separación por tamaño, las sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas pueden comprender adicionalmente uno o más marcadores detectables, porciones de cebadores u otras porciones de detección. Una serie de porciones de detección adecuadas y métodos de detección se ilustran en las figuras adjuntas y se describen en más detalle a continuación.

En una realización de la presente invención, la detección de los productos de la ligadura se ve facilitada por una porción zip-code. De acuerdo con esta realización, una de las sondas de oligonucleótidos en un conjunto de sondas comprende adicionalmente una porción zip-code y la otra sonda de oligonucleótidos del conjunto de sondas comprende un marcador detectable. Como se usa en el presente documento, un zip-code es una secuencia de nucleótidos corta, por ejemplo, de entre 16 y 24 nucleótidos de longitud, que no tiene identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos diana y, preferentemente, poca o ninguna identidad de secuencia con cualquier secuencia de nucleótidos genómica. En una colección de zip-codes, cada zip-code difiere en su secuencia de la secuencia de otros zip-codes de la colección en al menos el 25 %, sin embargo, todos los zip-codes de una colección se diseñan para que tengan temperaturas de fusión similares de manera que se facilite la hibridación con oligonucleótidos de captura complementarios en condiciones de hibridación uniformes con poca o ninguna hibridación no específica con secuencias de oligonucleótidos no de captura. En una realización de la presente invención, la porción zip-code de una sonda de oligonucleótidos de un conjunto de sondas se usa para identificar y distinguir secuencias producto ligadas individuales en una muestra, por tanto, la porción zip-code para cada secuencia producto ligada diferente tiene una secuencia de nucleótidos diferente (es decir, las porciones zip-code son específicas de alelo). Esta realización es particularmente útil para detectar y distinguir mutaciones alélicas diferentes. En una realización alternativa, donde el objetivo es simplemente detectar la presencia de una mutación en una serie de copias de un gen o cromosoma, pero la identidad de la mutación o región cromosómica no es crítica, puede usarse la misma



porción zip-code para detectar productos de la ligadura diferentes. En cualquier realización, la incorporación de zip-codes en una de las sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas permite la detección altamente multiplexada de diversas secuencias diana simultáneamente. Se describen métodos de diseño de colecciones de secuencias zip-code y sus secuencias de oligonucleótidos de captura complementarias en detalle en las Patentes de los EE.UU. N.º 6.852.487, 7.455.965 y 6.506.594 todas de Barany et al.

Los productos de la ligadura que contienen porciones zip-code están en contacto con una colección de oligonucleótidos de captura inmovilizados en condiciones de hibridación uniformes eficaces para hibridar la porción zip-code de cada secuencia producto ligada con su oligonucleótido de captura complementario. Puesto que los zip-codes de la colección varían en su secuencia de nucleótidos, por ejemplo, en al menos el 25 % de su secuencia cuando se alinean, la hibridación entre una pluralidad de zip-codes producto de la ligadura y sus oligonucleótidos de captura complementarios se produce con una hibridación no específica mínima. Se detectan productos de la ligadura inmovilizados a través de su marcador detectable.

La Figura 3 es un diagrama de flujo del proceso nucleasa-ligadura-captura de zip-code de acuerdo con la presente invención para detectar la mutación G → A, T, C en el gen K-ras. El método, como se representa en este ejemplo, implica cuatro segundas sondas de oligonucleótidos 5'-N y cuatro primeras sondas de oligonucleótidos N-3'. Cada primera sonda de oligonucleótidos comprende una porción zip-code diferente (es decir, Z1, Z2, Z3, Z4 o) y cada segunda sonda de oligonucleótidos comprende un marcador detectable (F). Como se muestra en la etapa 2, la actividad nucleasa 5' (♦) escinde solamente una base de solapamiento 5' apareada y la aleta adicional, por ejemplo, 5'-D (D = A, G o T) en el caso de una mutación (se muestra 5'-A) que deja un fosfato 5' competente para la ligadura en la segunda sonda de oligonucleótidos. La ligasa (●) sella covalentemente las dos sondas de oligonucleótidos juntas (solo se muestra el caso de mutación). En este ejemplo, la presencia de un mutante T en la secuencia de nucleótidos diana provoca que la primera sonda de oligonucleótidos con el 3'A y la porción específica de la matriz direccionable Z1 se ligue con la sonda de oligonucleótidos que tiene un nucleótido A idéntico de solapamiento 5' después de la escisión mediada por nucleasa del nucleótido A idéntico de solapamiento 5'. La presencia del alelo T en la secuencia de nucleótidos diana está indicada por la señal fluorescente (F) detectada en la dirección en el soporte sólido que tiene la sonda de oligonucleótidos de captura complementaria a la porción Z1 de la secuencia producto ligada. La aparición de la señal fluorescente (F) en las posiciones en el soporte sólido que comprenden las sondas de oligonucleótidos de captura que son complementarias a los zip-codes Z2, Z3 y Z4 (que se encontrarían en diferentes posiciones en el soporte sólido entre sí y el complemento de Z1) indica análogamente la presencia de los alelos A, C y G en la secuencia de nucleótidos diana, respectivamente.

Como se indica en la Figura 3, la detección de la secuencia producto ligada que contiene una porción zip-code implica la hibridación de la secuencia zip-code con su oligonucleótido de captura complementario. En una realización de la presente invención, una colección de oligonucleótidos de captura se inmoviliza a un soporte sólido, por ejemplo, una matriz, perlas, portaobjetos, discos, membranas, películas, placas de microtitulación y materiales compuestos de los mismos. El soporte sólido puede comprender una matriz de posiciones estando la colección de oligonucleótidos de captura inmovilizada en la matriz de posiciones. Se describen con todo detalle métodos de formación de matrices de oligonucleótidos de captura en un soporte sólido y su uso para la captura de ácidos nucleicos diana en la Patente de los EE.UU. N.º 6.852.487 y continuaciones y divisiones de la misma todas de Barany et al.

De acuerdo con esta realización de la presente invención, puede ser preferible realizar un procedimiento de amplificación del ácido nucleico diana inicial antes de la reacción de nucleasa-ligadura. Esto aumenta la cantidad de la secuencia de nucleótidos diana en la muestra antes del empleo del proceso de nucleasa-ligadura. Por ejemplo, la amplificación del ácido nucleico diana inicial puede conseguirse usando el proceso de la reacción en cadena de la polimerasa, la replicación de secuencias auto-sostenida o la amplificación de ARN mediada por la replicasa Q-β. El proceso de la reacción en cadena de la polimerasa es el procedimiento de amplificación preferido y se describe con todo detalle en H. Erlich, et. al., "*Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction*", *Science* 252: 1643-50 (1991); M. Innis, et. al., "*PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*", Academic Press: New York (1990); y R. Saiki, et. al., "*Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase*", *Science* 239: 487-91 (1988). J. Guatelli, et. al., "*Isothermal, in vitro Amplification of Nucleic Acids by a Multienzyme Reaction Modeled After Retroviral Replication*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874-78 (1990), describe el proceso de replicación de secuencias auto-sostenida. La amplificación de ARN mediada por la replicasa Q-β se describe en F. Kramer, et. al., "*Replicable RNA Reporters*", *Nature* 339: 401-02 (1989).

En otra realización de la presente invención, los productos de nucleasa-ligadura se detectan usando métodos de secuenciación de nueva generación. De acuerdo con esta realización, las sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas comprenden adicionalmente los marcadores o adaptadores de secuenciación apropiados requeridos para la plataforma Illumina® MiSeq™ o HiSeq™ (San Diego, CA), la plataforma Life Technologies™ Ion Torrent™ (Life Technologies, Carlsbad, CA), la plataforma Roche™ 454, u otra plataforma de secuenciación de nueva generación (es decir, pirosecuenciación, secuenciación por síntesis basada en fluorescencia, secuenciación por ligadura basada en la fluorescencia, secuenciación por síntesis basada en iones, y secuenciación por ligadura basada en iones), que son todas bien conocidas en la técnica. No hay necesidad de tener diferentes marcadores para diferentes cromosomas, ya que las propias secuencias pueden cartografiarse de forma inequívoca a uno de los cromosomas

en el genoma humano. La secuenciación está particularmente bien adaptada para el recuento de alelos de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*) diferentes en una molécula de ácido nucleico diana.

5 En otra realización de la presente invención la detección de los productos de nucleasa-ligadura implica la amplificación por PCR. De acuerdo con esta realización, la primera sonda de oligonucleótidos del conjunto de sondas comprende adicionalmente una porción 5' específica de cebador y la segunda sonda de oligonucleótidos en un conjunto de sondas comprende adicionalmente una porción 3' específica de cebador como se muestra en las Figuras 1 y 2. El producto de la ligadura resultante comprende la porción 5' específica de cebador, las porciones específicas de la diana y la porción 3' específica de cebador.

10 Las porciones específicas de cebador de las sondas de oligonucleótidos primera y segunda pueden ser secuencias de cebadores universales que permiten la amplificación universal posterior de todos los productos de la ligadura formados en un único conjunto de condiciones. Esto es particularmente útil cuando se detectan moléculas de nucleótidos diana de baja abundancia. En consecuencia, después de la formación del producto de la ligadura, una se realiza amplificación por PCR universal para amplificar proporcionalmente todos los productos de la ligadura en la muestra. Después de la PCR universal, los productos de prolongación de los productos de la ligadura originales se detectan y cuantifican. Como alternativa, las porciones específicas de cebador de las sondas de oligonucleótidos primera y segunda pueden ser específicas para la secuencia de nucleótidos diana (es decir, específicas de alelo).

15 En otra realización más, las sondas de oligonucleótidos se diseñan para contener un conjunto de porciones específicas de cebadores universales en combinación con una o más porciones específicas de cebador específicas de la diana (es decir, porciones de cebador específicas de alelo).

20 Después de la reacción de nucleasa-ligadura, la muestra que contiene los productos de la ligadura se somete a una reacción en cadena de la polimerasa. En la reacción en cadena de la polimerasa, se proporciona uno o una pluralidad de conjuntos de cebadores de oligonucleótidos. Cada conjunto de cebadores tiene un primer cebador de oligonucleótidos que contiene la misma secuencia que la porción 5' específica de cebador de la secuencia producto de la ligadura y un segundo cebador de oligonucleótidos complementario a la porción 3' específica de cebador de la secuencia producto de la ligadura. La mezcla de la reacción de nucleasa-ligasa se mezcla con uno o una pluralidad de conjuntos de cebadores de oligonucleótidos y la polimerasa para formar una mezcla de reacción en cadena de la polimerasa.

25 La mezcla de reacción en cadena de la polimerasa se somete a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que incluyen un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de prolongación. Durante el tratamiento de desnaturalización, se separan secuencias de ácidos nucleicos hibridados. El tratamiento de hibridación provoca que los cebadores se hibriden con sus porciones específicas de cebador complementarias de la secuencia producto de la ligadura. Durante el tratamiento de prolongación, los cebadores hibridados se prolongan para formar productos de prolongación complementarios a las secuencias con las que se hibridan los cebadores. En un primer ciclo de la fase de la reacción en cadena de la polimerasa, el segundo cebador de oligonucleótidos se hibrida con la porción 3' específica de cebador de la secuencia producto de la ligadura y se prolonga para formar un producto de prolongación complementario a la secuencia producto de la ligadura. En los ciclos posteriores, el primer cebador de oligonucleótidos se hibrida con la porción 5' específica de cebador del producto de prolongación complementario a la secuencia producto de la ligadura y el segundo cebador de oligonucleótidos se hibrida con la porción 3' corriente abajo de la secuencia producto de la ligadura.

30 En casi todos los casos, es deseable ocultar las sondas de oligonucleótidos no ligadas de la muestra que contiene secuencias producto ligadas antes de la amplificación por PCR para evitar la prolongación y/o amplificación de la sonda no ligada que puede generar señales positivas falsas. Se describen a continuación diversos medios para conseguir este objetivo.

35 Un enfoque implica la eliminación de secuencias de sondas no ligadas de una muestra tras el proceso de ligadura mediante digestión con exonucleasa antes de la amplificación (L-H Guo y R. Wu, *Methods in Enzymology* 100: 60-96 (1985) Para incorporar la digestión con exonucleasa, es necesario proteger los productos de la ligadura de la digestión. En un enfoque, las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas comprenden porciones marcadoras primera y segunda complementarias, respectivamente. Las porciones marcadoras primera y segunda de un conjunto de sondas de oligonucleótidos preferentemente, pero no necesariamente, difieren en su secuencia de las porciones marcadoras de otros conjuntos de sondas de oligonucleótidos, es decir, pueden ser específicas de alelo. La Figura 4A muestra un ejemplo donde la primera sonda de oligonucleótidos contiene la porción marcadora C1' y la segunda sonda de oligonucleótidos contiene la porción marcadora C1, donde C1' y C1 son complementarias entre sí. Después de la ligadura de las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas, las porciones marcadoras primera y segunda, es decir, C1' y C1, se hibridan para formar una secuencia producto ligada horquillada que es resistente a la digestión con exonucleasa (A<sub>1</sub> y B<sub>1</sub>, en este diagrama esquemático representan porciones específicas de cebador para la reacción en cadena de la polimerasa corriente abajo). La posterior digestión con exonucleasa elimina las sondas no ligadas. Además, las moléculas ligadas de forma no específica, que llevan marcadores desapareados y siguen siendo total o parcialmente monocatenarias, también son digeridas. Después de la digestión con exonucleasa, los productos de la ligadura horquillados se

desnaturalizan y se realiza la amplificación por PCR usando conjuntos de cebadores de oligonucleótidos que tienen un primer cebador que es complementario a la porción 3' específica de cebador del producto de la ligadura (es decir, B<sub>1</sub>) y un segundo cebador que tiene la misma secuencia de nucleótidos que la porción 5' específica de cebador del producto de la ligadura (es decir, A<sub>1</sub>).

5 La Figura 4B muestra un diseño de sondas de oligonucleótidos alternativa en la que la segunda sonda de oligonucleótidos contiene una región (A<sub>1</sub>') que es complementaria a la porción 5' específica de cebador de la primera sonda de oligonucleótidos (A<sub>1</sub>). Después de la ligadura de las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de este conjunto de sondas, A<sub>1</sub> y A<sub>1</sub>' se hibridan para formar un producto de la ligadura horquillado. De nuevo, las sondas de oligonucleótidos no ligadas y las moléculas ligadas de forma no específica, que llevan marcadores desapareados y que siguen siendo total o parcialmente monocatenarias, posteriormente se digieren usando una enzima exonucleasa específica de cadenas monocatenarias, por ejemplo ExoI. Como se ha indicado anteriormente para la Figura 4A, después de la digestión con exonucleasa, los productos de la ligadura horquillados se desnaturalizan y se añaden cebadores de oligonucleótidos y una polimerasa para amplificar los productos de la ligadura desnaturalizados en ausencia de cualquier sonda no ligada.

En una realización alternativa, las sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas pueden comprender el bloqueo de restos en sus extremos no implicados en la ligadura. Los restos de bloqueo adecuados incluyen un marcador detectable o un grupo fosforotioato (Nikiforow, et al., "*The Use of Phosphorothioate Primers and Exonuclease Hydrolysis for the Preparation of Singlestranded PCR Products and their Detection by Solid-phase Hybridization*", *PCR Methods and Applications*, 3: p. 285-291 (1994)). Después del proceso de ligadura, las sondas no ligadas se destruyen selectivamente mediante la incubación de la mezcla de reacción con la exonucleasa, mientras que las sondas ligadas se protegen debido a la eliminación de los extremos 3' libres que son necesarios para la iniciación de la reacción con exonucleasa.

25 La Figura 4C muestra otro enfoque para la separación de los productos de la ligadura de las sondas de oligonucleótidos no ligadas que se basa en la selección de productos de la ligadura. En esta realización, las sondas de oligonucleótidos primera y segunda llevan marcadores complementarios específicos de alelo, C<sub>1</sub> y C<sub>1</sub>', y, adicionalmente, la segunda sonda de oligonucleótidos tiene un marcador universal L<sub>1</sub>. Después de la ligadura, se forma una horquilla tras la hibridación de C<sub>1</sub> y C<sub>1</sub>', teniendo esta horquilla un L<sub>1</sub> que sobresale en su extremo. Un oligonucleótido (L<sub>1</sub>') biotinilado (●) universal se ligó con el producto horquillado en la misma reacción permitiendo la separación de los productos de la ligadura que llevan biotina de las sondas de oligonucleótidos no ligadas mediante selección de estreptavidina. Las sondas de oligonucleótidos también pueden hacerse lo suficientemente largas, por ejemplo, mediante la inclusión de los denominados espaciadores entre los marcadores (C<sub>1</sub>/C<sub>1</sub>') y las porciones específicas de cebador de los oligonucleótidos (A<sub>1</sub>/B<sub>1</sub>) de manera que se produce la ligadura del oligonucleótido biotinilado mientras que las porciones de las sondas de oligonucleótidos se hibridan con la diana. Como alternativa, puede aumentarse la temperatura para separar por fusión el producto ligado de la diana y después puede bajarse la temperatura para permitir la formación de horquilla del producto y la ligadura del oligonucleótido biotinilado con el producto horquillado. En cualquier caso, los productos de la ligadura separados se amplifican posteriormente en presencia de una polimerasa y cebadores de oligonucleótidos como se ha descrito anteriormente.

La característica clave para que los diseños de sondas de oligonucleótidos que se muestran en las Figuras 4A-4C funcionen es que las horquillas intramoleculares sean termodinámicamente mucho más estables que las interacciones bimoleculares entre las sondas de oligonucleótidos. Se seleccionan la temperatura y los tampones de manera que un porcentaje muy pequeño de las sondas de oligonucleótidos no ligadas con marcadores complementarios se hibriden entre sí, pero aproximadamente el 100 % de las moléculas ligadas formarán una estructura de horquilla.

En otra realización de la presente invención, las sondas de oligonucleótidos no ligadas se eliminan mediante filtración en gel (por ejemplo, Sephadex) o un método similar para separar los productos ligados más largos, de mayor peso molecular, de las sondas de oligonucleótidos no ligadas más cortas. Sin embargo, otro enfoque para la eliminación de las sondas no ligadas antes de la amplificación por PCR de las secuencias producto ligadas implica la inmovilización del producto de la ligadura en un soporte sólido (por ejemplo, usando captura de zip-code como se ha descrito anteriormente) y el lavado de las sondas de oligonucleótidos no ligadas.

En otra realización más de la presente invención, las sondas de oligonucleótidos no ligadas se ocluyen de la prolongación y la amplificación posteriores mediante el diseño de sondas que son capaces de formar estructuras de horquilla estables en ausencia de ligadura. Esta realización se representa en la Figura 5. De acuerdo con esta realización, la segunda sonda de oligonucleótidos comprende adicionalmente una aleta de nucleótidos que está en posición 5' con respecto al nucleótido idéntico de solapamiento en la unión, en la que al menos una porción de la aleta de nucleótidos (B<sub>1</sub>' en la Figura 5) es complementaria a al menos una porción de la porción 3' específica de cebador de la segunda sonda de oligonucleótidos (B<sub>1</sub> en la Figura 5). En ausencia de ligadura, regiones complementarias de la aleta de nucleótidos (B<sub>1</sub>') y la porción 3' específica de cebador (B<sub>1</sub>) de segundas sondas de oligonucleótidos no ligadas se hibridan entre sí para formar segundas sondas de oligonucleótidos horquilladas (Figura 5, lado derecho). La porción 3' específica de cebador (B<sub>1</sub>) de la segunda sonda de oligonucleótidos horquillada se prolonga durante el primer ciclo de PCR para formar una segunda sonda de oligonucleótidos

horquillada prolongada que ocluye la unión del segundo cebador de oligonucleótidos con su secuencia complementaria. Como se muestra en el lado izquierdo de la Figura 5, los productos de la ligadura que se forman se amplifican posteriormente usando PCR sin la interferencia de las sondas no ligadas.

5 Durante el proceso de nucleasa-ligadura la temperatura es relativamente alta (50-70 °C) permitiendo que el segundo oligonucleótido participe en la reacción nucleasa-ligadura usando enzimas termoestables con actividades nucleasa 5' y ligasa combinadas o separadas, por ejemplo, polimerasa Taq y ligasa Taq, respectivamente, y dNTP inactivados (bloqueados para la prolongación) (TriLink). Una vez que la ligadura se ha completado, la temperatura aumenta hasta 95 °C inactivando los dNTP y/o la polimerasa. A continuación, la temperatura disminuye rápidamente, de  
10 manera que las segundas sondas de oligonucleótidos no ligadas forman horquillas (Figura 5, lado derecho). El extremo 3' de la estructura de horquilla es prolongado por la polimerasa, formando un tallo de horquilla más largo y altamente estable (Figura 5, lado derecho) que impide que los cebadores ceben en segundas sondas de oligonucleótidos no ligadas durante la PCR. La principal ventaja de este enfoque es que permite la detección por PCR de la ligadura de "tubo cerrado": pueden precargarse ADN de muestra, nucleasa-polimerasa, ligasa, sondas de  
15 oligonucleótidos y cebadores, dNTP y otros reactivos necesarios para la nucleasa, la ligadura y la PCR, en un pocillo o gotita. La reacción cambia de una nucleasa-ligadura a la amplificación por PCR mediante la activación por calor de uno o varios reactivos necesarios para la PCR.

La Figura 6 representa el proceso de nucleasa-ligadura-PCR de la presente invención para detectar la mutación G  
20 → A, T, C en el gen K-ras. Esta reacción implica cuatro segundas sondas de oligonucleótidos 5'-N, algunas conteniendo aletas de nucleótidos en posición 5' con respecto al nucleótido idéntico de solapamiento en la unión. Al menos una porción de la aleta de nucleótidos en las segundas sondas de oligonucleótidos es complementaria a la porción 3' específica de cebador de la sonda para facilitar la formación de una horquilla en ausencia de ligadura. La reacción también implica cuatro primeras sondas de oligonucleótidos N-3'. En este ejemplo, las sondas de  
25 oligonucleótidos específicas para la mutación contienen porciones específicas de cebador 3' y 5' para la amplificación posterior, pero las sondas de oligonucleótidos específicas de tipo silvestre contienen secuencias cortas que no se amplificarán. Como se muestra en la etapa 2, la actividad nucleasa 5' (♦) separa por escisión solamente una base de solapamiento 5' apareada y una aleta adicional, por ejemplo, 5'-C en el caso del tipo silvestre y 5'-D (D = A, G o T) en el caso de una mutación (se muestra 5'-A) dejando un fosfato 5' competente para la ligadura en la segunda sonda de oligonucleótidos. La ligasa (●) sella covalentemente las dos sondas de oligonucleótidos juntas (solo se muestra el caso de mutación) y la PCR amplifica solamente productos de la ligadura para el mutante, pero no alelos de tipo silvestre. Como se muestra en el lado derecho de la Figura 6, las segundas sondas de oligonucleótidos no ligadas que no se escindieron ni se ligaron forman horquillas que son prolongadas por la polimerasa para ocluir la unión de, y la posterior prolongación o amplificación por, el cebador secundario.  
35

Las mutaciones de K-ras, que incluyen 6 cambios en el codón 12 y 1 cambio en el codón 13 que están todos espaciados juntos, son particularmente difíciles de detectar. Para conseguir una discriminación de alta fidelidad, el desapareamiento entre la sonda de oligonucleótidos mutante y la secuencia de tipo silvestre debería ser al menos C:A para la última base, no G:T. La fidelidad puede potenciarse adicionalmente si la base en la penúltima posición es un desapareamiento C:A o G:T. Adicionalmente, puede incluirse una sonda corriente arriba opcional para la secuencia de tipo silvestre, que tenga un desapareamiento en la tercera posición desde el lado 3'. Además, haciendo un desapareamiento en la tercera posición, las primeras sondas de oligonucleótidos mutantes se desaparearán ahora en las últimas 3 posiciones en el lado 3' y, en consecuencia, no pueden amplificar por PCR accidentalmente el producto de la ligadura LDR normal residual. La segunda sonda de oligonucleótidos para la secuencia de tipo silvestre contendrá la base de tipo silvestre en la base crítica. Esta sonda también carecerá de una región específica de cebador y, por tanto, no permitirá ninguna amplificación.  
40  
45

Puesto que las diferentes sondas competirán entre sí en la unión de la secuencia mutante (poco frecuente), es importante permitir que todas las sondas se hibriden con la secuencia correcta. Habrá cuatro sondas corriente arriba y cuatro corriente abajo para las mutaciones de la 1ª posición del codón de K-ras 12, proporcionando 16 combinaciones posibles diferentes. Para evitar la ligadura falsa/señal falsa por sondas mutantes para la secuencia normal, pero también permitir que se produzcan ligaduras correctas en presencia de la secuencia mutante, puede emplearse un enfoque de "mini-ciclos". En este enfoque, la temperatura se hace oscilar entre 60 °C para la ligadura (10 minutos) y 75 °C (1 minuto) de modo que las sondas no ligadas, pero no los productos ligados se caigan del molde.  
50  
55

Para resumir, los diversos niveles de discriminación que pueden emplearse en el proceso de nucleasa-ligadura-PCR usando dos cebadores para la detección de cada mutación incluyen: (i) el uso de la actividad nucleasa 5'-3' de la polimerasa o la nucleasa Fen para escindir solamente segundas sondas de oligonucleótidos que tienen un nucleótido idéntico de solapamiento en la unión con la primera sonda de oligonucleótidos para liberar un fosfato 5' que permite que se produzca la ligadura; (ii) el uso de la fidelidad de ligadura 3' de ligasa termoestable sobre la primera sonda de oligonucleótidos; (iii) el uso de desapareamiento o análogo de nucleótido en la 2ª o 3ª base desde el extremo 3' de la primera sonda de oligonucleótidos; (iv) el uso de sondas de oligonucleótidos con secuencia de tipo silvestre para suprimir la ligadura de sondas de oligonucleótidos diseñadas para detectar secuencias de nucleótidos mutantes en la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre; (v) el uso de condiciones de mini-ciclos para mejorar los rendimientos de producto cuando la mutación está presente; y (vi) el uso de una aleta de nucleótidos en  
60  
65

el extremo 5' de segundas sondas de oligonucleótidos que, en ausencia de ligadura, forman horquillas mediante la hibridación con regiones complementarias en las porciones 3' específicas de cebador a temperatura más baja. La prolongación de la horquilla forma productos que no están unidos mediante cebadores de PCR y, por tanto, se evita la prolongación o amplificación de sondas de oligonucleótidos no ligadas.

En una realización alternativa de la presente invención, las sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas están enlazadas juntas para formar una sonda acoplada como se muestra en la Figura 7. De acuerdo con esta realización, el extremo 5' de la primera sonda de oligonucleótidos está acoplada al extremo 3' de la segunda sonda de oligonucleótidos. Después de la hibridación de las porciones específicas de la diana de la sonda acoplada con su molécula de ácido nucleico diana y la escisión por nucleasa del nucleótido de la aleta 5', la sonda acoplada se liga para formar una secuencia producto ligada circular.

De acuerdo con esta realización de la presente invención, la base discriminadora es la misma base en el extremo 3' y el extremo 5', o la última base antes de la escisión de una aleta en el extremo 5'. Las condiciones de ciclado pueden variarse para determinar el momento óptimo para la (i) escisión por nucleasa 5' eficiente liberando un fosfato 5' cuando la porción de sonda corriente abajo para una mutación particular tiene una hibridación de apareamiento perfecta, seguida de (ii) la ligadura al extremo 3' de la porción de sonda corriente arriba, de nuevo a condición de que haya un apareamiento perfecto con la base de la mutación. Al mismo tiempo, la escisión y la ligadura no específicas se minimizan mediante la reducción del tiempo permitido para que ambas reacciones se produzcan antes de que se eleve la temperatura para desnaturalizar el cebador de del molde incorrecto.

Las sondas acopladas de la presente invención pueden diseñarse para incluir todas las características que se describen en el presente documento para las sondas no acopladas, por ejemplo, regiones de cebador corriente arriba/corriente abajo, porciones zip-code, porciones de detección UniTaq y porciones de cebadores, porciones de marcadores, etc. Adicionalmente, las sondas acopladas pueden diseñarse para contener una o más de las siguientes características. En una realización, la sonda acoplada contiene una secuencia o enlace químico que bloquea la prolongación por polimerasa a través de esa región, es decir, un bloqueante de polimerasa, evitando de este modo la replicación del producto ligado circularizado entero. En otra realización, las sondas acopladas se diseñan para contener una secuencia que se escinde después de la ligadura. Antes de que la escisión, las sondas acopladas no ligadas (así como el ADN molde de entrada) se eliminan por digestión con exonucleasa. En otra realización, los cebadores acoplados no ligados forman horquillas a una temperatura inferior y se prolongan sobre sí mismos para formar productos que no se amplifican (véase la Figura 8). Para facilitar la formación de horquillas, la sonda de oligonucleótidos acoplada comprende un segmento que es complementario a la porción 3' específica de la diana. En ausencia de ligadura, la porción 3' específica de la diana de la sonda acoplada se hibrida con el segmento complementario para formar una sonda de nucleótidos acoplada horquillada. La prolongación de la porción 3' específica de la diana de la sonda de oligonucleótidos horquillada acoplada durante la primera ronda de PCR posterior forma una sonda de oligonucleótidos horquillada acoplada prolongada que ocluye la unión del segundo cebador de oligonucleótidos con su secuencia complementaria. La ventaja de este enfoque es que elimina sondas acopladas no ligadas de los procesos de amplificación y detección corriente abajo sin necesidad de ninguna etapa de digestión adicional (por ejemplo, la digestión con exonucleasa).

