

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 906**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.05.2012 PCT/KR2012/003497**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2012 WO12150835**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2012 E 12779532 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2705163**

54 Título: **Detección de secuencias de ácidos nucleicos objetivo mediante una escisión y una hibridación de un PO**

30 Prioridad:

04.05.2011 KR 20110042332

12.07.2011 KR 20110068888

02.12.2011 WO PCT/KR2011/009317

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

07.03.2018

73 Titular/es:

Seegene, Inc. (100.0%)

8Fl, 9Fl Taewon Bldg. 65-5, Bangi-dong

Songpa-gu

Seoul 138-050, KR

72 Inventor/es:

CHUN, JONG YOON y

LEE, YOUNG JO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 657 906 T3

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

DESCRIPCIÓN

Detección de secuencias de ácidos nucleicos objetivo mediante una escisión y una hibridación de un PO

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a la detección de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo mediante un ensayo de POCH (escisión e hibridación de un PO) sobre un sustrato sólido.

Descripción de la técnica relacionada

15 Las tecnologías basadas en la hibridación de ADN serían una herramienta muy útil en la determinación de secuencias específicas de ácidos nucleicos, y claramente serían valiosas en el diagnóstico clínico, la investigación genética y el análisis de laboratorio forense. Además de los procesos de hibridación con sonda, se han sugerido varias metodologías que usan reacciones enzimáticas adicionales, por ejemplo, el método con la sonda TaqMan™.

20 En el método con la sonda TaqMan™, la sonda marcada hibridada con secuencias de ácidos nucleicos objetivo es escindida por una actividad de nucleasa en 5' de una polimerasa de ADN dependiente de un cebador secuencia arriba y se libera un fragmento marcado (Patentes de EE.UU. nº 5.210.015, 5.538.848 y 6.326.145). La liberación del fragmento marcado indica la escisión de la sonda, que indica finalmente la presencia de las secuencias objetivo. La detección del fragmento marcado puede llevarse a cabo mediante un análisis del tamaño, tal como una electroforesis en gel, una sedimentación en gradiente, una cromatografía de exclusión en gel y una homocromatografía. La escisión de las sondas puede llevarse a cabo en tiempo real mediante el uso de marcadores dobles interactivos.

30 El método con la sonda TaqMan™ sugiere dos metodologías para la generación de la señal: una escisión dependiente de la polimerización y una escisión independiente de la polimerización. En la escisión dependiente de la polimerización debe producirse la extensión del cebador secuencia arriba antes de que una polimerasa de ácido nucleico se encuentre con el extremo 5' de la sonda marcada. Según continúa la reacción de extensión, la polimerasa escinde progresivamente el extremo 5' de la sonda marcada. En la escisión independiente de la polimerización, el cebador secuencia arriba y la sonda marcada son hibridados con un ácido nucleico objetivo en estrecha proximidad, de forma que la unión de la polimerasa de ácido nucleico con el extremo 3' del cebador secuencia arriba se pone en contacto con el extremo 5' de la sonda marcada para liberar el marcador. Además, el método con la sonda TaqMan™ desvela que la sonda marcada en su extremo 5' que tiene una región de cola en 5' no hibridable con secuencias objetivo también es escindida para formar un fragmento que comprende la región de cola en 5'.

40 Se han notificado algunos métodos en los que las sondas que tienen una región de cola en 5' no complementaria de las secuencias objetivo son escindidas por una nucleasa de 5' para liberar un fragmento que comprende la región de cola en 5', y la detección del objetivo se lleva a cabo usando el fragmento que comprende la región de cola en 5'.

45 Por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 5.691.142 desvela una estructura de escisión que va ser digerida por la actividad de nucleasa en 5' de una polimerasa de ADN. La estructura de escisión está ejemplificada en un oligonucleótido que comprende una porción en 5' no complementaria de, y una porción en 3' complementaria de, un molde, es hibridada con el molde, y un oligonucleótido secuencia arriba es hibridado con el molde en estrecha proximidad. La estructura de escisión es escindida por la polimerasa de ADN que tiene actividad de nucleasa en 5' o una polimerasa de ADN modificada con una actividad sintética reducida para liberar la porción en 5' no complementaria del molde. La porción liberada en 5' es hibridada a continuación con un oligonucleótido que tiene una estructura en horquilla para formar una estructura de escisión, induciendo así reacciones de escisión progresivas para detectar las secuencias objetivo.

55 La Patente de EE.UU. nº 7.381.532 desvela un proceso en el que la estructura de escisión que tiene el oligonucleótido secuencia arriba con el extremo 3' bloqueado es escindido por una polimerasa de ADN que tiene actividad de nucleasa en 5' o de nucleasa FEN, para liberar una región de solapa en 5' no complementaria, y la región de solapa en 5' liberada es detectada mediante un análisis de tamaño o un marcador doble interactivo.

60 La Solicitud de Patente de EE.UU. publicada 2008-0241838 desvela un método de detección de un objetivo que usa la escisión de sondas marcadas individualmente que tienen una porción no complementaria en 5' del objetivo y sondas de captura inmovilizadas sobre sustratos sólidos. Se posiciona un único marcador en la porción no complementaria en 5' de la sonda marcada. Las sondas marcadas hibridadas con el objetivo son escindidas para liberar fragmentos, tras lo cual los fragmentos son después hibridados con las sondas de captura para detectar la presencia de la secuencia objetivo. En este método es necesario que una sonda no escindida/intacta no esté hibridada con la sonda de captura. Para este comportamiento, el método impide que la sonda objetivo no escindida hibride con la sonda de captura inmovilizada controlando la orientación de la inmovilización del oligonucleótido

inmovilizado y su distancia desde la superficie de un sustrato sólido. Sin embargo, dicha limitación da como resultado una menor eficacia de hibridación sobre un sustrato sólido y dificultades en la optimización de las condiciones de reacción.

5 La Solicitud de Patente de EE.UU. publicada 2008-0193940 también desvela un método de detección de un objetivo que usa sondas que tienen una secuencia no complementaria (secuencia de etiqueta o de solapa) de un objetivo, así como sondas de captura inmovilizadas sobre sustratos sólidos. También hay posicionado un marcador en la región no complementaria de las sondas. Las sondas sin digerir forman una estructura en horquilla y no es hibridada con las con sondas de captura. Por el contrario, cuando las sondas son digeridas, los fragmentos que contienen el
10 marcador son hibridados a continuación con las sondas de captura, detectando así la presencia de secuencias de los ácidos nucleicos objetivo. Sin embargo, tiene unos problemas importantes ya que las condiciones de reacción tienen que ser cuidadosamente controladas teniendo en consideración el valor de la T_m de hibridación entre las secuencias objetivo y las sondas, y teniendo en consideración también el valor de la T_m de la estructura en horquilla de las sondas sin digerir, así como el valor de la T_m de hibridación entre los fragmentos digeridos y las sondas de
15 captura.

Por lo tanto, sigue habiendo unas necesidades largamente anheladas en la materia de desarrollar nuevas metodologías para la detección de una secuencia objetivo sobre una fase sólida, particularmente, que estén exentas de las dificultades de las tecnologías convencionales que usan sondas portadoras de secuencias de etiqueta y sondas de captura inmovilizadas sobre sustratos sólidos.
20

Sumario de la invención

Los presentes inventores han realizado intensivas investigaciones para desarrollar nuevas metodologías para la
25 detección de secuencias objetivo con una precisión y una comodidad más mejoradas, entre otros, de múltiples formas. Como resultado, hemos establecido nuevos protocolos para la detección de las secuencias objetivo usando un oligonucleótido de sondeo (PO) y un oligonucleótido de captura (CO), en los que la detección del objetivo se lleva a cabo mediante una reacción de escisión de la sonda y una hibridación de la sonda adicional (es decir, una reacción nucleolítica en 5' del PO y una reacción de hibridación entre el PO escindido/no escindido y el CO). Los
30 presentes protocolos, con una especificidad de objetivo drásticamente mejorada, están bien adaptados para las reacciones en fase sólida, y aseguran la detección múltiple de secuencias objetivo con una precisión y una comodidad más mejoradas.

Por lo tanto, es un objeto de esta invención proporcionar un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos objetivo a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo de POCH (escisión e hibridación de un PO) sobre un sustrato sólido.
35

Es otro objeto de esta invención proporcionar el uso de un kit según un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos objetivo a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo de POCH (escisión e hibridación de un PO) sobre un sustrato sólido.
40

Otros objetos y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada que sigue, tomada junto con las reivindicaciones y los dibujos anexos.

45 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra las estructuras esquemáticas del PO (oligonucleótido de sondeo) y del CO (oligonucleótido de captura) usados en un ensayo de POCH (escisión e hibridación de un PO). El PO incluye un PO no etiquetado y un PO etiquetado que después es clasificado en un PO etiquetado en 3' y un PO etiquetado en 5'. Preferiblemente, el extremo 3' del PO está bloqueado para impedir su extensión (Fig. 1A). El CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con el PO. El CO está inmovilizado sobre el sustrato sólido a través de su extremo 3' o de su extremo 5'. Preferiblemente, el extremo 3' del CO inmovilizado a través del extremo 5' está bloqueado para impedir su extensión (Fig. 1B).
50

La Fig. 2 representa esquemáticamente el ensayo de POCH que usa un PO no etiquetado que tiene un único marcador fluorescente en el extremo 5' de su porción de direccionamiento.

