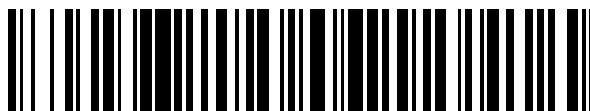


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 856**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2012** **PCT/GB2012/051694**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013** **WO13008042**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2012** **E 12737335 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017** **EP 2732050**

54 Título: **Amplificación de ácido nucleico**

30 Prioridad:

14.07.2011 GB 201112140

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

28.02.2018

73 Titular/es:

DNAE GROUP HOLDINGS LIMITED (100.0%)
Ugli Campus Block C 56 Wood Lane
London W12 7SB , GB

72 Inventor/es:

LAMURA, MAURIZIO;
WANG, ANGEL y
PATEL, ALPESH

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 656 856 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

Amplificación de ácido nucleico

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 **[0001]** La presente invención hace referencia a un método y un kit para amplificar una cantidad de ácido nucleico. La invención resulta particularmente relevante para técnicas de amplificación isotérmica. El ácido nucleico amplificado podrá ser detectado por un sensor.

ANTECEDENTES

- [0002]** Cuando se lleva a cabo un análisis genético, suele ser necesario amplificar el número de copias en la muestra, ya que el número presente en la misma es normalmente demasiado pequeño para ser detectado.
- 10 **[0003]** Esto se puede llevar a cabo, por ejemplo, recurriendo a la amplificación isotérmica o termocíclica. Las técnicas isotérmicas incluyen SDA, LAMP, SMAP, ICAN, SMART. La reacción se produce a una temperatura constante utilizando reacciones de desplazamiento de cadena. La amplificación puede completarse con un único paso, mediante la incubación de la mezcla de muestras, los cebadores y la ADN polimerasa con la actividad de desplazamiento de cadena, y extraerla a temperatura constante.
- 15 **[0004]** En otra técnica, llamada amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), se consigue una amplificación con un objetivo específico mediante el uso de 4 a 6 cebadores diferentes específicamente diseñados para reconocer de 6 a 8 regiones distintas del gen objetivo respectivamente. La LAMP aparece también descrita en la patente de Eiken Chemical EP2045337, "*Process for synthesizing nucleic acid*". Dichos métodos, por lo general, amplifican las copias de ácido nucleico 10^9 - 10^{10} veces en 15-60 minutos.
- 20 **[0005]** Además de los cebadores, las técnicas de desplazamiento de cadena utilizan compuestos con sulfatos y Tris (como el $MgSO_4$, NH_4SO_4) para mantener la funcionalidad de las enzimas.
- [0006]** El Tris es un compuesto orgánico (conocido formalmente como tris(hidroximetil)aminometano, con fórmula $(HOCH_2)_3CNH_2$). Las técnicas de desplazamiento de cadena, como la LAMP, utilizan el Tris como un tamponador, que mantiene la reacción con un pH óptimo. La concentración recomendada de Tris y sulfatos es de 20 mM o superior y 12-20 mM respectivamente.
- 25 **[0007]** Una vez se amplifica el ácido nucleico, un análisis de dicho ácido necesita una tecnología de detección secundaria, como espectrofotometría, turbidez, tiras reactivas de flujo lateral (LFD) o luciferasa. Sin embargo, dichas técnicas conocidas tienen inconvenientes. Los reactivos fluorescentes requieren etiquetado para admitir la fluorescencia UV, haciéndolo más caro. Además, los reactivos como el SYBR Green se asocian al ADN haciéndolo inherentemente carcinogénico; los test de Ames prueban que son tanto mutagénicos como citotóxicos. Por otra parte, el SYBR Green no es específico y se adhiere a cualquier ADN de doble cadena incrementando, así, la señal de fondo. La medición de la turbidez necesita de un instrumental caro para proporcionar una cuantificación. Y, por último, los reactivos utilizados en la LFD necesitan una conjugación secundaria que es susceptible de una detección no específica.
- 30 **[0008]** Las técnicas isotérmicas existentes no son aptas para sistemas que emplean la detección de pH. De este modo, existe la necesidad en este campo de un kit y un método para la amplificación de manera isotérmica de ácidos nucleicos y su detección de forma eficiente con un dispositivo seguro y barato. Sorprendentemente, los inventores han descubierto que los reactivos empleados pueden incrementar el rendimiento de la amplificación.

SUMARIO DE LA INVENCION

- 40 **[0009]** De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se provee de un kit de reactivos combinables con el fin de formar una mezcla para el uso en la amplificación de manera isotérmica de un ácido nucleico; dicho kit de reactivos comprende: un sulfato de magnesio, una sal de amonio cuaternario y una base. La capacidad tamponadora de la mezcla debe establecerse en un nivel inferior a una concentración esperada de protones liberados durante la amplificación dividido por un valor umbral de cambio del pH que debe detectarse por medio
- 45 de un sensor expuesto a la mezcla.
- [0010]** La capacidad tamponadora de la mezcla debe establecerse por debajo de la mitad de una concentración esperada de protones liberados durante la amplificación dividido por un valor umbral de cambio del pH que debe detectarse por medio de un sensor expuesto a la mezcla.
- 50 **[0011]** El valor umbral de cambio del pH a detectar debe suponer el límite de detección de dicho sensor. La capacidad tamponadora de la mezcla en las condiciones operativas para la amplificación debe de ser menor de 10 mM, preferiblemente inferior a 5 mM o menor de 1 mM.

[0012] La concentración de los agentes tamponadores en la mezcla debe ser inferior a 5 mM, aunque se prefiere que sea inferior a 3 mM, menor de 2 mM o menor de 1 mM.

[0013] La concentración de compuestos con sulfatos, si estuvieran presentes, debe ser inferior a 15 mM, preferiblemente menor de 10 mM, inferior a 8 mM y aún se prefiere si es menor de 5 mM o de 1 mM.

5 **[0014]** La concentración de la sal de amonio cuaternario, preferiblemente cloruro de amonio, debe estar entre 2 mM y 15 mM.

[0015] La concentración de la base establece el pH de la mezcla entre 6 y 9, preferiblemente entre 7 y 8,8, aunque se prefiere entre 8,3 y 8,6.

[0016] La base estará formada por NaOH, KOH o LiOH.

10 **[0017]** También deben utilizarse uno o más cebadores en la amplificación del ácido nucleico, que son específicos de alelo, de forma que la amplificación indica la presencia de un ácido nucleico objetivo.

[0018] La amplificación isotérmica debe ser una amplificación con desplazamiento de cadena, preferiblemente amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP).

15 **[0019]** La capacidad tamponadora de la mezcla debe enmascarar sustancialmente la cantidad esperada de protones liberados en la ausencia de amplificación.

[0020] El kit también debe presentar una enzima para el desplazamiento de cadena, nucleótidos y cebadores, preferiblemente donde al menos uno de ellos esté almacenado por separado respecto al resto de reactivos.

20 **[0021]** Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método de uso de un kit de reactivos para amplificación isotérmica, un sensor o indicador de pH, amplificando el ácido nucleico utilizando la amplificación isotérmica y detectando un cambio en el pH debido a la amplificación mediante el sensor o el indicador de pH.

[0022] El indicador de pH puede ser un tinte fluorescente o colorimétrico y el sensor de pH, un transistor de efecto campo sensible a iones (ISFET).

25 **[0023]** El método puede determinar un tiempo de reacción necesario para modificar el pH de la mezcla por encima de una cantidad predeterminada de cambio y cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico basado en el tiempo de reacción.

[0024] La mezcla debe estar en comunicación fluida con un electrodo de referencia, preferiblemente un electrodo de plata – cloruro de plata.