La Figura 8 muestra el uso de sondas acopladas en el proceso de nucleasa-ligadura-PCR de la presente invención para detectar la mutación  $G \rightarrow A, T, C$  en el gen K-ras. Este enfoque utiliza tres oligonucleótidos que contienen dos sondas acopladas con la base específica de la mutación en el extremo 3' de la sonda corriente arriba y en o cerca del extremo 5' de la sonda corriente abajo (solamente se muestra el oligonucleótido específico de "A"). Los oligonucleótidos específicos de la mutación contienen porciones específicas de cebador para la amplificación posterior. Solo una base de solapamiento 5' apareada, por ejemplo, en el caso de una mutación (se muestra 5'-A), se escinde por la actividad nucleasa 5' dejando un fosfato 5' competente para la ligadura. La escisión puede liberar solo la única base de solapamiento 5' apareada (se muestra 5'-A) o una aleta que contiene esa base en el extremo 3' liberado. La ligasa (●) sella covalentemente los dos extremos libres de las sondas de oligonucleótidos acopladas para crear productos de la ligadura circularizados cerrados covalentemente. La PCR amplifica productos de la ligadura solo para los alelos mutantes, pero no para los de tipo silvestre. Como se muestra en el lado derecho de la Figura 8, las sondas acopladas no ligadas forman horquillas que se prolongan mediante la polimerasa para ocluir la unión y la posterior prolongación o amplificación por el cebador secundario.

En resumen, los niveles de discriminación que pueden conseguirse usando sondas acopladas incluyen (i) el uso de la actividad nucleasa 5'-3' de la polimerasa o la nucleasa Fen en la porción de cebador corriente abajo; (ii) el uso de la fidelidad de ligadura 3' de la ligasa termoestable en la porción de cebador corriente arriba; (iii) el uso del desapareamiento o análogo de nucleótido en la 2ª o 3ª base desde el extremo 3' de la porción de cebador corriente arriba; (iv) el uso de condiciones de ciclación para mejorar la especificidad de la generación de producto de la ligadura solo cuando la mutación está presente; (v) el uso de concentraciones de cebador más bajas para minimizar acontecimientos independiente de la diana; y (vi) el uso de secuencias en los cebadores acoplados, de manera que cuando no se ligan, forman horquillas a una temperatura inferior y se prolongan sobre sí mismos para formar productos que no se amplifican.

Pueden emplearse varios medios de detección de productos de la ligadura amplificados por PCR como se describe a continuación.

5 En un primer enfoque, uno de los cebadores en un conjunto de cebadores de oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR puede comprender adicionalmente un marcador detectable para crear productos de prolongación primarios marcados que pueden detectarse e identificarse. Este método de detección es adecuado cuando las porciones específicas de cebador del producto de la ligadura son específicas de alelo. Las Patentes de los EE.UU. N.º 6.027.889, 6.797.470, 7.312.039, 7.320.865, 7.332.285, 7.166.434, 7.429.453, 8.283.121 todas de Barany, describen métodos de detección de la diferencia en la secuencia de ácido nucleico usando reacciones en cadena de la polimerasa y de detección de la ligadura acopladas.

15 En otro enfoque, las sondas de oligonucleótidos primera y/o segunda en un conjunto de sondas comprenden una porción zip-code. Como se ha descrito anteriormente, los zip-codes para conjuntos de sondas de oligonucleótidos diferentes tienen diferentes secuencias de nucleótidos (es decir, son específicos de alelo) y se hibridan con oligonucleótidos de captura complementarios en condiciones de hibridación uniformes. La Figura 9A representa el proceso de nucleasa-ligadura-PCR de la presente invención para detectar la mutación G → A, T, C en el gen K-ras. Esta reacción implica cuatro segundas sondas de oligonucleótido 5'-N, conteniendo algunas aletas de nucleótidos 5' para el nucleótido idéntico de solapamiento en la unión y una porción 3' específica de cebador. Para eliminar las sondas de oligonucleótidos no ligadas antes de la amplificación por PCR, al menos una parte de la aleta de nucleótidos en las segundas sondas de oligonucleótidos es complementaria a la porción 3' específica de cebador de la sonda para facilitar la formación de la horquilla en ausencia de ligadura. La reacción también implica cuatro primeras sondas de oligonucleótidos N-3', conteniendo cada una un zip-code diferente y una porción 5' específica de cebador. En este ejemplo, las sondas de oligonucleótidos específicas para la mutación contienen porciones 3' y 5' específicas de cebador para la amplificación posterior, pero las sondas de oligonucleótidos específicas de tipo silvestre contienen secuencias cortas que no se amplificarán. Como se muestra en la etapa 2, la actividad nucleasa 5' de la polimerasa (♦) escinde solamente una base de solapamiento 5' apareada y una aleta adicional, por ejemplo, 5'-C en el caso de tipo silvestre y 5'-D (D = A, G o T) en el caso de una mutación (se muestra 5'-A) dejando un fosfato 5' competente para la ligadura en la segunda sonda de oligonucleótidos. La ligasa (●) sella covalentemente las dos sondas de oligonucleótidos juntas (solo se muestra el caso de la mutación) y la PCR amplifica solamente productos de la ligadura para los alelos mutantes, pero no para los de tipo silvestre. Las segundas sondas de oligonucleótidos no ligadas que no se escindieron ni se ligaron forman horquillas que son prolongadas por la polimerasa para ocluir la unión y la posterior prolongación o amplificación por el cebador secundario.

35 La detección usando el zip-code puede realizarse usando la detección Taqman™ tradicional como se muestra en la Figura 9B (véase la Patente de los EE.UU. N.º 6.270.967 de Whitcombe et al. y la Patente de los EE.UU. N.º 7.601.821 de Anderson et al.). Para la detección usando ensayos Taqman, puede realizarse una primera reacción de amplificación universal opcional usando cebadores de PCR universales, para aumentar proporcionalmente el producto de la ligadura en la muestra (la etapa de PCR universal no se muestra en la Figura 9C). Esto es particularmente adecuado cuando se detectan secuencias de ácido nucleico diana poco abundantes. Después de aproximadamente 8-20 ciclos de amplificación universales, la muestra se diluye de 10 a 100 veces y se añadirían cebadores únicos que se solapan con algunas o todas las secuencias zip-code únicos para cada producto. La sonda Taqman sería para la secuencia de unión de ambos zip-code y el ADN diana (como se muestra en la Figura 9C) o simplemente para el ADN diana (sin solapamiento del cebador único en ninguno de los dos casos). El segundo cebador puede ser universal (U2) o, para una especificidad añadida, puede diseñarse para incluir algunas bases específicas de genoma (sin solapamiento con la sonda Taqman). La señal se genera por la actividad nucleasa 5' de la polimerasa cuando prolonga el segundo cebador. La prolongación del cebador escinde el marcador detectable del oligonucleótido de captura liberando el marcador detectable de la molécula inactivadora, permitiendo la detección.

50 Como alternativa, para la detección usando matrices (zip-code) universales como se muestra en la Figura 9C, el segundo cebador de oligonucleótidos (U2) contendría un marcador indicador, es decir, un grupo fluorescente, mientras que el primer cebador de oligonucleótidos (U1) contendría un fosfato 5', y la amplificación continuaría durante un total de aproximadamente 30 a 40 ciclos. Esto permitiría el uso de exonucleasa lambda para digerir la segunda cadena, haciendo que el producto marcado con fluorescencia sea de cadena simple y adecuado para la hibridación en una matriz (zip-code) universal como se muestra en la Figura 9C.

55 Además, las construcciones anteriores pueden incluir una secuencia única (que varía de 0 a 10 bases) interna a los cebadores universales (Ai Único, Bi Único), representada como se indica a continuación.

Cebador Univ. U1- Ai Único-Zip-code Zi-Diana de ADN-Bi Único-Cebador Univ. U2'

60 Para la detección usando ensayos Taqman de Zipcode, después de los 8-20 ciclos de amplificación universal, la muestra se diluiría de 10 a 100 veces y se añadirían cebadores únicos que se superponen con la secuencia Ai Único Bi Único para cada producto. La sonda TaqMan sería la secuencia zip-code.

65 Puesto que cada secuencia de unión entre el identificador de zip-code y la secuencia diana es única, los productos de la amplificación universal inicial también pueden identificarse y cuantificarse mediante secuenciación de nueva generación.

Otro enfoque de detección que utiliza zip-codes implica tener la porción zip-code dividida en dos partes, que pueden aproximarse entre sí usando una región corta de secuencia complementaria a ambos lados de las partes divididas. En particular, la primera sonda de oligonucleótidos comprendería una primera porción del zip-code y una primera porción marcadora que está en posición 3' con respecto a la primera porción zip-code y la segunda sonda de oligonucleótidos comprendería una segunda porción del zip-code y una segunda porción marcadora que está en posición 5' con respecto a la segunda porción zip-code. Las porciones marcadoras primera y segunda de un conjunto de sondas de oligonucleótidos son complementarias entre sí y tienen preferentemente entre aproximadamente 5 y 8 bases. Esto permite la formación de una horquilla transitoria en la región corta cuando las dos secciones están en la misma cadena monocatenaria de ADN, que se estabiliza mediante la hibridación de las dos mitades de la secuencia zip-code con una secuencia zip-code complementaria de longitud completa en una matriz, o, como alternativa, como parte de un ensayo Taqman.

La Figura 10 muestra un ejemplo de detección de horquilla de zip-code dividido Taqman universal. En esta Figura, y de acuerdo con los métodos descritos anteriormente, ya se ha formado un producto de la ligadura usando conjuntos de sondas de oligonucleótidos (no se muestran) que comprenden una primera sonda de oligonucleótidos que tiene (i) una primera porción 5' específica de cebador universal (U1), (ii) una primera secuencia de identificación única corta (1-10 bases) (A1), (iii) una primera porción de una porción zip-code (Z1.1'), (iv) una primera porción marcadora (T1) que está en posición 3' con respecto a la primera porción zip-code y (v) una porción específica de la diana. La segunda sonda de oligonucleótidos del conjunto de sondas tiene (i) una porción 3' específicas de cebador universal (U2'), (ii) una segunda secuencia de identificación única corta (B1), (iii) una segunda porción de una porción zip-code (Z1.2'), (iv) una segunda porción marcadora (T1') que está en posición 5' con respecto a la segunda porción zip-code y (v) una porción específica de la diana. Como se muestra en la Figura 10, las secuencias únicas A1 y B1 sirven para facilitar una amplificación por PCR específica de la diana de la secuencia producto de la ligadura cuando los cebadores de PCR que se utilizan abarcan la porción de cebador universal y las porciones A1 y B1, respectivamente. Esta amplificación por PCR específica de la diana puede ir precedida opcionalmente de una reacción de amplificación por PCR usando cebadores universales que se hibridan con las porciones específicas de cebador universales 5' y 3'. Una primera reacción de amplificación universal es particularmente adecuada cuando la se detectan secuencias de ácidos nucleicos diana poco abundantes en una muestra. Después de la amplificación por PCR específica de la diana de los productos de la ligadura o los productos de prolongación de los mismos (Figura 10, Etapa 1), los productos de ADN bicatenario se desnaturalizan (Figura 10, etapa 2). A medida que la temperatura disminuye, las porciones marcadoras primera y segunda (T1 y T1') se hibridan juntas transitoriamente, aproximando la primera porción de la secuencia zip-code (Z1.1' de la primera sonda de oligonucleótidos) a la segunda secuencia zip-code (Z1.2' de la segunda sonda de oligonucleótidos). La hibridación transitoria se estabiliza mediante la hibridación simultánea de un oligonucleótido de captura marcado (Z1) que es complementario a las secuencias zip-code posicionadas de forma adyacente (Figura 10, Etapa 3). En una realización, el oligonucleótido de captura tiene una molécula inactivadora (Q) y un marcador detectable (F) que están separados entre sí, donde el marcador detectable se inactiva cuando está en estrecha proximidad a la molécula inactivadora. La señal es generada por la actividad nucleasa 5' de una polimerasa a medida que prolonga un cebador (es decir, el "cebador de digestión") que está unido a la porción específica de cebador universal (U2), la porción B1 única, o una combinación de los mismos, y escinde el oligonucleótido de captura hibridado. La prolongación del cebador escinde el marcador detectable del oligonucleótido de captura liberando el marcador detectable de la molécula inactivadora, permitiendo la detección (Figura 10, Etapa 4). Tan pronto como la polimerasa ha atravesado Z1.2', el tallo corto entre Z1.2' y Z1.1' se desmorona y la polimerasa continúa prolongando para crear el producto ADNbc. Se conoce en la técnica una amplia diversidad de marcadores detectables, es decir, colorantes fluorescentes, y están disponibles en el mercado, por ejemplo, FAM, TET, JOE, VIC, HEX, CY3, TAMRA, TexasRed, Cy5, ROX. De forma similar, son bien conocidas para los expertos en la materia, las moléculas inactivadoras, por ejemplo, MGB-NFQ, BHQ-[0123], inactivador ZEN de IDT.

Un aspecto relacionado de la presente invención se refiere a un método de identificación de la presencia de una o más secuencias de nucleótidos diana en una muestra. Este método implica proporcionar una muestra que contiene potencialmente la una o más secuencias de nucleótidos diana y proporcionar uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos. Cada conjunto de sondas tiene (i) una primera sonda de oligonucleótidos que comprende una porción 5' específica de cebador, una primera porción de una porción zip-code, una primera porción marcadora que está en posición 3' con respecto a la primera porción zip-code, y una porción específica de la diana, y (ii) una segunda sonda de oligonucleótidos que comprende una porción 3' específica de cebador, una segunda porción de la porción zip-code, una segunda porción marcadora que está en posición 5' con respecto a la segunda porción zip-code, y una porción específica de la diana. Las porciones zip-code primera y segunda de un conjunto de sondas de oligonucleótidos, cuando están posicionadas de forma adyacente, forman una porción zip-code de longitud completa y las porciones marcadoras primera y segunda de un conjunto de sondas de oligonucleótidos son complementarias entre sí. La muestra y el uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ponen en contacto en condiciones eficaces para que las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas se hibriden de una manera específica de base con sus secuencias de nucleótidos diana correspondientes, si están presentes en la muestra, y las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de el uno o más conjuntos de sondas se ligan entre sí para formar secuencias producto ligadas. Este método implica adicionalmente proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos, comprendiendo cada conjunto (a) un primer cebador de oligonucleótidos que comprende la misma secuencia de nucleótidos que la porción 5' específica de cebador de la secuencia producto

ligada y (b) un segundo cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la porción 3' específica de cebador de la secuencia producto ligada. Las secuencias producto ligadas, el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos y una ADN polimerasa se mezclan para formar una mezcla de reacción en cadena de la polimerasa, y la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa se somete a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa, formando de este modo productos de extensión primarios. Se proporciona una colección de oligonucleótidos de captura que son complementarios a una porción de la primera porción zip-code y una porción de la segunda porción zip-code. Cada oligonucleótido de captura de la colección para cada producto de extensión primario diferente tiene una secuencia de nucleótidos diferente y comprende una molécula inactivadora y un marcador detectable separados entre sí. Los productos de extensión primarios y la colección de oligonucleótidos de captura se someten a condiciones eficaces para (i) que las porciones marcadoras primera y segunda de un producto de extensión primario particular se hibriden entre sí para formar productos de extensión horquillados con porciones zip-code primera y segunda posicionadas de forma adyacente y (ii) los oligonucleótidos de captura de la colección se hibriden con porciones zip-code primera y segunda posicionadas de forma adyacente complementarias de los productos de extensión horquillados. La molécula inactivadora o el marcador detectable se escinden de los oligonucleótidos de captura hibridados y se detecta el marcador detectable separado de la molécula inactivadora. La presencia de la una o más secuencias de nucleótidos diana en la muestra se identifica basándose en esta detección.

De acuerdo con este aspecto de la presente invención, el proceso de reacción de ligadura puede ser una reacción de ligadura que está precedida de la escisión por nucleasa 5' de la segunda sonda de oligonucleótidos, como se describe en el presente documento. Como alternativa, pueden proporcionarse sondas de oligonucleótidos competentes para la ligadura y la ligadura no necesita ir precedida de la escisión por nucleasa 5'.

La Figura 11 muestra otro ejemplo de detección de horquilla de zip-code dividido universal. En esta Figura, ya se ha formado un producto de la ligadura usando conjuntos de sondas de oligonucleótidos (no se muestran) que comprenden una primera sonda de oligonucleótidos que tiene (i) una primera porción 5' específica de cebador universal (U1), (ii) una segunda porción específica de cebador (A1) que es una porción de cebador específica de producto de la ligadura, (iii) una primera porción de una porción zip-code (Z1.1'), (iv) una primera porción marcadora (T1) que está en posición 3' con respecto a la primera porción zip-code y (v) una porción específica de la diana. La segunda sonda de oligonucleótidos del conjunto de sondas tiene (i) una porción 3' específica de cebador universal (U2'), (ii) una segunda porción de una porción zip-code (Z1.2'), (iii) una segunda porción marcadora (T1') que está en posición 5' con respecto a la segunda porción zip-code y (iv) una porción específica de la diana. En la Etapa 1 de la Figura 11, el producto de la ligadura inicialmente se amplifica opcionalmente usando un conjunto de cebadores de oligonucleótidos universales, es decir, un primer cebador de oligonucleótidos (U1) que tiene la misma secuencia que la porción 5' específica de cebador universal del producto de la ligadura, y un segundo cebador de oligonucleótidos (U2) que es complementario a la porción 3' específica de cebador universal del producto de la ligadura. Los productos de prolongación primarios formados a partir de la etapa de PCR universal primaria se someten a una etapa de PCR secundaria (Figura 11, Etapa 2) usando un conjunto de cebadores secundario que incluye un primer cebador de oligonucleótido secundario que tiene (a) una secuencia de nucleótidos que es igual que la segunda porción específica de cebador de la primera sonda de oligonucleótidos (A1), (b) una porción de captura de oligonucleótidos (Z1) que es complementaria a las porciones zip-code primera y segunda posicionadas de forma adyacente de un conjunto de sondas de oligonucleótidos, (c) una molécula inactivadora (Q) y un marcador detectable (F) separados por dicha porción de captura de oligonucleótidos. El segundo cebador de oligonucleótidos secundario (U2) del conjunto de cebadores tiene la misma secuencia de nucleótidos que el segundo cebador de oligonucleótidos primario de la PCR primaria (es decir, es complementaria a la porción 3' específica de cebador universal del producto de la ligadura). La molécula inactivadora del primer cebador secundario puede servir como un bloqueante de la polimerasa para bloquear la prolongación de la polimerasa de la cadena inferior. Como alternativa, un bloqueante de la polimerasa tal como HEG (hexetilenglicol), THF (tetrahidrofurano), Sp-18 o cualquier otro bloqueante conocido en la técnica que sea suficiente para detener la prolongación por la polimerasa puede colocarse próximo al grupo inactivador. Los productos de ADN bicatenario (que se muestran en la Figura 11, Etapa 3) se desnaturalizan y la temperatura disminuye para permitir la formación de una horquilla doble con tallos entre Z1.1' y Z1.2' (tallo formado mediante la hibridación entre T1 y T1') y entre la porción de oligonucleótidos de captura (Z1) y Z1.1'/Z1.2' (Figura 11, Etapa 4). La señal es generada por la actividad nucleasa 5' de la polimerasa cuando prolonga un "cebador de digestión" complementario a la porción 5' específica de cebador universal. La prolongación del cebador escinde el marcador detectable (F) o la molécula inactivadora (Q) del oligonucleótido de captura liberando el marcador detectable (F) de la molécula inactivadora (Q), permitiendo la detección (Figura 11, Etapa 5). Tan pronto como la polimerasa ha atravesado Z1.2', el tallo corto entre Z1.2 y Z1.1' se desmorona y la polimerasa continúa prolongando hasta que llega al bloqueante de la polimerasa para crear un producto de ADNbc similar al de la etapa 1, pero que carece de la señal D1 fluorescente.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de identificación de la presencia de y/o mutaciones potenciales dentro de una o más secuencias de nucleótidos diana en una muestra. Este método implica proporcionar una muestra que contiene potencialmente la una o más secuencias de nucleótidos diana y proporcionar uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos. Cada conjunto de sondas tiene (i) una primera sonda de oligonucleótidos que comprende una porción 5' específica de cebador, una primera porción de una porción zip-code, una primera porción marcadora que está en posición 3' con respecto a la primera porción zip-code y una porción específica de la



diana y (ii) una segunda sonda de oligonucleótidos que comprende una porción 3' específica de cebador, una segunda porción de la porción zip-code, una segunda porción marcadora que está en posición 5' con respecto a la segunda porción zip-code y una porción específica de la diana. Las porciones zip-code primera y segunda de un conjunto de sondas de oligonucleótidos, cuando están posicionadas de forma adyacente, forman una porción zip-code de longitud completa y las porciones marcadoras primera y segunda de un conjunto de sondas de oligonucleótidos son complementarias entre sí. La muestra y el uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ponen en contacto en condiciones eficaces para que las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas se hibriden de manera específica de base con sus secuencias de nucleótidos diana correspondientes, si están presentes en la muestra y las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de el uno o más conjuntos de sondas se ligan entre sí para formar secuencias producto ligadas. El método implica adicionalmente proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos, comprendiendo cada conjunto (i) un primer cebador de oligonucleótidos que tiene (a) una secuencia de nucleótidos que es igual que la segunda porción específica de cebador de la primera sonda de oligonucleótidos, (b) una porción de oligonucleótidos de captura que es complementaria a las porciones zip-code primera y segunda posicionadas de forma adyacente de un conjunto de sondas de oligonucleótidos, (c) una molécula inactivadora y un marcador detectable separados por dicha porción de oligonucleótidos de captura, (ii) un segundo cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria con la porción 3' específica de cebador de la secuencia producto ligada. Las secuencias producto ligadas, el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos y una ADN polimerasa se mezclan para formar una mezcla de reacción en cadena de la polimerasa y la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa se somete a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa, formando de este modo productos de prolongación primarios. Los productos de prolongación primarios se someten a condiciones eficaces para que las porciones marcadoras primera y segunda de un producto de prolongación primario particular se hibriden entre sí para formar productos de prolongación primarios horquillados con porciones zip-code primera y segunda posicionadas de forma adyacente y (ii) que la porción de oligonucleótidos de captura de un producto de prolongación primario horquillado particular se hibride con las porciones zip-code primera y segunda posicionadas de forma adyacente complementarias del producto de prolongación horquillado. La molécula inactivadora o el marcador detectable de los productos de prolongación primarios horquillados se escinden y se detecta el marcador detectable separado de la molécula inactivadora. La presencia de una o más secuencias de nucleótidos diana en la muestra se identifica basándose en esta detección

De acuerdo con este aspecto de la presente invención, el proceso de reacción de ligadura puede ser una reacción de ligadura que va precedida de la escisión por nucleasa 5' de la segunda sonda de oligonucleótidos como se describe en el presente documento. Como alternativa, pueden proporcionarse sondas de oligonucleótidos competentes para la ligadura y la ligadura no necesita ir precedida de la escisión por nucleasa 5'.

Un enfoque alternativo a la utilización de las secuencias de oligonucleótidos zip-code/de captura para la detección implica el enfoque UniTaq. El sistema UniTaq se describe con todo detalle en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 2011/0212846 de Spier. El sistema UniTaq implica el uso de dos a tres secuencias "marcadoras" únicas cortas (1-10 nucleótidos), en el que al menos una de las secuencias marcadoras únicas (Ai) está presente en la primera sonda de oligonucleótidos y las porciones marcadoras únicas segunda y tercera (Bi y Ci) están en la secuencia de la segunda sonda de oligonucleótidos. Tras la ligadura de las sondas de oligonucleótidos en un conjunto de sondas, el producto de la ligadura resultante contendrá la secuencia Ai-secuencias específicas de la diana-secuencia Bi-secuencia Ci. La esencia del enfoque UniTaq es que es necesario que ambas sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas de ligadura necesitan sean correctas con el fin de obtener una señal positiva, que permite la detección de ácidos nucleicos altamente multiplexada. Por ejemplo, y como se describe en el presente documento, esto se consigue requiriendo la hibridación de dos partes, es decir, dos de los marcadores, entre sí.

En una realización de la presente invención, las porciones de marcador UniTaq de un conjunto de sondas de oligonucleótidos son "específicas de alelo" y se usan para identificar y distinguir secuencias producto ligadas individuales en una muestra. De acuerdo con esta realización, las porciones UniTaq para cada secuencia producto ligada diferente son diferentes. Esta realización es particularmente útil para detectar y distinguir diferentes mutaciones alélicas. En una realización alternativa, donde el objetivo es simplemente detectar la presencia de una mutación en una serie de copias de un gen o cromosoma, pero la identidad de la mutación o la región cromosómica no es crítica, pueden usarse las mismas porciones de marcador UniTaq para detectar diferentes productos de ligadura. En cualquier realización, la incorporación de las porciones marcadoras UniTaq en una de las sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas permite la detección altamente multiplexada de diversas secuencias diana simultáneamente.

Las Figuras 12A y 12B son diagramas esquemáticos que muestran la incorporación de diferentes conjuntos de marcadores UniTaq, por ejemplo, Ai y Bi-Ci,  $i = 1-N$  en sondas de ligadura de oligonucleótidos y los productos resultantes. Como se muestra en las Figuras 12A y 12B, los conjuntos de sondas de oligonucleótidos pueden diseñarse para que sean complementarias a la cadena Watson o Crick del ADN genómico.

Las Figuras 13A-13C muestran diversas formas en las que el sistema de marcadores UniTaq pueden incorporarse en el proceso de nucleasa-ligadura-PCR de la presente invención. En el primer enfoque, que se muestra en la

Figura 13A, el producto de la ligadura que contiene Ai (una primera porción específica de cebador), B'i (una porción de detección UniTaq) y C'i (una segunda porción específica de cebador) se ceba en ambas cadenas usando un primer cebador de oligonucleótidos que tiene la misma secuencia de nucleótidos que Ai y un segundo cebador de oligonucleótidos que es complementaria a C'i (es decir, Ci). El primer cebador de oligonucleótidos también incluye una sonda de detección UniTaq (Bi) que tiene un marcador detectable D1 en un extremo y una molécula inactivadora (Q) en el otro extremo (D1-Bi-Q-Ai). Opcionalmente posicionada próxima al inactivador hay una unidad de bloqueo de la polimerasa, por ejemplo, HEG, THF, Sp-18 o cualquier otro bloqueante conocido en la técnica que sea suficiente para detener la prolongación por la polimerasa. Un bloqueante de la polimerasa puede no ser necesario si la cola 5' que se dobla en un tallo tiene una o más bases en el extremo 5' que no son complementarias a la secuencia marcadora universal intermedia, de manera que la horquilla formada por la cadena opuesta de ADN (con el extremo 3' en el extremo del tallo) no sea prolongable durante la PCR. También puede diseñarse una horquilla pequeña en la porción 5' del cebador 100, de manera que el colorante y el inactivador se aproximen entre sí, de forma similar a los cebadores y sondas "Sunrise" para mejorar la inactivación y disminuir la fluorescencia de fondo. Por ejemplo, véanse las Patentes de los EE.UU. N.º 5.866.336 y 6.270.967.

La amplificación por PCR da como resultado un producto bicatenario (Figura 13A, Etapa 2). En este ejemplo, una unidad de bloqueo de la polimerasa impide que una polimerasa copie la porción 5' (Bi) del primer cebador universal, de manera que la cadena inferior del producto no puede formar una horquilla cuando se convierte en monocatenaria. La formación de una horquilla de este tipo daría como resultado la hibridación del extremo 3' del tallo con el amplicón de manera que la prolongación por la polimerasa de este extremo 3' finalizaría la reacción por PCR.

Los productos de PCR bicatenarios se funden (por ejemplo, elevando la temperatura a aproximadamente 95 °C para separar la cadena superior de la cadena inferior, y cuando la temperatura disminuye posteriormente, la cadena superior del producto forma una horquilla que tiene un tallo entre la porción 5' (Bi) del primer cebador de oligonucleótidos y la porción B'i en el extremo opuesto de la cadena (Figura 13A, etapa 3). También durante esta etapa, el segundo cebador de oligonucleótidos se hibrida con la porción 5' específica de cebador (C'i). La formación de la horquilla intramolecular se produce rápidamente y es impulsada por la termodinámica: la energía libre está determinada por la longitud del tallo, el contenido de GC y la longitud del bucle. Es importante que la temperatura de fusión (Tf) de la horquilla sea significativamente mayor (por ejemplo, aproximadamente 10 °C o más) que la Tf del segundo cebador de oligonucleótidos. De esta manera, cuando la temperatura disminuye, casi el 100 % de las moléculas formarán la horquilla antes de que el segundo cebador universal se hibride y se prolongue. Tras la prolongación del segundo cebador universal en la etapa 4, la actividad nucleasa 5' de la polimerasa escinde el marcador detectable D1 o la molécula inactivadora desde el extremo 5' del amplicón, aumentando de este modo la distancia entre el marcador y el inactivador o el colorante FRET y permitiendo la detección del marcador. Se conoce en la técnica una amplia diversidad de marcadores detectables, es decir, colorantes fluorescentes, y están disponibles en el mercado, por ejemplo, FAM, TET, JOE, HEX, CY3, TAMRA, TexasRed, Cy5, ROX. De forma similar, son bien conocidas para los expertos en la materia, las moléculas inactivadoras, por ejemplo, MGB-NFQ, BHQ-[0123], inactivador ZEN de IDT.