La Fig. 3 representa esquemáticamente el ensayo de POCH que usa un PO no etiquetado que tiene un único marcador fluorescente en el extremo 3' de su porción de direccionamiento.

La Fig. 4 representa esquemáticamente el ensayo de POCH que usa un PO etiquetado en 3' que tiene un único marcador fluorescente en el extremo 5' de su porción de direccionamiento.

La Fig. 5 representa esquemáticamente el ensayo de POCH que usa un PO etiquetado en 5' que tiene un único marcador fluorescente en el extremo 3' de su porción de direccionamiento.

La Fig. 6 representa esquemáticamente el ensayo de POCH que usa un PO etiquetado en 5' que tiene un único marcador fluorescente en el extremo 3' de su porción de direccionamiento y un CO que comprende adicionalmente una porción de molde que sirve como molde para la extensión de la porción de etiquetado hibridada con el CO.
65

La Fig. 7 representa esquemáticamente el ensayo de POCH que usa un PO no etiquetado que tiene una molécula donante y una molécula aceptora de un marcador doble interactivo para medir la señal de la molécula aceptora. La molécula donante y la molécula aceptora están ubicadas de tal forma que una señal de la molécula donante es inactivada por la molécula aceptora cuando se forma el dúplex de PO no escindido/CO.

La Fig. 8 representa esquemáticamente el ensayo de POCH que usa un PO etiquetado en 3' que tiene una molécula donante y una molécula aceptora de un marcador doble interactivo para medir la señal de la molécula aceptora. La molécula donante y la molécula aceptora están ubicadas de tal forma que una señal de la molécula donante es inactivada por la molécula aceptora cuando se forma el dúplex de PO no escindido/CO.

La Fig. 9 representa esquemáticamente el ensayo de POCH que usa un PO etiquetado en 5' que tiene una molécula donante y una molécula aceptora de un marcador doble interactivo para medir la señal de la molécula aceptora. La molécula donante y la molécula aceptora están ubicadas de tal forma que una señal de la molécula donante es inactivada por la molécula aceptora cuando se forma el dúplex de PO no escindido/CO.

La Fig. 10 representa esquemáticamente el ensayo de POCH que usa un PO no etiquetado que tiene una molécula donante y una molécula aceptora de un marcador doble interactivo para medir la señal de la molécula donante. La molécula donante y la molécula aceptora están ubicadas de tal forma que una señal de la molécula donante es inactivada por la molécula aceptora cuando se forma el dúplex de PO no escindido/CO.

La Fig. 11 representa esquemáticamente el ensayo de POCH que usa un PO etiquetado en 3' que tiene una molécula donante y una molécula aceptora de un marcador doble interactivo para medir la señal de la molécula donante. La molécula donante y la molécula aceptora están ubicadas de tal forma que una señal de la molécula donante es inactivada por la molécula aceptora cuando se forma el dúplex de PO no escindido/CO.

La Fig. 12 representa esquemáticamente el ensayo de POCH que usa un PO etiquetado en 5' que tiene una molécula donante y una molécula aceptora de un marcador doble interactivo para medir la señal de la molécula donante. La molécula donante y la molécula aceptora están ubicadas de tal forma que una señal de la molécula donante es inactivada por la molécula aceptora cuando se forma el dúplex de PO no escindido/CO.

La Fig. 13 representa esquemáticamente el ensayo de POCH que usa un agente intercalante.

La Fig. 14 representa los resultados de la detección del objetivo mediante el ensayo de POCH que usa un PO con un único marcador no etiquetado.

La Fig. 15 representa los resultados de la detección del objetivo mediante el ensayo de POCH que usa un PO con un único marcador etiquetado en 3'.

La Fig. 16 representa los resultados de la detección del objetivo mediante el ensayo de POCH que usa un PO con un único marcador etiquetado en 5'.

La Fig. 17 representa los resultados de la detección del objetivo mediante el ensayo de POCH que usa un PO con un marcador doble etiquetado en 3'.

La Fig. 18 representa los resultados de la detección del objetivo mediante el ensayo de POCH con una amplificación mediante PCR. El PO es un PO con un único marcador no etiquetado.

La Fig. 19 representa los resultados de la detección del objetivo mediante el ensayo de POCH con una amplificación mediante PCR. El PO es un PO con un único marcador etiquetado en 3'.

La Fig. 20 representa los resultados de la detección en tiempo real de las secuencias de ácidos nucleicos objetivo mediante el ensayo de POCH que usa un PO con un único marcador etiquetado en 3'. La Fig. 20A muestra las imágenes fluorescentes dependiendo del número de ciclos durante el ensayo de POCH, y la Fig. 20B muestra el cambio en la intensidad de la fluorescencia dependiendo del número de ciclos durante el ensayo de POCH.

La Fig. 21 representa esquemáticamente el ensayo de POCH que usa un PO etiquetado en 5' para detectar una variación de nucleótido simple.

La Fig. 22 representa esquemáticamente el ensayo de POCH que usa un PO etiquetado en 5' que tiene un nucleótido malapareado artificial como fracción de apareamiento que no es una base para detectar una variación de nucleótido simple.

Descripción detallada de esta invención

Los presentes inventores han realizado intensivas investigaciones para desarrollar nuevas metodologías para la detección de secuencias objetivo con una precisión y una comodidad más mejoradas, entre otros, de múltiples formas. Como resultado, hemos establecido nuevos protocolos más para la detección de las secuencias objetivo usando un oligonucleótido de sondeo (PO) y un oligonucleótido de captura (CO), en los que la detección del objetivo se lleva a cabo mediante una reacción de escisión de la sonda y una hibridación de la sonda adicional (es decir, una reacción nucleolítica en 5' del PO y una reacción de hibridación entre el PO escindido/no escindido y el CO). Los presentes protocolos con una especificidad de objetivo drásticamente mejorada están bien adaptados para las reacciones en fase sólida, y aseguran la detección múltiple de secuencias objetivo con una precisión y una comodidad más mejoradas.

La presente invención es un nuevo protocolo para detectar las secuencias objetivo sobre un sustrato sólido mediante la utilización de una combinación de un PO y un CO.

El principio subyacente de la presente invención es detectar el hecho de la escisión del PO mediante el uso del CO inmovilizado sobre un sustrato sólido. Además, es notable que cuando una secuencia objetivo en una muestra está ausente, un PO no escindido es hibridado con el CO inmovilizado sobre un sustrato sólido. Según la presente

invención, la señal final que se va a medir es diferente dependiendo de si se ha formado o no el dúplex de PO no escindido/CO, que es capaz de indicar la presencia o la ausencia de la secuencia objetivo.

5 La presente invención detecta una secuencia objetivo según el principio de comportamiento descrito anteriormente, y está clasificada en tres realizaciones dependiendo de los sistemas marcadores adoptados.

La presente invención se describirá a continuación en el presente documento con más detalle:

10 I. Proceso de detección del objetivo mediante un POCH que usa un único marcador

En un aspecto de la presente invención se proporciona un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos objetivo a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo de POCH (escisión e hibridación de un PO) sobre un sustrato sólido, que comprende:

- 15 (a) hibridar la secuencia de ácidos nucleicos objetivo con un oligonucleótido secuencia arriba y un oligonucleótido de sondeo (PO); en el que el oligonucleótido secuencia arriba comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el PO comprende una porción de direccionamiento que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el PO tiene un único marcador; el oligonucleótido secuencia arriba está
20 localizado secuencia arriba del PO; el oligonucleótido secuencia arriba o su hebra extendida induce la escisión del PO por parte de una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5';
- (b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' en unas condiciones para la escisión del PO; en el que cuando el PO es hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, el PO es escindido por la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' para producir un
25 fragmento que contiene un único marcador;
- (c) llevar a cabo una reacción de hibridación poniendo en contacto el resultante de la etapa (b) con un oligonucleótido de captura (CO) inmovilizado sobre el sustrato sólido; en el que el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con el PO; en el que la reacción de hibridación se lleva a cabo en unas condiciones tales que el fragmento que contiene un único marcador no es hibridado con el CO, y un PO no escindido es
30 hibridado con el CO para formar un dúplex de PO no escindido/CO; y
- (d) detectar el hecho de la escisión del PO midiendo una señal del marcador único del sustrato sólido; mediante lo cual, el hecho de la escisión del PO indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

35 Se ha sugerido que la presencia de una secuencia objetivo está determinada por la hibridación del fragmento escindido de una sonda objetivo con un oligonucleótido inmovilizado sobre un sustrato sólido (véanse las Solicitudes de Patente de EE.UU. publicadas nº 2008-0241838 y 2008-0193940). El método convencional determina la presencia o la ausencia de una secuencia objetivo mediante la hibridación únicamente de la sonda escindida con el oligonucleótido inmovilizado sobre un sustrato sólido. La sonda no escindida no está implicada en la hibridación con el oligonucleótido inmovilizado. Para este comportamiento se requiere que el método convencional impida que la
40 sonda objetivo no escindida hibride con el oligonucleótido inmovilizado mediante el diseño de la sonda objetivo con una porción de etiquetado que tenga una estructura en horquilla, o controlando la orientación de la inmovilización del oligonucleótido inmovilizado y su distancia con respecto a la superficie de un sustrato sólido.