30 **[0025]** La mezcla puede comprender uno o más cebadores específicos de alelo contando con, al menos, una base complementaria a un polimorfismo de nucleótido simple objetivo (SNP) del ácido nucleico. El método, además, comprende la identificación de, al menos, una base del ácido nucleico dependiendo de si la amplificación se produce, como se detecta por medio del sensor o el indicador de pH.

[0026] La amplificación debe cambiar la concentración de protones de la mezcla en más de un 10 % de la capacidad tamponadora de la mezcla.

35 **[0027]** A tenor de un tercer aspecto de la presente invención, se facilita un método que comprende la amplificación de manera isotérmica de un ácido nucleico utilizando un novedoso kit de reactivos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0028] Las realizaciones específicas de la invención se describirán a continuación a modo de ejemplo, únicamente con referencia a las figuras a las que acompañan, en las que:

40 - La Figura 1 muestra una serie de reacciones químicas en una técnica de amplificación con desplazamiento de cadena como la LAMP.

- La Figura 2 refleja una vista de perfil de un ISFET expuesto a una muestra.

- La Figura 3 ilustra una vista de perfil de un sistema de detección de pH.

- La Figura 4 presenta un diagrama de flujo de un método para la supervisión de la amplificación de una muestra de ADN para (opción A) identificar el ADN o (opción B) calcular la cantidad de ADN.

45 - La Figura 5 recoge una tabla de capacidad tamponadora de los reactivos en una fórmula normal de LAMP.

- La Figura 6 representa una tabla en la que se muestra la capacidad tamponadora de diferentes concentraciones de NH_4Cl .

- La Figura 7 muestra una tabla con una curva estándar para la cuantificación de ADN en una muestra.

5 **[0029]** Los medios de amplificación LAMP convencionales utilizan ADN polimerasas con actividad de desplazamiento bajo condiciones de análisis estándar como: 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5 mM MgSO_4 , 0,1% Triton X-100, 0,8M Betaína, ADN/ARN, dNTP y Bst polimerasa.

[0030] Los inventores descubrieron que dichos reactivos convencionales no permiten la detección por medio de sensores de pH principalmente por su habilidad para enmascarar la producción de protones durante la amplificación.

10 **[0031]** De hecho, todos estos constituyentes tienen un pKa diferente, lo que significa que presentan un impacto distinto en la capacidad tamponadora de la mezcla.

[0032] Entre los reactivos mencionados anteriormente, el TrisHCl muestra la capacidad de absorber iones contrarios (H^+ y OH^-) con el fin de ayudar a mantener la solución en un nivel de pH estable con un índice óptimo para que la polimerasa actúe.

15 **[0033]** Los inventores hallaron que reemplazando el TrisHCl por NaOH se reduce la capacidad tamponadora mientras que se configura el pH allí donde la polimerasa (como la Bst) puede funcionar. Además, el NaOH hace que las dos cadenas del ADN de doble cadena estén vinculadas de forma menos estricta, permitiendo el desplazamiento de la polimerasa para separarlas de manera más fácil, y así acelerar la reacción e incrementar la eficiencia de la enzima para el desplazamiento de cadena.

20 **[0034]** Adicionalmente, los sensores electrónicos, como los ISFETs, utilizan electrodos de referencia como el platino, el Ag/AgCl, el cloruro de mercurio, etc. Algunos de estos materiales, en particular los electrodos Ag/AgCl, reaccionan con estos reactivos estándar. Por ejemplo, con electrodos Ag/AgCl, Tris forma un complejo Tris-Ag en el electrodo que deteriora el rendimiento de Ag/AgCl y los reactivos que contienen sulfatos pueden contaminar el electrodo Ag/AgCl.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0035] Un sistema preferido que utiliza el presente método comprende un sensor o indicador de pH, una estructura de microfluidos, una muestra de ácido nucleico, reactivos y un electrodo de referencia cuando se desea establecer un voltaje potencial de la muestra. Los reactivos y la muestra aparecen combinados en un fluido que posibilita la amplificación. Se liberan protones durante dicha amplificación y el cambio en el pH se mide con un sensor o

30 **[0036]** Preferiblemente, el sensor o indicador de pH será un ISFET (transistor de efecto campo sensible a iones). Se muestra en la Figura 3, en la que el sensor(es) de pH 3 puede estar formado por uno o más transistores de efecto campo sensibles a iones (ISFET) o un microchip CMOS 7, disponiendo de cámaras para microfluidos 8 definidas mediante vacíos en el sustrato 2. Los reactivos y la muestra de ácido nucleico deben combinarse antes o después de añadirse a una o más cámara(es) expuestas al ISFET(s). Cada ISFET emite una señal eléctrica que se supervisa mediante un procesador de señales. La película pasivante del ISFET se puede funcionalizar para que sea sensible a los protones (iones de hidrógeno). Cuando el ácido nucleico se amplifica, los protones se liberan y se detectan mediante un procesador de señales como un cambio en la emisión eléctrica del ISFET.

40 **[0037]** En una realización alternativa, se debe utilizar un indicador de pH con el fin de detectar protones liberados durante la amplificación. Por ejemplo, el indicador de pH debe ser un tinte fluorescente o colorimétrico que cambia las propiedades ópticas, como la longitud de onda emitida del tinte ya que el pH del fluido en contacto cambia. Algunos ejemplos de indicadores de pH incluyen la fluoresceína, la piranina y el tinte pHrodo (disponible de Life Technology).

45 **[0038]** La estructura de microfluidos debe estar formada por un pocillo, cámara o canal con el fin de recibir la muestra próxima al sensor o indicador y debe comprender medios para la entrega de la muestra en el sensor o indicador. La estructura de microfluidos también ayuda a reducir la difusión de los protones fuera del sensor o indicador. En las siguientes realizaciones, los ISFETs se utilizan para ilustrar el esquema de detección de pH, aunque también se puede recurrir a otros sensores de pH. La cámara debe definirse como una cavidad en un material, como por ejemplo el SU-8, que está depositada en la parte superior del microchip y selectivamente retirada para abandonar dichas cavidades.

50 **[0039]** La Figura 2 muestra un ISFET con una puerta flotante y una película de detección realizada con nitrato de silicio que está expuesta al electrolito fluido. Los ISFETs también se describen en la patente US 2004134798. Preferiblemente cada ISFET genera una señal de emisión normalizada en cuanto a la diferencia entre el ISFET y la señal de referencia. La señal de referencia debe derivarse de otro ISFET expuesto a una reacción negativa de

control o a un transistor de efecto de campo (FET) localizado en el chip pero no expuesto al pH fluctuante. Así, cualquier movimiento o ruido común en el chip será cancelado tomando la diferencia entre estas señales.

5 **[0040]** La reacción de amplificación preferida es una reacción de amplificación isotérmica, preferiblemente una reacción de desplazamiento de cadena. Como aquí se recoge, una reacción de desplazamiento de cadena viene proporcionada por una polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena y condiciones de reacción en las que dicho desplazamiento es posible. Entre los ejemplos de reacciones de desplazamiento de cadena se incluye la amplificación con desplazamiento de cadena (SDA), la amplificación con desplazamiento múltiple (MDA), la amplificación con círculo rodante (RCA) o amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP).