En el enfoque que se muestra en la Figura 13B, se usa un ensayo Taqman™ tradicional para detectar el producto de la ligadura. Este método implica proporcionar una sonda de detección UniTaq (Bi) que es complementaria a la porción de detección UniTaq (B'i). La sonda de detección UniTaq comprende una molécula inactivadora (Q) y un marcador detectable (D1) que están separados entre sí. La sonda de detección UniTaq se hibrida con su porción de detección UniTaq complementaria en el producto de la ligadura, al mismo tiempo, el segundo cebador de oligonucleótidos (Ci) se hibrida con la porción 5' específica de cebador C'i del producto de la ligadura durante la amplificación por PCR. La prolongación del segundo cebador de oligonucleótidos genera una señal mediante la escisión por la exonucleasa 5' de D1 y la separación de D1 del inactivador.

Un formato de detección de ejemplo adicional que implica la formación de un círculo universal se ilustra esquemáticamente en la Figura 13C. Como anteriormente, el producto de la ligadura en la Figura 13C contiene Ai (una primera porción específica de cebador), porciones específicas de la diana, B'i (una porción de detección UniTaq) y C'i (una segunda porción específica de cebador). El producto de la ligadura se amplifica usando un primer cebador de oligonucleótidos (Ai) que tiene la misma secuencia de nucleótidos que la porción específica de cebador Ai del producto de la ligadura, y un segundo cebador de oligonucleótidos que incluye (i) una porción cebadora (Ci) que es complementaria a la porción 5' específica de cebador C'i del producto de la ligadura, (ii) una región espaciadora que contiene un bloqueante de la polimerasa (x), (iii) una molécula inactivadora (Q), (iv) una sonda de detección UniTaq (Bi) y (v) un marcador detectable (D1) que se inactiva cuando está en las proximidades de la molécula inactivadora. Durante la PCR, la porción de cebador del segundo cebador de oligonucleótidos (Ci) se hibrida con la porción específica de cebador del producto de la ligadura, mientras que la sonda de detección UniTaq (Bi) se hibrida con su porción de detección UniTaq complementaria del producto de la ligadura (Figura 13C, Etapa 1). En este ejemplo, la prolongación del segundo cebador de oligonucleótidos (Figura 13, Etapa 2) escinde la sonda de detección UniTaq hibridada (Bi) liberando de este modo el marcador detectable. La liberación del marcador detectable de la molécula inactivadora genera una señal detectable.

La Figura 14 muestra un ejemplo de detección para dos alelos usando el mismo proceso que se representa en la Figura 13A. Se muestran dos alelos "X" y "O". A diferencia de las reacciones de LDR normales, ambas sondas de

oligonucleótidos de un conjunto de sondas son específicas de alelo. En otras palabras, el conjunto de sondas que comprende una primera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción 5' específica de cebador (Aix) y una porción específica de la diana, y una segunda sonda de oligonucleótidos que tiene una porción 3' específica de cebador (Ci), la porción de detección UniTaq (Bix) y una porción específica de la diana, es específico para la detección del alelo X. Análogamente, el conjunto de sondas que comprende una primera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción 5' específica de cebador (Aio) y una porción específica de la diana, y la segunda sonda de oligonucleótidos que tiene una porción 3' específica de cebador (Ci), la porción de detección UniTaq (Bio) y una porción específica de la diana, es específico para la detección del alelo O. La Etapa 1 en la Figura 14 muestra el proceso de nucleasa-ligadura de la presente invención. Este formato de diseño de sondas de oligonucleótidos aumenta la especificidad de detección: la base 5'-ALETA en la segunda sonda de oligonucleótidos se escinde solo si la base 5' se aparea con el alelo y las dos sondas de oligonucleótidos se ligan solamente si la base más hacia el extremo 3' en la primera sondas de oligonucleótidos se aparea con el alelo. Este método es especialmente ventajoso para detectar la detección de mutaciones, por ejemplo, para detectar mutaciones somáticas poco frecuentes en un gran exceso de moléculas de tipo silvestre. Las reacciones de nucleasa-ligasa específicas de alelo y de mutación pueden realizarse a una temperatura similar o más alta que la  $T_f$  de la sonda de ligadura, de manera que los oligonucleótidos desapareados puedan separarse por fusión del molde y permitan que se hibriden nuevos oligonucleótidos. En el caso de detección de mutaciones, pueden usarse solamente las sondas de oligonucleótidos específicas para las mutaciones y no los alelos normales. Las Etapas 2 y 3 de la Figura 14 muestran el mismo proceso representado en la Figura 13A, donde el producto de la ligadura se amplifica usando un conjunto de cebadores que tiene un primer cebador de oligonucleótidos que contiene la porción de sonda de detección UniTaq (Bix o Bio) que contiene una molécula inactivadora (Q) y un marcador detectable (D1 o D2) (Etapa 2). El producto de prolongación resultante forma una horquilla como resultado de la hibridación entre las porciones de sonda de detección UniTaq (Bix o Bio) y porciones de detección UniTaq complementarias (B'ix y B'io, respectivamente) (Etapa 3). Una señal detectable se genera mediante la actividad nucleasa 5' de una polimerasa que escinde el marcador detectable (D1 o D2) de la porción de sonda de detección UniTaq (Bix o Bio) del producto horquillado a medida que prolonga un cebador hibridado (Ci) (Etapa 3).

La Figura 15 muestra un ejemplo de uso de "marcadores" universales de origen natural para la detección. Este método puede usarse cuando hay suficiente libertad para escoger dianas de detección y existe la necesidad de aumentar la sensibilidad y robustez de detección. La detección de la aneuploidía fetal del síndrome de Down permite escoger múltiples loci (N en la Figura 15A) en el cromosoma 21 que tienen todos la misma secuencia universal B1, por ejemplo, un 8-mero. Puede usarse opcionalmente el mismo oligonucleótido intermedio 8-mero universal para todas las dianas. En este caso, pueden usarse bases modificadas estabilizantes de la hibridación en este oligonucleótido intermedio universal, por ejemplo, LNA. Las sondas de oligonucleótidos de ligadura se diseñan para ligarse en los puntos de ligadura cerca de la mitad de los marcadores universales. Como alternativa, pueden diseñarse oligonucleótidos de ligadura de manera que los marcadores universales B1 se produzcan en cualquier parte de los productos de la ligadura. La Figura 15A a la derecha muestra cómo puede usarse un diseño de ligadura doble; en este caso un marcador universal diferente B2 está presente en todas las dianas de control N. La detección universal usando cebadores doblemente marcados detectará todas las dianas con marcadores B1 en el colorante D1 y todas las dianas con marcadores B2 en el colorante 2. Este enfoque de uso de la misma secuencia universal para la detección de un primer cromosoma (es decir, el cromosoma 21) y una secuencia universal diferente para la detección de un segundo cromosoma (es decir, el cromosoma de control 2) puede usarse para el diagnóstico prenatal no invasivo. Los productos de la ligadura individuales se "cuentan" usando PCR digital (dPCR). En el caso de la dPCR, los recuentos de los pocillos con señal D1 y D2 pueden usarse para detectar la aneuploidía fetal.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un método de identificación de la presencia de una o más secuencias de nucleótidos diana en una muestra. Este método implica proporcionar una muestra que contiene potencialmente la una o más secuencias de nucleótidos diana y proporcionar uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos. Cada conjunto comprende (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la diana y (b) una segunda sonda de oligonucleótidos que tiene una porción de aleta 5' no específica de la diana y una porción específica de la diana que contiene una o más bases de nucleótidos modificados con tiofosfato, en la que las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas se configuran para que se hibriden en la secuencia de nucleótidos diana. La muestra y el uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ponen en contacto en condiciones eficaces para que las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas se hibriden de una manera específica de base con sus secuencias de nucleótidos diana correspondientes, si están presentes en la muestra. La porción de aleta 5' no específica de la diana de la segunda sonda de oligonucleótidos se escinde con una enzima que tiene actividad nucleasa 5', liberando de este modo un fosfato 5' en una primera base de nucleótido de la porción específica de la diana del segundo oligonucleótido, y las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ligan entre sí para formar secuencias producto ligadas que contienen las porciones específicas de la diana con la una o más bases de nucleótidos modificados con tiofosfato. El método comprende adicionalmente la detección de secuencias producto ligadas en la muestra y la identificación de la presencia de la una o más secuencias de nucleótidos diana en la muestra basándose en dicha detección.

De acuerdo con este aspecto de la presente invención, al menos una de la una o más bases de nucleótidos modificados con tiofosfato de la segunda sonda de oligonucleótidos es adyacente a la primera base de nucleótido

específica de la diana.

De acuerdo con este aspecto de la presente invención, las sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas pueden comprender porciones específicas de la diana que se encuentran en estrecha proximidad entre sí en una molécula de ácido nucleico diana y se configuran para que se hibriden adyacentes entre sí en la secuencia de nucleótidos diana con una unión entre ellas, como se muestra en la Figura 1. Como alternativa, y como se muestra en la Figura 16, las sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas pueden comprender porciones específicas de la diana que no son adyacentes entre sí. De acuerdo con esta realización, la primera sonda de oligonucleótidos se prolonga con una polimerasa para formar una unión con la segunda sonda de oligonucleótidos antes de la escisión de la porción de aleta 5' no específica de la diana (aleta) de la segunda sonda de oligonucleótidos, es decir, reacción de hueco-ligadura (Jou et al, "*Deletion Detection in Dystrophin Gene by Multiplex Gap Ligase Chain Reaction and Immunochromatographic Strip Technology*", *Human Mutation* 5: 86-93 (1995)). La escisión se produce si la porción específica de la diana de la segunda sonda de oligonucleótidos tiene un nucleótido idéntico de solapamiento en la unión con la primera sonda de oligonucleótidos prolongada. Adicionalmente, la actividad nucleasa 5' se detiene por los nucleótidos modificados con tiofosfato ("S") de la porción de aleta 5' de oligonucleótidos. Después de la escisión por la actividad nucleasa 5' de la polimerasa (♦), la primera sonda de oligonucleótidos prolongada se liga a la segunda sonda de oligonucleótidos por una ligasa (●). En la realización representada en la Figura 16, la primera sonda de oligonucleótidos comprende adicionalmente una porción 5' específica de cebador (P1) y la segunda sonda de oligonucleótidos comprende una porción 3' específica de cebador (P2). En consecuencia, después de la ligadura, el producto ligado posteriormente se amplifica por PCR y/o se somete a secuenciación. Las secuencias de segunda sonda de oligonucleótidos no ligadas pueden ocluirse para que no interfieran con la amplificación por PCR de los productos de la ligadura mediante el diseño de la porción de aleta 5' de la sonda de oligonucleótidos para que sea complementaria a una porción de la porción 3' específica de cebador. Como se muestra en la Figura 16 (lado derecho), las sondas de oligonucleótidos no ligadas forman una horquilla como resultado de la hibridación entre la porción de aleta 5' y su región complementaria en la porción 3' específica de cebador. La prolongación de la porción 3' específica de cebador de la sonda de oligonucleótidos horquillada forma una horquilla estable que se unirá mediante un cebador de oligonucleótidos de PCR.

Los diversos medios de detección de la secuencia producto ligada se han descrito anteriormente, por ejemplo, la detección basada en sondas de ligadura marcadas, la secuenciación de nueva generación, la amplificación por PCR y la detección de productos de prolongación marcados que contienen porciones zip-code y/o porciones de detección UniTaq. Como se ha descrito anteriormente, es preferible ocluir las sondas de oligonucleótidos no ligadas de la muestra que comprende secuencias producto ligadas antes de realizar cualquier ensayo posterior basado en la amplificación para evitar la prolongación o la amplificación de la sonda no ligada. La aleta de nucleótidos 5' de la segunda sonda de oligonucleótidos es complementaria a al menos una porción de la porción 3' específica de cebador de la segunda sonda de oligonucleótidos y en la que, en ausencia de ligadura, regiones complementarias de la aleta de nucleótidos 5' y la porción 3' específica de cebador de una segunda sonda de oligonucleótidos no ligada se hibridan entre sí para formar una segunda sonda de oligonucleótidos horquillada.

El reto para el desarrollo de ensayos de diagnóstico y de detección fiables para ambas categorías es distinguir aquellos marcadores que emanan del tumor o el feto que son indicativos de enfermedad (es decir, cáncer temprano) frente a la presencia de los mismos marcadores que emanan del tejido normal. También existe la necesidad de equilibrar el número de marcadores examinados y el coste del ensayo, con la especificidad y la sensibilidad del ensayo. Este es un reto que debe abordar la variación biológica en enfermedades tales como el cáncer. En muchos casos el ensayo debe servir como una herramienta de detección, lo que requiere la disponibilidad de un seguimiento diagnóstico secundario (es decir, colonoscopia, amniocentesis).

Agravando el problema biológico está la necesidad de detectar de manera fiable las mutaciones de secuencias de ácidos nucleicos o cuantificar de forma fiable el número de copias de ADN o ARN ya sea de un número muy pequeño de células iniciales (es decir, de las CTC) o cuando la señal específica del cáncer o del feto es en presencia de una mayoría de ácido nucleico que emana de células normales.

Por último, existe el reto técnico de distinguir la señal verdadera resultado de la detección de las diferencias de ácidos nucleicos específicas de enfermedad deseada, frente a la señal falsa generada a partir de ácidos nucleicos normales presentes en la muestra, frente a la señal falsa generada en ausencia de las diferencias de ácidos nucleicos específicas de enfermedad.

Los métodos de la presente invención que se describen en el presente documento proporcionan soluciones a estos retos. Estas soluciones comparten algunos temas comunes que se destacan a continuación.

El primer tema es la multiplexación. La PCR funciona mejor cuando la concentración de cebadores es relativamente alta, de 50 nM a 500 nM, lo que limita la multiplexación. Adicionalmente, cuantos más pares de cebadores de PCR se añadan, las posibilidades de amplificar productos incorrectos o de crear dímeros de cebadores aumentan exponencialmente. Por el contrario, para las sondas de LDR, se usan concentraciones bajas del orden de 4 nM a 20 nM y los dímeros de sonda están limitados por el requisito de la hibridación adyacente en la diana para permitir un acontecimiento de ligadura. El uso de bajas concentraciones de cebadores de PCR o sondas de LDR específicos

de genes con las "colas" de secuencias de cebador universal permite la adición posterior de concentraciones mayores de cebadores universales para conseguir la amplificación proporcional de los productos de PCR o de LDR iniciales.

5 El segundo tema son las fluctuaciones de señales debidas a ácidos nucleicos diana de aporte bajo. Con frecuencia, el ácido nucleico diana se origina a partir de unas pocas células, ya sea capturado como CTC, o a partir de células tumorales que se sometieron a apoptosis y liberaron su ADN como fragmentos pequeños (200 pb) en el suero. En dichas condiciones, es preferible realizar algún nivel de amplificación proporcional para evitar la pérdida de la señal por completo o la notificación de un número de copias inexacto debido a las fluctuaciones cuando se distribuyen  
10 números pequeños de moléculas de partida en pocillos individuales (para la cuantificación por PCR en tiempo real o digital). Siempre que estas amplificaciones universales iniciales se mantengan en un nivel razonable (aproximadamente de 8 a 20 ciclos), el riesgo de contaminación por arrastre durante la apertura del tubo y la distribución de amplicones para la posterior detección/cuantificación (usando PCR en tiempo real o en gotitas) se reduce al mínimo. Si es necesario, la señal de arrastre puede eliminarse mediante la incorporación de uracilo  
15 convencional durante la etapa de amplificación universal y mediante el uso de la endonucleasa AP y UNG en el procedimiento de tratamiento preamplificación.

El tercer tema es la señal independiente de la diana. Esto surge de las reacciones de ligasa o polimerasa que se producen en ausencia de la diana correcta. Parte de esta señal puede minimizarse mediante el diseño de cebadores con criterio. Para las reacciones de ligadura, la actividad nucleasa 5' -> 3' de la polimerasa puede usarse para liberar el fosfato 5' del cebador de ligadura corriente abajo (solo cuando se hibrida con la diana), de modo que sea adecuado para la ligadura. Puede conseguirse especificidad adicional para distinguir la presencia de una mutación de bajo nivel mediante (i) el uso de cebadores de LDR corriente arriba que contienen un desapareamiento en la 2ª o  
20 3ª posición del OH 3' y (ii) cebadores LDR para la secuencia de tipo silvestre que se ligan, pero que no experimentan amplificación adicional.

El cuarto tema es ya sea la amplificación suprimida (reducida) o la amplificación incorrecta (falsa) debida a cebadores no utilizados en la reacción. Un enfoque para eliminar dichos cebadores no utilizados es capturar ADN genómico en un soporte sólido, permitir que los cebadores de ligadura se hibriden y liguen, y después eliminar los  
30 cebadores o productos que no están hibridados con el ADN genómico en un soporte sólido. Otro enfoque es hacer que el extremo 3' de cebadores de ligadura de corriente abajo se hibride con una porción de su propio extremo 5', con una secuencia que falta del cebador si ha experimentado una escisión por nucleasa satisfactoria y una etapa de ligadura posterior. Esos cebadores que no se escindieron se auto-prolongan para formar bucles de horquilla más largos que no experimenten una amplificación adicional. Otro enfoque más es usar colas de cebadores universales en cebadores genómicos de PCR o LDR, que son ligeramente más cortos que los cebadores Universales. Esto  
35 permite la amplificación universal inicial a una temperatura de ciclo inferior (es decir, hibridación a 55 °C) seguida de una temperatura de ciclo mayor (es decir hibridación a 65 °C) de manera que los cebadores universales se unan preferencialmente al producto deseado (en comparación con cebadores de PCR o LDR compuestos que se unen a productos incorrectos).

Los métodos de la presente invención que se describen en el presente documento son capaces de detectar y cuantificar una o más moléculas de ácido nucleico diana de baja abundancia que tienen una o más inserciones, deleciones, translocaciones, mutaciones de bases de nucleótidos y/o bases de nucleótidos dañados. Como se usa en el presente documento "molécula de ácido nucleico diana de baja abundancia" se refiere a una molécula de ácido  
45 nucleico diana que está presente en niveles tan bajos como del 1 % al 0,01 % de la muestra. En otras palabras, una molécula de ácido nucleico de baja abundancia con una o más inserciones, deleciones, translocaciones, mutaciones de bases de nucleótidos y/o bases de nucleótidos dañadas puede distinguirse de un exceso de 100 a 10.000 veces de moléculas de ácido nucleico en la muestra que tienen una secuencia de nucleótidos similar a las moléculas de ácido nucleico de baja abundancia, pero sin la muestra de ácido nucleico total con inserciones, deleciones,  
50 translocaciones, mutaciones de una o más bases de nucleótidos y/o bases dañadas usando los métodos de la presente invención. En algunas realizaciones de la presente invención, el número de copias de una o más secuencias de nucleótidos diana de baja abundancia se cuantificó en relación con el número de copias de un exceso de moléculas de ácido nucleico en la muestra que tienen una secuencia de nucleótidos similar a la de las moléculas de ácido nucleico de baja abundancia. En otra realización de la presente invención, la una o más secuencias de  
55 nucleótidos diana se cuantifican en relación con otras secuencias de nucleótidos en la muestra. En otras realizaciones de la presente invención, se cuantificó el número de copias relativo de una o más secuencias de nucleótidos diana.

Las moléculas de ácido nucleico diana de baja abundancia que se han de detectar pueden estar presentes en cualquier muestra biológica, incluyendo, sin limitación, tejido, células, suero, sangre, plasma, líquido amniótico, esputo, orina, fluidos corporales, secreciones corporales, excreciones corporales, ácidos nucleicos circulantes libres de células, ácidos nucleicos fetales libres de células circulantes en la mujer embarazada, células tumorales circulantes, tumor, biopsia de tumor y exosomas.

65 Con respecto a la detección temprana del cáncer, como se describe en el Ejemplo Profético en el presente documento, los métodos de la presente invención son adecuados para detectar tanto mutaciones de repetición en

genes conocidos (por ejemplo, Braf, K-ras) como las mutaciones poco comunes en los genes conocidos (por ejemplo, p53) cuando están presentes en del 1 % al 0,01 % de la muestra. Los métodos de la presente invención también pueden conseguir la cuantificación precisa de ARNm específico de tumor aislado de exosomas (por ejemplo, una docena de marcadores de expresión que diferencian el tejido de tumor de colon de la mucosa normal correspondiente) y ARNip específico de tumor aislado de exosomas o proteínas Argonaut (por ejemplo, una docena de marcadores de microARN que diferencian el tejido de tumor de colon de la mucosa normal correspondiente). Los métodos de la presente invención también ofrecen la cuantificación precisa de cambios de copias específicos de tumor en ADN aislado de células tumorales circulantes (por ejemplo, una docena de cambios de copias que diferencian el tejido de tumor de colon de la mucosa normal correspondiente) y la detección de mutaciones en ADN aislado de células tumorales circulantes (por ejemplo, genes K-ras, B-Raf, AKT, p53, BRCA1).

La presente invención también es capaz de cuantificar con precisión (i) ARNm específico de tumor aislado de exosomas o células tumorales circulantes, (ii) ARNip específico de tumor aislado de exosomas o proteínas Argonaut y (iii) cambios de copias específicos de tumor en el ADN aislado de células tumorales circulantes que pueden predecir el resultado o guiar el tratamiento. La presente invención también puede detectar mutaciones en ADN aislado de las células tumorales circulantes, por ejemplo, K-ras, B-raf, AKT, p53, BRCA1 u otros genes, que predicen el resultado o guían el tratamiento.

Con respecto a los diagnósticos prenatales, los métodos de la presente invención son capaces de detectar la aneuploidía a través del recuento del número de copias (por ejemplo, la trisomía del 21), enfermedades hereditarias que contienen mutaciones comunes en genes conocidos (por ejemplo, la anemia de células falciformes, la fibrosis quística), enfermedades hereditarias que contiene mutaciones poco comunes en genes conocidos (por ejemplo la poliposis adenomatosa familiar), enfermedades hereditarias que surgen de la pérdida o la ganancia conocidas o esporádicas de un número de copias en un gen conocido (por ejemplo, la distrofia muscular de Duchenne) y ensayos de paternidad.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un kit para identificar la presencia de una o más secuencias de nucleótidos diana en una muestra. El kit contiene una enzima que tiene actividad nucleasa 5', una ligasa y uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos. Los conjuntos de sondas de oligonucleótidos tienen cada uno (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la diana y (b) una segunda sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la diana, donde las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas se configuran para que se hibriden adyacentes entre sí en la secuencia de nucleótidos diana con una unión entre las sondas de oligonucleótidos primera y segunda y donde, en un conjunto de sondas, la porción específica de la diana de la segunda sonda de oligonucleótidos tiene un nucleótido idéntico de solapamiento en la unión con la primera sonda de oligonucleótidos.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un kit para identificar la presencia de una o más secuencias de nucleótidos diana en una muestra. Este kit contiene una enzima que tiene actividad nucleasa 5', una ligasa y uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos. Los conjuntos de sondas de oligonucleótidos tienen cada uno (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la diana y (b) una segunda sonda de oligonucleótidos que tiene una porción de aleta 5' no específica de la diana y una porción específica de la diana que contiene una o más bases de nucleótidos modificadas con tiofosfato, donde las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas se configuran para que se hibriden en la secuencia de nucleótidos diana.

#### **Ejemplos proféticos**

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar realizaciones proféticas de la presente invención, pero no tienen por objeto de ninguna manera limitar su alcance

#### **Ejemplo profético 1 - Detección de un marcador de mutación de alta sensibilidad (presente del 1 % al 0,01 %); mutaciones de repetición en genes conocidos**

Los cambios mutacionales en oncogenes están por lo general en regiones o posiciones aisladas y pueden con frecuencia impulsar la progresión tumoral. Una lista de estos genes y sus mutaciones puede encontrarse en bases de datos públicas tales como la base de datos "COSMIC" del Centro del Genoma Sanger. La presencia de dichas mutaciones en el suero es un indicador fuerte de algún tejido tumoral en el cuerpo. Tradicionalmente dichas mutaciones se han identificado usando amplificación por PCR específica de alelo. Este enfoque es susceptible de una amplificación falsa inicial, seguida de la amplificación del producto falso. Otros han utilizado PCR digital para tratar de cuantificar el ADN mutante en el suero.

**Visión de conjunto del enfoque:** Este enfoque depende de la fidelidad de dos enzimas: (i) la nucleasa polimerasa 5' → 3' o la enzima de escisión de aleta en la discriminación de un apareamiento de un desapareamiento en el lado 5' del cebador corriente abajo, y (ii) la ligasa en la discriminación de un apareamiento de un desapareamiento en el lado 3' de la sonda corriente arriba. Ésta última se potencia adicionalmente mediante el uso de un desapareamiento intencional o análogo de nucleótido en la 2ª o 3ª base desde el extremo 3' que desestabiliza ligeramente la hibridación del extremo 3' si se aparean perfectamente en el extremo 3', pero desestabiliza significativamente la

hibridación del extremo 3' si se desaparea en el extremo 3'. Por último, los enfoques cinéticos, tales como la alteración de los tiempos y las condiciones del ciclado pueden potenciar la discriminación entre el molde de tipo silvestre y mutante. Una vez que ha tenido lugar un acontecimiento de ligadura, estos productos se amplificarán en una etapa de amplificación por PCR posterior y, por tanto, ésta es la etapa discriminatoria clave.

5 El caso más difícil es para las mutaciones de K-ras, donde seis cambios en el codón 12 y un cambio en el codón 13 están espaciados entre sí. En general, para la más alta fidelidad, el desapareamiento entre el cebador mutante y la secuencia de tipo silvestre debería ser al menos C:A para la última base, no G:T. Por tanto, es necesario ejecutar cebadores de cadena tanto superiores como inferiores o dos tubos de ligadura iniciales por reacción de cualquier manera. Sin embargo, puede proporcionarse la misma secuencia UniTaq u otra porción detectable (zip-code, marcador detectable) a más de una mutación, puesto que el objetivo es encontrar una mutación y no necesariamente distinguir mutaciones diferentes entre sí.

15 El segundo problema es que la fidelidad más alta para la ligadura se consigue si la base en la penúltima posición es un desapareamiento ya sea C:A o G:T. Esto puede reducir los rendimientos, pero mejora la fidelidad.

20 Un tercer problema es incluir también una sonda corriente arriba opcional para la secuencia de tipo silvestre, que tiene un desapareamiento en la tercera posición desde el lado 3'. Sin embargo, la región corriente arriba carecerá de la región cebadora UniTaq y Universal y, por tanto, no permitirá ninguna amplificación. Adicionalmente, haciendo un desapareamiento en la tercera posición, la sonda de LDR mutante se desaparecerá ahora en las últimas 3 posiciones en el lado 3' y, en consecuencia, no puede amplificar por PCR accidentalmente el producto de la ligadura por LDR normal residual. La sonda corriente abajo de la secuencia de tipo silvestre contendrá la base de tipo silvestre en la base crítica. Este cebador también carecerá de la región cebadora UniTaq y Universal y, por tanto, no permitirá ninguna amplificación.

25 Puesto que los diferentes cebadores competirán entre sí en la unión de la secuencia mutante (poco frecuente), es importante permitir que toda la sonda se hibride con la secuencia correcta. Habrá 4 sondas corriente arriba y 4 sondas corriente abajo para las mutaciones de la 1ª posición del codón 12 de K-ras, proporcionando 16 combinaciones diferentes posibles. El objetivo es evitar la ligadura falsa/señal falsa de la sonda mutante a la secuencia normal (por tanto, la sonda normal que carece de colas de cebadores UniTaq y Universal no se amplificarán), pero también se producen ligaduras correctas en presencia de la secuencia mutante. Por tanto, puede incorporarse el "mini-ciclado" donde se hace oscilar la temperatura entre 60 °C para la ligadura (10 minutos) y 75 °C (1 minuto) de modo que las sondas no ligadas pero no los productos ligados se caigan del molde.