45 El método convencional que requiere la sonda objetivo que tiene una estructura en horquilla tiene unas graves limitaciones, ya que el diseño de la sonda objetivo y las condiciones de reacción deben ser determinadas teniendo en consideración ambas condiciones para la hibridación entre la sonda objetivo que tiene una estructura en horquilla y la secuencia objetivo, y las condiciones para la no hibridación entre la sonda objetivo y el oligonucleótido inmovilizado. Por lo tanto, los métodos convencionales son muy inconvenientes y no prácticos en términos del diseño de una sonda objetivo y de un oligonucleótido inmovilizado, y en la determinación de las condiciones de
50 reacción.

Al contrario que los métodos convencionales, la presente invención emplea una hibridación entre el PO no escindido y el CO inmovilizado, estando exenta de las limitaciones asociadas a los métodos convencionales.

55 Según la presente invención, la señal final que se va a medir, indicativa de la presencia o de la ausencia de una secuencia objetivo, es diferente dependiendo de si el fragmento escindido de PO está hibridado con el CO inmovilizado sobre un sustrato sólido o de si el PO no escindido está hibridado con el CO inmovilizado.

60 Por lo tanto, la presente invención se denomina "análisis de escisión e hibridación de un PO (POCH)".

La presente invención se describirá con más detalle como sigue:

Etapa (a): hibridación de un oligonucleótido secuencia arriba y un PO con una secuencia de ácidos nucleicos objetivo

65

Según la presente invención, una secuencia de ácidos nucleicos objetivo es hibridada en primer lugar con un oligonucleótido secuencia arriba y un PO (oligonucleótido de sondeo).

5 El término usado en el presente documento "ácido nucleico objetivo", "secuencia de ácidos nucleicos objetivo" o "secuencia objetivo" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos de interés para su detección, que está apareada o hibridada con una sonda o un cebador en condiciones de hibridación, de apareamiento o de amplificación.

10 Según una realización preferida, el oligonucleótido secuencia arriba es un cebador secuencia arriba o una sonda secuencia arriba.

El PO usado en la presente invención es preferentemente una sonda.

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

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

25 Las sondas o los cebadores usados en esta invención pueden estar formados por dNMP naturales (es decir, dAMP, dGM, dCMP y dTMP), un nucleótido modificado o un nucleótido no natural. Las sondas o los cebadores también pueden incluir ribonucleótidos.

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

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

40 La hibridación de las secuencias de ácidos nucleicos objetivo con el oligonucleótido secuencia arriba y el PO puede llevarse a cabo en unas condiciones de hibridación adecuadas determinadas rutinariamente mediante unos procedimientos de optimización. Las condiciones tales como la temperatura, la concentración de componentes, los tiempos de hibridación y de lavado, los componentes del tampón, y su pH y fuerza iónica pueden modificarse dependiendo de varios factores que incluyen la longitud y el contenido en GC del oligonucleótido (el oligonucleótido secuencia arriba y el PO) y de las secuencias de los nucleótidos objetivo. Por ejemplo, cuando se usa un oligonucleótido relativamente corto, es preferible adoptar unas condiciones de baja rigurosidad. Las condiciones detalladas para la hibridación pueden encontrarse en Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001); y en M. L. M. Anderson, Nucleic Acid Hybridization, Springer-Verlag Nueva York Inc. N. Y. (1999).

50 No existe ninguna distinción prevista entre los términos "apareamiento" e "hibridación", y estos términos se usarán de forma intercambiable.

55 El oligonucleótido secuencia arriba y el PO tienen unas secuencias de nucleótidos de hibridación complementarias de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo. El término "complementaria" se usa en el presente documento para significar que los cebadores o las sondas son lo suficientemente complementarios como para hibridar selectivamente con una secuencia de ácidos nucleicos objetivo en las condiciones de apareamiento indicadas o en unas condiciones rigurosas, englobando los términos "sustancialmente complementaria" y "perfectamente complementaria", preferentemente perfectamente complementaria.

60 El oligonucleótido de sondeo (PO) usado en el presente documento significa un oligonucleótido que comprende una porción de direccionamiento que sirve como sonda.

65 Según una realización preferida, el PO incluye un PO no etiquetado sin una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, y un PO etiquetado con

una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo (Fig. 1A).

5 Según una realización preferida, el PO es un PO etiquetado en 3' que comprende adicionalmente en su porción 3' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, o un PO etiquetado en 5' que comprende adicionalmente en su porción 5' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo (Fig. 1A).

10 La porción de etiquetado del PO tiene preferentemente una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo. El término "no complementaria" se usa en el presente documento para significar que los cebadores o las sondas son lo suficientemente no complementarios para no hibridar selectivamente con una secuencia de ácidos nucleicos objetivo en unas condiciones de apareamiento indicadas o en unas condiciones rigurosas, englobando los términos "sustancialmente no complementaria" y "perfectamente no complementaria", preferentemente perfectamente no complementaria.

Preferiblemente, el PO etiquetado es utilizado para hibridar selectivamente con el CO a través de la porción de etiquetado.

20 El PO no requiere ninguna longitud específica. El PO no etiquetado puede tener cualquier longitud siempre que hibride específicamente con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, por ejemplo, su longitud puede ser de 10-60 nucleótidos, de 10-50 nucleótidos, de 10-40 nucleótidos, de 10-30 nucleótidos, de 15-60 nucleótidos, de 15-50 nucleótidos, de 15-40 nucleótidos, de 15-30 nucleótidos, de 20-60 nucleótidos, de 20-50 nucleótidos, de 20-40 nucleótidos o de 20-30 nucleótidos. El PO etiquetado puede ser de 15-80 nucleótidos, de 15-60 nucleótidos, de 15-40 nucleótidos, de 20-80 nucleótidos, de 20-60 nucleótidos, de 20-40 nucleótidos, de 30-80 nucleótidos, de 30-60 nucleótidos o de 30-40 nucleótidos de longitud. La porción de direccionamiento del PO puede tener cualquier longitud siempre que hibride específicamente con las secuencias de ácidos nucleicos objetivo. Por ejemplo, la porción de direccionamiento del PO puede ser de 10-50 nucleótidos, de 10-40 nucleótidos, de 10-30 nucleótidos, de 15-50 nucleótidos, de 15-40 nucleótidos, de 15-30 nucleótidos, de 20-50 nucleótidos, de 20-40 nucleótidos o de 20-30 nucleótidos de longitud. La porción de etiquetado del PO etiquetado puede tener cualquier longitud siempre que hibride específicamente con el CO. Por ejemplo, la porción de etiquetado del PO puede ser de 5-50 nucleótidos, de 5-40 nucleótidos, de 5-30 nucleótidos, de 5-20 nucleótidos, de 10-50 nucleótidos, de 10-40 nucleótidos, de 10-30 nucleótidos, de 10-20 nucleótidos, de 15-50 nucleótidos, de 15-40 nucleótidos, de 15-30 nucleótidos o de 15-20 nucleótidos de longitud.

35 El extremo 3' del PO puede tener un OH en el 3' terminal. Preferiblemente, el extremo 3' del PO está "bloqueado" para impedir su extensión.

40 El bloqueo puede conseguirse según cualquier método convencional. Por ejemplo, el bloqueo puede llevarse a cabo mediante la adición, en el grupo hidroxilo en 3' del último nucleótido, de una fracción química tal como biotina, marcadores, un grupo fosfato, un grupo alquilo, un conector no nucleotídico, un fosforotioato o un alcanodiol. Alternativamente, el bloqueo puede llevarse a cabo mediante la eliminación del grupo hidroxilo en 3' del último nucleótido o usando un nucleótido sin ningún grupo hidroxilo en 3', tal como un didesoxinucleótido.

45 Alternativamente, el PO puede estar diseñado para tener una estructura secundaria, tal como una estructura en horquilla. Dado que un PO no escindido está hibridado con oligonucleótidos inmovilizados sobre un sustrato sólido en la presente invención, la estructura en horquilla tiene que estar diseñada para no impedir que el PO no escindido hibride con el CO inmovilizado. Preferiblemente, la estructura en horquilla del PO tiene un menor valor de la T_m que el del dúplex entre el PO no escindido y CO inmovilizado.

50 No obstante, según el método convencional para la detección de una secuencia objetivo mediante el uso de una reacción de escisión de una sonda objetivo que tiene una porción de etiquetado y su hibridación con un oligonucleótido inmovilizado sobre un sustrato sólido, se requiere que la sonda objetivo tenga una estructura en horquilla para impedir que la sonda objetivo no escindida hibride con el oligonucleótido inmovilizado.

55 Cuando se usa el PO etiquetado, la hibridación con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo se lleva a cabo en unas condiciones rigurosas de forma que su porción de direccionamiento esté hibridada con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo y su porción de etiquetado no esté hibridada con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo. La frase, "la porción de etiquetado del PO no está hibridada con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo" significa que no forma un dúplex estable con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo en unas ciertas condiciones rigurosas. Preferiblemente, la porción de etiquetado del PO etiquetado no está hibridada con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, formando una única hebra.

65 El oligonucleótido secuencia arriba está ubicado secuencia arriba del PO cuando hibrida con el ácido nucleico objetivo. El oligonucleótido secuencia arriba o su hebra extendida hibridada con la secuencia de ácidos nucleicos

objetivo, induce la escisión del PO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo por parte de una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5'.