10 **[0041]** Como ejemplo, los pasos en la reacción química del método LAMP aparecen ilustrados en la Figura 1. En el paso 1, una plantilla de ADN de doble cadena a una temperatura elevada está en equilibrio dinámico. Los cebadores F2 pueden templar la cadena simple en una posición complementaria. En el paso 2, una polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena permite que los nucleótidos se extiendan a lo largo de la plantilla desde el 3' final de F2. La incorporación de nucleótidos supone una reacción que cuenta con iones de hidrógeno (protones) como uno de los subproductos. En el paso 3, el cebador F3 temple la región F3c en la plantilla y comienza el desplazamiento de las cadenas. La cadena superior es sintetizada en el paso 4 liberando más protones. La cadena inferior se convierte en una cadena simple (paso 5) que forma una horquilla mientras F1c temple F1 en el final 5' del paso 6. Al mismo tiempo, los cebadores BIP templen el otro extremo de la cadena y el nucleótido se extiende desde B2 liberando más protones. El cebador B3 desplaza las cadenas y promueve su extensión con el fin de crear la cadena doble mostrada en el paso 7. La estructura en el paso 8 presenta una doble horquilla final de la que se presenta una extensión y desplazamiento continuo para amplificar la plantilla. Como anteriormente, la extensión se asocia con la liberación de protones.

15 **[0042]** La polimerasa de desplazamiento de cadena utilizada en la reacción de amplificación isotérmica descrita en el presente documento puede elegirse de este grupo: DNA-polimerasa de Phi29, Klenow DNA-Polimerasa, Vent DNA-polimerasa, Deep Vent DNA-polimerasa, Bst DNA-polimerasa, DNA-polimerasa 90Nm(TM) y mutaciones y variaciones de las mismas.

[0043] El especialista apreciará que las concentraciones óptimas de reactivos dependerán de la selección de la polimerasa y de que alguna modificación a los reactivos preferidos siguientes suponga una práctica normal desde el conocimiento o la experimentación con la polimerasa. Comentarios sobre las condiciones apropiadas están disponibles en los productores de enzimas.

30 CONCENTRACIONES DE REACTIVO PREFERIDAS

[0044] El presente método no requiere ningún agente tamponador y se prefiere que haya los mínimos agentes tamponadores presentes. Un agente tamponador está representado por un ácido débil y su base conjugada utilizada con el fin de mantener la acidez (pH) de una solución próxima a un punto operativo elegido de manera que el pH varíe insignificadamente cuando se añada una pequeña cantidad de ácido fuerte o base, o en el presente caso, cuando una pequeña cantidad de protones se libere durante la incorporación de nucleótidos. Un agente tamponador es un compuesto que se añade a una mezcla con el objetivo principal de tamponar contra los cambios en el pH. Como aquí se utiliza, se trata de un compuesto cuyo propósito principal no es otro que tamponar o que su efecto tamponador sea mucho menor que el de otro compuesto en la mezcla que no sea un agente tamponador. Los agentes tamponadores para reacciones de amplificación de ácido nucleico suelen tener un valor pKa entre 6 y 8,5 y un rango tamponador entre 6 y 9. Por ejemplo, el amonio (NH₄⁺) tiene ciertas propiedades tamponadoras pero su principal función no es tamponar la mezcla; y, con un pKa de 9,24 operando en una mezcla de pH 8, no será un tampón muy fuerte en comparación con el Tris.

45 **[0045]** La elección de agente tamponador, enzima y pH inicial del sistema es independiente. Por ejemplo, mientras que el agente tamponador debe ser uno de los siguientes agentes tamponadores comunes (TAPS, bicina, Tris, tricina, TAPSO, HEPES, TES, MOPS, PIPES, cacodilato, SSC y MES), en una realización se utilizó Tris con la Bst enzima con un pH de 8,5. Se prefería una concentración del agente tamponador menor de 10 mM, menor de 8 mM, menor de 5 mM o menor de 1 mM. Los agentes tamponadores preferidos son Tris o HEPES.

50 **[0046]** Con el fin de reducir el efecto contaminante en el electrodo de referencia, la concentración de compuestos con sulfatos en el fluido combinado es menor de 15mM, preferiblemente menor de 10 mM, de 8 mM, de 5 mM o menor de 1 mM.

55 **[0047]** Se puede recurrir al cloruro de amonio en lugar del sulfato de amonio y aun así se consigue un buen rendimiento de amplificación. En general, otras sales cuaternarias también pueden sustituirse por cloruro de amonio. Las sales de amonio cuaternario están cargadas positivamente con iones poliatómicos de la estructura NR₄⁺, donde R es un grupo de alquilo o areno. El hidrocloreto de guanidino y el cloruro de amonio son ejemplos de sales de amonio cuaternario.

[0048] Preferiblemente el índice de concentración de sales de amonio cuaternario en el fluido combinado es mayor de 2 mM, de 5 mM o de 8 mM. No obstante, el amonio (NH₄⁺) tiene cierta capacidad tamponadora, por lo que la

concentración final de los compuestos de amonio, como el cloruro de amonio, en el fluido combinado necesita minimizarse para así mantener un rendimiento óptimo de amplificación. Con el fin de reducir dicha capacidad tamponadora, la concentración de compuestos de amonio en el fluido combinado es menor de 15 mM, aunque preferiblemente menor de 10 mM.

- 5 **[0049]** El magnesio resulta de utilidad para la promoción de la incorporación de nucleótidos a la plantilla. La concentración de compuestos de magnesio (por ejemplo, el sulfato de magnesio) en fluidos combinados se prefiere que sea superior a 0,5 mM, a 1 mM, a 2 mM o mayor de 4 mM. La concentración de iones de magnesio en fluidos combinados depende de la concentración de dNTP, plantilla y cebadores. En general, el índice preferido de dNTP al sulfato de magnesio en el fluido combinado es menor de 1:2, de 1:3, de 1:4 o menor de 1:5.
- 10 **[0050]** Puesto que la alta concentración de cloruro ayuda al electrodo Ag/AgCl, se añade una sal monovalente, como el cloruro de sodio o el cloruro de potasio, siendo la concentración de iones de cloruro preferiblemente superior a 10 mM, superior a 20 mM, a 30 mM, a 40 mM o superior a 50 mM. En una realización, la concentración de iones de cloruro en el fluido se encuentra entre 40 mM y 60 mM.
- 15 **[0051]** Para establecer el pH de inicio del fluido, una base, como NaOH, LiOH o KOH, se añade al fluido. La concentración de la base está diseñada para establecer el pH de la solución combinada entre 6 y 9, aunque preferiblemente entre 7 y 8,8, o mejor entre 8 y 8,6, siendo deseables estos rangos de pH para que determinadas encimas puedan operar. Para la Bst polimerasa, el pH de inicio deseado es superior a 7, preferiblemente superior a 8,2 y menor de 8,8, aunque preferiblemente menor de 8,6.
- 20 **[0052]** La concentración de otros reactivos debe mantenerse en cantidades normales. Véase Notomi T. y otros, *Nucleic Acids Res.*, 15 junio 2000, 28 (12): E63. Por ejemplo, en una realización, la cantidad de Bst polimerasa es, al menos, 0,3 unidades por microlitro de fluido combinado; la concentración de betaína es de 0-1,5 M, preferiblemente de 0,8-1 M; y la concentración total de cebadores se encuentra entre 2 mM y 6,2 μ M.
- 25 **[0053]** Se ha probado que las concentraciones de reactivos anteriores proporcionan un buen rendimiento de la amplificación y, al mismo tiempo, una baja capacidad tamponadora de manera que se puede utilizar un sensor de pH con el fin de detectar protones liberados durante la amplificación del ácido nucleico.
- 30 **[0054]** El proceso puede tener lugar a una temperatura establecida, reduciendo el desvío de la señal del sensor asociado con el termociclado, haciendo que las señales de los sensores sean más estables. Adicionalmente, el proceso es altamente compatible con plataformas semiconductoras. Por ejemplo, la temperatura enzimática óptima puede conseguirse y controlarse con elementos calefactores en chip y sensores de temperatura; existe menos preocupación en cuanto a la expansión y fatiga térmica asociadas con el termociclado; y los reactivos se escogen de manera que no afecten a los electrodos en el microchip.
- 35 **[0055]** Normalmente, los métodos isotérmicos requieren una temperatura establecida, que viene determinada por los reactivos que se van a utilizar. Por ejemplo, en la LAMP las enzimas funcionan mejor entre 60 y 65°C. De manera ventajosa, los reactivos/tampón de las realizaciones preferidas descritas en el presente documento permiten una temperatura de funcionamiento más amplia.
- 40 **[0056]** Debido a que la amplificación isotérmica, a diferencia del termociclado, no implica pasos discontinuos, cada paso doblando el ADN, es difícil estimar cuánta amplificación ha tenido lugar en un tiempo dado. Como resultado, dichos métodos de amplificación isotérmica normalmente estimulan una amplificación excesiva con el efecto secundario de que el nivel de la amplificación (no específica) de fondo o el nivel de fondo fluorescente es muy alto.
- 45 El presente método posibilita la detección a tiempo real del proceso de amplificación de manera que el proceso puede detenerse cuando se ha conseguido un rendimiento suficiente. En el caso en el que el presente método tenga lugar en un microchip, teniendo el fluido supervisado por un sensor de pH y calentado por medio de elementos en la superficie del chip, la temperatura puede disminuirse o aumentarse hasta el punto en el que la amplificación pase a estar suspendida. Esto garantiza que exista suficiente ADN deseado más allá del ADN de fondo sin tener que esperar innecesariamente a asegurarse que se ha producido la amplificación suficiente.
- 50 **[0057]** Los reactivos vienen proporcionados en las concentraciones anteriores cuando están combinados. Algunos reactivos deben almacenarse por separado antes de realizar la mezcla para mantener estables sus propias condiciones solicitadas. Por ejemplo, la enzima debe almacenarse durante un largo plazo en una solución tamponadora de forma moderada separada de otros reactivos para garantizar la estabilidad de la enzima. Una vez que se mezcla con el resto de reactivos, el agente tamponador se disuelve lo suficiente para no enmascarar significativamente un cambio de pH. Además, los cebadores para genes específicos de interés deben proporcionarse en una solución aparte o en forma liofilizada. Las condiciones y concentraciones previas a la mezcla serán conocidas o deducibles por el experto teniendo en cuenta el reactivo que se va a utilizar.