35 Para resumir los niveles de discriminación del enfoque anterior usando dos sondas para la detección de cada mutación:

1. Uso de la actividad nucleasa 5'-3' de la polimerasa o la nucleasa Fen en la sonda corriente abajo.
2. Uso de fidelidad de ligadura 3' de la ligasa termoestable en la sonda corriente arriba.
3. Uso de desapareamiento o análogo de nucleótido en la 2ª o 3ª base desde el extremo 3' de la sonda corriente arriba.
4. Uso de la sonda con la secuencia de tipo silvestre para suprimir la ligadura de la sonda mutante en ADN de tipo silvestre.
- 45 5. Uso de condiciones de mini-ciclado para mejorar los rendimientos del producto cuando la mutación está presente.
6. Uso de secuencias en el extremo 5' de la sonda de oligonucleótidos corriente abajo, de manera que cuando no se escinden, forman horquillas a una temperatura inferior y se prolongan sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican.

50 Un enfoque alternativo (véase a continuación), usando cebadores corriente arriba y corriente abajo apareados enlazados o acoplados, también es posible. En este caso, la base discriminadora es la misma base en el extremo 3' y el extremo 5', o la última base antes de la escisión de una aleta en el extremo 5'. Las condiciones de ciclado pueden variarse para determinar el tiempo óptimo para la (i) escisión eficiente de la nucleasa polimerasa 5' → 3' liberando un fosfato 5' cuando la sonda corriente abajo para una mutación particular tiene una hibridación apareada perfecta, seguida de (ii) la ligadura al extremo 3' de la sonda corriente arriba, de nuevo a condición de que haya una combinación perfecta a la base de mutación. Al mismo tiempo, la escisión de la nucleasa polimerasa 5' → 3' de la sonda corriente abajo si hay una base incorrecta (es decir, un desapareamiento), seguida de la ligasa ligando incorrectamente una sonda corriente arriba (también con un desapareamiento) puede minimizarse reduciendo el tiempo permitido para que ambas reacciones se produzcan antes de que se eleve la temperatura para desnaturalizar la sonda del molde incorrecto.

65 Existen dos variaciones de sondas acopladas que se han de considerar. En la primera variación, (que se muestra en la Figura 8), los cebadores acoplados se diseñan para (i) que contengan una secuencia que bloquee la replicación de la polimerasa alrededor del producto ligado y (ii) las sondas acopladas no ligadas forman horquillas a una temperatura inferior y se prolongan sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican.

Para resumir los niveles de discriminación de la primera variación usando una sonda de oligonucleótidos acoplada para la detección de cada mutación:

- 5 1. Uso de la actividad nucleasa 5'-3' de la polimerasa o nucleasa Fen en la porción de sonda corriente abajo.
2. Uso de la fidelidad de ligadura 3' de la ligasa termoestable en la porción de sonda corriente arriba.
3. Uso de desapareamiento o análogo de nucleótido en la 2ª o 3ª base desde el extremo 3' de la porción de sonda corriente arriba.
4. Uso de condiciones de ciclación para mejorar la especificidad de generación de producto de la ligadura solo cuando la mutación está presente.
- 10 5. Uso de concentraciones de sonda inferiores para minimizar los acontecimientos independientes de la diana.
6. Uso de secuencias en la sonda acoplada, de manera que cuando no se ligan, forman horquillas a una temperatura inferior y se prolongan sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican.

15 En una segunda variación, las sondas acopladas se diseñan para contener una secuencia (por ejemplo, tracto dU que es diana de UNG) que puede escindir después de la etapa de ligadura como se muestra en la Figura 7. Antes de esa escisión, los cebadores acoplados no ligados (así como el ADN molde de entrada) se eliminan por digestión con exonucleasa.

20 Para resumir, los niveles de discriminación de la primera variación usando cebadores acoplados para la detección de cada mutación:

- 25 1. Uso de la actividad nucleasa 5'-3' de la polimerasa o nucleasa Fen en la porción de sonda corriente abajo.
2. Uso de la fidelidad de ligadura 3' de la ligasa termoestable en la porción de sonda corriente arriba.
3. Uso de desapareamiento o análogo de nucleótido en la 2ª o 3ª base desde el extremo 3' de la porción de sonda corriente arriba.
4. Uso de condiciones de ciclación para mejorar la especificidad de generación de producto de la ligadura solo cuando la mutación está presente.
5. Uso de concentraciones de cebador inferiores para minimizar los acontecimientos independientes de la diana.
- 30 6. Uso de exonucleasas para destruir las sondas y la diana no ligadas.

35 Como control para la cantidad total de ADN presente, puede elegirse una región diana en las inmediaciones. El oligonucleótido corriente arriba que se liga a la de corriente abajo es una mezcla de dos oligonucleótidos: (i) un oligonucleótido presente a 1 en 100 con la secuencia específica UniTaq correcta y (ii) un oligonucleótido presente a 99 en 100 con una secuencia que tiene aproximadamente 8-10 bases complementarias a su extremo 3'. El producto de la ligadura que contiene la secuencias UniTaq amplifica y proporcionará una señal equivalente a 1 en 100 del molde original. La mayor parte del producto de la ligadura carece de la secuencia universal en el extremo 5' y no amplifica exponencialmente. El cebador corriente arriba no ligado formará una horquilla sobre sí mismo y prolonga su propia secuencia 3' sobre sí misma, sacándola de la contención para convertirse en parte de otro amplicón de PCR.

40 Como control para la cantidad total de ADN presente, este enfoque también puede usarse con sondas acopladas, de nuevo en una región diana cercana. Se usa una mezcla de dos oligonucleótidos: (i) un oligonucleótido presente a 1 en 100 con la secuencia UniTaq correcta y/u otra secuencia marcadora y (ii) un oligonucleótido presente a 99 en 100 con una secuencia que o bien carece de o tiene secuencias marcadoras incorrectas. El producto de la ligadura que contiene las secuencias UniTaq y/o marcadoras amplifica y proporcionará una señal equivalente a 1 en 100 del molde original. La mayor parte del producto de la ligadura ya sea carece o tiene secuencias marcadoras incorrectos y no se amplifica exponencialmente.

50 **Protocolo detallado: Detección altamente sensible de un marcador de mutación (cuando está presente del 1 % al 0,01 %), mutaciones de repetición en genes conocidos (véase la Figura 6)**

55 Etapa 1: Desnaturalizar ADN genómico de suero (94 °C 1 minuto) en presencia de primeras sondas de oligonucleótidos ("sondas corriente arriba" que contienen 5' Cebador Universal U1, seguido de UniTaq Ai, seguido de la secuencia específica de la diana con un desapareamiento C:A o G:T en la penúltima base y la base de mutación en el extremo 3'), segundas sondas de oligonucleótidos ("sondas corriente abajo" que contienen un extremo 5' de saliente adicional de 20 bases, donde 8-10 bases son complementarias al extremo 3' de la secuencia Cebador Univ. U2', seguido de la secuencia específica de la diana - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'), polimerasa Taq y ligasa termoestable (preferentemente de la cepa AK16D). Realizar una o más reacciones de detección de ligadura, donde la temperatura de hibridación se cicla una o más veces entre 60 °C para la ligadura (10 minutos) y 75 °C (1 minuto). Esto permitirá que se produzcan acontecimientos de ligadura si el ADN mutante está presente.

65 Etapa 2: Añadir Cebador Universal U1 de dNTP de arranque en caliente, Cebador Universal U2. Incubar a 55 °C (activa los dNTP) para permitir que las sondas de corriente abajo no ligadas se auto-horquillen a las 8-10 bases que son complementarias al extremo 3', que se prolonga para crear horquillas más largas que hacen que estas sondas corriente abajo sean refractarias a la amplificación adicional. Después, permitir que transcurra la amplificación por PCR durante 8-20 ciclos. Idealmente, las colas de cebadores universales U1 y U2 en las sondas de compuesto de



LDR son ligeramente más cortas que los cebadores universales U1 y U2. Esto permite la amplificación universal inicial a una temperatura de ciclo inferior (es decir, hibridación a 55 °C) seguida de una temperatura de ciclo mayor (es decir, hibridación a 65 °C) de manera que los cebadores universales U1 y U2 se unan preferencialmente al producto deseado (en comparación con sondas de LDR compuestas que se unen a productos incorrectos).

5 Adicionalmente los cebadores universales U1 y U2, contienen una secuencia corta en común (es decir, de 6-10 bases) para evitar la formación de dímeros de cebador. Estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:

Cebador Univ. U1 - UniTaq Ai - Diana Corriente Arriba – Mutación – Diana Corriente Abajo- UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

10 Etapa 3: Abrir el tubo, diluir de 10 a 100 veces y distribuir alícuotas a pocillos TaqMan, conteniendo cada pocillo los siguientes cebadores: Cebador Universal U2 y cebadores específicos de UniTaq del formato F1 - UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai. (donde F1 es un colorante fluorescente que se inactiva mediante el Inactivador Q). En estas condiciones, se formará el siguiente producto:

15 F1 - UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai - Diana Corriente Arriba - Mutación – Diana Corriente Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

20 Esto se horquillará, de manera que la secuencia UniTaq Bi se empareja con la secuencia UniTaq Bi'. Cuando el Cebador Universal U2 se une a la secuencia de Cebador Univ. U2', la actividad exonucleasa 5' → 3' de la polimerasa digiere la secuencia UniTaq Bi, liberando el colorante F1 fluorescente.

25 Puede realizarse una detección de la mutación altamente sensible usando matriz de Zipcode, Taqman de Zipcode o detección Taqman tradicional como se ha descrito anteriormente. Brevemente, este enfoque usaría primeras sondas de oligonucleótidos corriente arriba (Cebador Universal U1 5', seguido de Zipcode Zi, seguido de una secuencia específica de la diana con un desapareamiento C:A o G:T en la penúltima base y la base mutación en el extremo 3') y segundas sondas de oligonucleótidos corriente abajo (en posición 5' del saliente adicional de 20 bases, donde 8-10 bases son complementarias al extremo 3' de la secuencia del Cebador Univ. U2', seguido de la secuencia específica de la diana - Cebador Univ. U2'). Después de la amplificación universal por PCR, estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:

Cebador Univ. U1 - Zipcode Zi - Diana Corriente Arriba - Mutación - Diana Corriente Abajo - Cebador Univ. U2'

35 Para la detección utilizando matrices universales que contienen oligonucleótidos de captura, el Cebador Univ. U2 contendría un marcador indicador, es decir, un grupo fluorescente, mientras que el Cebador Univ. U1 contendría un fosfato 5', y la amplificación continuaría durante un total de aproximadamente 30 a 40 ciclos. Esto permitiría el uso de exonucleasa lambda para digerir la segunda cadena, convirtiendo el producto marcado con fluorescencia en monocatenario y adecuado para la hibridación en una matriz (zipcode) universal que contiene oligonucleótidos de captura.

40 En un enfoque alternativo, la detección de mutaciones altamente sensible puede realizarse usando secuencias de Zipcode dividido. Este enfoque usaría primeras sondas de oligonucleótidos corriente arriba (Cebador Universal U1 5', una primera secuencia de medio zipcode Ai y una secuencia corta Ci, seguida de la secuencia específica de la diana con un desapareamiento C:A o G:T en la penúltima base, y la base de mutación en el extremo 3'), y segundas sondas de oligonucleótidos corriente abajo (en posición 5' del saliente adicional de 20 bases, donde 8-10 bases son complementarias al extremo 3' de la secuencia del Cebador Univ. U2', seguidas de la secuencia específica de la diana - el complemento de la secuencia corta Ci', una segunda secuencia de medio zipcode Ai - Cebador Univ. U2'). Después de la amplificación universal por PCR, estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:

50 Cebador Univ. U1 - 1º ½ Zipcode Zi - Ci Corta - Diana Corriente Arriba - Mutación - Diana Corriente Abajo - Ci' Corta - 2º ½ Zipcode Zi - Cebador Univ. U2'

55 cuando la Ci Corta se hibrida de forma transitoria con la Ci' Corta, la 1º secuencia de ½ Zipcode Zi se acerca a la 2º secuencia de ½ Zipcode Zi, y la hibridación transitoria puede estabilizarse cuando se hibridan ambas secuencias de medio Zipcode Zi con la secuencia Zipcode de longitud completa Zi' en una matriz de zipcode.

Además, las construcciones anteriores pueden incluir una secuencia única (que varía de 0 a 10 bases) interna a los cebadores Universales (Ai Único, Bi Único), representada como se indica a continuación.

60 Cebador Univ. U1 - Ai Único - 1º ½ Zipcode Zi - Ci Corta - Diana Corriente Arriba - Mutación - Diana Corriente Abajo - Ci' Corta - 2º ½ Zipcode Zi - Bi Único - Cebador Univ. U2'

65 Para la detección usando ensayos Taqman de Zipcode, después de los 8-20 ciclos de amplificación universal, la muestra se diluiría de 10 a 100 veces y se añadirían cebadores únicos que se superponen con la secuencia Ai Único Bi Único para cada producto. La sonda Taqman sería la de la secuencia zipcode de longitud completa.

Puesto que cada secuencia de unión entre las secuencias diana es única, los productos de la amplificación universal inicial también pueden identificarse y cuantificarse usando secuenciación de nueva generación. (La secuenciación puede identificar la ligadura independiente de la diana de fragmentos incorrectos, pero no la ligadura errónea de la sonda de ligadura mutante en la diana normal. Sin embargo, el uso de la sonda de ligadura corriente arriba no amplificadora para la secuencia de tipo silvestre debería minimizar significativamente dichas ligaduras incorrectas).

Un enfoque alternativo a este problema es renunciar al uso de sondas para la secuencia de tipo silvestre, y usar en su lugar sondas de ligadura que se acoplan entre sí a través de sus extremos no de ligadura. Esto permite el uso de menores concentraciones de cebadores. Adicionalmente, proporciona una manera simple para evitar que los cebadores no ligados tanto corriente arriba como corriente abajo experimenten reacciones de post-ligadura.

**Protocolo detallado para detección altamente sensible de un marcador de mutación (cuando está presente del 1 % al 0,01 %), mutaciones de repetición en genes conocidos usando sondas acopladas (véase la Figura 8):**

Etapa 1: Desnaturalizar ADN genómico de suero (94 °C 1 minuto) en presencia de sondas de oligonucleótidos acopladas, que comprende porciones de cebadores de LDR corriente arriba (Cebador Univ. U1 5' - UniTaq Ai, seguido de la secuencia específica de la diana con un desapareamiento C:A o G:T en la penúltima base y la base de mutación en el extremo 3'), acoplados a las porciones de cebadores de LDR corriente abajo apareadas (misma base de mutación o aleta 5' que contienen misma base de mutación seguida de la secuencia específica de la diana - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2' - y secuencia específica de la diana de 8-10 bases complementaria al extremo libre 3' de la porción de secuencia del cebador corriente arriba), polimerasa Taq y ligasa termoestable (preferentemente de la cepa AK16D). En esta variación, la sonda acoplada puede contener bases adicionales o simplemente espaciador, pero debería contener una región a través de la cual la polimerasa no copie. Realizar una o más reacciones de ligadura que se hayan optimizado para una escisión/ligadura por polimerasa de apareamiento perfecto en comparación con la escisión/ligadura por polimerasa de desapareamiento. Esto permitirá que los acontecimientos de ligadura se produzcan si el ADN mutante está presente.

Etapa 2: Añadir Cebador Universal U1 dNTP de arranque en caliente y Cebador Universal U2. Incubar a 55 °C (activa los dNTP) para permitir que las sondas acopladas no ligadas se auto-horquillen a los 8-10 bases que son complementarias al extremo 3', que se prolonga para crear horquillas más largas que convierten estos cebadores acoplados en refractarios a la amplificación adicional. Después, permitir que transcurra la amplificación por PCR durante 8-20 ciclos. Idealmente, las colas de cebadores universales U1 y U2 en los cebadores de unión son ligeramente más cortos que los cebadores universales U1 y U2. Adicionalmente, los cebadores universales U1 y U2 contienen una secuencia corta en común (es decir, 6-10 bases) para evitar la formación de dímeros de cebador. En una variación opcional para minimizar amplificaciones independientes de la diana, los cebadores de PCR de unión contienen una base uracilo y un extremo bloqueado 3', que es liberado por una ARNasa H que escinde la base uracilo cuando el cebador se hibrida con su diana. Estas condiciones generan productos de amplificación universales de la secuencia:

Cebador Univ. U1 - UniTaq Ai - Diana Corriente Arriba - Mutación - Diana Corriente Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

Etapa 3: Abrir el tubo, diluir de 10 a 100 veces y distribuir alícuotas a pocillos Taqman, conteniendo cada pocillo los siguientes cebadores: Cebador Universal U2 y cebadores UniTaq específicos del formato F1 - UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai (donde F1 es un colorante fluorescente que se inactiva mediante el Inactivador Q). En estas condiciones, se formarán los siguientes productos de prolongación secundarios:

F1 - UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai - Diana Corriente Arriba - Mutación - Diana Corriente Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

Esto se horquillará, de manera que la secuencia UniTaq Bi se empareja con la secuencia UniTaq Bi'. Cuando el Cebador Universal U2 se une a la secuencia de Cebador Univ. U2', la actividad exonucleasa 5' → 3' de la polimerasa digiere la secuencia UniTaq Bi, liberando el colorante F1 fluorescente.

En una variación de lo anterior, las porciones de cebadores de LDR corriente abajo apareadas, es decir, la misma base de mutación o aleta 5' que contiene la misma base de mutación seguida de la secuencia específica de la diana - UniTaq Bi' - no incluyen 8-10 bases de la secuencia específica de la diana complementaria al extremo libre 3' de la porción de secuencia de cebador corriente arriba. En lugar de ello, la sonda acoplada contiene una secuencia interna que no inhibe la digestión con exonucleasa, pero que puede escindirse después de una etapa de digestión con exonucleasa y antes de una etapa de amplificación con polimerasa. Un ejemplo de dicha secuencia es el uso de una base uracilo, que pueden escindirse posteriormente con uracilo ADN glucosilasa. En este ejemplo, después de la etapa de ligadura, se añaden tanto exonucleasa I como exonucleasa III para digerir todas las sondas acopladas no ligadas, así como todo el ADN diana de entrada. Después de destruir por calor las exonucleasas, se añade uracilo ADN glucosilasa para linealizar las sondas ligadas para la posterior amplificación por PCR.

En ambas de las variaciones anteriores, las sondas acopladas pueden sintetizarse sin una o ambas secuencias Cebador Univ. U1 y/o Cebador Univ. U2', o porciones de las mismas, requiriendo de este modo la necesidad de uno o dos cebadores de unión (Cebador Universal U1 - UniTaq Ai y Cebador Universal U2 - UniTaq Bi) durante la etapa de amplificación por PCR universal.

5 Un resumen de los posibles diseños de cebadores para detectar mutaciones, inserciones y deleciones se muestra en la Figura 2. Para mutaciones de una sola base, la base "Z" en la 2ª o 3ª posición (no se muestra) desde el extremo 3' representa: dG, dA, inosina, nitroindol, nitropirrol u otro análogo de nucleótido, y mediante la desestabilización del extremo 3' reducirá las ligaduras erróneas inapropiadas cuando las sondas mutantes se hibridan con la diana de tipo silvestre (Figura 2A). Para las inserciones o deleciones, el uso de una base o nucleótido análogo apareado en la 2ª o 3ª posición que mejora la estabilidad (tal como 2-amino-dA o 5-propinil-dC) puede mejorar la discriminación de dichas mutaciones de desplazamiento del marco de lectura de las secuencias de tipo silvestre. Para las inserciones, el uso de uno o más grupos tiofosfato corriente abajo del enlace fosfato escindible deseado de la sonda corriente abajo evitará la escisión inapropiada por la actividad exonucleasa 5'-3' de la polimerasa cuando las sondas se hibridan con ADN de tipo silvestre, y de este modo se reduce la ligadura positiva falsa en la diana de tipo silvestre (Figura 2B). Análogamente, para las deleciones, el uso de uno o más grupos tiofosfato corriente arriba del enlace fosfato escindible deseado de la sonda corriente abajo evitará la escisión inapropiada por la actividad exonucleasa 5'-3' de la polimerasa cuando las sondas se hibridan con ADN de tipo silvestre, y de este modo se reduce la ligadura positiva falsa en la diana de tipo silvestre (Figura 2C). Los marcadores de las sondas corriente arriba y corriente abajo también pueden acoplarse a través de sus extremos no ligantes, como se muestra en la Figura 8.

**Marcaje fluorescente:** Considere un instrumento que pueda detectar 5 señales fluorescentes, F1, F2, F3, F4 y F5 respectivamente. Como un ejemplo, en el caso del cáncer de colon, se descubrirán las mutaciones de frecuencia más alta para K-ras, p53, APC y BRAF. Pudieron detectarse mutaciones en estos cuatro genes con una sola señal fluorescente; F1, F2, F3, F4. Si la escala es de 1000 UF, entonces el cebador se añadiría usando relaciones de cebadores UniTaq marcados y no marcados, de manera que la amplificación de productos de LDR en la diana mutante de estos genes produce aproximadamente 300 UF en la meseta. Para los controles, la F5 se calibraría para proporcionar una señal de 100 UF para el control de la cuantificación de la dilución 1:1000, y 300 UF adicionales para la ligadura de la sonda mutante en el control de tipo silvestre (no debería proporcionar ninguna señal de fondo o baja).

Para los otros genes habitualmente mutados en el cáncer de colon, como se muestra a continuación, (o mutaciones de abundancia incluso más baja en el gen p53), puede usarse el siguiente sistema de codificación: Dos señales fluorescentes en cantidad equimolar en el extremo 5' de la misma UniTaq, con cebador no marcado titulado, de manera que ambas señales fluorescentes se estabilizan a 100 UF. Si las señales fluorescentes son F1, F2, F3, F4, entonces eso proporciona la capacidad para detectar mutaciones en 4 genes usando una sola señal fluorescente y en mutaciones en 6 genes usando combinaciones de señal fluorescente:

Gen 1 = F1 (300 UF)	(p53, Puntos Calientes)
Gen 2 = F2 (300 UF)	(KRAS)
Gen 3 = F3 (300 UF)	(APC)
Gen 4 = F4 (300 UF)	(BRAF)
Gen 5 = F1 (100 UF), F2 (100 UF)	(PIK3CA)
Gen 6 = F1 (100 UF), F3 (100 UF)	(FBXW7)
Gen 7 = F1 (100 UF), F4 (100 UF)	(SMAD4)
Gen 8 = F2 (100 UF), F3 (100 UF)	(p53, adicional)
Gen 9 = F2 (100 UF), F4 (100 UF)	(CTNNB1)
Gen 10 = F3 (100 UF), F4 (100 UF)	(NRAS)

40 Suponga que hay una segunda mutación, combinada con una mutación en uno de los genes superiores. Esto es fácil de distinguir, puesto que el gen superior siempre proporcionará más señal, independiente de si se solapa con las otras señales fluorescentes o no. Por ejemplo, si la señal fluorescente es F1 100 UF y F2 400 UF, eso correspondería a mutaciones en el Gen 2 y el Gen 5.

45 Si hay dos mutaciones de los genes menos habitualmente mutados (Gen 5 - Gen 10), entonces los resultados aparecerán ya sea como un solapamiento en las señales fluorescentes, es decir, F1 200 UF, F2 100 UF, F4 100 UF o las 4 señales fluorescentes. Si las señales fluorescentes están en la relación de 2:1:1, entonces es bastante sencillo entender las 2 mutaciones: en el ejemplo anterior, F1 200 UF, F2 100 UF, F4 100 UF, corresponderían a mutaciones en el Gen 5 y el Gen 7.

50 Para todas las 4 señales fluorescentes, es muy poco probable que la concentración de las mutaciones sea exactamente idéntica, es decir las 4 señales fluorescentes comenzarán a aparecer al mismo tiempo o producirán el mismo Ct. Si dos señales fluorescentes están unidas entre sí en términos de la detección de la mutación, entonces

su cinética debería ser igual. Por ejemplo, si F1 100 UF y F2 100 UF tuvieran un Ct de 31 y F3 100 UF y F4 100 UF tuvieran un Ct de 31,8, entonces ese patrón correspondería a mutaciones en el Gen 5 y el Gen 10.

5 Por último, la aparición de 3 o 4 señales fluorescentes indica que al menos dos genes contienen mutaciones, lo que indica que es muy probable que el ADNc refleje pruebas de un tumor o cáncer, independientemente de la naturaleza de las mutaciones.

10 En un enfoque alternativo, puede realizarse una detección de mutaciones altamente sensible usando matriz de Zipcode, Taqman de Zipcode o detección Taqman tradicional. Este enfoque usaría primeras sondas de ligadura de oligonucleótidos corriente arriba (Zipcode Zi 5', seguido de una secuencia específica de la diana con un desapareamiento C:A o G:T en la penúltima base y la base de mutación en el extremo 3'), acopladas a las segundas sondas de ligadura de oligonucleótidos corriente abajo apareadas (misma base de mutación 5' seguida de secuencia específica de la diana - Cebador Univ. U2' - y secuencia específica de la diana de 8-10 bases complementaria al extremo libre 3' de la secuencia de cebador corriente arriba). Después de la amplificación por PCR universal, se forman los siguientes productos de amplificación:

Cebador Univ. U1 - Zipcode Zi - Diana Corriente Arriba - Mutación - Diana Corriente Abajo - Cebador Univ. U2'

20 Para la detección usando matrices (zipcode) universales que comprenden una colección de oligonucleótidos de captura, el Cebador Univ. U2 contendría un marcador indicador, es decir, un grupo fluorescente, mientras que el Cebador Univ. U1 contendría un fosfato 5' y la amplificación continuaría durante un total de aproximadamente 30 a 40 ciclos. Esto permitiría el uso de exonucleasa lambda para digerir la segunda cadena, convirtiendo el producto marcado con fluorescencia en monocatenario y adecuado para la hibridación en una matriz (zipcode) universal.

25 En un enfoque alternativo, puede realizarse la detección de mutaciones altamente sensible usando secuencias de Zipcode dividido. Este enfoque usaría primeras sondas de oligonucleótidos corriente arriba (Cebador Universal U1 5', una primera secuencia de medio zipcode Ai y una secuencia corta Ci, seguida de secuencia específica de la diana con un desapareamiento C:A o G:T en la penúltima base y la base de mutación en el extremo 3'), acopladas a las segundas sondas de oligonucleótidos corriente abajo apareadas (misma base de mutación 5' seguida de secuencia específica de la diana - el complemento de la secuencia corta Ci', una segunda secuencia de medio zipcode Ai - Cebador Univ. U2' - y secuencia específica de la diana de 8-10 bases complementaria al extremo libre 3' de la secuencia de cebador corriente arriba). Después de la amplificación por PCR universal, el producto de amplificación tendría la secuencia:

35 Cebador Univ. U1 - 1º ½ Zipcode Zi - Ci Corta - Diana Corriente Arriba - Mutación - Diana Corriente Abajo - Ci' Corta - 2º ½ Zipcode Zi - Cebador Univ. U2'

40 Cuando la Ci Corta se hibrida transitoriamente con la Ci' Corta, la 1º secuencia de ½ Zipcode Zi se aproxima al 2º ½ Zipcode Zi, y la hibridación transitoria puede estabilizarse cuando se hibridan ambas medias secuencias de Zipcode Zi con la secuencia Zipcode Zi' de longitud completa en una matriz de zipcode.

Además, las construcciones anteriores pueden incluir una secuencia única (que varía de 0 a 10 bases) interna a los cebadores Universales (Ai Único, Bi Único), representada como se indica a continuación.

45 Cebador Univ. U1 - Ai Único - 1º ½ Zipcode Zi - Ci Corta - Diana Corriente Arriba - Mutación - Diana Corriente Abajo - Ci' Corta - 2º ½ Zipcode Zi - Bi Único - Cebador Univ. U2'

50 Para la detección usando ensayos Taqman de Zipcode, después de los 8 - 20 ciclos de amplificación universal, la muestra se diluiría de 10 a 100 veces y se añadirían cebadores únicos que se superponen con la secuencia Ai Único Bi Único para cada producto. La sonda Taqman sería la de la secuencia zipcode de longitud completa.

**Ejemplo Profético 2 - Marcador de mutación de alta sensibilidad (presente del 1 % al 0,01 %); mutaciones poco frecuentes en genes conocidos**

55 Los cambios mutacionales en los genes supresores de tumores tales como p53 y APC son demasiado numerosos para abarcar el uso de enfoques de PCR específicos de alelo. Por tanto, el enfoque se ha desplazado a la secuenciación profunda a través de todos los exones de la proteína. Cuando la entrada de ADN es limitante, es importante conseguir la igualdad de amplificación de las diferentes regiones para asegurar la misma profundidad general de cobertura.

60 **Visión de conjunto del enfoque:** La idea es hacer una copia fiel de todos los exones que están presentes y hacer una amplificación idéntica limitada de todos antes de la secuenciación. Mientras que otros usan trucos como la PCR fría para enriquecer en fragmentos de tipo silvestre, un enfoque de este tipo es vulnerable a SNP en los genes de interés. Adicionalmente, es poco probable que dichos enfoques de enriquecimiento amplifiquen fragmentos de forma igualitaria, dejando la tarea de la secuenciación profunda de todos modos.