5 La inducción de la escisión del PO por parte del oligonucleótido secuencia arriba puede llevarse a cabo de dos formas: (i) una inducción de la escisión del oligonucleótido secuencia arriba independiente de la extensión (es decir, de la polimerización); y (ii) una inducción de la escisión del oligonucleótido secuencia arriba dependiente de la extensión.

10 Cuando el oligonucleótido secuencia arriba está posicionado lo suficientemente adyacente al PO como para inducir la escisión del PO por parte de una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5', la enzima unida al oligonucleótido secuencia arriba digiere el PO sin ninguna reacción de extensión. Por el contrario, cuando el oligonucleótido secuencia arriba está posicionado distante al PO, una enzima que tiene una actividad de polimerasa (por ejemplo, una polimerasa dependiente del molde) cataliza la extensión del oligonucleótido secuencia arriba (por ejemplo, cebador secuencia arriba) y una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5' unida al producto extendido digiere el PO.

15 Por lo tanto, el oligonucleótido secuencia arriba puede estar ubicado con respecto al PO de dos formas. El oligonucleótido secuencia arriba puede estar ubicado lo suficientemente adyacente al PO como para inducir la escisión del PO de una forma independiente de la extensión (es decir, de la polimerización). Alternativamente, el oligonucleótido secuencia arriba puede estar ubicado lo suficientemente distante del PO como para inducir la escisión del PO de una forma dependiente de la extensión.

20 El término usado en el presente documento "adyacente" con referencia a las posiciones en las ubicaciones significa que el oligonucleótido secuencia arriba está ubicado adyacentemente a la porción de direccionamiento del PO para formar una mella. También, el término significa que el oligonucleótido secuencia arriba está ubicado a 1-30 nucleótidos, a 1-20 nucleótidos o a 1-15 nucleótidos de la porción de direccionamiento del PO.

25 Según una realización preferida, el oligonucleótido secuencia arriba está ubicado lo suficientemente distante del PO como para inducir la escisión del PO de una forma dependiente de la extensión.

30 El término usado en el presente documento "distante" con referencia a las posiciones o las ubicaciones no tiene limitaciones como el término "adyacente", que incluye cualquier posición ubicación suficiente para asegurar las reacciones de extensión. Por ejemplo, el término "distante" puede incluir una ubicación para formar una mella.

35 Según una realización preferida, el oligonucleótido secuencia arriba es un cebador secuencia arriba o una sonda secuencia arriba. El cebador secuencia arriba es adecuado para la inducción de una escisión independiente de la extensión o para una escisión dependiente de la extensión, y la sonda secuencia arriba es adecuada para una inducción de la escisión independiente de la extensión.

40 Alternativamente, el oligonucleótido secuencia arriba tiene una secuencia parcialmente solapada con la porción de direccionamiento del PO. Preferiblemente, la secuencia solapada tiene 1-10 nucleótidos, más preferentemente 1-5 nucleótidos, aún más preferentemente 1-3 nucleótidos de longitud. Cuando se usa el PO etiquetado en 5' que tiene la secuencia parcialmente solapada, la porción de direccionamiento en 3' puede ser parcialmente digerida junto con la digestión de la porción de etiquetado en la reacción de escisión de la etapa (b). Además, la secuencia solapada permite la escisión de un sitio deseado de la porción de direccionamiento.

45 Según una realización preferida, el cebador secuencia arriba induce, a través de su hebra extendida, la escisión del PO por parte de la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5'.

50 Las tecnologías convencionales de las reacciones de escisión mediante oligonucleótidos secuencia arriba pueden ser aplicadas a la presente invención siempre que el oligonucleótido secuencia arriba induzca la escisión del PO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo. Por ejemplo, los métodos divulgados en las Patentes de EE.UU. nº 5.210.015, 5.487.972, 5.691.142, 5.994.069 y 7.381.532 y en la Publicación de Solicitud de EE.UU. nº 2008-0241838 pueden ser aplicados a la presente invención.

55 Según una realización preferida, el presente método se lleva a cabo en presencia de un cebador secuencia abajo. El cebador secuencia abajo genera adicionalmente la secuencia de ácidos nucleicos objetivo que se va a hibridar con el PO, aumentando la sensibilidad en la detección del objetivo.

60 Cuando se usa adicionalmente el cebador secuencia abajo, se usa adicionalmente un PO secundario ubicado secuencia abajo del cebador secuencia abajo.

65 Según una realización preferida, cuando se usan el cebador secuencia arriba y el cebador secuencia abajo, se emplea una polimerasa de ácido nucleico dependiente del molde para la extensión de los cebadores. La polimerasa de ácido nucleico dependiente del molde puede servir como una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5' para la escisión del PO.

Según una realización preferida, el oligonucleótido secuencia arriba (el cebador secuencia arriba o la sonda secuencia arriba) y/o el cebador secuencia abajo tienen una estructura de oligonucleótido de cebado doble (DPO) desarrollada por el presente inventor. Los oligonucleótidos que tienen la estructura DPO muestran una especificidad de objetivo significativamente mejorada en comparación con los cebadores y las sondas convencionales (véase el documento WO 2006/095981; Chun et al., Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene, *Nucleic Acid Research*, 35: 6e40 (2007)).

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

El término "oligonucleótido convencional" se refiere a oligonucleótidos (cebador o sonda) que no tienen una estructura de DSO o de mDSO.

El PO usado en esta invención tiene un único marcador. El marcador único proporciona una señal indicativa de la presencia o de la ausencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo. El marcador se describirá con más detalle en la etapa (d).

Etapa (b): escisión del PO

A continuación, el resultante de la etapa (a) se pone en contacto con una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5' en unas condiciones para la escisión del PO.

El PO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo es digerido por la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' para liberar un fragmento que contiene un único marcador (véanse las Figs. 2-6). Cuando la secuencia de ácidos nucleicos objetivo está ausente, el PO no es digerido por la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5'.

El término usado en el presente documento "condiciones para la escisión del PO" significa unas condiciones suficientes para digestión del PO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo por la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5', tal como temperatura, pH, fuerza iónica, tampón, longitud de secuencia de los oligonucleótidos y enzimas. Por ejemplo, cuando se usa una polimerasa *Taq* de ADN como la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5', las condiciones para la escisión del PO incluyen tampón de Tris-HCl, KCl, MgCl₂ y temperatura.

Puede emplearse una multitud de tecnologías convencionales para la reacción de escisión del PO. Los sitios de escisión del PO varían dependiendo del tipo de oligonucleótidos secuencia arriba (sonda secuencia arriba o cebador secuencia arriba), de los sitios de hibridación de los oligonucleótidos secuencia arriba y de las condiciones de escisión (véanse las Patentes de EE.UU. nº 5.210.015, 5.487.972, 5.691.142, 5.994.069 y 7.381.532 y la Publicación de Solicitud de EE.UU. nº 2008-0241838).

La longitud y la secuencia del fragmento que contiene un único marcador puede variar dependiendo de la tecnología de escisión adoptada. En particular, cuando se usa el PO etiquetado, puede producirse su fragmento que comprende una secuencia parcial o total de la porción de etiquetado. Ajustando la ubicación del marcador único del PO etiquetado, el marcador único puede no existir en el fragmento que comprende una secuencia parcial o total de la porción de etiquetado.

Generalmente, el sitio inicial para la escisión del PO mediante la extensión del cebador secuencia arriba es un punto de partida de la hebra doble entre el PO y la secuencia de ácidos nucleicos objetivo o un sitio de 1-3 nucleótidos separado del punto de partida. El PO escindido tiene una longitud más corta, de forma que se disocia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo. Cuando se usa el PO etiquetado en 3' o el PO etiquetado en 5', puede producirse un fragmento que comprende la porción de etiquetado y una parte de la porción de direccionamiento. Cuando se emplea una reacción de escisión independiente de la extensión de los oligonucleótidos secuencia arriba, el sitio de escisión del PO se determina dependiendo de la ubicación de los oligonucleótidos secuencia arriba. Cuando se usa el PO etiquetado en 3' o el PO etiquetado en 5', un fragmento del PO producido puede comprender (i) una parte de la porción de etiquetado, (ii) la porción de etiquetado o (iii) la porción de etiquetado y una parte de la porción de direccionamiento.

El término usado en el presente documento "un fragmento que comprende la porción de etiquetado o una parte la porción de etiquetado" junto con la escisión del PO etiquetado por parte de la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' se usa para englobar (i) la porción de etiquetado, (ii) la porción de etiquetado y una secuencia parcial adyacente de la porción de direccionamiento y (iii) una parte de la porción de etiquetado.

El término "parte" usado junto con el PO tal como la parte de la porción de etiquetado en 5' del PO y la parte del extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' del PO se refiere a una secuencia de nucleótidos formada por 1-40, 1-30, 1-20, 1-15, 1-10 o 1-5 nucleótidos, preferentemente por 1, 2, 3 o 4 nucleótidos.

5 Según una realización preferida, la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' es una polimerasa de ADN que tiene una actividad de nucleasa en 5' o de nucleasa FEN, más preferentemente una polimerasa de ADN termoestable que tiene una actividad de nucleasa en 5' o de nucleasa FEN.