APLICACIONES

- 55 **[0058]** Tal y como se ilustra en el diagrama de flujo de la Figura 4, una muestra de ADN puede prepararse y dividirse en una o diversas cámaras o pocillos. Cada cámara o pocillo está expuesto a un ISFET o un microchip.

El ADN se combina con los reactivos para la amplificación isotérmica mediada por bucle. Los siguientes son los agentes y concentraciones preferidas individualmente, en las que la combinación es el kit de reactivos más deseado:

- 5
 - Bst polimerasa de, al menos, 0,3 unidades por microlitro.
 - Una concentración de betaína de 1 M.
 - Una concentración total de cebadores de 5 uM.
 - Una concentración de sulfato de magnesio de 5 mM.
 - Una concentración de Tris de 1 mM.
 - Una concentración de sulfato de amonio de cero.
- 10
 - Una concentración de NaOH de 1,2 mM que establece el pH del fluido combinado en 8,5 pH.
 - Una concentración de cloruro de amonio de 5 mM.
 - Una concentración de cloruro de potasio de 50 mM.

[0059] Las señales del ISFET se toman de manera diferenciada con respecto a una referencia FET y se supervisan mediante un procesador de señales. La cámara y el fluido se calientan a 60°C mediante calentadores integrados en el microchip. Tras un periodo de reacción determinado, se debería haber producido, si es posible, la suficiente amplificación de la plantilla detectándose como un cambio en la señal del ISFET. La señal también puede supervisarse de manera continua para determinar cuándo la amplificación y, por tanto, el cambio de señal, ha cruzado un valor umbral.

DIAGNÓSTICO

- 20 **[0060]** El método debe utilizarse para identificar una o más bases en una cadena de ácido nucleico como se ilustra en una realización preferida, mediante la opción A de la Figura 4. La identificación debe producirse en una base o secuencia única. En el caso en el que se identifica una secuencia única, es posible identificar determinadas bases que están asociadas con las condiciones médicas y este conocimiento de las bases puede proporcionar un método para el diagnóstico. Ejemplos de bases de interés incluyen secuencias únicas, polimorfismo de nucleótido simple
- 25 (SNP), eliminaciones, inserciones, repeticiones cortas en tándem (STP) y mutaciones que deben ser inherentes o derivadas somáticamente. La detección de patógenos también es posible de forma que el método debe detectar la presencia de un organismo o cadena del organismo.

- 30 **[0061]** Los cebadores utilizados en la amplificación, como los FIP (cebador directo interno) y BIP (cebador inverso interno), pueden diseñarse para incluir o excluir la secuencia, SNP, o región STP. De esta forma, la amplificación o la falta de ella indica, pues, la presencia o ausencia de la base(s)/secuencia que se deben identificar.

- 35 **[0062]** En el sistema mostrado en la Figura 1, se pueden emplear dos o más cámaras o pocillos para llevar a cabo la amplificación simultánea del ADN. En cada pocillo se ha introducido un set diferente de cebadores, cada uno de los cuales adaptado para detectar una base diferente en la muestra de ADN. El ADN, por tanto, sólo se amplificará en presencia de un set de cebadores complementario, produciendo protones, y en otros no lo hará. Si solo una cámara experimenta la amplificación, se considerará el ADN homocigótico; es decir, que posee alelos idénticos (mutantes o de tipo natural) en ambos genes. En los casos en los que se produce amplificación en dos cámaras, se considerará el ADN heterocigótico; es decir, que presenta diferentes alelos (mutantes y de tipo natural) en los genes. Así, se puede determinar la identificación de la base(s) de la muestra de ADN mediante la supervisión de las señales de los ISFETs para detectar una fluctuación combinada con el conocimiento del primer set de
- 40 cebadores en el pocillo correspondiente. Con el fin de reducir los requisitos de procesamiento de señales, las señales de los ISFETs pueden compararse en tiempo real para emitir una señal que represente la diferencia entre la amplificación y los subproductos en cada pocillo.

CUANTIFICACIÓN

- 45 **[0063]** El método debe utilizarse para cuantificar la cantidad de ADN en una muestra tal y como se ilustra en la Figura 4, opción B. La concentración de protones en un tiempo dado será proporcional a la cantidad de ADN en el fluido y la cantidad acumulativa de los protones previos generados y que no se han disipado de la zona de detección. Conociendo el cambio de señal desde el inicio de la reacción en un tiempo dado y comparándolo con el estándar, se puede determinar la cantidad de ADN en la muestra del inicio de la amplificación. Así, se trabaja hacia atrás desde la cantidad y tiempo actual para determinar la cantidad de ADN de inicio en la muestra.
- 50 **[0064]** La señal estándar deberá extraerse de datos experimentales y modelo, o de una o varias reacciones de control interno independientes que llevan a cabo una reacción de amplificación en paralelo al ensayo. La señal estándar debe representarse como una tabla de consulta en un medio de almacenamiento o como una ecuación de cuantificación en un programa informático. La Figura 7 muestra un gráfico de ejemplo de la cantidad de ADN frente al tiempo para detectar dicha cantidad. El gráfico puede interpolarse o extrapolarse o puede utilizarse para
- 55 extraer una ecuación más adecuada a través de los datos para estimar las cantidades de ADN una vez que se ha medido el tiempo de reacción.