Para copiar todos los exones, una sonda de ligadura de corriente arriba se empareja con una sonda de ligadura corriente abajo que tiene aproximadamente de 100 a 160 pb corriente abajo, dependiendo de la calidad del ADN que se evalúa. Si el ADN es de suero, donde el tamaño promedio del ADN derivado de tumor es de aproximadamente 160 bases, se usa el amplicón de menor tamaño, con una estrategia de mosaico de superposición utilizada para tubos alternos.

El reto en este caso es evitar que la polimerasa prolongue el cebador corriente arriba de manera que destruya la sonda corriente abajo sin una etapa de ligadura. Esto se consigue mediante la incorporación de uniones tiofosfato en la 2ª y la 3ª posición desde el extremo fosfato 5', (que se liberará mediante la actividad nucleasa 5' → 3' de la polimerasa). Para minimizar el desplazamiento por la polimerasa de esas bases medida que prolonga una base como mucho (lo que haría imposible ligar a la sonda corriente abajo), las bases diana en la unión de ligadura serían preferentemente ricas en AT en el lado 3' y ricas en GC en el lado 5'.

Un enfoque alternativo es usar una sonda de ligadura corriente abajo que contenga un sitio apurínico (AP) en la posición adyacente al fosfato 5' deseado. Este fosfato 5' se libera usando un EndoIII termoestable (tal como Tma EndoIII). Esta enzima escinde sitios AP dejando un fosfato 5' cuando la sonda se une a la diana. La endonucleasa también escinde la sonda monocatenaria, pero con menor eficiencia y, por tanto, la sonda hibridada con el molde sería el sustrato preferido. Cuando se usa EndoIII termoestable, la polimerasa de PCR utilizada carecería de la actividad exonucleasa 5' → 3'.

**Protocolo detallado para la detección altamente sensible de un marcador de mutación (presente del 1 % al 0,01 %); mutaciones poco frecuentes en genes conocidos (Figura 14):**

Etapa 1: Desnaturalizar ADN genómico de suero (94 °C, 5 minutos para activar la polimerasa Taq de Arranque en Caliente) en presencia de una primera sonda de oligonucleótidos cadena arriba (Cebador Universal U1 5', seguido de una secuencia específica de la diana en el extremo 3'), una segunda sonda de oligonucleótidos corriente abajo (5' del saliente adicional de 20 bases, donde 8-10 bases son complementarias al extremo 3' de la secuencia Cebador Univ. U2', seguido de la secuencia específica de la diana -- Cebador Univ. U2'), polimerasa Taq de de Arranque en Caliente, dNTP y ligasa termoestable (preferentemente de la cepa AK16D). La sonda corriente abajo es más larga y tiene un valor de Tf superior a la de la sonda corriente arriba, de manera que cuando se enfría desde 94 °C se detiene a 70 °C para permitir que la sonda corriente abajo se hibride primero, después, cuando la reacción se enfría a 65 °C o 60 °C, permitiendo que la sonda corriente arriba se hibride y que la polimerasa haga una copia del ADN entre las dos sondas, se corta la cola 5' de la sonda corriente abajo y después la ligasa termoestable sella la mella. La sonda corriente abajo tiene uniones tiofosfato en la 2ª y la 3ª posición desde el extremo fosfato 5', (que se liberará mediante la actividad nucleasa 5' → 3' de la polimerasa) de manera que la polimerasa no digiere la sonda corriente abajo pero más bien se cae para permitir una etapa de ligadura.

Etapa 2: Añadir Cebador Universal U1, Cebador Universal U2. Incubar a 55 °C para permitir que la sonda corriente abajo no ligada se auto-horquille con las 8-10 bases que son complementarias al extremo 3', que se prolonga para crear horquillas más largas que convierten a estas sondas corriente abajo en refractarias a la amplificación adicional. Después, permitir que transcurra la amplificación por PCR durante 8-20 ciclos. Idealmente, las colas de cebador universal U1 y U2 en las sondas compuestas de ligadura son ligeramente más cortas que los cebadores universales U1 y U2. Esto permite la amplificación universal inicial a una temperatura de ciclo inferior (es decir, hibridación a 55 °C) seguida de una temperatura de ciclo mayor (es decir, hibridación a 65 °C) de manera que los cebadores universales U1 y U2 se unan, preferencialmente al producto deseado (en comparación con sondas de ligadura compuestas que se unen a productos incorrectos). Adicionalmente, los cebadores universales U1 y U2 contienen una secuencia corta en común (es decir, 6-10 bases) para evitar la formación de dímeros de cebador. Después, permitir que transcurra la amplificación durante 8-20 ciclos. Estas condiciones de PCR universales amplifican fragmentos de la secuencia:

Cebador Univ. U1 – Diana de aproximadamente 100-160 bases - (posiblemente contiene una mutación) -  
Cebador Univ. U2'

Etapa 3: La presencia de mutación en el gen después puede identificarse usando tecnología de secuenciación de nueva generación.

Cuando se trata con un bajo número de moléculas de ADN de entrada que contienen una mutación en presencia de un exceso de ADN de tipo silvestre, existe la probabilidad de error de la polimerasa. En consecuencia, será necesario confirmar la presencia de la mutación en ambas cadenas en múltiples lecturas.

Una etapa alternativa 1 usaría una polimerasa termoestable que carezca de la actividad exonucleasa 5' → 3' (que contiene preferentemente la actividad correctora de errores 3' → 5') en presencia de sondas de ligadura corriente arriba (Cebador Universal U1 5', seguido de una secuencia específica de la diana en el extremo 3', con uniones tiofosfato en las posiciones 1º y 2º del extremo 3' para evitar la digestión de la sonda cuando se usa la polimerasa con actividad correctora de pruebas 3' → 5'), sonda de ligadura corriente abajo (5' del saliente adicional de 20 bases, donde 8-10 bases son complementarias al extremo 3' de la secuencia del Cebador Univ. U2', un sitio apurínico,

seguido de una secuencia específica de la diana - Cebador Univ. U2'), dNTP, EndoIII termoestable (preferentemente Tma EndoIII) y ligasa termoestable (preferentemente de la cepa AK16D). La sonda corriente abajo es más larga y tiene un valor de Tf superior a la de la sonda corriente arriba, de manera que cuando se enfría desde 94 °C se detiene a 70 °C para permitir que la sonda corriente abajo se hibride primero y se corte con la EndoIII para liberar el extremo 5', después, cuando la reacción se enfría a 65 °C o 60 °C, permitiendo que la sonda corriente arriba se hibride y que la polimerasa haga una copia del ADN entre los dos cebadores, y después la ligasa termoestable sella la mella.

### Ejemplo Profético 3 - Cuantificación precisa de ARNm específico de tumor aislado de exosomas

En los últimos años, varios grupos han capturado exosomas específicos de tumores, que contienen ARNip y ARNm que es específico de la célula tumoral original. La cuantificación exacta de estos marcadores puede ayudar a identificar el cáncer a tiempo, así como proporcionar distintivos para predecir el resultado. Tradicionalmente, los niveles relativos de expresión de ARNm se determinan usando PCR en tiempo real de la transcripción inversa.

**Visión de conjunto del enfoque:** En este caso la idea es contar cuántas copias de ARNm de más o menos una docena de genes están presentes en la muestra. Una etapa de transcripción inversa inicial hace copias de ADN de todas las regiones deseadas de ARNm y después puede usarse uno o dos pares de sondas de ligadura por transcrito para cuantificar con precisión la cantidad de cada transcrito de interés.

El reto en este caso, de nuevo, es evitar que la polimerasa prolongue la sonda corriente arriba de manera que destruya la sonda corriente abajo sin una etapa de ligadura. Esto se consigue mediante la incorporación de uniones tiofosfato en la posición 2ª y 3ª desde el extremo fosfato 5', (que se liberará mediante la actividad nucleasa 5' → 3' de la polimerasa). Para minimizar el desplazamiento por la polimerasa de esas bases a medida que prolonga una base como mucho (lo que haría imposible ligar al cebador corriente abajo), las bases diana en la unión de ligadura serían preferentemente ricas en AT en el lado 3' y ricas en GC en el lado 5'.

A diferencia del caso de la identificación de mutaciones poco frecuentes, no hay necesidad de determinar ninguna información de la secuencia entre las dos sondas de ligadura. Por tanto, pueden diseñarse para que sean directamente adyacentes entre sí. En este enfoque alternativo, la segunda sonda de oligonucleótidos corriente abajo contiene un sitioapurínico (AP) en la posición adyacente al fosfato 5' deseado. Este fosfato 5' se libera usando una EndoIII termoestable (tal como Tma EndoIII). Esta enzima escinde sitios AP dejando un fosfato 5' cuando la sonda se une a la diana. La endonucleasa también escinde la sonda monocatenaria, pero con menor eficiencia y, por tanto, la sonda hibridada con el molde serían el sustrato preferido. Cuando se usa EndoIII termoestable para liberar el fosfato 5', no hay necesidad de añadir polimerasa termoestable en esta etapa, puesto que la ligasa puede sellar inmediatamente la mella en la unión.

Aunque este protocolo se escribe para la codificación de ARNm, también es igualmente válido para la cuantificación de ARN no codificante. Dicho ARN no codificante también puede estar presente en exosomas derivados de tumores.

### Protocolo detallado para la cuantificación de ARNm específico de tumor aislado de exosomas:

Etapa 1: Uso de transcriptasa inversa (TI), ya sea con cebadores específicos de genes o cebado dN-dT 10 no específico para generar copias de ADNc de extremos 3' de transcritos. Incubar a 37 °C durante 1 hora, después, destruir por calor la TI a 94 °C durante 5 minutos y simultáneamente activar la polimerasa Taq de Arranque en Caliente. La reacción también contiene primeras sondas de oligonucleótidos corriente arriba (Cebador Universal U1 5', seguido de UniTaq Ai, seguido de una secuencia específica de gen diana en el extremo 3'), segundas sondas de oligonucleótidos corriente abajo (5' del saliente adicional de 20 bases, donde 8-10 bases son complementarias al extremo 3' de la secuencia del Cebador Univ. U2', seguido de una secuencia específica de gen diana - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'), polimerasa Taq de Arranque en Caliente y ligasa termoestable (preferentemente de la cepa AK16D). La sonda corriente abajo tiene uniones tiofosfato en la 2ª y la 3ª posición desde el extremo fosfato 5', (que se liberará mediante la actividad nucleasa 5' → 3' de la polimerasa), de manera que la polimerasa no digiere la sonda corriente abajo, sino que más bien se cae para permitir una etapa de ligadura.

Etapa 2: Añadir Cebador Universal U1, Cebador Universal U2. Incubar a 55 °C para permitir que las sondas corriente abajo no ligadas se auto-horquillen con las 8-10 bases que son complementarias al extremo 3', que se prolonga para crear horquillas más largas que convierten estas sondas corriente abajo en refractarias a una amplificación adicional. Idealmente, las colas de cebador universal U1 y U2 en las sondas de ligadura compuestas son ligeramente más cortas que los cebadores universales U1 y U2. Esto permite la amplificación universal inicial, a una temperatura de ciclo inferior (es decir, hibridación a 55 °C) seguida de una temperatura de ciclo mayor (es decir, hibridación a 65 °C) de manera que los cebadores universales U1 y U2 se unan preferencialmente al producto deseado (en comparación con los cebadores de LDR compuestos que se unen a los productos incorrectos). Adicionalmente, los cebadores universales U1 y U2, contienen una secuencia corta en común (es decir, 6-10 bases) para evitar la formación de dímeros de cebador. Después, permitir que transcurra la amplificación durante 8-20 ciclos. Estas condiciones de amplificación universales amplifican productos de secuencia:

## ES 2 655 509 T3

Cebador Univ. U1 - UniTaq Ai - Región Diana del Gen - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

5 Etapa 3: Abrir el tubo, diluir de 10 a 100 veces y distribuir alícuotas a pocillos Taqman, conteniendo cada pocillo los siguientes cebadores: Cebador Universal U2 y cebadores específicos UniTaq del formato F1 - UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai (donde F1 es un colorante fluorescente que se inactiva mediante el Inactivador Q). En estas condiciones, se formará el siguiente producto:

F1 - UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai - Región Diana del Gen - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

10 Esto se horquillará, de manera que la secuencia UniTaq Bi se empareja con la secuencia UniTaq Bi'. Cuando el Cebador Universal U2 se une a la secuencia del Cebador Univ. U2', la actividad exonucleasa 5' → 3' de la polimerasa digiere la secuencia UniTaq Bi, liberando el colorante F1 fluorescente.

15 En un enfoque alternativo, la cuantificación precisa de ARNm específico de tumor puede realizarse usando matriz de Zipcode, Taqman de Zipcode o detección Taqman tradicional. Este enfoque usaría primeras sondas de oligonucleótidos corriente arriba (Cebador Universal U1 5', seguido de zipcode Zi, seguido de una secuencia específica de gen diana en el extremo 3') y segundas sondas de oligonucleótidos corriente abajo (5' del saliente adicional de 20 bases, donde 8-10 bases son complementarias al extremo 3' de la secuencia del Cebador Univ. U2', seguido de una secuencia específica de gen diana - Cebador Univ. U2'). Después de la amplificación por PCR universal, se forman productos de la siguiente secuencia:

Cebador Univ. U1 - Zipcode Zi - Región Diana del Gen - Cebador Univ. U2'

25 Para la detección usando matrices (zipcode) universales que contienen una colección de oligonucleótidos de captura, el Cebador Univ. U2 contendría un marcador indicador, es decir, un grupo fluorescente, mientras que el Cebador Univ. U1 contendría un fosfato 5' y la amplificación continuaría durante un total de aproximadamente 30 a 40 ciclos. Esto permitiría el uso de exonucleasa lambda para digerir la segunda cadena, convirtiendo el producto marcado con fluorescencia en monocatenario y adecuado para la hibridación en una matriz (zipcode) universal.

30 Además, las construcciones anteriores pueden incluir una secuencia única (que varía de 0 a 10 bases) interna a los cebadores Universales (Ai Único, Bi Único), para amplificar fragmentos de secuencia:

Cebador Univ. U1 - Ai Único - Zipcode Zi - Región Diana del Gen - Bi Único - Cebador Univ. U2'

35 Para la detección usando ensayos Taqman de Zipcode, después de los 8-20 ciclos de amplificación universal, la muestra se diluiría de 10 a 100 veces y se añadirían cebadores únicos que se superponen con la secuencia iA Único Bi Único para cada producto. La sonda TaqMan sería la de la secuencia zipcode.

40 En un enfoque alternativo, la cuantificación precisa de ARNm específico de tumor puede realizarse usando secuencias de zipcode dividido. Este enfoque usaría una primera sonda de oligonucleótidos corriente arriba (Cebador Universal U1 5', una primera secuencia de medio zipcode Ai y una secuencia corta Ci, seguido de una secuencia específica de gen diana en el extremo 3') y una segunda sonda de oligonucleótidos corriente abajo (5' del saliente adicional de 20 bases, donde 8-10 bases son complementarias al extremo 3' de la secuencia del Cebador Univ. U2', seguido de una secuencia específica de gen diana - el complemento de la secuencia corta Ci', una segunda secuencia de medio zipcode Ai - Cebador Univ. U2'). Después de la amplificación por PCR universal, estas condiciones amplifican fragmentos de secuencia:

50 Cebador Univ. U1 - 1º ½ Zipcode Zi - Ci Corta - Región Diana del Gen - Ci' Corta - 2º ½ Zipcode Zi - Cebador Univ. U2'

Cuando la Ci Corta se hibrida transitoriamente con Ci' Corta, la 1º secuencia de ½ Zipcode Zi se aproxima al 2º ½ Zipcode Zi y la hibridación transitoria puede estabilizarse cuando se hibridan ambas secuencias de medio Zipcode Zi con la secuencia Zipcode Zi' de longitud completa en una matriz de zipcode.

55 Además, las construcciones anteriores pueden incluir una secuencia única (que varía de 0 a 10 bases) interna a los cebadores Universales (Ai Único, Bi Único), representada como se indica a continuación.

60 Cebador Univ. U1 - Ai Único - 1º ½ Zipcode Zi - Ci Corta - Región Diana del Gen - Ci' Corta - 2º ½ Zipcode Zi - Bi Único - Cebador Univ. U2'

Para la detección usando ensayos Taqman de Zipcode, después de los 8-20 ciclos de amplificación universal, la muestra se diluiría de 10 a 100 veces y se añadirían cebadores únicos que se superponen con la secuencia de Ai Único Bi Único para cada producto. La sonda Taqman sería la de la secuencia zipcode de longitud completa.

65 Puesto que cada secuencia de unión entre las secuencias diana es única, los productos de la amplificación universal inicial también pueden identificarse y cuantificarse mediante secuenciación de nueva generación. En estas

condiciones, las sondas de LDR puede hibridarse directamente adyacentes entre sí, o, como alternativa, permitir que la polimerasa complete la secuencia entre los dos cebadores antes del corte del extremo 5' del cebador corriente abajo para liberar el fosfato 5'.

- 5 A los inventores les gustaría incluir genes constitutivos de "bajo nivel" como controles. Como alternativa, pueden compararse valores de Ct de genes que se predice que aumentan en expresión/número de copias de esos genes que se predice que disminuyen en expresión/número de copias.

10 Una alternativa a la Etapa 1 anterior usaría EndoIII termoestable (preferentemente Tma EndoIII), en presencia de una primera sonda de oligonucleótidos corriente arriba (Cebador Universal U1 5', seguido de una secuencia específica de la diana en el extremo 3'), una segunda sonda de oligonucleótidos corriente abajo (5' de saliente adicional de 20 bases, donde 8-10 bases son complementarias al extremo 3' de la secuencia del Cebador Univ. U2', un sitioapurínico, seguido de una secuencia específica de la diana - Cebador Univ. U2'), dNTP y ligasa termoestable (preferentemente de la cepa AK16D). La sonda corriente abajo es más larga y tiene un valor de Tf superior al de la sonda corriente arriba, de manera que cuando se enfría desde 94 °C se detiene a 70 °C para permitir que la sonda corriente abajo se hibride primero y se corte con la EndoIII para liberar el extremo 5', después, cuando la reacción de se enfría a 65 °C o 60 °C, permitiendo que la sonda corriente arriba se hibride directamente adyacente a la sonda corriente abajo con el fosfato 5' liberado y, después, la ligasa termoestable sella la mella.

20 **Ejemplo Profético 4 - Cuantificación precisa de ARNip específico de tumor aislado de exosomas o proteínas Argonaut**

25 Visión de conjunto del enfoque: El enfoque es el mismo que para ARNm, excepto porque los cebadores específicos de ARNip iniciales tienen una pequeña horquilla que se forma a baja temperatura y permite la hibridación y prolongación en la diana de ARNip. A las temperaturas más altas adecuadas para la ligadura por LDR, la horquilla es monocatenaria y proporciona bases adicionales para permitir que el cebador de LDR corriente abajo se hibride. El enfoque del uso de cebadores específicos de ARNip con una pequeña horquilla se desarrolló en ABI.

30 **Ejemplo Profético 5 - Cuantificación precisa de cambios de copia específicos de tumor en ADN aislado de células tumorales circulantes**

35 Los cambios de copias en el ADN tumoral pueden ser un factor predictivo fuerte del resultado. En los últimos años, la mayoría del trabajo sobre el número de copias se ha realizado en chips de SNP, donde enfoques bioinformáticos promedian la señal a través de una región para determinar el número de copias relativo. Para los números bajos de células, se usan enfoques de PCR digital para obtener un recuento preciso de moléculas de partida.

40 **Visión de conjunto del enfoque:** Generalmente, los cambios de copias se producen en grandes regiones de ADN, tales como los brazos cromosómicos. Puesto que se trata con números muy bajos de células tumorales, se podría mejorar la precisión interrogando múltiples regiones de un brazo cromosómico dado simultáneamente y sumando o promediando la señal resultante. Análogamente, se amplifican genes específicos en algunos tumores (es decir, Her2-neu, IGF2), que pueden predecir el resultado o guiar la terapia.

45 **Protocolo detallado para la cuantificación de cambios de copias específicos de tumor en ADN aislado de células tumorales circulantes:**

50 Etapa 1: Desnaturalizar ADN genómico de suero (94 °C, 5 minutos para activar la polimerasa Taq de Arranque en Caliente) en presencia de una primera sonda de oligonucleótidos corriente arriba (Cebador Universal U1 5', seguido de UniTaq Ai, seguido de una secuencia específica de la diana en el extremo 3'), una segunda sonda de oligonucleótidos corriente abajo (5' del saliente adicional de 20 bases, donde 8-10 bases son complementarias al extremo 3' de la secuencia del Cebador Univ. U2', seguido de una secuencia específica del gen diana - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'), polimerasa Taq de Arranque en Caliente y ligasa termoestable (preferentemente de la cepa AK16D).

55 Etapa 2: Añadir dNTP de Arranque en Caliente, Cebador Universal U1, Cebador Universal U2. Incubar a 55 °C para permitir que las sondas corriente abajo no ligadas se auto-horquillen con las 8-10 bases que son complementarias al extremo 3', que se prolonga para crear horquillas más largas que convierten estas sondas corriente abajo en refractarias a la amplificación adicional. Idealmente, las colas de cebadores universales U1 y U2 en las sondas de ligadura compuestas son ligeramente más cortas que los cebadores Universales U1 y U2. Esto permite la amplificación universal inicial a una temperatura de ciclo inferior (es decir, hibridación a 55 °C) seguida de una temperatura de ciclo más alta (es decir, hibridación a 65 °C) de manera que los cebadores universales U1 y U2 se unan, preferentemente, al producto deseado (en comparación con sondas de ligadura compuestas que se unen a productos incorrectos). Adicionalmente, los cebadores universales U1 y U2, contienen una secuencia corta en común (es decir, 6-10 bases) para evitar la formación de dímeros de cebador. Después, permitir que transcurra la amplificación durante 8-20 ciclos. Estas condiciones amplifican fragmentos de secuencia:

65 Cebador Univ. U1 - UniTaq Ai - Región Diana - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'



Etapa 3: Abrir el tubo, diluir de 10 a 100 veces y distribuir alícuotas a pocillos para PCR digital, conteniendo cada pocillo los siguientes cebadores: Cebador Universal U2 y cebadores específicos UniTaq del formato F1 - UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai (donde F1 es un colorante fluorescente que se inactivó mediante el Inactivador Q). Cada pocillo contiene un conjunto de productos de la ligadura para un brazo cromosómico o una región del gen dados, así como para una región de control. En estas condiciones, se formará el producto siguiente, después de la PCR digital:

F1 - UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai - Región Diana - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

Esto se horquillará, de manera que la secuencia UniTaq Bi se empareja con la secuencia UniTaq Bi'. Cuando el Cebador Universal U2 se une a la secuencia del Cebador Univ. U2', la actividad exonucleasa 5' → 3' de la polimerasa digiere la secuencia UniTaq Bi, liberando el colorante F1 fluorescente. Las gotitas totales con señal fluorescente para la región diana se comparan con las gotitas totales con señal fluorescente para la región de control para determinar el número de copias relativo.

Cromosomas que rara vez experimentan cambio de copias en el cáncer de colon: 2, 11, 16

Brazos cromosómicos que con frecuencia experimentan ganancia de copias en el cáncer de colon: 7p, 7q, 8q, 13q, 20p, 20q

Brazos cromosómicos que con frecuencia experimentan pérdida de copias en el cáncer de colon: 1p, 4p, 4q, 8p, 14q, 17p, 18p, 18q

La pérdida de 8p y 18q se correlaciona con mal pronóstico.

La amplificación de Her2-Neu indica el tratamiento con Herceptin.

La amplificación de IGF2 indica el tratamiento con un inhibidor de IGFR

Como una alternativa al uso de la PCR digital, los productos de la ligadura pueden cuantificarse mediante el uso de secuenciación de nueva generación. Para asegurar que la etapa e ligadura tuviera lugar en el ADN genómico, las sondas de ligadura se hibridan con aproximadamente 10-20 bases de separación, y el hueco se llena con la polimerasa antes de la etapa de ligadura, de forma similar al procedimiento descrito en el Ejemplo profético 2. Este enfoque puede usarse cuando se interrogan muchas regiones simultáneamente y se buscan deleciones o amplificaciones específicas de genes focalizadas.

#### **Ejemplo Profético 6 - Detección de mutaciones en ADN aislado de células tumorales circulantes**

Las células tumorales circulantes proporcionan la ventaja de concentrar el ADN que contiene la mutación, por lo que ya no hay necesidad de encontrar mutaciones de bajo nivel en un exceso de secuencia de tipo silvestre. Sin embargo, puesto que hay un bajo número de moléculas de ADN de partida, es importante amplificar todas las regiones con precisión y verificar si las mutaciones están realmente presentes.

**Visión de conjunto del enfoque:** El enfoque en este caso es el mismo que para la búsqueda de mutaciones puntuales comunes conocida o para la secuenciación de múltiples exones, como se indica en los Ejemplos Proféticos 2 y 3 anteriores. Sin embargo, cuando se trata con cantidades bajas de ADN de entrada, existe la probabilidad de error de la polimerasa. En consecuencia, será necesario confirmar la presencia de la mutación en ambas cadenas en múltiples lecturas.

Puesto que el ADN se obtiene de unas pocas células tumorales capturadas, si hay una mutación presente, debería estar presente en algunos si no en la mayoría de las células capturadas. Esto abre la posibilidad de hacer un ensayo de PCR-LDR-PCR (UniTaq).

#### **Protocolo detallado para la detección de mutaciones en ADN aislado de células tumorales circulantes.**

Etapa 1: Desnaturalizar ADN genómico de las CTC capturadas (94 °C 5 minutos) para activar la polimerasa Taq de Arranque en Caliente en presencia de cebadores específicos de genes que contienen uracilo y amplificar por PCR el ADN durante 10-20 ciclos. Destruir por calor la polimerasa Taq mediante la incubación a 99 °C durante 30 minutos. El propósito de destruir por calor la polimerasa después de ciclos de PCR limitados es evitar productos de prolongación espurios entre las sondas de ligadura durante la incubación de 30 minutos con la mezcla que contiene endonucleasa AP y UNG.

Etapa 2: Añadir endonucleasa AP y UNG, polimerasa Taq de Arranque en Caliente, dNTP recién preparados si es necesario, Cebador Universal U1, Cebador Universal U2. Incubar a 37 °C durante 30 minutos para destruir los cebadores originales, activar la polimerasa a 95 °C durante 5 minutos. La reacción contiene primeras sondas de oligonucleótidos corriente arriba (Cebador Universal U1 5', seguido de UniTaq Ai, seguido de una secuencia específica de la diana con un desapareamiento C:A o G:T en la penúltima base y la base de mutación en el extremo 3'), segundas sondas de oligonucleótidos corriente abajo (5' de del saliente adicional d 20 bases, donde 8-10 bases son complementarias al extremo 3' de la secuencia del Cebador Univ. U2', seguido de una secuencia específica de la diana - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'), polimerasa Taq y ligasa termoestable (preferentemente de la cepa AK16D). Realizar una o más reacciones de ligadura, donde la temperatura de hibridación se cicla una

o más veces entre 60 °C para la ligadura (10 minutos) y 75 °C (1 minuto). Esto permitirá que se produzcan acontecimientos de ligadura si hay ADN mutante presente. La sonda corriente abajo tiene uniones tiofosfato en la 2ª y 3ª posición desde el extremo fosfato 5', (que se liberará mediante la actividad nucleasa 5' → 3' de la polimerasa), de manera que la polimerasa no digiere la sonda corriente abajo, sino que más bien se cae para permitir una etapa de ligadura. Una opción adicional es el diseño de la sonda corriente abajo para que sea más larga y tenga un valor de Tf superior al de la sonda corriente arriba, de manera que cuando se enfría desde 94 °C se detiene a 70 °C para permitir que la sonda corriente abajo se hibride primero, después, cuando la reacción se enfría a 65 °C o 60 °C, permitiendo que la sonda corriente arriba se hibride y que la polimerasa corte la cola 5' de la sonda corriente abajo y la ligasa termoestable sella la mella. Esto debería limitar la prolongación por la polimerasa de la sonda corriente arriba antes de que la sonda corriente abajo se hibride.

Etapa 3: Añadir Cebador Universal U1, Cebador Universal U2. Incubar a 55 °C para permitir que las sondas corriente abajo no ligadas se auto-horquillen con las 8-10 bases que son complementarias al extremo 3', que se prolonga para crear horquillas más largas que convierten estas sondas corriente abajo en refractarias a la amplificación adicional. Después, permitir que transcurra la amplificación por PCR durante 0-15 ciclos. Idealmente, las colas de cebadores universales U1 y U2 en las sondas de ligadura compuestas son ligeramente más cortas que los cebadores Universales U1 y U2. Esto permite la amplificación universal inicial a una temperatura de ciclado inferior (es decir, hibridación a 55 °C) seguida de una temperatura de ciclado mayor (es decir, hibridación a 65 °C) de manera que los cebadores universales U1 y U2 se unan preferencialmente al producto deseado (en comparación con cebadores de LDR compuestos que se unen a productos incorrectos). Adicionalmente, los cebadores universales U1 y U2 contienen una secuencia corta en común (es decir, 6-10 bases) para evitar la formación de dímeros de cebador. Estas condiciones amplifican fragmentos de secuencia:

Cebador Univ. U1 - UniTaq Ai - Diana Corriente Arriba - Mutación - Diana Corriente Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

Etapa 4: Abrir el tubo, diluir de 10 a 100 veces y distribuir alícuotas en pocillos Taqman, conteniendo cada pocillo los siguientes cebadores: Cebador Universal U2 y cebadores específicos UniTaq del formato F1 - UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai (donde F1 es un colorante fluorescente que se inactiva mediante el Inactivador Q). En estas condiciones, se formará el siguiente producto:

F1 - UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai - Diana Corriente Arriba - Mutación - Diana Corriente Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

Esto se horquillará, de manera que la secuencia UniTaq Bi se empareja con la secuencia UniTaq Bi'. Cuando el Cebador Universal U2 se une a la secuencia del Cebador Univ. U2', la actividad exonucleasa 5' → 3' de la polimerasa digiere la secuencia UniTaq Bi, liberando el colorante F1 fluorescente.