10 Una polimerasa de ADN adecuada que tiene una actividad de nucleasa en 5' en esta invención es una polimerasa de ADN termoestable obtenida a partir de diversas especies bacterianas que incluyen *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermus antranikianii*, *Thermus caldophilus*, *Thermus chliarophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus igniterrae*, *Thermus lacteus*, *Thermus oshimai*, *Thermus ruber*, *Thermus rubens*, *Thermus scotoductus*, *Thermus silvanus*, *Thermus species Z05*, *Thermus species sps 17*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosipho africanus*,
15 *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus barossi*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosipho africanus*, *Pirococcus woesei*, *Pyrococcus horikoshii*, *Pirococcus abyssi*, *Pirodictium occultum*, *Aquifexpirophilus* y *Aquifexaeolius*. Lo más preferentemente, la polimerasa de ADN termoestable es una polimerasa Taq.

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

La nucleasa FEN (endonucleasa de solapa) usada es una nucleasa específica de la solapa en 5'.

25 La nucleasa FEN adecuada en la presente invención comprende las nucleasas FEN obtenidas a partir de diversas especies bacterianas que incluyen *Sulfolobus solfataricus*, *Pirobaculum aerophilum*, *Thermococcus litoralis*, *Archaeoglobus veneficus*, *Archaeoglobus profundus*, *Acidianus brieryi*, *Acidianus ambivalens*, *Desulfurococcus amilolyticus*, *Desulfurococcus mobilis*, *Pirodictium brockii*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermococcus zilligii*, *Metanopyrus kandleri*, *Methanococcus igneus*, *Pirococcus horikoshii*, *Aeropyrum pernix* y *Archaeoglobus veneficus*.

30 Cuando se usa el cebador secuencia arriba en la etapa (a), es preferible que las condiciones para la escisión del PO comprendan la reacción de extensión del cebador secuencia arriba.

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

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

Etapa (c): hibridación con el CO en fase sólida

45 El resultante de la etapa (b) se pone en contacto con un CO (oligonucleótido de captura) inmovilizado sobre el sustrato sólido para la reacción de hibridación.

50 En la presente invención, la escisión del PO es detectada mediante el uso del CO inmovilizado sobre el sustrato sólido. Cuando el PO es escindido en la etapa (b), el PO no escindido que contiene el marcador único es hibridado con el CO inmovilizado sobre el sustrato sólido, de forma que en el sustrato sólido se proporciona una señal por parte del marcador único. Cuando se escinde el PO en la etapa (b), el fragmento que contiene un único marcador escindido no es hibridado con el CO, por lo que en el sustrato sólido no se proporciona una señal por parte del marcador único.

55 Dado que el hecho de la escisión del PO depende de la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, la secuencia de ácidos nucleicos objetivo puede ser detectada midiendo la extinción o la reducción de la señal del marcador único en el sustrato sólido.

60 El CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con el PO. El término usado en el presente documento "secuencia hibridable" junto con el CO se refiere a una secuencia capaz de formar un dúplex estable con el PO no escindido en la etapa (c). Por ejemplo, una secuencia hibridable del CO con el PO puede comprender una secuencia complementaria de toda o de una parte de la porción de direccionamiento del PO; de toda o de una parte de la porción de etiquetado del PO; de toda la porción de direccionamiento y de una parte de la porción de etiquetado del PO; de una parte de la porción de direccionamiento y de toda la porción de etiquetado del PO; o de una parte de la porción de direccionamiento y de una parte de la porción de etiquetado del PO.

65

No se pretende ninguna distinción entre los términos "secuencia de nucleótidos hibridable" y "secuencia de nucleótidos complementaria", y estos términos se usarán de forma intercambiable.

5 La reacción de hibridación de la etapa (c) se lleva a cabo en unas condiciones tales que el fragmento que contiene un único marcador no hibrida con el CO, y el PO no escindido hibrida con el CO para formar un dúplex de PO no escindido/CO.

10 En una realización de esta invención, el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de direccionamiento del PO. La secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de direccionamiento del PO comprende una secuencia complementaria de toda o de una parte de la porción de direccionamiento del PO, y tiene la complementariedad y la longitud suficientes para formar de forma estable un dúplex entre el PO no escindido y el CO en la reacción de hibridación de la etapa (c).

15 Como se ilustra en las Figs. 2 y 3, el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de direccionamiento del PO. Cuando está presente la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, el fragmento que contiene un único marcador generado por la reacción de escisión tiene una longitud menor que el PO no escindido, y por lo tanto no es capaz de hibridar con el CO en ciertas condiciones rigurosas (particularmente, de temperatura). Finalmente, el marcador único no existe en el sustrato sólido.

20 Alternativamente, el CO puede estar diseñado para no tener una secuencia hibridable con el fragmento que contiene un único marcador, para impedir que el fragmento que contiene un único marcador hibride con el CO.

25 Por lo tanto, cuando está presente la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, no se genera el dúplex entre el PO no escindido y el CO, y no se proporciona ninguna señal desde el marcador único.

30 Cuando la secuencia de ácidos nucleicos objetivo está ausente, el PO no escindido forma un dúplex con el CO, y el marcador único existe en el sustrato sólido.

35 Si los procesos ilustrados en las Figs. 2 y 3 se llevan a cabo usando una polimerasa que no tiene actividad de nucleasa en 5', el PO no etiquetado hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo no es escindido. Dado que el PO no etiquetado está hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, su hibridación con el CO puede impedirse en una condición delicadamente controlada, sin proporcionar ninguna señal desde el marcador único. Sin embargo, en el caso de que se usen enzimas que tienen una actividad de nucleasa en 5' como en la presente invención, el PO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo es escindido, y se mide el hecho de la escisión en una condición convenientemente establecida para detectar de forma precisa la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

40 Como se ilustra en las Figs. 4 y 5, el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado del PO. El marcador único del PO etiquetado está posicionado de forma que el marcador único no se queda en el fragmento que contiene la porción de etiquetado liberado por la escisión del PO etiquetado e hibridado con el CO. Incluso cuando el fragmento que contiene la porción de etiquetado está hibridado con el CO, no se proporciona señal el marcador único debido a que el fragmento que contiene la porción de etiquetado no porta el marcador único. La señal se proporciona tras la hibridación del PO etiquetado no escindido con el CO.

45 Cuando está presente la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, no se forma el dúplex entre el PO no escindido y el CO debido a la escisión del PO, dando como resultado una extinción (o una reducción) de la señal del marcador único en el sustrato sólido, que es indicativa de la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

50 Según una realización preferida que usa el PO etiquetado, la secuencia de nucleótidos del CO hibridable con la porción de etiquetado del PO comprende una secuencia complementaria de toda o de una parte de la porción de etiquetado del PO y tiene la complementariedad y la longitud suficientes para formar de forma estable un dúplex entre el PO etiquetado no escindido y el CO en la reacción de hibridación de la etapa (c).

55 Alternativamente, cuando se usa el PO etiquetado, el CO puede comprender una secuencia de nucleótidos hibridable con una parte de (o con toda) la porción de etiquetado y una parte de (o toda) la porción de direccionamiento del PO etiquetado. La posición del marcador único sobre el PO etiquetado se determina teniendo en consideración el método de escisión, el sitio de escisión y la secuencia del CO, y la escisión del PO etiquetado se lleva a cabo en unas condiciones tales que el fragmento que contiene un único marcador no hibrida con el CO. Preferiblemente, el marcador único está posicionado de tal forma que se queda sobre un fragmento liberado mediante la escisión del PO etiquetado, y no está hibridado con el CO.

60 Según una realización preferida que usa el PO etiquetado en 5', el CO puede comprender adicionalmente una porción de molde que sirve como molde para la extensión de la porción de etiquetado hibridada con el CO (véase la Fig. 6). El producto de extensión permite que la hibridación con el CO sea más estable. Para la extensión puede ser necesaria una polimerasa de ADN adicional.

65

El CO es inmovilizado sobre el sustrato sólido a través de su extremo 5' o de su extremo 3'.

Según una realización preferida, el PO es el PO etiquetado en 3' y el CO es inmovilizado sobre el sustrato sólido a través de su extremo 5' (Fig. 4). Preferiblemente, el PO es el PO etiquetado en 5' y el CO es inmovilizado sobre el sustrato sólido a través de su extremo 3' (Fig. 5).

Según una realización preferida, el sustrato sólido sobre el que el CO es inmovilizado es una micromatriz. El CO es inmovilizado directa o indirectamente (preferentemente indirectamente) a través de su extremo 5' o de su extremo 3' sobre la superficie del sustrato sólido. Adicionalmente, el CO puede ser inmovilizado en la superficie del sustrato sólido de una forma covalente o no covalente. Cuando los CO inmovilizados son inmovilizados indirectamente en la superficie del sustrato sólido, se usan algunos conectores adecuados. Los conectores útiles en esta invención pueden incluir cualquier conector utilizado para la inmovilización de sondas en la superficie de un sustrato sólido. Por ejemplo, los compuestos de alquilo o de arilo con una funcionalidad amina, o los compuestos de alquilo o de arilo con una funcionalidad tiol, sirven como conectores para la inmovilización del CO. Además, pueden usarse como conectores colas de poli (T) o colas de poli (A). Las colas de poli (T) o las colas de poli (A) son ventajosas en el sentido de que son capaces de disminuir el impedimento espacial sobre la acción de la enzima (por ejemplo, la reacción de escisión enzimática) y de aumentar la eficacia de la hibridación. Las colas de poli (T) o las colas de poli (A) no se consideran secuencias de sonda.