[0065] El tiempo de reacción está formado por el periodo desde que comienza la amplificación (es decir, cuando todos los reactivos y las condiciones para la amplificación están presentes) hasta que el cambio del pH supera el valor umbral. El cambio del pH puede detectarse por medio de la supervisión de la señal a través de un sensor o indicador de pH.

5 ARN

[0066] El presente método también debe utilizarse para detectar la plantilla de ARN a través del uso de una enzima (RTase) transcriptasa inversa, como el virus de la mieloblastosis aviar (AMV RTase) junto con la ADN polimerasa. El cADN se puede sintetizar de la plantilla ARN y amplificar con la presente técnica y después detectarlo mediante el uso de un sensor o indicador de pH.

10 OPTIMIZACIÓN DE LA CAPACIDAD TAMPONADORA

[0067] Mientras muchos compuestos contribuyen a algunas capacidades tamponadoras para la mezcla, la contribución total se minimiza convenientemente. No obstante, algunos tampones menores son necesarios para estabilizar las enzimas. La selección del agente tamponador (si presente), la capacidad tamponadora total del reactivo y las concentraciones deberían tomar en consideración los protones esperados generados por la reacción de la amplificación. La cantidad de protones generada dependerá de la cantidad de la plantilla de inicio, condiciones de amplificación y tiempo de amplificación (asumiendo el exceso de nucleótidos, enzimas y cebadores). La plantilla de inicio dependerá del donante, del tipo de muestra biológica tomada y el tiempo de amplificación debe elegirlo el operador o productor del test. No obstante, desde un conocimiento del tiempo de amplificación, el tipo de muestra biológica y el tipo de donante, se puede calcular una cantidad esperada (o rango de cantidad) de protones que se va a generar.

[0068] Así pues, la capacidad tamponadora de la mezcla puede elegirse de manera que un cambio de pH mayor que un valor umbral tendrá como resultado la generación de protones esperada (o menor de lo esperado) debido a la amplificación incluso en presencia de la mezcla tamponadora. El valor umbral de cambio del pH deberá ser el límite de detección del sensor y del circuito asociado. Alternativamente, el valor umbral de cambio del pH debe ser de 0,1 pH, preferiblemente 0,2 pH o mejor 0,5 pH.

[0069] La capacidad tamponadora está definida por una ecuación (I):

$$\beta = dn / d(p[H^+])$$

donde n es una cantidad de OH⁻ o H⁺ añadida y d(p[H⁺]) es el resultado del cambio infinitésimo en el cologaritmo de la concentración de iones de hidrógeno.

[0070] En una realización ejemplar, se emplea un ISFET con un límite inferior de detección de 0,5 pH, expuesto a una reacción de amplificación de 35 ul, en la que tras 30 minutos el rendimiento experimental es de 50 ug de amplicones. El número total de protones liberados del rendimiento del amplicón será aproximadamente de 2,17 mM (asumiendo que el peso molecular de un par de base es de 650g/mol);

$$\beta = 2,17 \text{ mM} / > 0,5$$

35 $\beta < 4,34 \text{ mM}$

así la capacidad tamponadora de la mezcla debería establecerse en menos de 4,34 mM con el fin de conseguir el cambio de pH deseado de >0,5.

[0071] La Tabla 1 mostrada a continuación proporciona propiedades de agentes tamponadores comunes con pKas a 25°C entre 6,15 y 8,43. La concentración de estos agentes tamponadores debería minimizarse en la reacción para conseguir un cambio de pH mayor en un tiempo de reacción de la amplificación más corto. Sin embargo, los agentes tamponadores deben proporcionarse opcionalmente para reducir el ruido de fondo, estabilizar la enzima y/o estabilizar la reacción inicial. La Tabla 2 muestra un cálculo del efecto de la capacidad tamponadora de las reacciones de la amplificación aptas para la Bst enzima variando las concentraciones de los agentes tamponadores. Como se puede ver, un número de opciones tamponadoras satisfarán los requerimientos previos, mostrando una capacidad tamponadora de menos de 4,34 mM (4340 uM). Cada agente tamponador y concentración listada en la Tabla 2 que satisfacen estas condiciones se prefiere de manera individual y se considera dentro del alcance de la presente invención.

Tabla 1. Propiedades de varios agentes tamponadores

Nombre del tampón	pKa a 25°C	Rango tamponador	Nombre completo del compuesto
TAPS	8.43	7.7-9.1	Ácido 3-[[tris(hidroximetil)metil]amino]propanosulfónico

Nombre del tampón	pKa a 25°C	Rango tamponador	Nombre completo del compuesto
Bicina	8.35	7.6-9.0	N,N-bis(2-hidroxietil)glicina
Tris	8.06	7.5-9.0	tris(hidroximetil)metilamina
Tricina	8.05	7.4-8.8	N-tris(hidroximetil)metilglicina
TAPSO	7.635	7.0-8.2	Ácido 3-[N-Tris(hidroximetil)metilamino]-2-hidroxipropanosulfónico
HEPES	7.48	6.8-8.2	Ácido 4-2-hidroxiethyl-1-piperazineethanesulfónico
TES	7.4	6.8-8.2	Ácido 2-[[tris(hidroximetil)metil]amino]etanesulfónico
MOPS	7.2	6.5-7.9	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
PIPES	6.76	6.1-7.5	Ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico)
Cacodilato	6.27	5.0-7.4	Ácido dimetilarsínico
SSC	7	6.5-7.5	Citrato de sodio salino
MES	6.15	5.5-6.7	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico

Tabla 2. Capacidad tamponadora de varias condiciones

Hepes @pH	9	8.5	8	7.5	7	
40mM		8865	17121	23580	18235	
20mM		5199	8916	12071	9628	
10mM	3352	3367	4813	6317	5324	
5mM	3024	2451	2762	3440	3173	
Tris @pH	9	8.5	8	7.5	7	
40mM		19536.4	23631	16160	7809	
20mM		10535	12170	8361	4415	
10mM	4824	6035	6441	4462	2718	
5mM	3761	3785	3575	2512	1869	
MOPS @pH	9	8.5	8	7.5	7	6.5
40mM		5721	11589	21050	22871	14673
20mM		3628	6149	10806	11946	8286
10mM	3051	2581	3430	5685	6483	5092
5mM	2874	2058	2070	3124	3752	3496

Bicina @pH	9	8.5	8	7.5	7	6.5
40mM		23891	20371	10553	4791.26	3164
20mM		12713	10541	5558	2906	2531
10mM	6139	7124	5626	3061	1963	2215
5mM	4418	4329	3168	1812	1492	2057

5 **[0072]** En algunas realizaciones, la capacidad tamponadora se ve reducida por el máximo calculado mediante un factor para garantizar que se detecte la suficiente señal de pH. La capacidad tamponadora deberá ser menor de la mitad, preferiblemente menor de un quinto, o incluso menor de una décima parte de la capacidad tamponadora máxima para la que es detectable un cambio de pH debido a una liberación esperada de protones desde una reacción de amplificación. Así, en el ejemplo anterior, la capacidad tamponadora deberá establecerse en 1/10 de 4,34 mM; es decir, 0,434 mM.

10 **[0073]** En una realización, la capacidad tamponadora de los reactivos en el fluido está preparada para enmascarar un cambio de pH que, de otro modo, tendría como resultado incluso la ausencia de una amplificación exitosa del ácido nucleico objetivo. Este cambio puede considerarse ruido de fondo de iones, que puede resultar de una amplificación no específica o degradación espontánea e hidrólisis de nucleótidos, cebadores o plantilla. La amplificación no específica hace referencia a productos de la amplificación de ácido nucleico que no vienen derivados de la región objetivo del ácido nucleico de la plantilla. En general, esto proviene de una formación cebador-dímero y/o cebadores templando regiones no objetivo de la plantilla de ADN.