En un enfoque alternativo, puede realizarse la detección de mutaciones altamente sensible usando matriz de Zipcode, Taqman de Zipcode o detección Taqman tradicional como se describe en el Ejemplo profético 3 dando como resultado los siguientes productos:

Cebador Univ. U1 - Zipcode Zi - Diana Corriente Arriba - Mutación - Diana Corriente Abajo - Cebador Univ. U2'

En un enfoque alternativo, puede realizarse la detección de mutaciones altamente sensible usando secuencias de zipcode dividido como se describe en el Ejemplo profético 3 anterior, dando como resultado los siguientes productos:

Cebador Univ. U1 - 1º ½ Zipcode Zi - Ci Corta - Diana Corriente Arriba - Mutación - Diana Corriente Abajo - Ci' Corta - 2º ½ Zipcode Zi - Cebador Univ. U2'

Puesto que hay una amplificación primaria de los productos de PCR, es posible omitir la Etapa 3. Adicionalmente, las sondas de LDR corriente arriba no necesitan una secuencia universal, de manera que los productos de la ligadura de la Etapa 2 tendrían la siguiente forma:

UniTaq Ai - Diana Corriente Arriba - Mutación - Diana Corriente Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

Esto todavía permitirá que los productos de la ligadura de la Etapa 4 tengan la siguiente forma:

F1 - UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai - Diana Corriente Arriba - Mutación - Diana Corriente Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

Además, si la amplificación por PCR con cebador universal de la Etapa 4 se omite, una alternativa para eliminar los cebadores de PCR no utilizados usando endonucleasa AP y UNG en la Etapa 2 es el uso de una fosfatasa sensible al calor (es decir, CIAP) para destruir los dNTP después de la Etapa 1 y antes de la Etapa 2. No se añadirían dNTP recién preparados en la Etapa 2, ya que no serían necesarios para la Etapa 3.

**Ejemplo profético 7 - Cuantificación precisa de ARNm específico de tumor aislado de exosomas o células tumorales circulantes**

5 Véase el enfoque que se ha esbozado en Ejemplo profético 3 anterior. Cuando se aísla ARNm de células tumorales circulantes, la cantidad total puede ser bastante baja. Por tanto, puede ser prudente usar más de un conjunto de sondas de ligadura para un transcrito de ARNm dado y tener la lectura en PCR digital. Proceder con las Etapas 1 y 2 como se ha esbozado para las Etapas 1 y 2 del Ejemplo profético 3 anterior, después:

10 Etapa 3: Abrir el tubo, diluir de 10 a 100 veces y distribuir alícuotas a pocillos para PCR digital, conteniendo cada pocillo los siguientes cebadores: Cebador Univ. U2 y cebadores específicos UniTaq del formato F1 - UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai. (donde F1 es un colorante fluorescente que se inactiva mediante el Inactivador Q). Cada pocillo contiene un conjunto de productos de la ligadura para una región de ARNm dada, así como para una región de control. En estas condiciones, se formará el producto siguiente, después de la PCR digital:

15 F1 - UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai - Región Diana - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

20 Esto se horquillará, de manera que la secuencia UniTaq Bi se empareja con la secuencia UniTaq Bi'. Cuando el Cebador Universal U2 se une a la secuencia del Cebador Univ. U2', la actividad exonucleasa 5' → 3' de la polimerasa digiere la secuencia UniTaq Bi, liberando el colorante F1 fluorescente. Las gotitas totales con señal fluorescente para la región diana se comparan con las gotitas totales con señal fluorescente para la región de control para determinar los niveles de expresión relativos de ARNm.

**Ejemplo Profético 8 – Aplicaciones diagnósticas prenatales a partir de muestras de suero materno**

25 Visión de conjunto: El trabajo reciente ha demostrado que el ADN fetal como porcentaje del ADN materno en el suero está a aproximadamente el 6 %, el 20 % y el 26 % en el 1º, 2º y 3º trimestre respectivamente. Debido a cómo se degrada el ADN, el ADN materno tiene por lo general aproximadamente 160 bases y aún está asociado a la histona H1, mientras que el ADN fetal tiene aproximadamente 140 bases y no se asocia a histonas. Dependiendo de la necesidad clínica y cuando el conocimiento proporcione el mejor cuidado, pueden desarrollarse ensayos con suficiente sensibilidad para detectar ADN fetal en el trimestre apropiado.

30 **Aneuploidía a través del recuento del número de copias (por ejemplo, Trisomía del 21).** Véase el enfoque del Ejemplo profético 5 descrito anteriormente. Es más prudente utilizar un gran número de regiones para interrogar el cromosoma 21 y un cromosoma de control (por ejemplo, el cromosoma 2), para demostrar que el recuento cromosómico para el cromosoma 21 fetal es estadísticamente más alto que para el control fetal (por ejemplo, el cromosoma 2). Mediante el uso de un cromosoma de control interno en cada pocillo de amplificación digital, el método no depende de las condiciones de amplificación exactas ni de la eficiencia por ciclo.

40 Un enfoque alternativo depende de interrogar SNP individuales y es más adecuado para mutaciones de enfermedades, como se describe a continuación.

45 **Enfermedades hereditarias que contienen mutaciones comunes en genes conocidos (por ejemplo, anemia de células falciformes, fibrosis quística).** El análisis de secuencia determina fácilmente la presencia del alelo recesivo en ambos padres. Si la mutación es diferente en los padres, es posible determinar si el niño es un heterocigoto compuesto para la enfermedad mediante la evaluación del ADN libre de células del suero materno. Para obtener la respuesta completa a partir del análisis del ADN fetal en el suero materno pueden ser necesarias dos partes en este ensayo. La primera es la de establecer la fase para los SNP maternos que rodean el gen de la enfermedad. Esto puede conseguirse mediante el aislamiento de ADN de alto peso molecular a partir de GB o cromosomas en metafase y la distribución en placas de 96 o 384 pocillos de manera que haya menos de un cromosoma por pocillo. Posteriormente, se usa amplificación del genoma entero para determinar qué pocillos contienen el cromosoma y, después, se determina la fase de 96 SNP vecinos para el alelo de la enfermedad materno para el gen en cuestión. Una vez que se consigue esto, se puntúa la presencia del alelo de la enfermedad del padre (como se describe en el Ejemplo Profético 2 anterior) y, usando PCR digital, se verifica que el cromosoma que se hereda de la madre también contenga un alelo de la enfermedad.

55 La cuestión clave será qué tan importante es para la familia obtener la respuesta correcta. Es sencillo determinar si ambos padres son portadores y si las mutaciones son diferentes, es relativamente sencillo determinar si el alelo de la enfermedad del padre está presente en el feto. Si está ausente, entonces el feto estará libre de la enfermedad o será un portador de la misma. Si está presente, entonces las posibilidades de heredar el alelo materno y contraer la enfermedad son del 50 %. Si la tasa de error para el ensayo de ADN fetal global es del 3 %, ¿merece la pena obtener la respuesta equivocada? Puede ser más prudente hacer una amniocentesis y someter a ensayo directamente la presencia del alelo materno.

65 En consecuencia, la recomendación es simplemente secuenciar el gen como se describe en el Ejemplo Profético 2 anterior y puntuar el alelo de la enfermedad paterna. Si está presente, o si las mutaciones específicas de la enfermedad paternas y maternas son idénticas, se recomienda la amniocentesis.

**Enfermedades hereditarias que contienen mutaciones poco frecuentes en genes conocidos (por ejemplo, poliposis adenomatosa familiar).** El enfoque descrito en el Ejemplo Profético 2 puede utilizarse para detectar estas mutaciones de enfermedades hereditarias.

5 **Enfermedades hereditarias que surgen de la pérdida o la ganancia del número de copias esporádicas o conocidas en un gen conocido (por ejemplo, la distrofia muscular de Duchenne).** Véase el enfoque en el Ejemplo Profético 5 anterior. Si la madre es portadora y se conoce la región de la pérdida de copias, esto será más fácil de realizar. Si la madre no es portadora, probablemente es mejor usar secuenciación para contar el número de copias en múltiples secuencias estrechamente espaciadas a lo largo del gen de DMD.

10

**Ejemplo profético 9 - Ensayos de paternidad**

15 Visión de conjunto: El enfoque básico es buscar la presencia de alelos presentes en el padre, pero ausentes en la madre. Existen dos formas generales de aproximarse a esto. Puede comenzarse con SNP en los que el alelo común tiene una frecuencia de aproximadamente el 70-75 %, de manera que hay una probabilidad del 50 % de que la madre sea homocigótica para el alelo mayor. Se comienza con aproximadamente 48 SNP de los cuales aproximadamente la mitad (24) la madre será homocigótica para el alelo común y hay una probabilidad del 50 % de que el padre sea o bien heterocigótico u homocigótico para el alelo minoritario. Simplemente se puntúa la presencia del alelo minoritario en la sangre materna, de forma similar a la búsqueda de mutaciones, pero también se cuantifica la cantidad presente solo para confirmar que es un alelo minoritario del padre. Un segundo enfoque es comenzar con alelos con una frecuencia de aproximadamente el 50 %, entonces hay una probabilidad del 50 % de que la madre sea homocigótica para uno de los alelos, y entonces hay una probabilidad del 75 % de que el padre tenga el otro alelo en esa posición. Es un poco menos informativo en la diferenciación de los padres, pero más posiciones serán informativas.

25

**Protocolo detallado para la detección de marcadores de alelos de SNP:**

30 Etapa 1: Desnaturalizar ADN genómico de suero (94 °C 1 minuto) en presencia de 2 primeras sondas de oligonucleótidos cadena arriba (Cebador Universal U1 5', seguido de UniTaq A1i, seguido de una secuencia específica de la diana y la base SNP1 en el extremo 3', o Cebador Universal U1, seguido de UniTaq A2i, seguido de una secuencia específica de la diana y la base SNP2 en el extremo 3'), segundas sondas de oligonucleótidos corriente abajo (5' del saliente adicional de 20 bases, donde 8-10 bases son complementarias al extremo 3' de la secuencia del Cebador Univ. U2', seguido de una secuencia específica de la diana - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'), polimerasa Taq y ligasa termoestable (preferentemente de la cepa AK16D). Realizar una o más reacciones de LDR, donde la temperatura de hibridación se cicla una o más veces entre 60 °C para la ligadura (10 minutos) y 75 °C (1 minuto). Esto permitirá que se produzcan acontecimientos de ligadura para cada SNP que esté presente.

40 Etapa 2: Añadir Cebador Universal U1 de dNTP de Arranque en Caliente, Cebador Universal U2. Incubar a 55 °C (activa los dNTP) para permitir que las sondas corriente abajo no ligadas se auto-horquillen con las 8-10 bases que son complementarias al extremo 3', que se prolonga para crear horquillas más largas que convierten estas sondas corriente abajo en refractarias a la amplificación adicional. Después, permitir que transcurra la amplificación por PCR durante 8-20 ciclos. Idealmente, las colas de cebadores universales U1 y U2 en las sondas de ligadura compuestas son ligeramente más cortas que los cebadores Universales U1 y U2. Esto permite la amplificación universal inicial a una temperatura de ciclado inferior (es decir, hibridación a 55 °C) seguida de una temperatura de ciclado mayor (es decir, hibridación a 65 °C) de manera que los cebadores universales U1 y U2 se unan preferencialmente al producto deseado (en comparación con sondas de ligadura compuestas que se unen a productos incorrectos). Adicionalmente, los cebadores universales U1 y U2, contienen una secuencia corta en común (es decir, 6-10 bases) para evitar la formación de dímeros de cebador. Estas condiciones amplifican fragmentos de secuencia:

50

Cebador Univ. U1 - UniTaq A1i - Diana Corriente Arriba - SNP1 - Diana Corriente Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

55 Cebador Univ. U1 - UniTaq A2i - Diana Corriente Arriba - SNP2 - Diana Corriente Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

60 Etapa 3: Abrir el tubo, diluir de 10 a 100 veces y distribuir alícuotas a pocillos Taqman, conteniendo cada pocillo los siguientes cebadores: Cebador Universal U2 y cebadores específicos UniTaq del formato F1 - UniTaq Bi - Q - UniTaq A1i y F2 - UniTaq Bi - Q - UniTaq A2i. (donde F1 y F2 son colorantes fluorescentes que se inactivan mediante el Inactivador Q). En estas condiciones, se formará el siguiente producto:

F1 - UniTaq Bi - Q - UniTaq A1i - Diana Corriente Arriba - SNP1 - Diana Corriente Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

65 F2 - UniTaq Bi - Q - UniTaq A2i - Diana Corriente Arriba - SNP2 - Diana Corriente Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

## ES 2 655 509 T3

Esto se horquillará, de manera que la secuencia UniTaq Bi se empareja con la secuencia UniTaq Bi'. Cuando el Cebador Universal U2 se une a la secuencia del Cebador Univ. U2', la actividad exonucleasa 5' → 3' de la polimerasa digiere la secuencia UniTaq Bi, liberando el colorante fluorescente F1 si SNP1 estaba originalmente presente y el colorante fluorescente F2 si SNP2 estaba originalmente presente.

5 En un enfoque alternativo, la detección de SNP puede realizarse usando matriz de Zipcode, Taqman de Zipcode o detección Taqman tradicional (véase el Ejemplo Profético 1) para formar los siguientes productos.

10 Cebador Univ. U1 - Zipcode A1i - Diana Corriente Arriba - SNP1 - Diana Corriente Abajo - Cebador Univ. U2'

Cebador Univ. U1 - Zipcode A2i - Diana Corriente Arriba - SNP2 - Diana Corriente Abajo - Cebador Univ. U2'

15 En un enfoque alternativo, la detección de SNP puede realizarse usando secuencias de zipcode dividido (véase el Ejemplo Profético 1) para formar los siguientes productos:

20 Cebador Univ. U1 - 1º ½ Zipcode Zi - Ci Corta - Diana Corriente Arriba - SNP1 - Diana Corriente Abajo - Ci' Corta - 2º ½ Zipcode Zi - Cebador Univ. U2'

Cebador Univ. U1 - 1º ½ Zipcode Zi - Ci Corta - Diana Corriente Arriba - SNP2 - Diana Corriente Abajo - Ci' Corta - 2º ½ Zipcode Zi - Cebador Univ. U2'

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de identificación de la presencia de una o más secuencias de nucleótidos diana en una muestra, que comprende:

5 proporcionar una muestra que contiene potencialmente la una o más secuencias de nucleótidos diana;  
 proporcionar uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos, comprendiendo cada conjunto (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción 5' específica de cebador y una porción específica de la diana, y (b) una segunda sonda de oligonucleótidos que tiene una porción 3' específica de cebador, una porción específica de la diana y una secuencia de nucleótidos 5', en donde dicha secuencia de nucleótidos 5' es complementaria a al menos una porción de la porción 3' específica de cebador y se hibrida con dicha porción complementaria de la porción 3' específica de cebador para formar una segunda sonda de oligonucleótidos horquillada cuando dicha segunda sonda no se hibrida con una secuencia de nucleótidos diana, en donde las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas se configuran para que se hibriden adyacentes entre sí en la secuencia de nucleótidos diana con una unión entre las sondas de oligonucleótidos primera y segunda y, en donde, en un conjunto de sondas, la porción específica de la diana de la segunda sonda de oligonucleótidos tiene un nucleótido idéntico de solapamiento en la unión con la primera sonda de oligonucleótidos;  
 10 poner en contacto la muestra y el uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos en condiciones eficaces para que las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas se hibriden en posiciones adyacentes de una manera específica de base con sus secuencias de nucleótidos diana correspondientes, si están presentes en la muestra, en donde tras la hibridación el nucleótido idéntico de solapamiento de la segunda sonda de oligonucleótidos forma una aleta en la unión que comprende el nucleótido idéntico de solapamiento;  
 15 escindir el nucleótido idéntico de solapamiento de la segunda sonda de oligonucleótidos con una enzima que tiene actividad nucleasa 5', liberando de este modo un fosfato en el extremo 5' de la segunda sonda de oligonucleótidos;  
 20 ligar las sondas de oligonucleótidos primera y segunda del uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos juntas en la unión para formar secuencias producto ligadas, en donde cada secuencia producto ligada comprende la porción específica de cebador 5', las porciones específicas de la diana y las porciones específicas de cebador 3' de las sondas de oligonucleótidos primera y segunda de un conjunto de sondas de oligonucleótidos;  
 25 detectar las secuencias producto ligadas en la muestra; e  
 identificar la presencia de una o más secuencias de nucleótidos diana en la muestra basándose en dicha detección,

35 opcionalmente en donde la muestra se selecciona entre el grupo que consiste en tejido, células, suero, sangre, plasma, líquido amniótico, esputo, orina, fluidos corporales, secreciones corporales, excreciones corporales, ácidos nucleicos circulantes sin células, ácidos nucleicos fetales sin células circulantes en la mujer embarazada, células tumorales circulantes, tumor, biopsia del tumor y exosomas.

40 2. El método de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente:

amplificar las secuencias de nucleótidos diana en la muestra antes de dicho contacto.

45 3. El método de la reivindicación 1, en el que una de las sondas de oligonucleótidos en un conjunto de sondas comprende adicionalmente una porción zip-code, en donde las porciones zip-code se hibridan con sus oligonucleótidos de captura complementarias en condiciones de hibridación uniformes, comprendiendo dicho método adicionalmente:

50 proporcionar una colección de los oligonucleótidos de captura y  
 poner en contacto la secuencia producto de la ligadura con la colección de oligonucleótidos de captura en condiciones eficaces para hibridar la porción zip-code de cada secuencia producto ligada con su oligonucleótido de captura complementario de la colección con una hibridación no específica mínima y en condiciones de hibridación uniformes, por lo que dicha detección tiene lugar después de la hibridación de las secuencias  
 55 producto ligadas con sus oligonucleótidos de captura complementarios,

opcionalmente en donde cada tipo de oligonucleótido de captura de la colección comprende una secuencia de nucleótidos que tiene más de dieciséis nucleótidos y difiere de secuencias de nucleótidos de otros tipos de oligonucleótidos de captura de la colección, cuando se alinean entre sí, en al menos el 25 %,

60 opcionalmente en donde la colección de oligonucleótidos de captura se inmoviliza sobre un soporte sólido,  
 opcionalmente en donde el soporte sólido está en una forma seleccionada entre el grupo que consiste en perlas, portaobjetos, discos, membranas, películas, placas de microtitulación y materiales compuestos de los mismos, o en donde el soporte sólido comprende una matriz de posiciones, en donde la colección de oligonucleótidos de captura se inmoviliza en la matriz de posiciones.

65

4. El método de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente:

proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos, comprendiendo cada conjunto (a) un primer cebador de oligonucleótidos que comprende la misma secuencia de nucleótidos que la porción 5' específica de cebador de la secuencia producto ligada y (b) un segundo cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la porción 3' específica de cebador de la secuencia producto ligada;

mezclar las secuencias producto ligadas, el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos y una ADN polimerasa para formar una mezcla de reacción en cadena de la polimerasa; y someter la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de prolongación formando de este modo productos de prolongación primarios,

por lo que dicha detección implica la detección de los productos de prolongación primarios.

5. El método de la reivindicación 4, en el que uno de los cebadores de oligonucleótidos primero o segundo de un conjunto de cebadores comprende un marcador detectable, en donde dicha detección implica la detección de productos de prolongación primarios marcados.

6. El método de la reivindicación 1, en el que dicha detección comprende: secuenciar las secuencias producto ligadas en la muestra o separar por tamaño las secuencias producto ligadas.

7. El método de la reivindicación 4, en el que cualquiera o ambas de las sondas de oligonucleótidos primera y segunda en un conjunto de sondas comprenden adicionalmente un zip-code o una porción del mismo, donde los zip-codes se hibridan con oligonucleótidos de captura complementarios en condiciones de hibridación uniformes, opcionalmente en el que:

1) el método comprende adicionalmente proporcionar una colección de oligonucleótidos de captura, en donde cada oligonucleótido de captura se hibrida con porciones zip-code complementarias, y comprende una molécula inactivadora y un marcador detectable que están separados entre sí; después

a) añadir la colección de oligonucleótidos de captura a la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa; e hibridar oligonucleótidos de captura de la colección con sus porciones zip-code complementarias de las secuencias producto ligadas o un complemento de las mismas durante dicho sometimiento, por lo que la molécula inactivadora y/o el marcador detectable se escinden del oligonucleótido de captura hibridado durante dicho tratamiento de prolongación por lo que dicha detección implica la detección del marcador detectable escindido,

o

b) proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos secundarios capaces de hibridarse con los productos de prolongación primarios; mezclar la colección de oligonucleótidos de captura, el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos secundarios, los productos de prolongación primarios y una polimerasa para formar una mezcla de reacción en cadena de la polimerasa secundaria;

someter la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa secundaria a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación, en donde los oligonucleótidos de captura de la colección se hibridan con sus porciones zip-code complementarias de los productos de prolongación primarios y los cebadores de oligonucleótidos secundarios se hibridan con los productos de prolongación primarios, y un tratamiento de prolongación, en el que los cebadores hibridados se prolongan formando de este modo productos de prolongación secundarios; y escindir la molécula inactivadora y/o el marcador detectable de los oligonucleótidos de captura hibridados durante dicho tratamiento de prolongación, por lo que dicha detección implica la detección del marcador detectable escindido,

opcionalmente en el que cada tipo de oligonucleótido de captura de la colección comprende una secuencia de nucleótidos que difiere de secuencias de nucleótidos de otros tipos de oligonucleótidos de captura de la colección, cuando se alinean entre sí, en al menos el 25 %,

o

2) el método comprende adicionalmente proporcionar una colección de los oligonucleótidos de captura, en donde cada oligonucleótido de captura de la colección se hibrida con porciones zip-code complementarias y

poner en contacto los productos de prolongación primarios, después de dicho sometimiento, con la colección de oligonucleótidos de captura en condiciones eficaces para hibridar la porción zip-code de cada producto de prolongación primario con su oligonucleótido de captura complementario de la colección con una hibridación no específica mínima y en condiciones de hibridación uniformes, por lo que dicha detección tiene lugar después de la hibridación de los productos de prolongación primarios con sus oligonucleótidos de captura complementarios,

opcionalmente en donde

a) cada tipo de oligonucleótido de captura de la colección comprende una secuencia de nucleótidos que tiene más de dieciséis nucleótidos y difiere de las secuencias de nucleótidos de otros tipos de oligonucleótidos de captura de la colección, cuando se alinean entre sí, en al menos el 25 %, o

b) uno de los cebadores de oligonucleótidos del uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos comprende adicionalmente un marcador detectable formando de este modo productos de prolongación primarios marcados, o

c) la colección de oligonucleótidos de captura se inmoviliza sobre un soporte sólido, opcionalmente en donde el soporte sólido está en una forma seleccionada entre el grupo que consiste en perlas, portaobjetos, discos, membranas, películas, placas de microtitulación y materiales compuestos de los mismos, o en donde el soporte sólido comprende una matriz de posiciones, en donde la colección de oligonucleótidos de captura se inmoviliza en la matriz de las posiciones

o

3) la primera sonda de oligonucleótidos comprende adicionalmente una primera porción del zip-code y una primera porción marcadora que está en posición 3' con respecto a la primera porción zip-code, y la segunda sonda de oligonucleótidos comprende adicionalmente una segunda porción del zip-code y una segunda porción marcadora que está en posición 5' con respecto a la segunda porción zip-code, en donde las porciones zip-code primera y segunda de un conjunto de sondas de oligonucleótidos, cuando se posicionan de forma adyacente, forman un zip-code de longitud completa, y en donde las porciones marcadoras primera y segunda de un conjunto de sondas de oligonucleótidos son complementarias entre sí, comprendiendo dicho método adicionalmente:

proporcionar una colección de oligonucleótidos de captura complementaria a una porción de la primera porción zip-code y una porción de la segunda porción zip-code, en donde cada oligonucleótido de captura de la colección comprende una molécula inactivadora y un marcador detectable que están separados entre sí; someter los productos de prolongación primarios y la colección de oligonucleótidos de captura a condiciones eficaces para que (i) las porciones marcadoras primera y segunda de un producto de prolongación primario particular se hibriden entre sí para formar productos de prolongación horquillados con porciones zip-code primera y segunda posicionadas de forma adyacente y (ii) los oligonucleótidos de captura de la colección se hibriden con porciones zip-code primera y segunda posicionadas de forma adyacente complementarias de los productos de prolongación horquillados; y escindir la molécula inactivadora o el marcador detectable de los oligonucleótidos de captura hibridados, por lo que dicha detección implica la detección del marcador detectable separado de la molécula inactivadora,

o

4) la primera sonda de oligonucleótidos comprende adicionalmente una segunda porción específica de cebador que difiere para cada conjunto de sondas de oligonucleótidos diferente, una primera porción del zip-code y una primera porción marcadora que está en posición 3' con respecto a la primera porción zip-code, y (ii) la segunda sonda de oligonucleótidos comprende adicionalmente una segunda porción del zip-code y una segunda porción marcadora que está en posición 5' con respecto a la segunda porción zip-code, en donde las porciones zip-code primera y segunda de un conjunto de sondas de oligonucleótidos, cuando se posicionan de forma adyacente, forman un zip-code de longitud completa, y en donde las porciones marcadoras primera y segunda de un conjunto de sondas de oligonucleótidos son complementarias entre sí, comprendiendo dicho método adicionalmente:

proporcionar uno o más conjuntos de cebadores secundarios que comprenden (i) un primer cebador de oligonucleótidos secundario que tiene (a) una secuencia de nucleótidos que es la misma que la segunda porción específica de cebador de la primera sonda de oligonucleótidos, (b) una porción de oligonucleótidos de captura que es complementaria a las porciones zip-code primera y segunda posicionadas de forma adyacente de un conjunto de sondas de oligonucleótidos, (c) una molécula inactivadora y un marcador detectable separados por dicha porción de oligonucleótidos de captura, y (ii) un segundo cebador de oligonucleótidos secundario que tiene la misma secuencia de nucleótidos que el segundo cebador de oligonucleótidos primario;

mezclar los productos de prolongación primarios, el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos secundarios y una polimerasa para formar una segunda mezcla de reacción en cadena de la polimerasa; someter la segunda mezcla de reacción en cadena de la polimerasa a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa, formando de este modo productos de prolongación secundarios;

someter los productos de prolongación secundarios a condiciones eficaces para que las porciones marcadoras primera y segunda de un producto de prolongación secundario particular se hibriden entre sí para formar productos de prolongación secundarios horquillados con porciones zip-code primera y segunda posicionadas de forma adyacente y (ii) la porción de oligonucleótido de captura de un producto de prolongación secundario horquillado particular se hibride con porciones zip-code primera y segunda posicionadas de forma adyacente complementarias del producto de prolongación horquillado; y

escindir la molécula inactivadora o el marcador detectable de la porción de oligonucleótido de captura de los



productos de prolongación secundarios horquillados por lo que dicha detección implica la detección del marcador detectable separado de la molécula inactivadora.