La micromatriz para proporcionar un entorno de reacción en esta invención puede incluir cualquiera de las conocidas por el experto en la materia. Todos los procesos de la presente invención, es decir, la hibridación con las secuencias de ácidos nucleicos objetivo, la escisión y la detección, se llevan a cabo en la micromatriz. Los CO inmovilizados en la micromatriz sirven como elementos hibridables de la matriz. El sustrato sólido para la fabricación de la micromatriz incluye, pero no se limita a, metales (por ejemplo, oro, una aleación de oro y cobre, aluminio), óxidos metálicos, vidrio, cerámica, cuarzo, silicio, un semiconductor, una oblea de Si/SiO₂, germanio, arseniuro de galio, carbono, nanotubos de carbono, polímeros (por ejemplo, poliestireno, polietileno, polipropileno y poliacrilamida), sefarosa, agarosa y coloides. Puede inmovilizarse una pluralidad de CO inmovilizados en esta invención en una región accesible o en dos o más regiones accesibles sobre un sustrato sólido que puede comprender 2-1.000.000 regiones accesibles. Los CO inmovilizados pueden fabricarse para producir una matriz o matrices para una aplicación dada mediante las tecnologías de fabricación convencionales, tales como fotolitografía, inyección de tinta, micromoteado mecánico y derivados de las mismas.

La presente invención realizada en la fase sólida puede detectar simultáneamente una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos objetivo incluso usando un único tipo de marcador, dado que los marcadores de los CO inmovilizados están físicamente separados. A este respecto, el número de secuencias de ácidos nucleicos objetivo que van a ser detectadas por presente invención en la fase sólida no está limitado.

Usando dispositivos de detección confocal sobre una fase sólida, la señal que sólo existe en el sustrato sólido puede ser detectada sin ninguna influencia de las señales de los marcadores en una solución de reacción.

La longitud del CO puede variar ampliamente. El CO puede tener cualquier longitud siempre que sea capaz de formar un dúplex con el PO no escindido. Por ejemplo, el CO tiene 5-80 nucleótidos, 5-60 nucleótidos, 5-40 nucleótidos, 5-30 nucleótidos, 10-80 nucleótidos, 10-60 nucleótidos, 10-40 nucleótidos, 10-30 nucleótidos, 10-20 nucleótidos, 15-80 nucleótidos, 15-60 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 15-30 nucleótidos o 15-20 nucleótidos de longitud.

Según una realización preferida que usa el PO etiquetado en 5', en la que el CO comprende adicionalmente la porción de molde para la extensión de la porción de etiquetado hibridada con el CO, el CO puede comprender adicionalmente una longitud adicional de 5-100 nucleótidos en la porción de molde.

Según una realización preferida, el extremo 3' del CO está bloqueado para impedir su extensión. El bloqueo no extensible del CO puede conseguirse según los métodos convencionales. Por ejemplo, el bloqueo puede llevarse a cabo mediante la adición, al grupo hidroxilo en 3' del último nucleótido del CO, de una fracción química tal como biotina, marcadores, un grupo fosfato, un grupo alquilo, un conector no nucleotídico, un fosforotioato o un alcanodiol. Alternativamente, el bloqueo puede llevarse a cabo mediante la eliminación del grupo hidroxilo en 3' del último nucleótido, o usando un nucleótido sin ningún grupo hidroxilo en 3', tal como un didesoxinucleótido.

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

La hibridación en la etapa (c) se lleva a cabo en unas condiciones tales que el fragmento que contiene un único marcador no es hibridado con el CO, y un PO no escindido es hibridado con el CO para formar un dúplex de PO no escindido/CO. Las condiciones de hibridación pueden ser determinadas de forma rutinaria mediante los métodos convencionales conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, las condiciones de hibridación pueden ser ajustadas según la temperatura, la concentración de los componentes, los tiempos de hibridación, los componentes del tampón, y su pH y fuerza iónica.

Según una realización preferida, las condiciones de hibridación en la etapa (c) se ajustan según la temperatura de la hibridación. Alternativamente, las condiciones de hibridación en la etapa (c), en particular las condiciones que permitan que el fragmento que contiene un único marcador no hibride con el CO, pueden proporcionarse mediante la exclusión en el CO de una secuencia que sea capaz de hibridar de forma estable con el fragmento que contiene un

5

El PO y el CO pueden estar formados por dNMP naturales. Alternativamente, el PO y el CO pueden estar formados por nucleótidos modificados o nucleótidos no naturales tales como PNA (ácido nucleico peptídico, véase la publicación PCT nº WO 92/20702) y LNA (ácido nucleico bloqueado, véanse las publicaciones PCT nº WO 98/22489, WO 98/39352 y WO 99/14226). El PO y el CO pueden comprender bases universales tales como desoxiinosina, inosina, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol y 5-nitroindol. El término "base universal" se refiere a aquella capaz de formar pares de bases con cada una de las bases naturales del ADN/ARN con poca discriminación entre ellas.

10

15 Etapa (d): detección de la escisión del PO indicativa de la presencia de la secuencia objetivo

Después de la reacción de hibridación, el hecho de la escisión del PO es detectado mediante la medición de una señal del marcador único en el sustrato sólido, mediante lo cual el hecho de la escisión del PO indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

20

Como se ha analizado anteriormente, el patrón de hibridación del PO con el CO es notablemente diferente dependiendo de la escisión del PO. Dicha diferencia en el patrón de hibridación es responsable de la diferencia en la señal del sustrato sólido. Por lo tanto, la presencia o la ausencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo puede ser determinada mediante la detección de la señal del marcador único en el sustrato sólido.

25

La etapa (d) se lleva a cabo mediante la medición de la señal del marcador único unido al PO en el sustrato sólido.

El marcador único del PO puede ser descrito como una molécula indicadora.

30

El marcador único usado incluye, pero no se limita a, marcadores químicos (por ejemplo, biotina), marcadores enzimáticos (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa, β -galactosidasa y β -glucosidasa), marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores electroquímicos y marcadores metálicos. Preferiblemente, el marcador único incluye marcadores fluorescentes.

35

El marcador único está ubicado de tal forma que el marcador único no se queda en un fragmento que es liberado por la escisión del PO e hibridado con el CO.

40

Cuando se usa el PO no etiquetado, el marcador único puede estar unido a cualquier sitio. Preferiblemente, el marcador único está unido a una porción del extremo 5' o a una porción del extremo 3' del PO no etiquetado. Más preferentemente, está ubicado en el extremo 5' o en el extremo 3' o a 1-20 nucleótidos (aún más preferentemente a 1-10 nucleótidos) lejos del extremo 5' o del extremo 3' del PO no etiquetado, aún más preferentemente, en el extremo 5' o en el extremo 3'.

45

Según una realización preferida que usa el PO etiquetado, el marcador único está posicionado de tal forma que el marcador único no se queda en el fragmento que contiene una porción de etiquetado por la escisión del PO etiquetado. Más preferentemente, el marcador único está posicionado de tal forma que el marcador único no se queda en el fragmento que contiene una porción de etiquetado que es liberado por la escisión del PO etiquetado e hibridado con el CO.

50

La ubicación del marcador único puede ser determinada teniendo en consideración los métodos de escisión, los sitios de escisión y la liberación del PO escindido desde la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

55

Más preferentemente, el marcador único está ubicado en una porción del extremo 5' o a 1-20 nucleótidos (aún más preferentemente a 1-10 nucleótidos) lejos del extremo 5' del PO etiquetado en 3', y ubicado en una porción del extremo 3' o a 1-20 nucleótidos (aún más preferentemente a 1-10 nucleótidos) lejos del extremo 3' del PO etiquetado en 5'. Aún más preferentemente, el marcador único está ubicado en el extremo 5' del PO etiquetado en 3', y ubicado en el extremo 3' del PO etiquetado en 5'.

60

Según una realización preferida, el PO etiquetado tiene el marcador único; el marcador único está posicionado en la porción de direccionamiento del PO etiquetado; el marcador único está posicionado de forma que el marcador único no se queda en fragmento que contiene la porción de etiquetado generado por la escisión del PO en la etapa (b); y el dúplex entre el fragmento que contiene la porción de etiquetado y el CO no tiene el marcador único, y el dúplex de PO no escindido/CO tiene el marcador único (véanse las Figs. 4 y 5). El fragmento que contiene la porción de etiquetado/dúplex de CO inmovilizado en el sustrato sólido no consigue proporcionar la señal debido a la ausencia del marcador único; sin embargo, el dúplex de PO no escindido/CO proporciona la señal debido a la presencia del marcador único en el PO no escindido.

65

Como se ha descrito anteriormente, la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo se detecta mediante la medición de la señal del marcador único en el sustrato sólido.