15 **[0074]** En otra realización, la capacidad tamponadora total de la mezcla está establecida de manera que el ruido de fondo pueda ser ignorado. Por ejemplo, la cantidad de ruido de fondo que debe producirse durante el método puede estimarse o deducirse del experimento y expresarse como un cambio en el pH. La capacidad tamponadora de los reactivos puede aumentarse, más allá de la cantidad mínima sugerida anteriormente, con el fin de proporcionar un límite de detección inferior hasta una cantidad que enmascare el ruido de fondo absorbiendo los protones liberados o consumidos debido al fondo. Por tanto, el sensor o indicador de pH no detecta ninguna señal a menos y hasta que exista una liberación de protones suficiente que debería, pues, corresponder con la inserción específica de nucleótidos para el ácido nucleico objetivo de la plantilla.

20 **[0075]** En otra realización, se añaden una muestra de ADN y reactivos a diversas cámaras con microfluidos. En una realización ejemplar, la caída del pH debido al ruido de fondo en ausencia de un tampón se estima en 0,1 pH. Una cantidad pequeña de tampón se suministra a cada cámara con el fin de enmascarar este efecto esperado. La señal del sensor se supervisa antes, durante y después de que las reacciones químicas tengan lugar. Solo en la cámara(es) en la que se produce una reacción de amplificación de ácido nucleico liberando una cantidad de protones significativa se producirá, pues, un cambio detectable en la señal del sensor. Así, en una realización, la capacidad tamponadora es mayor de 0,5 mM.

30 **[0076]** Diferentes reactivos, como cebadores específicos de alelos, deben utilizarse para detectar la presencia o ausencia de biomarcadores genéticos en la muestra. La reacción deberá ser una amplificación de ADN y los reactivos deberán comprender cebadores y nucleótidos aptos para la amplificación isotérmica o termocíclica. Una amplificación del ADN objetivo se produce en una o más cámaras y se liberan protones más allá del efecto de fondo esperado enmascarado por el tampón. El cambio del pH se detecta como un cambio en la señal del sensor.

35

REIVINDICACIONES

1. Mezcla de reacción para su utilización en la amplificación isotérmica de un ácido nucleico, comprendiendo la mezcla: una sal de magnesio, una base alcalina y, al menos, un compuesto de amonio seleccionado del grupo que consiste en una sal de amonio cuaternario, cloruro de amonio e hidrocloreto de guanidina, donde la mezcla tiene una capacidad tamponadora inferior a 10 mM.
2. Mezcla según la reivindicación 1, donde la capacidad tamponadora de la mezcla está establecida por debajo de una concentración de protones esperada para ser liberada durante la amplificación isotérmica de un ácido nucleico dividida por un cambio de pH umbral predeterminado para ser detectado por un sensor de pH expuesto a la mezcla durante dicha amplificación.
3. Mezcla según la reivindicación 1, donde la capacidad tamponadora de la mezcla está establecida en menos de una mitad de una concentración de protones esperada para ser liberada durante la amplificación isotérmica de un ácido nucleico dividida por un cambio de pH umbral predeterminado para ser detectado por un sensor de pH expuesto a la mezcla durante dicha amplificación.
4. Mezcla según la reivindicación 2 o 3, donde el cambio de pH umbral predeterminado para ser detectado es el límite de detección de dicho sensor de pH expuesto a la mezcla durante dicha amplificación.
5. Mezcla según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que, además, comprende un agente tamponador y donde la concentración de agentes tamponadores en la mezcla es menor de 5 mM, más preferiblemente menor de 3 mM, menor de 2 mM o menor de 1 mM.
6. Mezcla según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la mezcla comprende además compuestos de sulfato en una concentración inferior a 15 mM.
7. Mezcla según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la concentración de compuestos de amonio en la mezcla es menor de 15 mM.
8. Mezcla según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la concentración de la base alcalina establece el pH de la mezcla entre 6 y 9, preferiblemente entre 7 y 8,8, más preferiblemente entre 8 y 8,6.
9. Mezcla según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la base alcalina es una entre NaOH, KOH o LiOH.
10. Mezcla según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una enzima de desplazamiento de cadena, nucleótidos y cebadores, preferiblemente donde los cebadores son específicos de alelo de manera que la amplificación indica la presencia de un ácido nucleico diana.
11. Método de monitorización de la amplificación de un ácido nucleico que comprende los siguientes pasos:
proporcionar una muestra de ácido nucleico y una mezcla de amplificación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un sensor de pH o indicador de pH;
amplificar el ácido nucleico utilizando una amplificación isotérmica; y
detectar un cambio en el pH debido a la amplificación utilizando el sensor de pH o el indicador de pH.
12. Método según la reivindicación 11, que comprende además:
medir un tiempo de reacción necesario para que el cambio de pH sea superior a un umbral predeterminado; y
utilizar el tiempo de reacción y el cambio de pH para cuantificar la cantidad de ácido nucleico en la muestra.
13. Método según la reivindicación 11 o 12, donde la mezcla comprende uno o más cebadores específicos de alelo que presentan, al menos, una base complementaria al polimorfismo de nucleótido simple diana (SNP) del ácido nucleico, comprendiendo el método también la identificación de dicha al menos una base del ácido nucleico en función de si la amplificación se produce, como se detecta a través del sensor de pH o indicador de pH.
14. Método según una de las reivindicaciones 11 a 13, donde la amplificación cambia la concentración de protones de la mezcla en más de un 10 % de la capacidad tamponadora de la mezcla.