8. El método de la reivindicación 4, en el que

(a) (i) la segunda sonda de oligonucleótidos comprende adicionalmente una porción de detección unitaq, formando de este modo secuencias producto ligadas que comprenden la porción 5' específica de cebador, las porciones específicas de la diana, la porción de detección unitaq y la porción 3' específica de cebador, (ii) el primer cebador de oligonucleótidos comprende adicionalmente una sonda de detección unitaq que es complementaria a la porción de detección unitaq de la secuencia producto ligada, y una molécula inactivadora y un marcador detectable separados por dicha sonda de detección unitaq, y (iii) los productos de prolongación primarios formados durante dicho sometimiento comprenden el marcador detectable, la sonda de detección unitaq, la molécula inactivadora, la porción 5' específica de cebador, las porciones específicas de la diana, la porción de detección unitaq y la porción 3' específica de cebador, comprendiendo dicho método adicionalmente:

someter productos de prolongación primarios a condiciones eficaces para que la sonda de detección unitaq de un producto de prolongación particular se hibride con su porción de detección unitaq complementaria, formando de este modo productos de prolongación horquillados; y escindir la molécula inactivadora o el marcador detectable de la sonda de detección unitaq del producto de prolongación horquillado, por lo que dicha detección implica la detección del producto de prolongación horquillado marcado o el marcador detectable escindido; o en donde

(b) la segunda sonda de oligonucleótidos comprende adicionalmente una porción de detección unitaq, formando de este modo secuencias producto ligadas que comprenden la porción 5' específica de cebador, las porciones específicas de la diana, la porción de detección unitaq y la porción 3' específica de cebador, comprendiendo dicho método adicionalmente

proporcionar una o más sondas de detección unitaq, en donde cada sonda de detección unitaq se hibrida con una porción de detección unitaq complementaria y comprende una molécula inactivadora y un marcador detectable que están separados entre sí;

añadir la una o más sondas de detección unitaq a la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa; e hibridar la una o más sondas de detección unitaq con porciones de detección unitaq complementarias en la secuencia producto ligada o un complemento de la misma durante dicho sometimiento, por lo que la molécula inactivadora y el marcador detectable se escinden de la una o más sondas de detección unitaq durante dicho tratamiento de prolongación, por lo que dicha detección implica la detección del marcador detectable escindido; o en donde

(c) la segunda sonda de oligonucleótidos comprende adicionalmente una porción de detección unitaq, por lo que las secuencias producto de prolongación primarias formadas comprenden la porción 5' específica de cebador, las porciones específicas de la diana, la porción de detección unitaq y la porción 3' específica de cebador, comprendiendo dicho método adicionalmente

proporcionar una o más sondas de detección unitaq, en donde cada sonda de detección unitaq se hibrida con una porción de detección unitaq complementaria y comprende una molécula inactivadora y un marcador detectable que están separados entre sí;

proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos secundarios capaces de hibridarse con los productos de prolongación primarios;

mezclar la una o más sondas de detección unitaq, el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos secundarios, los productos de prolongación primarios y una polimerasa para formar una mezcla de reacción en cadena de la polimerasa secundaria;

someter la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa secundaria a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación, en el que la una o más sondas de detección unitaq se hibridan con sus porciones de detección unitaq complementarias de los productos de prolongación y los cebadores de oligonucleótidos secundarios se hibridan con los productos de prolongación primarios, y un tratamiento de prolongación, en el que los cebadores hibridados se prolongan formando de este modo productos de prolongación secundarios;

escindir la molécula inactivadora y/o el marcador detectable de la una o más sondas de detección unitaq hibridadas durante dicho tratamiento de prolongación, por lo que dicha detección implica la detección del marcador detectable escindido; o en donde

(d) el método comprende adicionalmente ocultar las sondas de oligonucleótidos no ligadas de la muestra que comprenden secuencias producto ligadas antes de dicho sometimiento para impedir la prolongación o la amplificación de la sonda de oligonucleótidos no ligada.

9. El método de la reivindicación 1, en el que las sondas de oligonucleótidos primera y segunda del uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos comprenden adicionalmente unas porciones marcadoras primera y segunda, respectivamente, en donde las porciones marcadoras primera y segunda de un conjunto de sondas de oligonucleótidos son complementarias entre sí, y en donde las porciones marcadoras primera y segunda para cada conjunto de sondas de oligonucleótidos diferente tienen secuencias de nucleótidos diferentes, comprendiendo dicho método adicionalmente:

someter la muestra, después de dicha ligadura, a condiciones eficaces para que las porciones marcadoras primera y segunda de una secuencia producto ligada particular se hibriden, formando de este modo secuencias producto ligadas horquilladas; y

5 eliminar las sondas de oligonucleótidos no ligadas de la muestra después de dicho sometimiento, opcionalmente en donde la primera sonda de oligonucleótidos del conjunto de sondas comprende adicionalmente una porción 5' específica de cebador y la segunda sonda de oligonucleótidos en un conjunto de sondas comprende adicionalmente una porción 3' específica de cebador, comprendiendo dicho método adicionalmente:

10 proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos, comprendiendo cada conjunto (a) un primer cebador de oligonucleótidos que comprende la misma secuencia de nucleótidos que la porción 5' específica de cebador de la secuencia producto ligada y (b) un segundo cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la porción 3' específica de cebador de la secuencia producto ligada;

15 mezclar, después de dicha digestión, las secuencias producto ligadas, el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos y una ADN polimerasa para formar una mezcla de reacción en cadena de la polimerasa; y someter la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa formando de este modo productos de prolongación primarios, por lo que dicha detección implica la detección de los productos de prolongación primarios, opcionalmente en donde uno de los cebadores de oligonucleótidos primero o segundo de un conjunto de cebadores comprende un marcador detectable, por lo que dicha detección implica la detección de productos de prolongación primarios marcados.

20 10. El método de la reivindicación 4, en el que el extremo 5' de la primera sonda de oligonucleótidos se acopla al extremo 3' de la segunda sonda de oligonucleótidos, formando de este modo una sonda de oligonucleótidos acoplada, formando dicha sonda de oligonucleótidos acoplada una secuencia producto ligada circular que comprende la porción 5' específica de cebador, las porciones específicas de la diana y la porción 3' específica de cebador, opcionalmente en el que la sonda acoplada comprende adicionalmente

30 a) un bloqueante de la polimerasa dentro de la porción donde el extremo 5' de la primera sonda de oligonucleótidos se acopla al extremo 3' de la segunda sonda de oligonucleótidos, y en donde durante dicho sometimiento se forman productos de prolongación no circularizados, o  
 b) un nucleótido o un análogo de nucleótido escindibles dentro de la porción donde el extremo 5' de la primera sonda de oligonucleótidos se acopla al extremo 3' de la segunda sonda de oligonucleótidos, y en donde durante dicho sometimiento se forman productos de prolongación no circularizados, o  
 35 c) un segmento que es complementario a la porción 3' específica de la diana, en donde, en ausencia de ligadura, la porción 3' específica de la diana de la sonda acoplada se hibrida con el segmento complementario para formar una sonda de oligonucleótidos acoplada horquillada, que opcionalmente comprende adicionalmente:

40 prolongar la porción 3' específica de la diana de la sonda de oligonucleótidos horquillada acoplada durante dicho sometiendo para formar una sonda de oligonucleótidos horquillada acoplada prolongada que ocluye la unión del segundo cebador de oligonucleótidos con su secuencia complementaria.

45 11. El método de la reivindicación 1, en el que el uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos comprenden adicionalmente una tercera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción diana específica de la diana, en donde las sondas de oligonucleótidos segunda y tercera de un conjunto de sondas se configuran para que se hibriden adyacentes entre sí en la secuencia de nucleótidos diana con una unión entre las sondas de oligonucleótidos segunda y tercera durante dicho contacto, y en donde, en un conjunto de sondas, la porción específica de la diana de la tercera sonda de oligonucleótidos tiene un nucleótido idéntico de solapamiento en la unión con la segunda sonda de oligonucleótidos en un conjunto de sondas que se elimina durante dicha escisión para permitir la ligadura entre las sondas de oligonucleótidos segunda y tercera en la unión para formar una secuencia producto ligada que comprende las sondas de oligonucleótidos primera, segunda y tercera de un conjunto de sondas.

50 12. El método de la reivindicación 1, en el que la una o más secuencias de nucleótidos diana son moléculas de ácido nucleico de baja abundancia que comprenden una o más inserciones, deleciones, translocaciones o mutaciones de bases de nucleótidos y/o bases de nucleótidos dañadas, opcionalmente en donde las moléculas de ácido nucleico de baja abundancia con una o más inserciones, deleciones, translocaciones o mutaciones de bases de nucleótidos y/o bases de nucleótidos dañadas se identifican y se distinguen de un exceso de moléculas de ácido nucleico en la muestra que tienen una secuencia de nucleótidos similar a la de las moléculas de ácido nucleico de baja abundancia pero sin la una o más inserciones, deleciones, translocaciones o mutaciones de bases de nucleótidos y/o bases dañadas, opcionalmente en donde

55 a) la primera sonda de oligonucleótidos comprende un nucleótido o un análogo de nucleótido desapareados en una posición de base que está a dos o tres bases de la unión entre las sondas de oligonucleótidos segunda y primera, o  
 60 b) la segunda sonda de oligonucleótidos comprende una o más bases de nucleótidos modificados con tiofosfato que están en posición 3' con respecto al nucleótido idéntico de solapamiento en la unión entre las sondas de

oligonucleótidos segunda y primera, o

c) la segunda sonda de oligonucleótidos comprende una o más bases de nucleótidos modificados con tiofosfato que están en posición 5' con respecto al nucleótido de solapamiento en la unión entre las sondas de oligonucleótidos segunda y primera, o

5 d) el número de copias de una o más secuencias de nucleótidos diana de baja abundancia se cuantifican con respecto al número de copias de un exceso de moléculas de ácido nucleico en la muestra que tienen una secuencia de nucleótidos similar a la de las moléculas de ácido nucleico de baja abundancia.

10 13. El método de la reivindicación 1, en el que la una o más secuencias de nucleótidos diana se cuantifican, opcionalmente

a) en el que la una o más secuencias de nucleótidos diana se cuantifican con respecto a otras secuencias de nucleótidos en la muestra o

15 b) se cuantifica el número de copias relativo de una o más secuencias de nucleótidos diana.

14. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente:

diagnosticar o pronosticar una patología basándose en dicha identificación, o

20 distinguir un genotipo o una predisposición a una enfermedad basándose en dicha identificación.

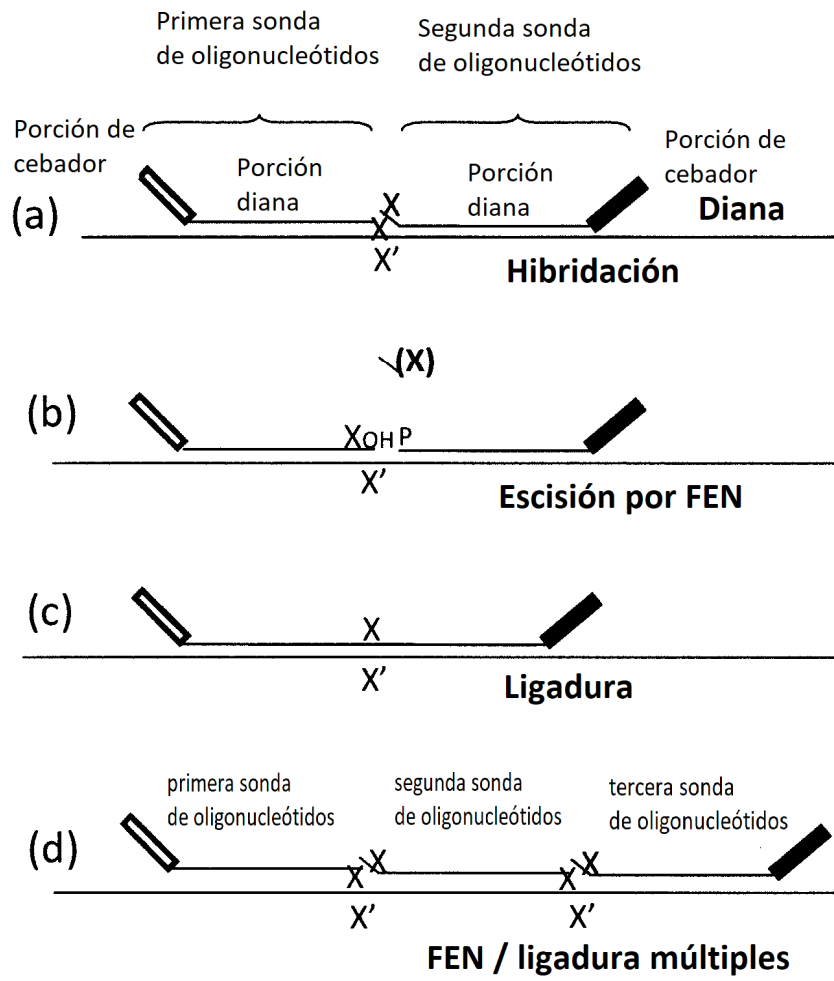


Figura 1

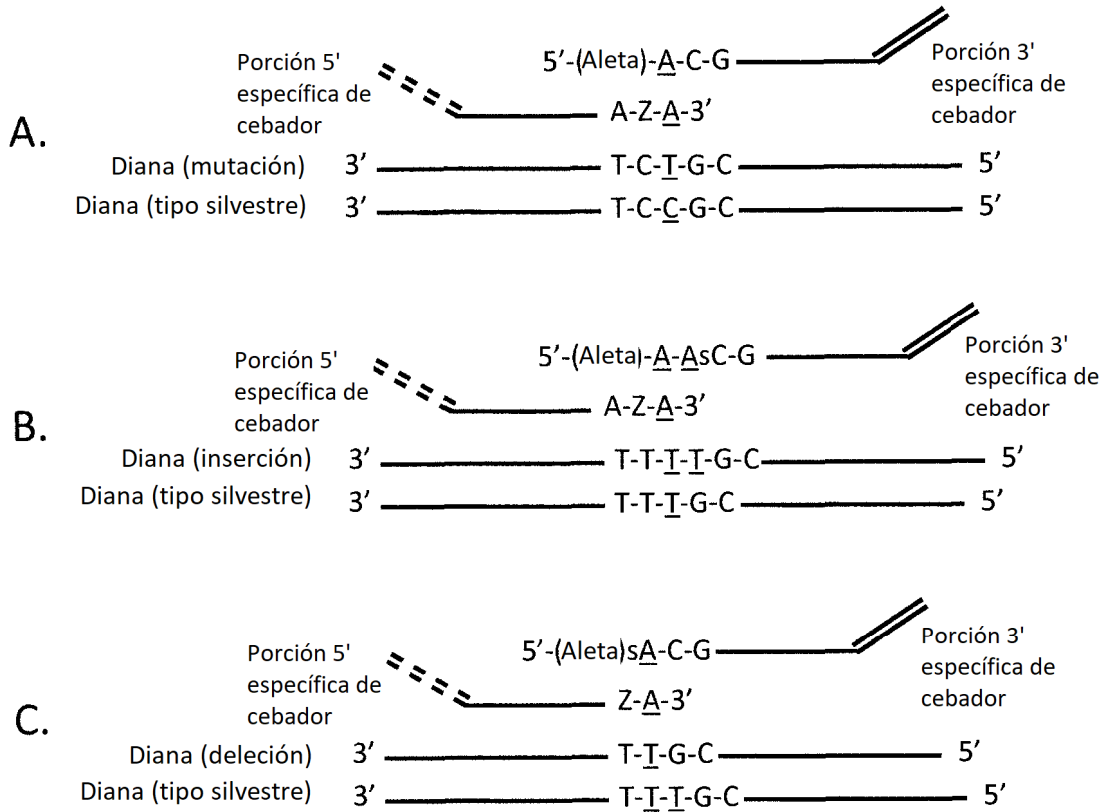


Figura 2

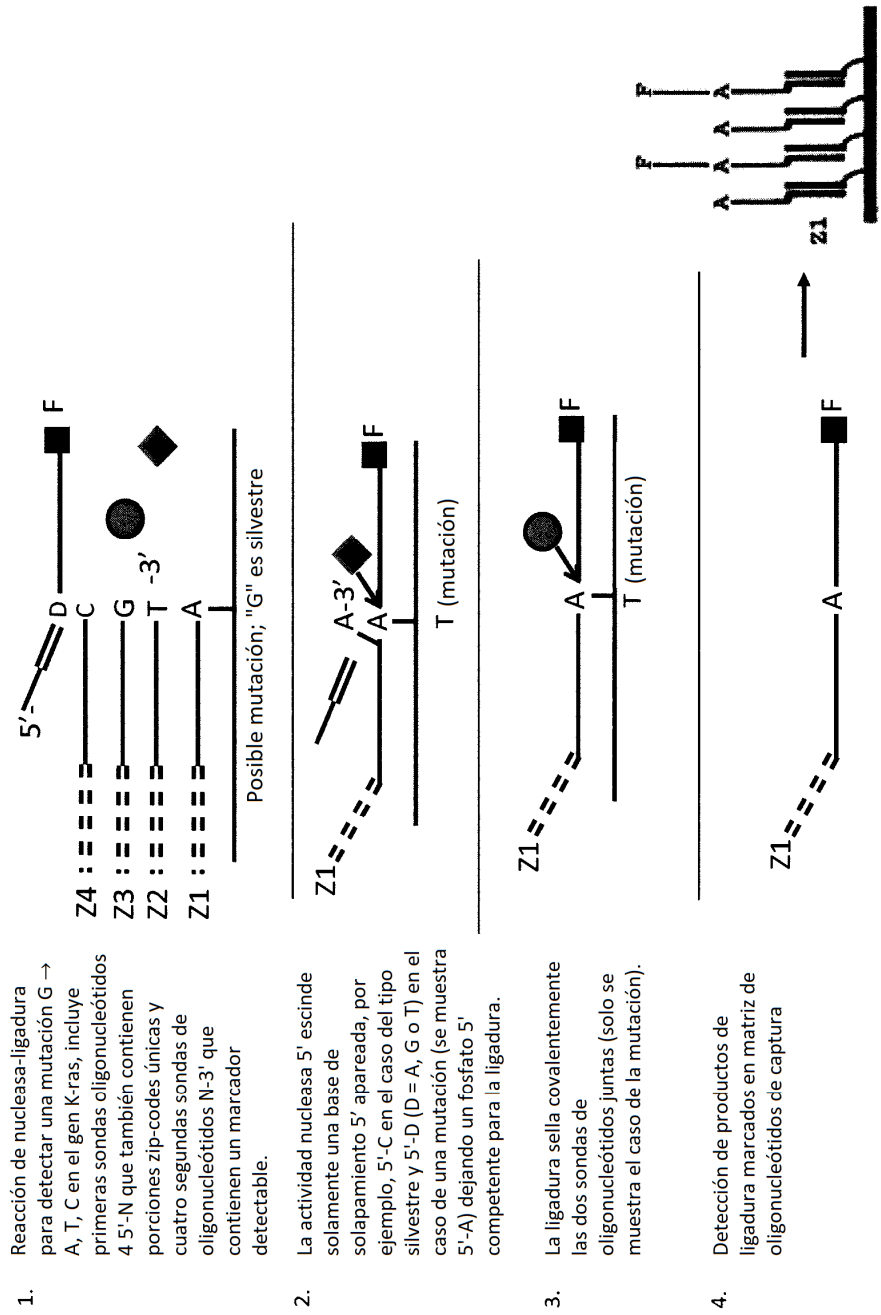
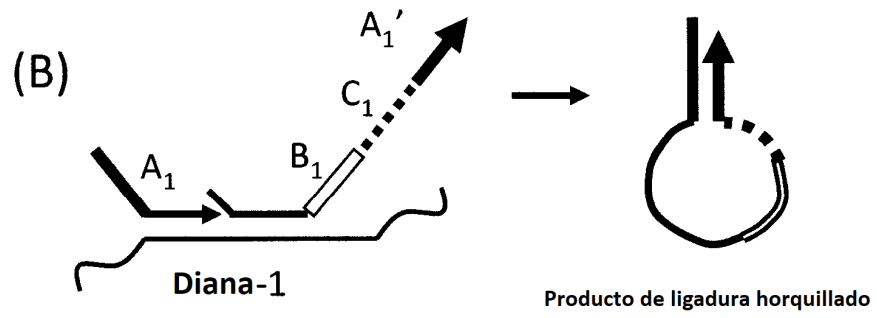
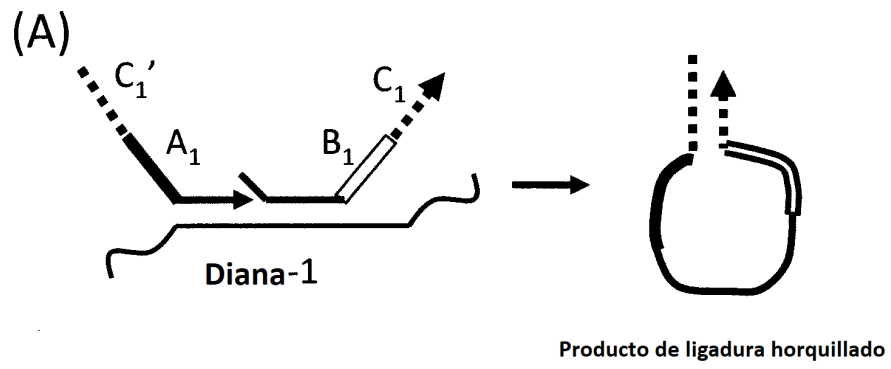


Figura 3



Figuras 4A-4B

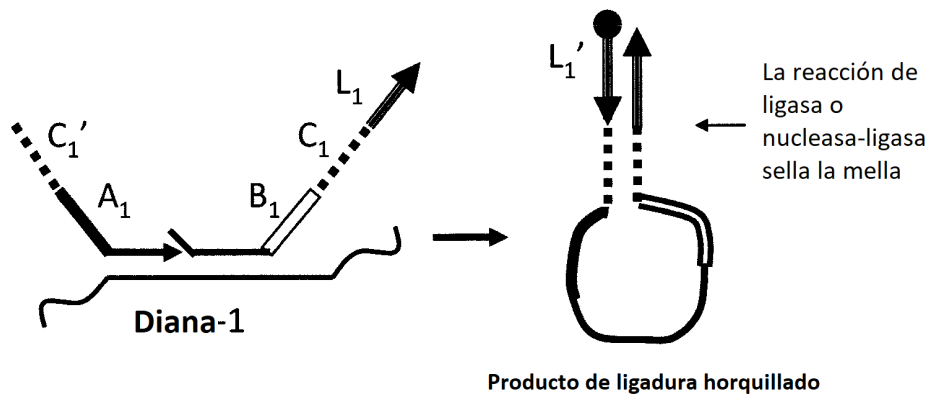


Figura 4C



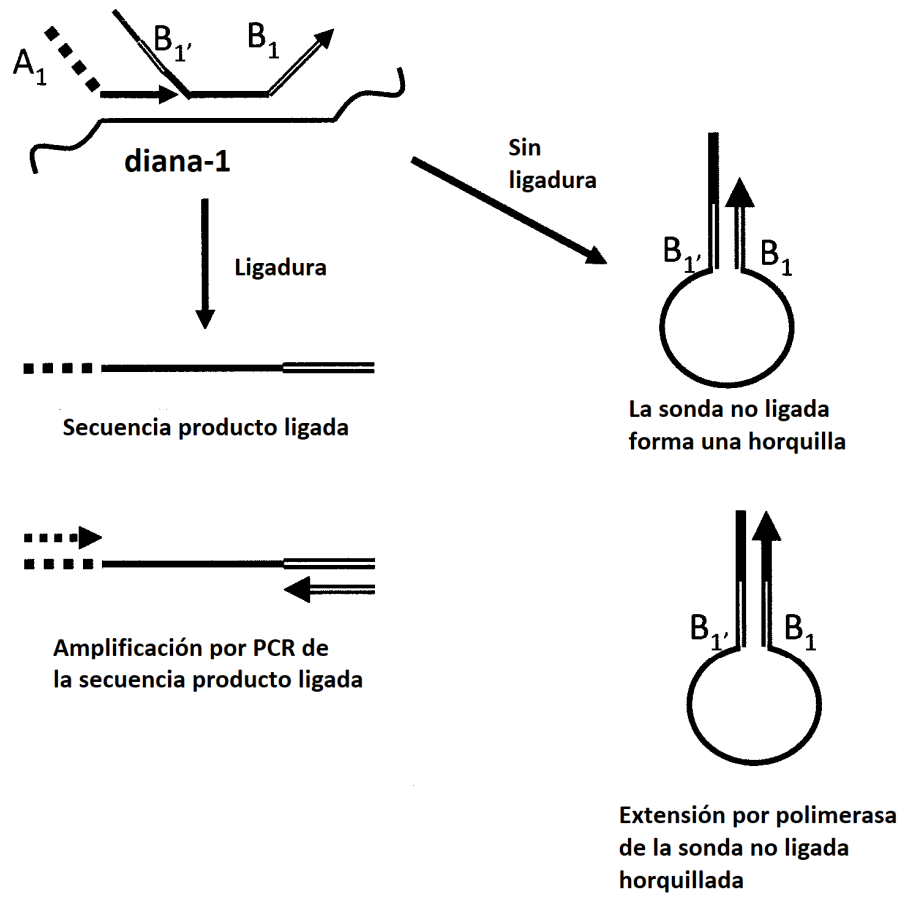
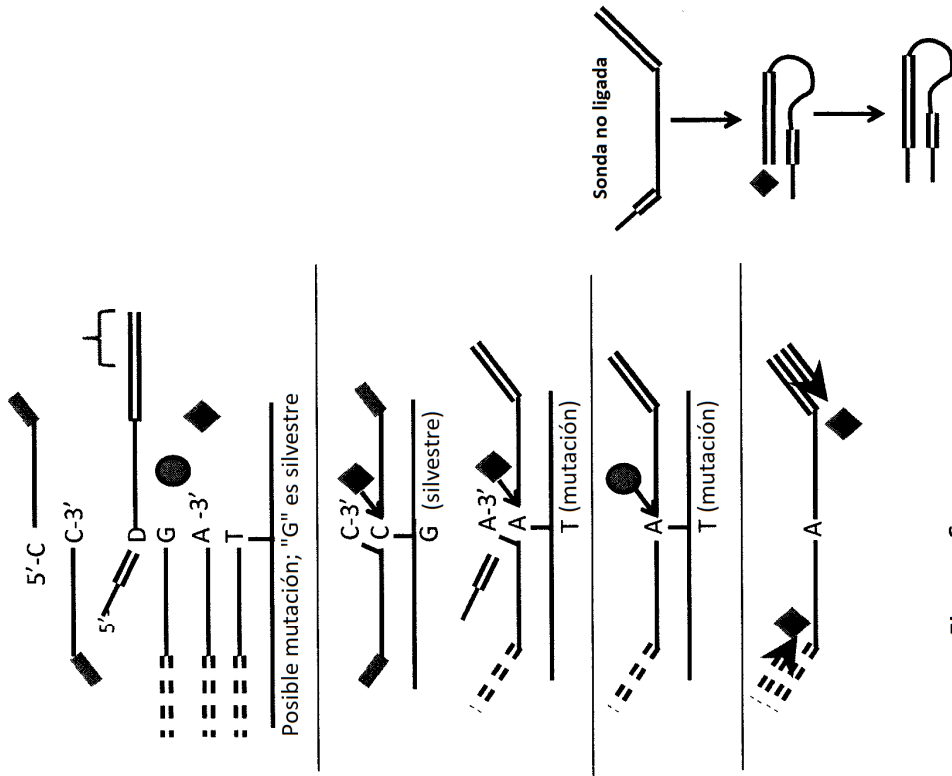


Figura 5



1. Reacción de nucleasa-ligadura para detectar una mutación G → A, T, C en el gen K-ras, incluye segundas sondas oligonucleótidos 4 5'-N, algunas contienen aletas 5' adicionales y cuatro primeras sondas de oligonucleótidos N-3'. Las sondas específicas de mutación contienen porciones específicas de cebador para la posterior amplificación, pero las sondas de tipo silvestre contienen secuencias cortas que no se amplificarán.

2. La actividad nucleasa 5' escinde solamente una base de solapamiento 5' apareada y una aleta adicional, por ejemplo, 5'-C en el caso del tipo silvestre y 5'-D (D = A, G o T) en el caso de una mutación (se muestra 5'-A) dejando un fosfato 5' competente para la ligadura.

3. La ligadura sella covalentemente las dos sondas de oligonucleótidos juntas (solo se muestra el caso de la mutación). Las sondas no ligadas forman una horquilla debido a las regiones complementarias de la aleta 5' y la porción 3' específica de cebador

4. La PCR amplifica solamente productos de ligadura para los alelos mutantes, pero no para los de tipo silvestre. Las sondas de oligonucleótidos segundas horquilladas no ligadas se prolongan mediante la polimerasa para ocultar la unión, y la posterior extensión o amplificación, por el cebador secundario.