5 Según una realización preferida que usa el PO con el marcador único, la señal medida finalmente se compara con la señal de un control negativo que no tiene ninguna secuencia de ácidos nucleicos objetivo. Entonces se determina la extinción (o la reducción) de la señal para detectar la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

10 Según una realización preferida que usa el PO con el marcador único, cuando la detección en el sustrato sólido se lleva a cabo de forma continua junto con repeticiones de la escisión de PO, el número de PO escindido se aumenta con el número de repeticiones de la reacción de escisión y la señal disminuye en paralelo con el número de PO escindidos. Después, la secuencia de ácidos nucleicos objetivo puede ser detectada en tiempo real. Por el contrario, el cambio de la señal no se observa en ausencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

15 Algunos marcadores fluorescentes individuales útiles en la presente invención pueden incluir cualquier molécula conocida en la materia. Algunos ejemplos de estos son: Cy2™ (506), YO-PRO™-1 (509), YOYO™-1 (509), Calcein (517), FITC (518), Fluor™ (519), Alexa™ (520), Rhodamina 110 (520), Oregon Green™ 500 (522), Oregon Green™ 488 (524), RiboGreen™ (525), Rhodamina Green™ (527), Rhodamina 123 (529), Magnesium Green™ (531), Calcium Green™ (533), TO-PRO™-1 (533), TOTO1 (533), JOE (548), BODIPY530/550 (550), Dil (565), BODIPY TMR (568), BODIPY558/568 (568), BODIPY564/570 (570), Cy3™ (570), Alexa™ 546 (570), TRITC (572), Magnesium Orange™ (575), Phycoerythrin R&B (575), Rhodamina Phalloidin (575), Calcium Orange™ (576), Pionin Y (580), Rhodamina B (580), TAMRA (582), Rhod- amina Red™ (590), Cy3.5™ (596), ROX (608), Calcium Crimson™ (615), Alexa™ 594 (615), Texas Red(615), Nile Red (628), YO-PRO™-3 (631), YOYO™-3 (631), R-phycocianin (642), C-Phycocianin (648), TO-PRO™-3 (660), TOTO3 (660), DiD DilC(5) (665), Cy5™ (670), Tiadicarbocianine (671), Cy5.5 (694), HEX (556), TET (536), Biossearch Blue (447), CAL Fluor Gold 540 (544), CAL Fluor Orange 560 (559), CAL Fluor Red 590 (591), CAL Fluor Red 610 (610), CAL Fluor Red 635 (637), FAM (520), Fluorescein (520), Fluorescein-C3 (520), Pulsar 650 (566), Quasar 570 (667), Quasar 670 (705) y Quasar 705 (610). Las cifras entre paréntesis es la longitud de onda de emisión máxima en nanómetros. Preferiblemente, los marcadores fluorescentes individuales incluyen JOE, FAM, TAMRA, ROX y un marcador basado en fluoresceína.

30 El marcador único puede ser unido al PO mediante una diversidad de métodos conocidos por el experto en la materia. Preferiblemente, el marcador único puede ser unido al PO a través de un separador que contiene al menos tres átomos de carbono (por ejemplo, un separador de 3 carbonos, un separador de 6 carbonos y un separador de 12 carbonos).

35 II. Proceso de detección del objetivo mediante un POCH que usa un marcador doble

La presente invención muestra un excelente comportamiento usando un marcador doble interactivo en la detección de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

40 En otro aspecto de esta invención, se proporciona un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos objetivo a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo de POCH (escisión e hibridación de un PO) sobre un sustrato sólido, que comprende:

45 (a) hibridar la secuencia de ácidos nucleicos objetivo con un oligonucleótido secuencia arriba y un oligonucleótido de sondeo (PO); en el que el oligonucleótido secuencia arriba comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el PO comprende una porción de direccionamiento que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el PO tiene un marcador doble interactivo que comprende una molécula donante y una molécula aceptora; el oligonucleótido secuencia arriba está ubicado secuencia arriba del PO; el oligonucleótido secuencia arriba o su hebra extendida induce la escisión del PO por parte de una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5';

50 (b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' en unas condiciones para la escisión del PO; en el que cuando el PO es hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, el PO es escindido por la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' para separar el marcador doble interactivo, mediante lo cual se produce un fragmento que contiene el donante y un fragmento que contiene el aceptor;

55 (c) llevar a cabo una reacción de hibridación poniendo en contacto el resultante de la etapa (b) con un oligonucleótido de captura (CO) inmovilizado sobre el sustrato sólido; en el que el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con el PO; en el que la reacción de hibridación se lleva a cabo en unas condiciones tales que al menos uno del fragmento que contiene el donante y del fragmento que contiene el aceptor no es hibridado con el CO, y un PO no escindido es hibridado con el CO para formar un dúplex de PO no escindido/CO; en el que una señal del dúplex de PO no escindido/CO se diferencia de una señal proporcionada en el momento en el que al menos uno del fragmento que contiene el donante y el fragmento que contiene el aceptor no está hibridado con el CO; y

(d) detectar el hecho de la escisión del PO mediante la medición de una señal del marcador doble interactivo en el sustrato sólido; mediante lo cual, el hecho de la escisión del PO indica la presencia de la secuencia de los ácidos nucleicos objetivo.

5 Dado que la segunda realización de esta invención es la misma que la primera realización que usa el marcador único excepto por un sistema de marcador, las descripciones habituales entre ellas se han omitido con objeto de evitar una excesiva redundancia que produciría complejidad en esta memoria descriptiva. El marcador doble interactivo del donante/aceptor está unido al PO.

10 El marcador doble interactivo es un sistema generador de una señal en el que la energía pasa de una forma no radioactiva entre una molécula donante y una molécula aceptora. Como un representante del sistema marcador interactivo, el sistema marcador de FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) incluye una molécula indicadora fluorescente (molécula donante) y una molécula inactivadora (molécula aceptora). En la FRET, el donante de energía es fluorescente, pero el aceptor de la energía puede ser fluorescente o no fluorescente. En 15 otra forma de sistemas marcadores interactivos, el donante de energía no es fluorescente, por ejemplo, un cromóforo, y el aceptor de energía es fluorescente. En otra forma más de sistemas marcadores interactivos, el donante de energía es luminiscente, por ejemplo, bioluminiscente, quimioluminiscente, electroquimioluminiscente, y el aceptor es fluorescente.

20 Según una realización preferida, el PO tiene un marcador doble interactivo, más preferentemente un marcador de FRET, aún más preferentemente un marcador doble que comprende una molécula donante y una molécula aceptora (véanse las Figs. 7-13).

25 La molécula donante y la molécula aceptora útiles en esta invención incluyen cualquier molécula conocida por el experto en la materia, y sus ejemplos pueden describirse con referencia a los marcadores fluorescentes descritos anteriormente.

Algunos pares adecuados de donante-aceptor se divulgan en diversas publicaciones como sigue: Pesce et al., editors, Fluorescence Spectroscopy (Marcel Dekker, Nueva York, 1971); White et al., Fluorescence Analysis: A Practical Approach (Marcel Dekker, Nueva York, 1970); Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2ª Edición (Academic Press, Nueva York, 1971); Griffiths, Color AND Constitution of Organic Molecules (Academic Press, Nueva York, 1976); Bishop, editor, Indicators (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Molecular Probes, Eugene, 1992); Pringsheim, Fluorescence and Phosphorescence (Interscience Publishers, Nueva York, 1949); Haugland, R. P., Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6ª Edición (Molecular Probes, Eugene, Oreg., 1996) las Patentes de EE.UU. nº 3.996.345 y 4.351.760.

40 En el sistema de señalización que comprende un indicador y un inactivador adoptado para el PO, el indicador engloba un donante de FRET y el inactivador engloba el otro compañero (aceptor) de la FRET. Por ejemplo, Se usa un colorante de fluoresceína como indicador y un colorante de rodamina como inactivador.

45 La molécula donante (indicador) y la molécula aceptora (inactivador) unidas al PO pueden ser fluorescentes o no fluorescentes. Por ejemplo, puede usarse un inactivador oscuro no fluorescente capaz de inactivar la fluorescencia con un intervalo de longitudes de onda más amplio o una longitud de onda específica en esta invención. Cuando la molécula aceptora (inactivador) es fluorescente, la señal de la molécula aceptora (inactivador) puede emplearse para la detección de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

La presente invención se describirá con más detalle como sigue:

50 Etapa (a): hibridación de un oligonucleótido secuencia arriba y un PO con una secuencia de ácidos nucleicos objetivo

La etapa (a) de la segunda realización de esta invención puede comprenderse mediante una referencia a las descripciones de la etapa (a) de la primera realización.

55 El PO tiene un marcador doble interactivo que comprende una molécula donante y una molécula aceptora que proporciona una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

60 Etapa (b): escisión del PO

La etapa (b) de la segunda realización de esta invención puede comprenderse mediante una referencia a las descripciones de la etapa (b) de la primera realización.

65 El resultante de la etapa (a) se pone en contacto con una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5' en unas condiciones para la escisión del PO.

El PO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo es digerido por la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' para separar el marcador doble interactivo, mediante lo cual se produce un fragmento que contiene el donante y un fragmento que contiene el aceptor (véanse las Figs. 7-13).

5 Según una realización preferida, la molécula donante y la molécula aceptor del PO son separadas por un sitio de escisión por parte de la enzima que tiene actividad de nucleasa en 5'.

En ausencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, el PO no es digerido por la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5', y por lo tanto el marcador doble interactivo no se separa.

10

Etapa (c): hibridación con el CO en fase sólida

El resultante de la etapa (b) se pone en contacto con un CO (oligonucleótido de captura) inmovilizado sobre el sustrato sólido para una reacción de hibridación.