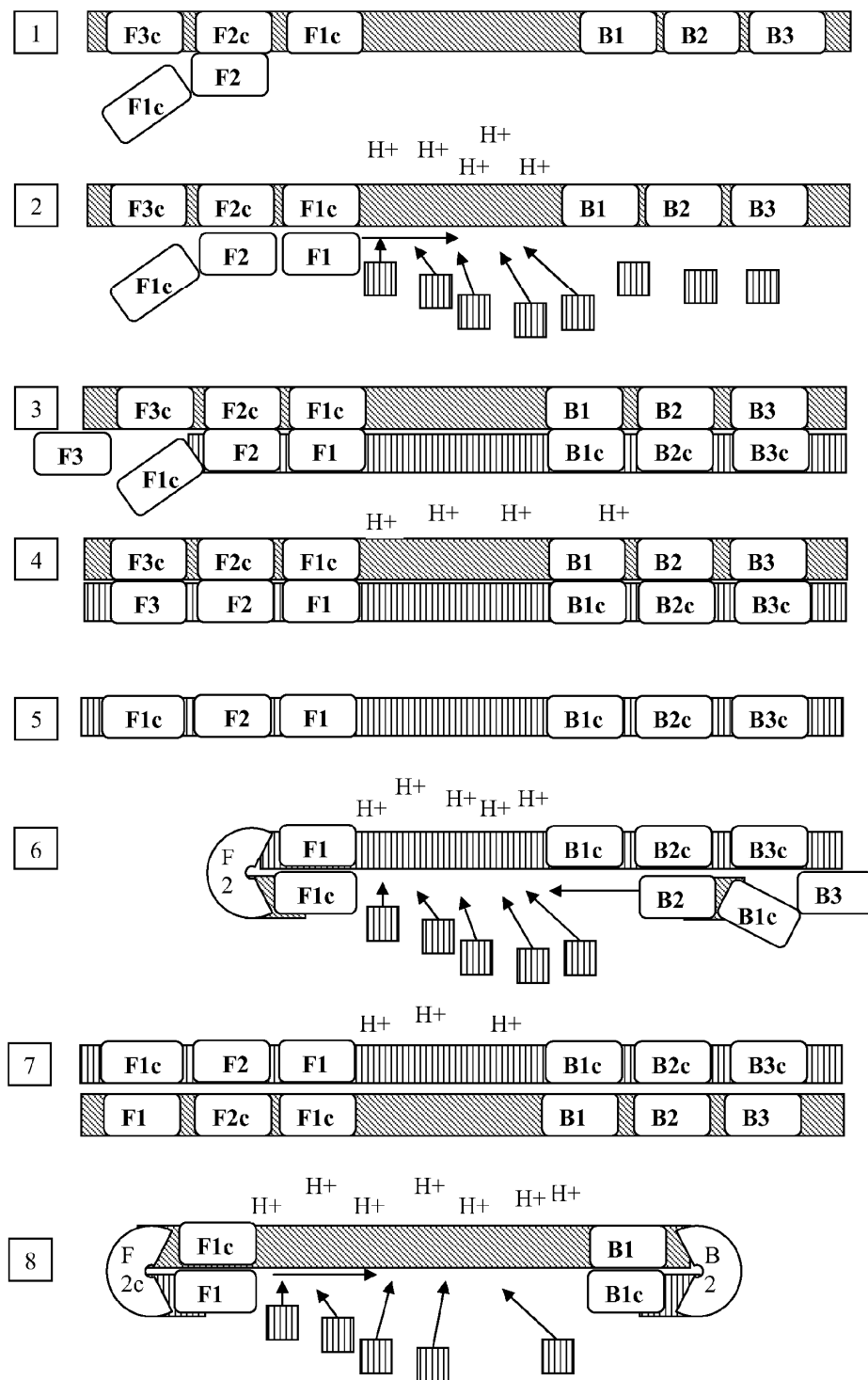


Figura 1

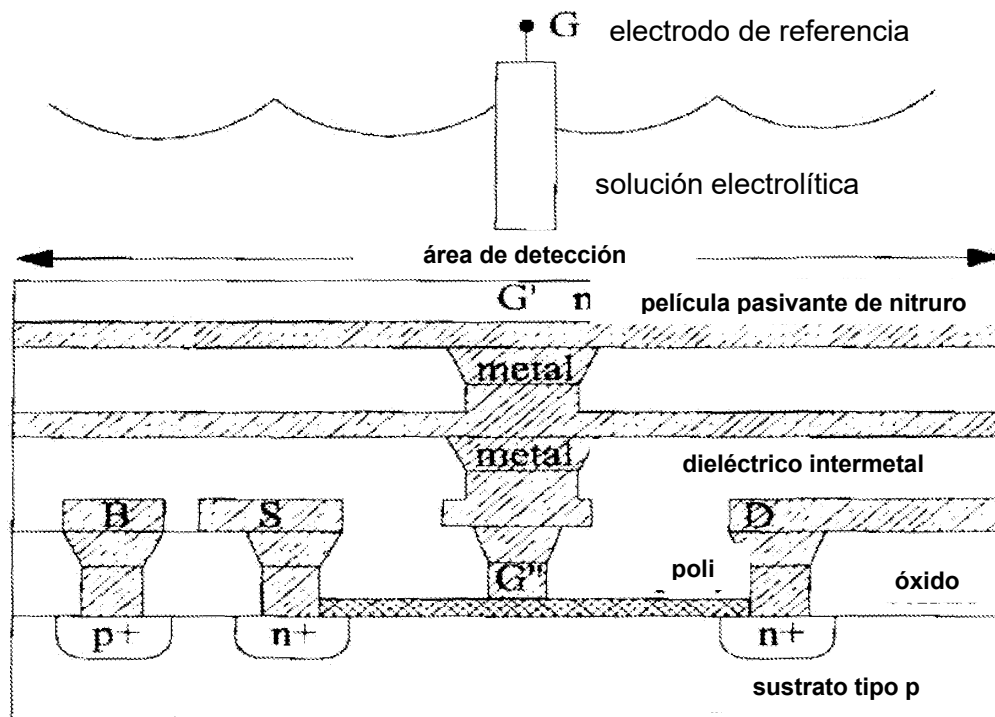


Figura 2

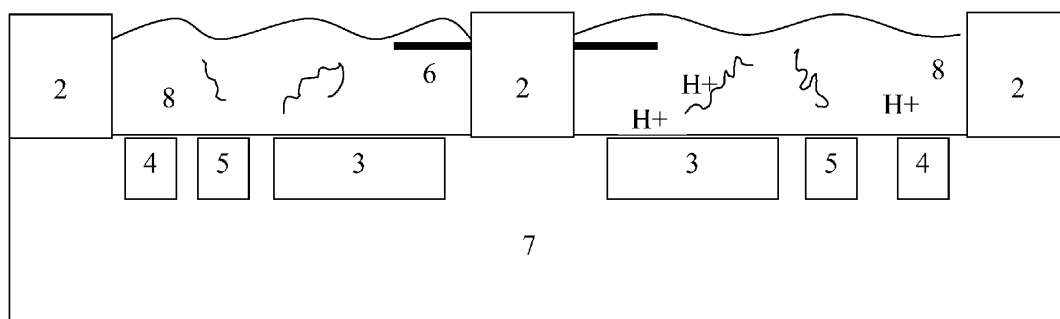


Figura 3

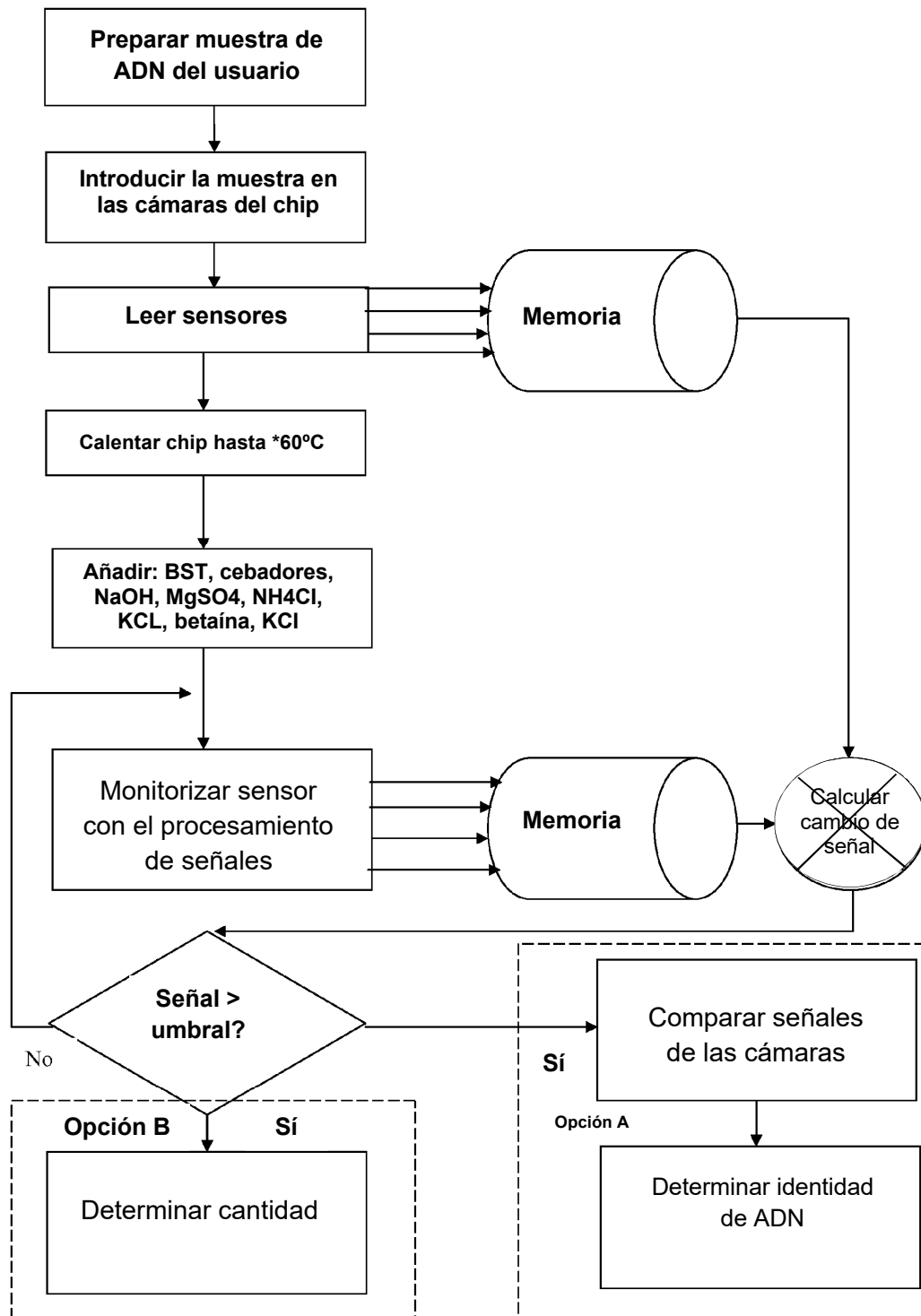