Figura 6

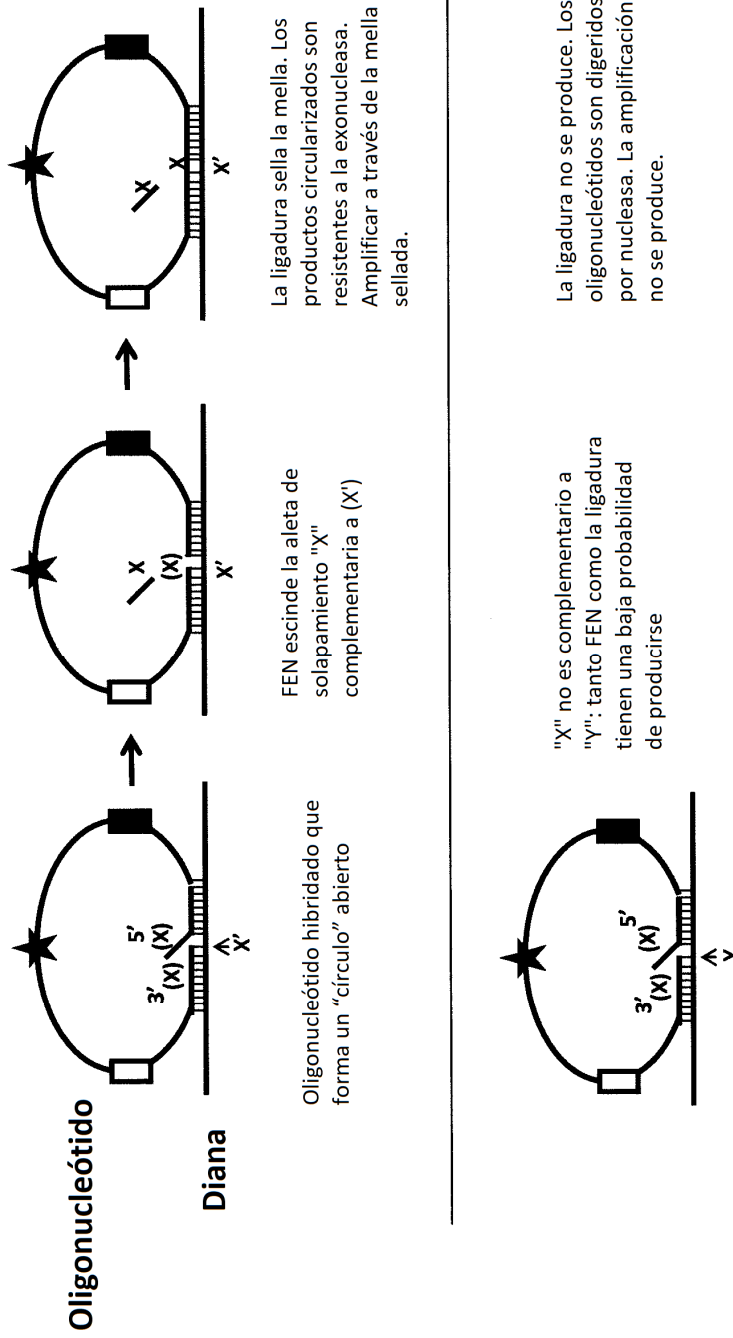


Figura 7

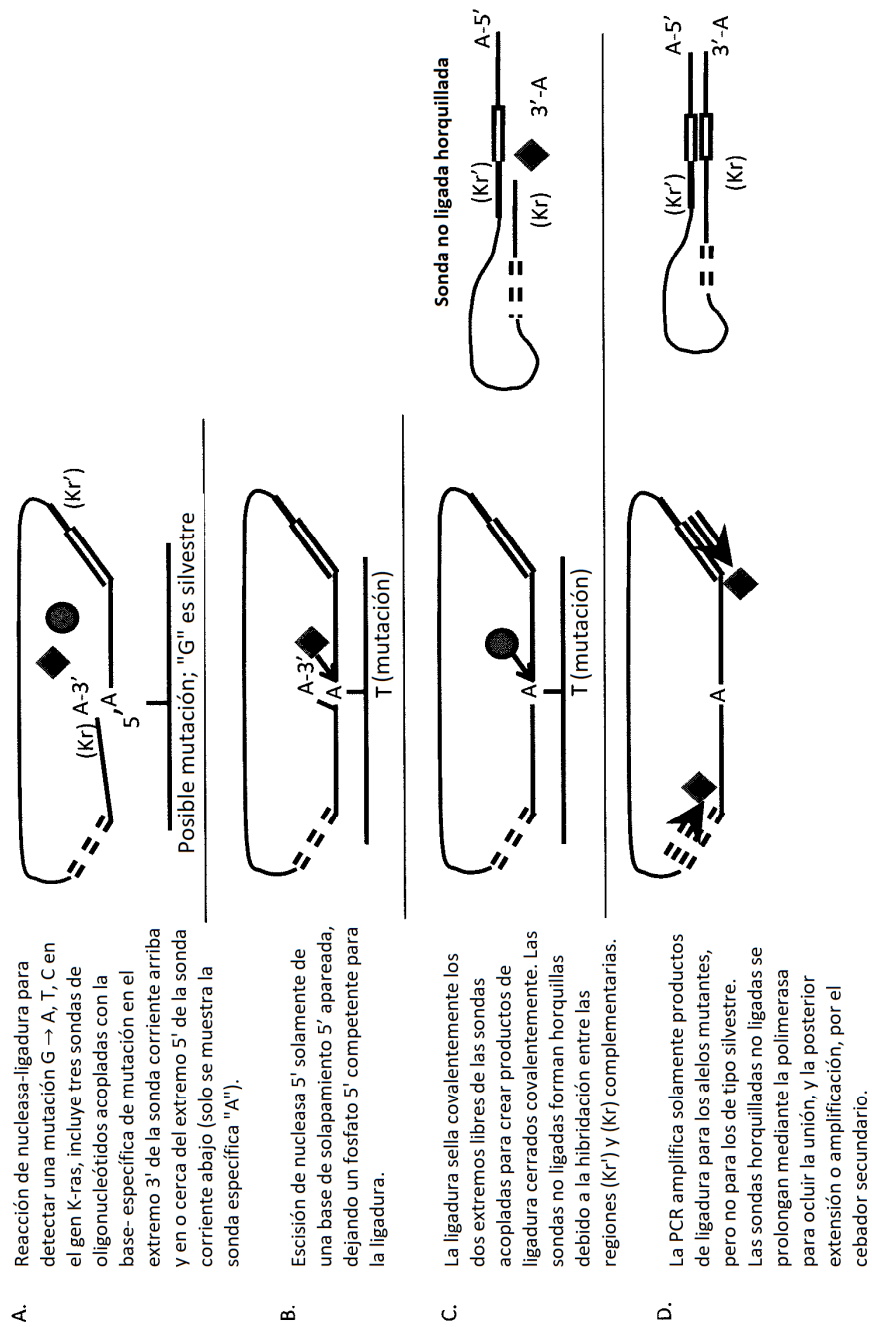
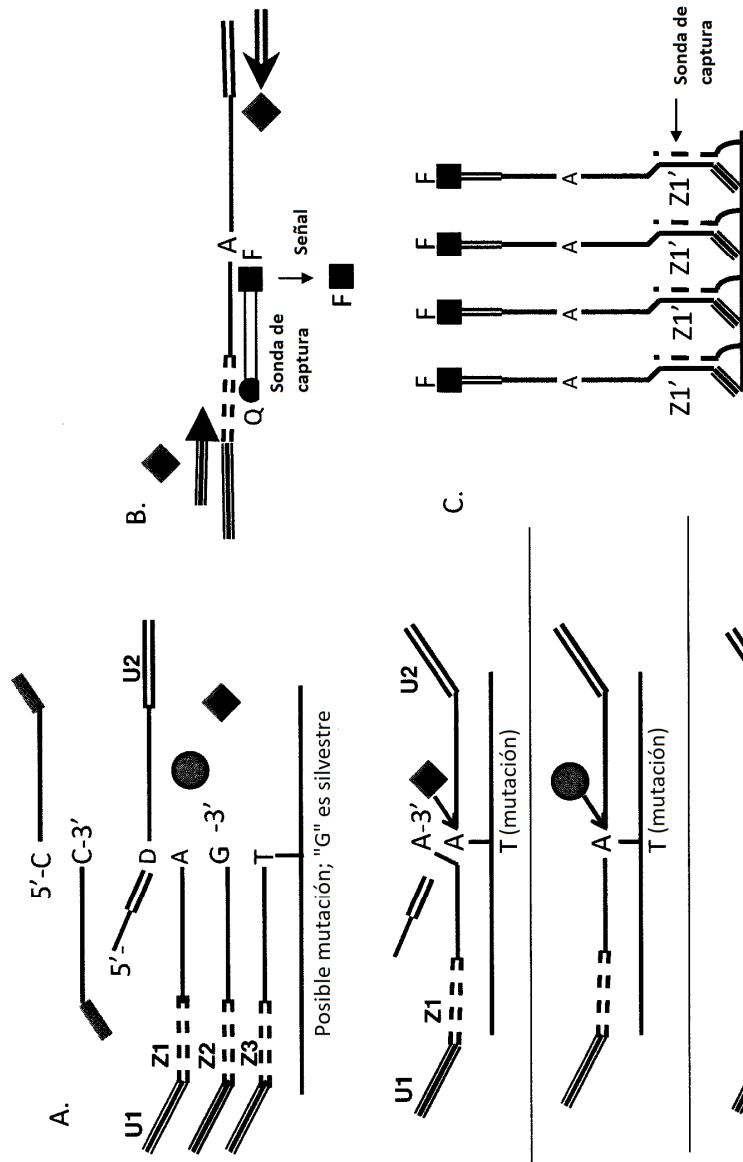


Figura 8



Figuras 9A-9C

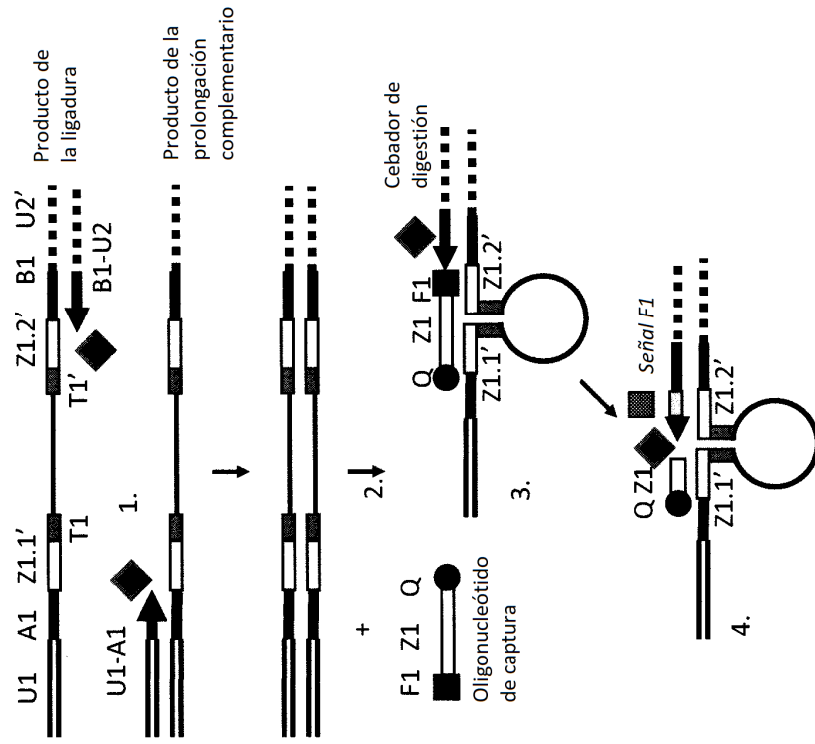


Figura 10

1. Cebado en el producto de la ligadura codificado por marcador y producto de prolongación complementario del mismo.
2. Productos de ADNbc de la PCR.
3. Formación de horquilla: después de que el ADNbc se funde y la temperatura disminuye se forma una horquilla con el tallo entre Z1.1' + Z1.2'.
4. La señal se genera por actividad nucleasa 5' de la polimerasa cuando prolonga el cebador, el "cebador de digestión". Tan pronto como la polimerasa ha atravesado Z1.2', el tallo corto entre Z1.2' y Z1.1' se desmorona y la polimerasa continúa prolongando para crear el producto de ADNbc.

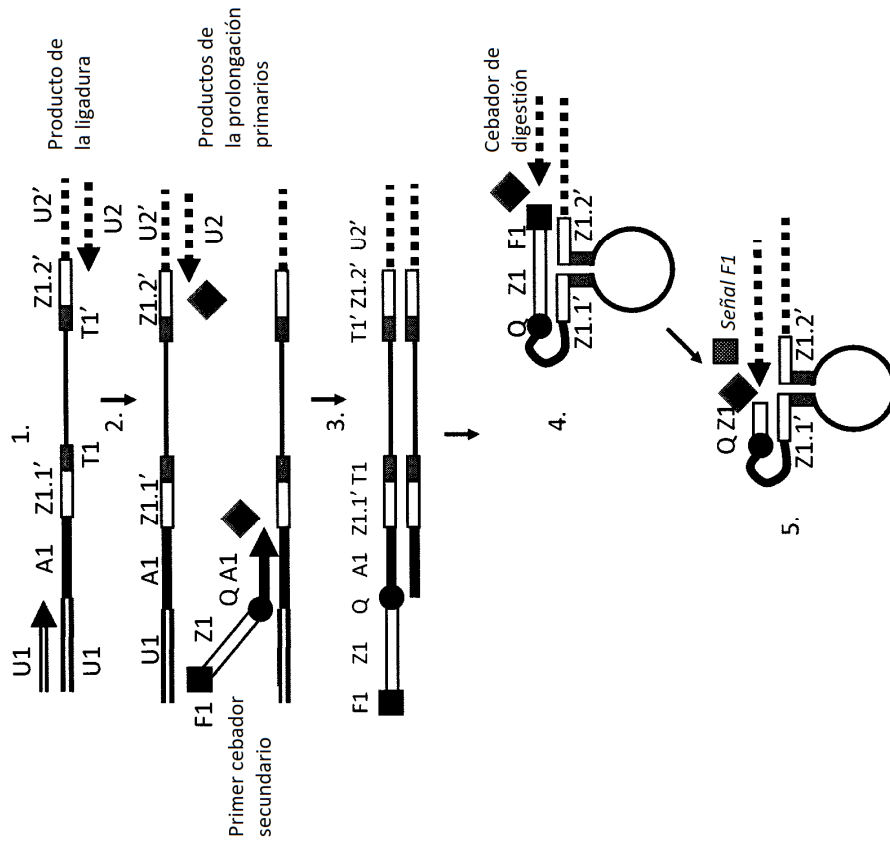
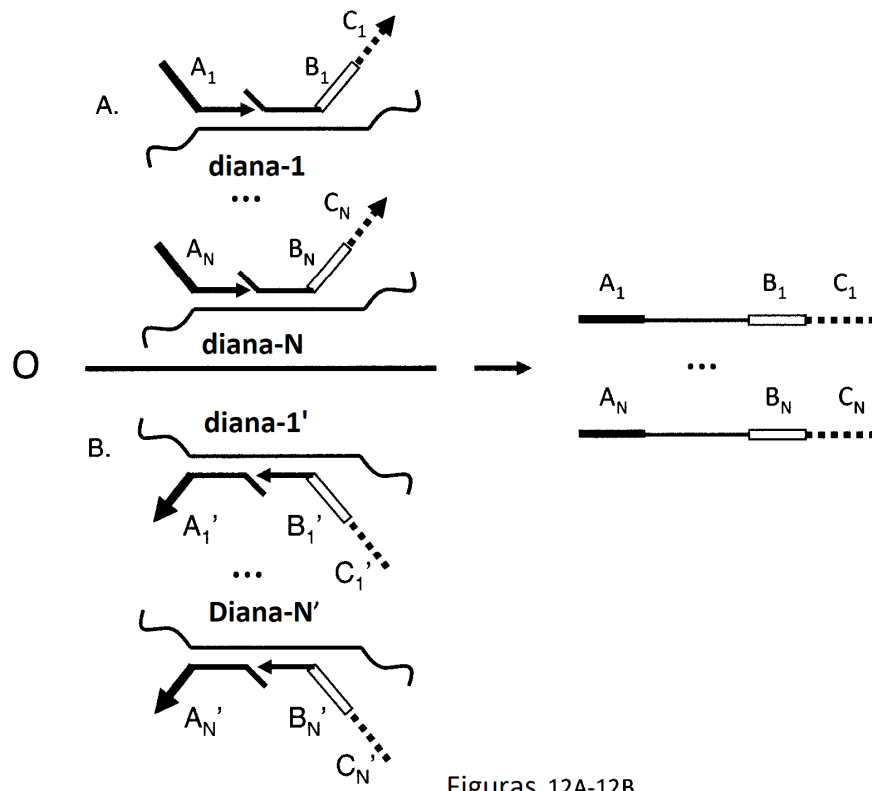


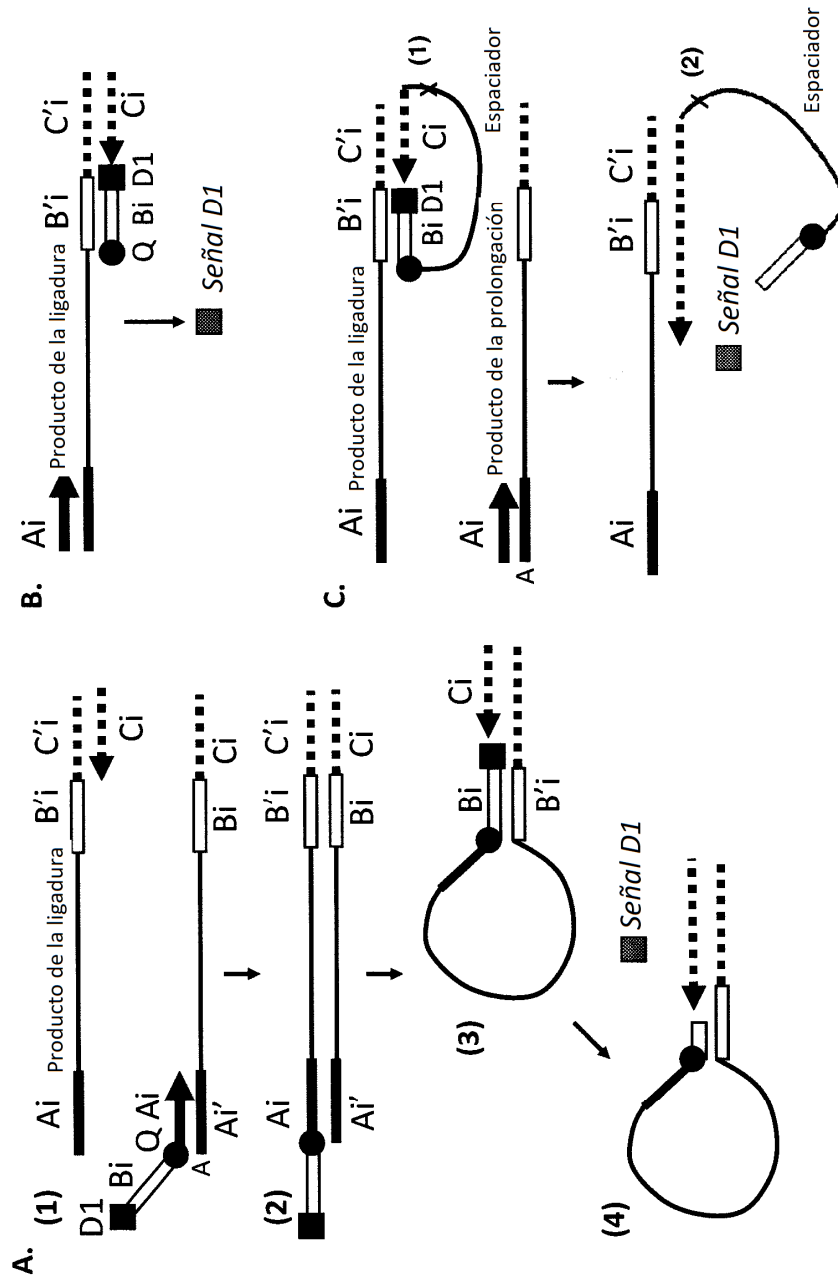
Figura 11

1. Amplificación por PCR universal del producto de la ligadura
2. Cebado en ambas cadenas de productos de la prolongación primarios de los productos de la ligadura.
3. Los productos de ADNbc de la PCR; el bloqueante de la polimerasa detiene la prolongación de la cadena inferior.
4. Formación de una horquilla doble: después de que el ADNbc se funde y la temperatura disminuye se forman dos horquillas con los tallos entre Z1 y Z1.1' + Z1.2'.
5. La señal se genera por actividad nucleasa 5' de la polimerasa cuando prolonga el cebador, el "cebador de digestión". Tan pronto como la polimerasa ha atravesado Z1.2', el tallo corto entre Z1.2' y Z1.1' se desmorona y la polimerasa continúa prolongando hasta que llega al bloqueante de la polimerasa para crear un producto de ADNbc.



Figuras 12A-12B





Figuras 13A-13C

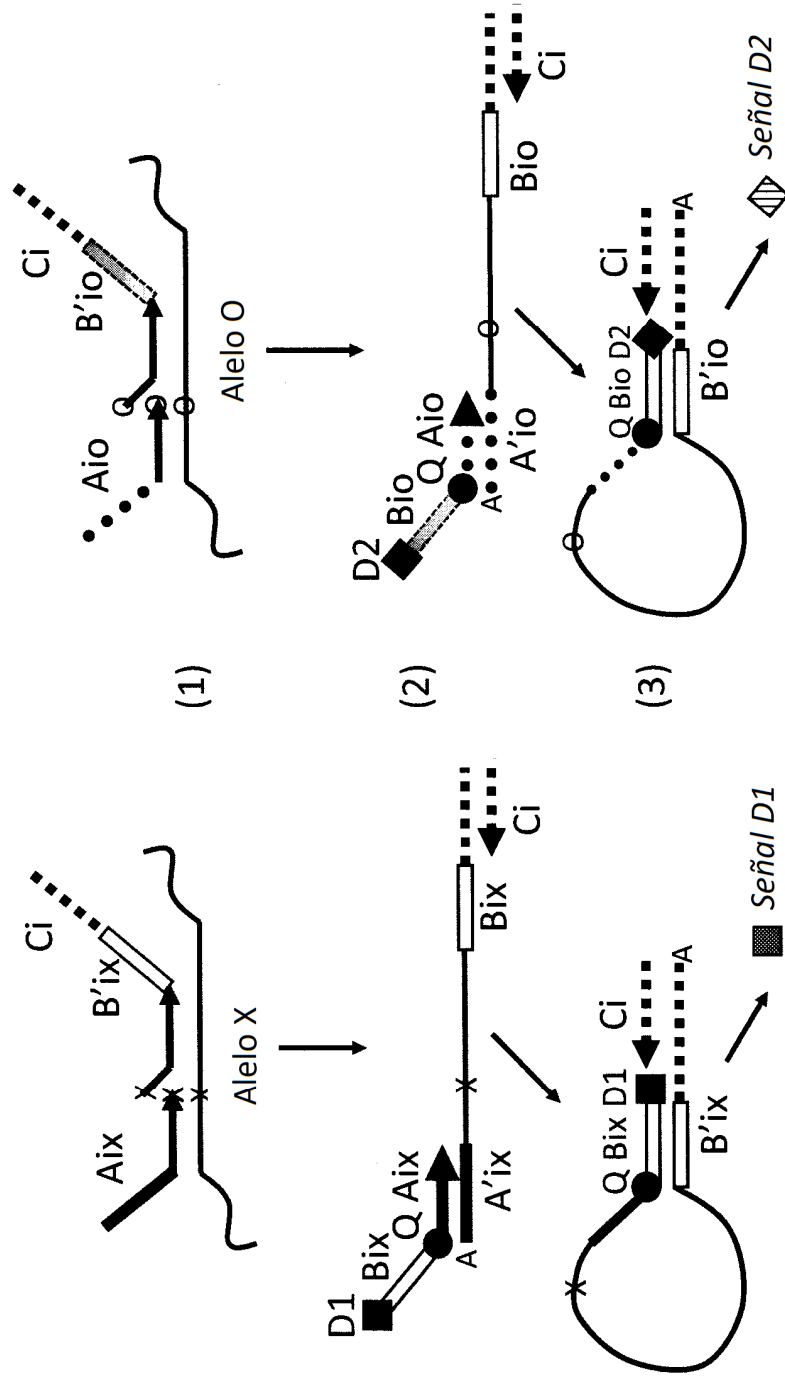


Figura 14

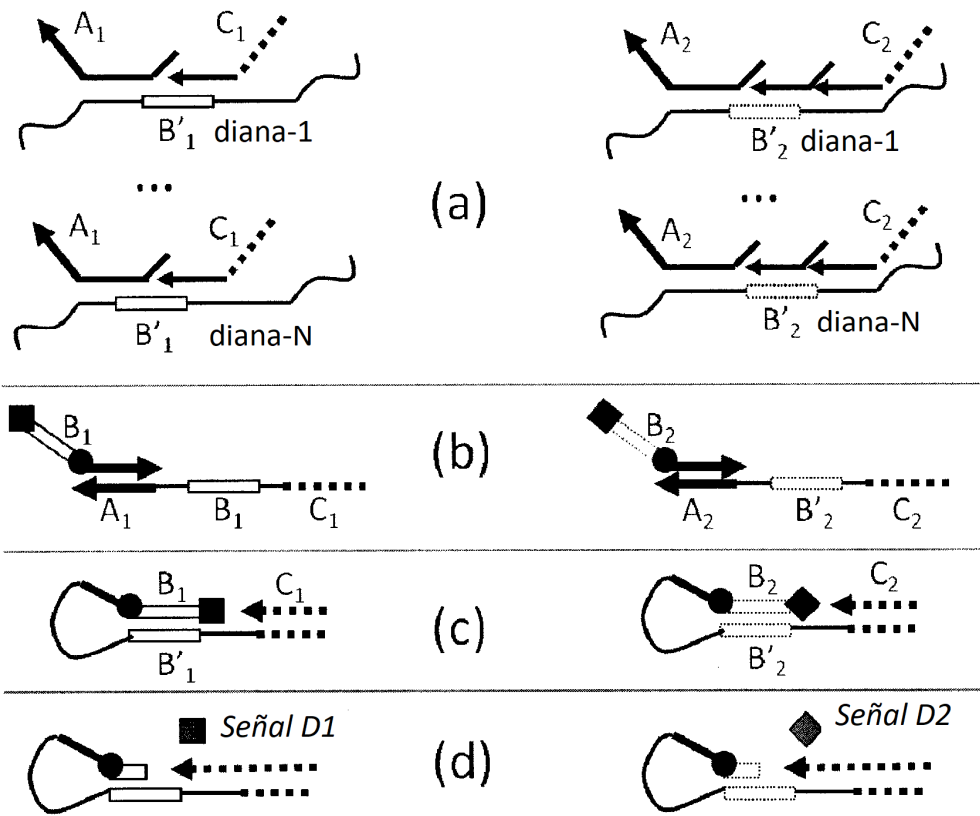
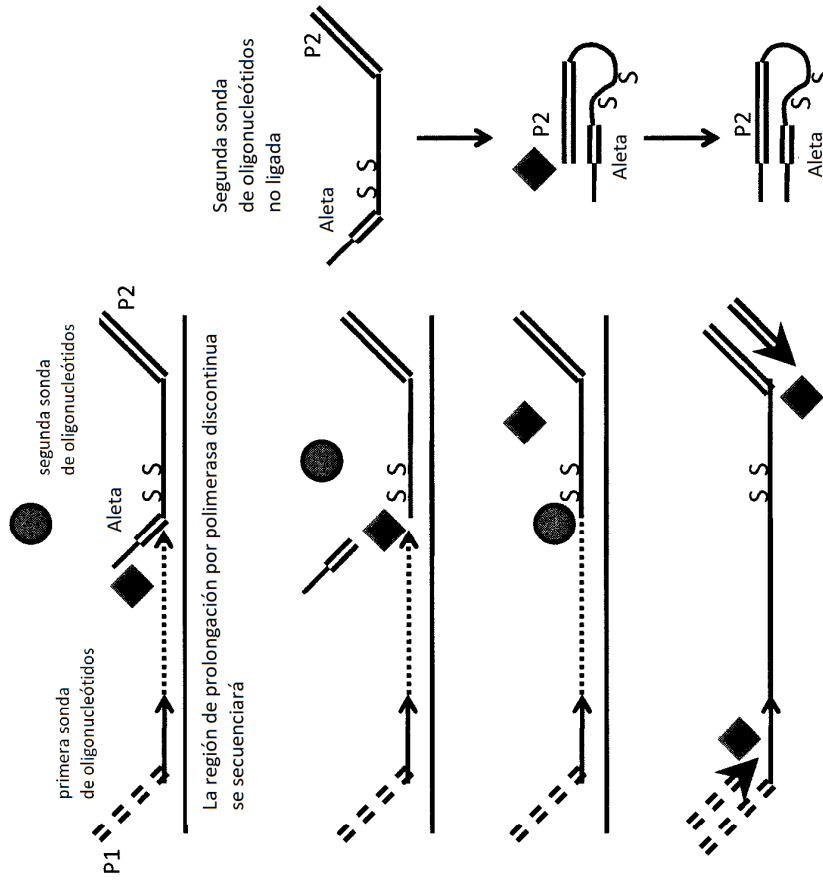


Figura 15



1. Las sondas de oligonucleótidos primera y segunda se hibridan con el molde de ADN. La primera sonda se prolonga hacia la segunda sonda, desplazando mediante la cadena una base interna apareada, que está en posición 5' con respecto a dos enlaces tiofosfato internos.
2. La actividad 5-nucleasa escinde en esa base interna, pero la actividad nucleasa adicional se detiene mediante enlaces tiofosfato internos, que no son escindibles.
3. La ligasa liga la primera sonda prolongada a la segunda sonda. Las segundas sondas no ligadas (que no se escindieron) forman horquillas que se prolongan mediante la polimerasa para ocluir la unión, y posterior extensión o amplificación, por el cebador secundario.
4. El ADN diana es adecuado para la secuenciación directa, o, como alternativa, para la secuenciación y amplificación por PCR.

Figura 16