Figura 4

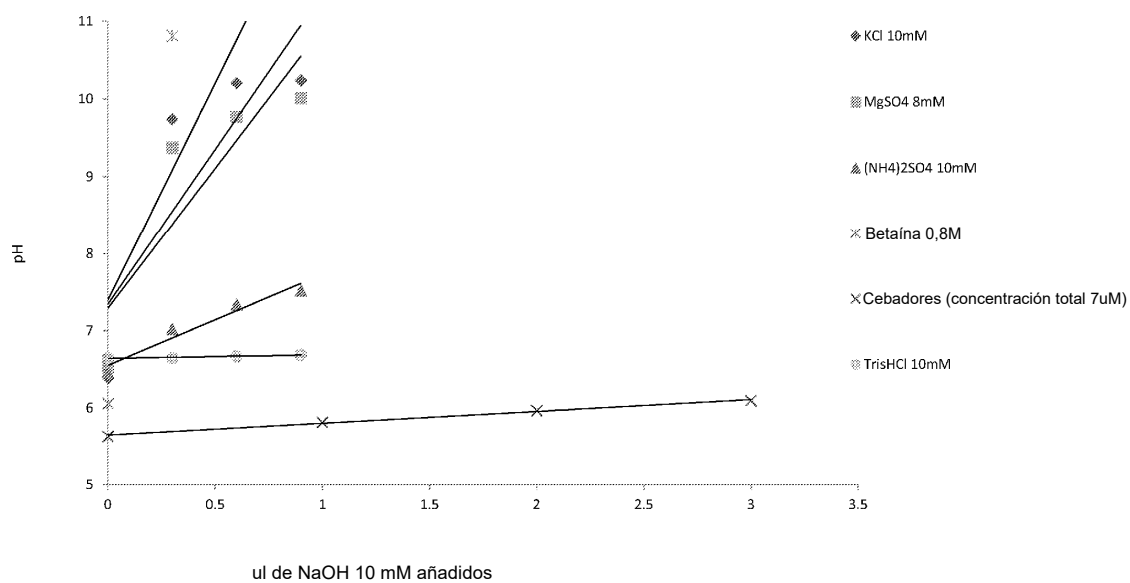


Figura 5

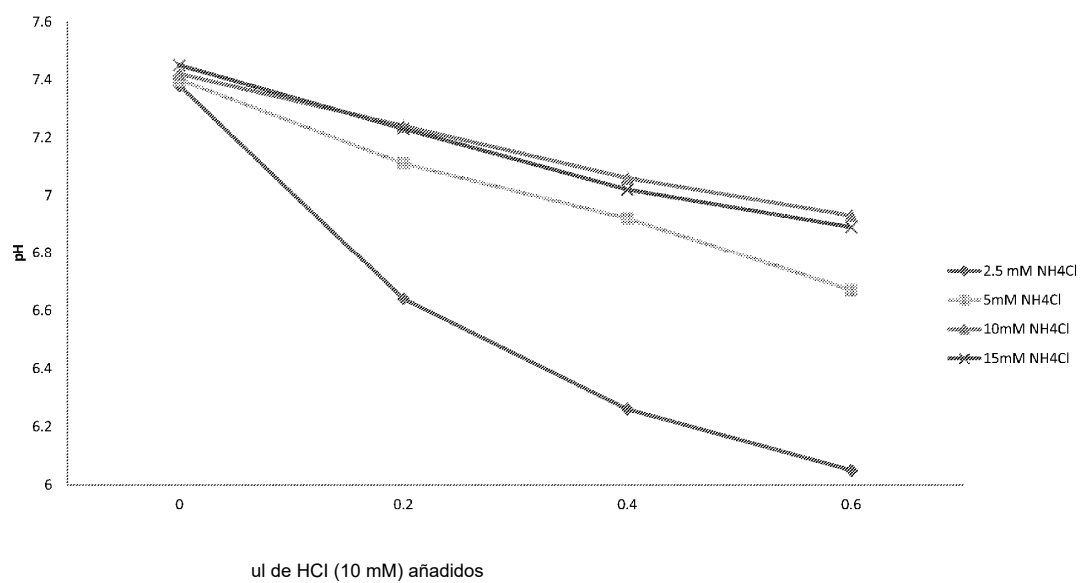


Figura 6

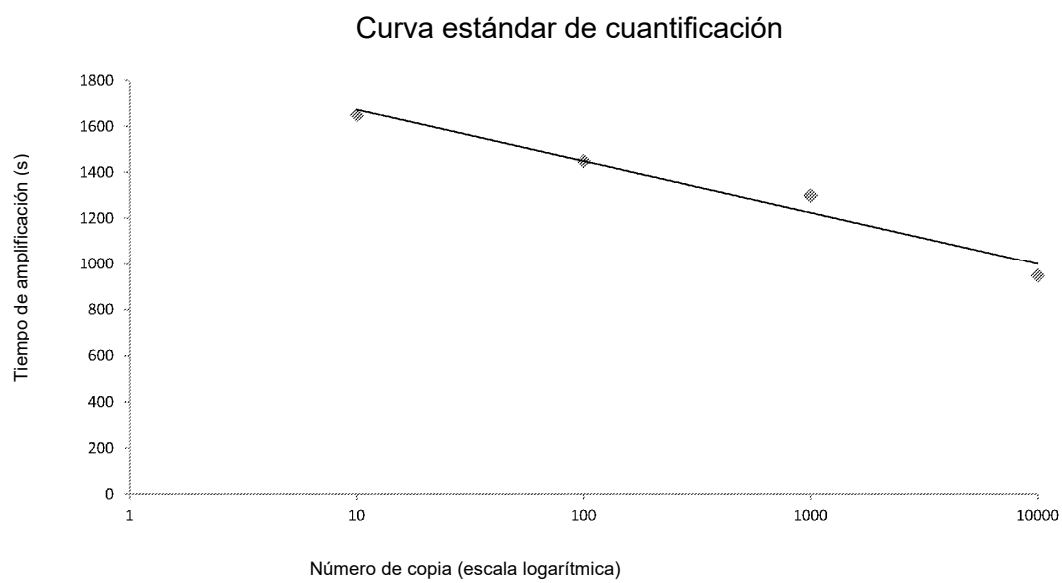


Figura 7