15

La etapa (c) de la segunda realización de esta invención puede comprenderse mediante una referencia a las descripciones de la etapa (c) de la primera realización. La reacción de hibridación se lleva a cabo en unas condiciones tales que al menos uno del fragmento que contiene el donante y el fragmento que contiene el aceptor no está hibridado con el CO, y un PO no escindido está hibridado con el CO para formar un dúplex de PO no escindido/CO. Las condiciones de hibridación pueden ser determinadas de forma rutinaria mediante los métodos convencionales conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, las condiciones de hibridación pueden ajustarse según la temperatura, la concentración de componentes, los tiempos de hibridación, los componentes del tampón, y su pH y fuerza iónica.

20

25 Según una realización preferida, las condiciones de hibridación tales que al menos uno del fragmento que contiene el donante y el fragmento que contiene el aceptor no está hibridado con el CO se ajustan según la temperatura de la hibridación. Alternativamente, las condiciones de hibridación en la etapa (c) pueden proporcionarse mediante la exclusión en el CO de una secuencia que sea capaz de hibridar de forma estable con el fragmento que contiene el marcador.

30

Cuando está presente la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, al menos uno del fragmento que contiene el donante y el fragmento que contiene el aceptor no está hibridado con el CO. En el caso de la ausencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, el PO no escindido que tiene el marcador doble interactivo está hibridado con el CO.

35

La señal proporcionada por el dúplex de PO no escindido/CO (es decir, en ausencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo) se diferencia notablemente de una señal proporcionada en el momento en el que al menos uno del fragmento que contiene el donante y el fragmento que contiene el aceptor no está hibridado con el CO (es decir, en presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo). Por lo tanto, la señal del marcador doble interactivo se genera de forma diferente dependiendo de la presencia o de la ausencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

40

Etapa (d): detección de la escisión del PO indicativa de la presencia de la secuencia objetivo

45 Después de la reacción de hibridación, el hecho de la escisión del PO se detecta mediante la medición de una señal del marcador doble interactivo en el sustrato sólido, mediante lo cual el hecho de la escisión del PO indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

50

Como se ha analizado anteriormente, el patrón de hibridación del PO con el CO es notablemente diferente dependiendo de la escisión del PO. Dicha diferencia en el patrón de hibridación es responsable de la diferencia en la señal del sustrato sólido. Por lo tanto, la presencia o la ausencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo puede ser determinada mediante la detección de la señal del marcador doble interactivo en el sustrato sólido.

55

En el caso de usar el marcador doble interactivo, la señal se emite de dos formas. La primera forma es medir la señal generada desde la molécula aceptor, y la segunda forma es medir la señal generada desde la molécula donante.

La primera forma de medición se ilustra en las Figs. 7-9.

60

La Fig. 7 que usa el PO no etiquetado representa una realización para la medición de la señal de la molécula aceptor. Según una realización preferida, la secuencia de nucleótidos hibridable con el PO en el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de direccionamiento del PO. En este caso, el marcador doble interactivo está ubicado preferentemente de tal forma que la señal de la molécula donante es inactivada por la molécula aceptor cuando se forma el dúplex de PO no escindido/CO, en el que la etapa (d) se lleva a cabo mediante la detección de la señal de la molécula aceptor.

65

Como se ejemplifica en la Fig. 7, cuando la molécula donante y la molécula aceptora son adyacentes entre sí en el PO no etiquetado, hasta el punto de que la energía pasa entre la molécula donante y la molécula aceptora (por ejemplo, adyacente para permitir un fenómeno de FRET), el PO no etiquetado hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo es escindido para formar un fragmento que contiene la molécula donante y un fragmento que contiene la molécula aceptora. Por lo tanto, la interacción entre la molécula donante y la molécula aceptora no se produce salvo que el fragmento que contiene la molécula donante y el fragmento que contiene la molécula aceptora estén hibridados con el CO en la etapa (c), no proporcionando finalmente ninguna señal en el sustrato sólido.

La expresión usada en el presente documento "la molécula donante y la molécula aceptora son adyacentes" significa que la molécula donante y la molécula aceptora están separadas por varios nucleótidos en la sonda de tal forma que de que la energía pasa entre la molécula donante y la molécula aceptora. Preferiblemente, la molécula donante y la molécula aceptora están separadas por 1-20, 1-15 y 1-10 nucleótidos.

En el caso de que la secuencia de ácidos nucleicos objetivo esté ausente, el PO no escindido no etiquetado está hibridado con el CO, y se produce la interacción entre la molécula donante y la molécula aceptora, proporcionando así la señal desde la molécula aceptora. La iluminación con luz con una longitud de onda de excitación para la molécula donante genera fluorescencia desde la molécula donante, que después es inactivada por la molécula aceptora, proporcionando finalmente una señal fluorescente desde el aceptor.

En presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, el dúplex de PO no escindido/CO no se forma debido a la escisión del PO, y por lo tanto no consigue proporcionar la señal desde el aceptor. La medición de la extinción (o de la reducción) de la señal de la molécula aceptora en el sustrato sólido permite la determinación de la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

Las Figs. 8 y 9 que usan el PO etiquetado representan realizaciones para la medición de la señal de la molécula aceptora. Según una realización preferida, el PO es un PO etiquetado en 3' que comprende adicionalmente en su porción 3' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, o un PO etiquetado en 5' que comprende adicionalmente en su porción 5' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, y la secuencia de nucleótidos hibridable con el PO en el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado del PO. El marcador doble interactivo está ubicado preferentemente de tal forma que una señal de la molécula donante es inactivada por la molécula aceptora cuando se forma el dúplex de PO no escindido/CO, en el que la etapa (d) se lleva a cabo mediante la detección de una señal de la molécula aceptora.

Como se ilustra en la Fig. 8 que usa el PO etiquetado en 3', cuando la molécula donante y la molécula aceptora están conformacionalmente adyacentes entre sí de tal forma que la energía pasa entre la molécula donante y la molécula aceptora, el PO etiquetado en 3' hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo es escindido para formar un fragmento que contiene la molécula donante y un fragmento que contiene la molécula aceptora. El fragmento que contiene la molécula aceptora que comprende la porción de etiquetado está hibridado con el CO que comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado del PO etiquetado en 3', pero el fragmento que contiene la molécula donante no está implicado en la hibridación con el CO, por lo que no consigue proporcionar la señal desde el aceptor.

La expresión usada en el presente documento "la molécula donante y la molécula aceptora están conformacionalmente adyacentes" significa que la molécula donante y la molécula aceptora están tridimensionalmente adyacentes entre sí mediante una estructura conformacional de una parte del PO o del PO, tal como una espiral aleatoria y una estructura en horquilla.

En el caso de que la secuencia de ácidos nucleicos objetivo esté ausente, el PO no escindido etiquetado en 3' está hibridado con el CO, y se produce la interacción entre la molécula donante y la molécula aceptora, proporcionando así la señal desde la molécula aceptora.

En presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, el dúplex de PO no escindido/CO no se forma debido a la escisión del PO etiquetado en 3', y por lo tanto no consigue proporcionar la señal desde el aceptor. La medición de la extinción (o de la reducción) de la señal de la molécula aceptora en el sustrato sólido permite la determinación de la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

Según una realización preferida, la molécula donante y la molécula aceptora del PO etiquetado en 3' están adyacentes entre sí de tal forma que la energía pasa entre ellas. La molécula donante y la molécula aceptora están ubicadas en el PO etiquetado en 3' en una dirección de a 5' a 3' o en una dirección de 3' a 5'.

Según una realización preferida, tanto la molécula donante como la molécula aceptora están ubicadas en la porción de direccionamiento del PO etiquetado en 3', o una de ellas está ubicada en la porción de direccionamiento y la otra está ubicada en la porción de etiquetado del PO etiquetado en 3'.

- Como se ilustra en la Fig. 9 que usa el PO etiquetado en 5', cuando la molécula donante y la molécula aceptora están conformacionalmente adyacentes entre sí de tal forma que la energía pasa entre la molécula donante y la molécula aceptora, el PO etiquetado en 5' hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo es escindido para formar un fragmento que contiene la molécula donante y un fragmento que contiene la molécula aceptora. El fragmento que contiene la molécula donante que comprende la porción de etiquetado está hibridado con el CO que comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado del PO etiquetado en 5' pero el fragmento que contiene la molécula aceptora no está implicado en la hibridación con el CO, por lo que no consigue proporcionar la señal del aceptor.
- En el caso de que la secuencia de ácidos nucleicos objetivo esté ausente, el PO no escindido etiquetado en 5' está hibridado con el CO y se produce la interacción entre la molécula donante y la molécula aceptora, proporcionando así la señal desde la molécula aceptora.
- En presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, el dúplex de PO no escindido/CO no se forma debido a la escisión del PO etiquetado en 5', y por lo tanto no consigue proporcionar la señal desde el aceptor. La medición de la extinción (o de la reducción) de la señal de la molécula aceptora en el sustrato sólido permite la determinación de la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.
- Según una realización preferida, la molécula donante y la molécula aceptora del PO etiquetado en 5' están adyacentes entre sí de tal forma que la energía pasa entre ellas. La molécula donante y la molécula aceptora están ubicadas en el PO etiquetado en 5' en una dirección de 5' a 3' o en una dirección de 3' a 5'.
- Según una realización preferida, tanto la molécula donante como la molécula aceptora están ubicadas en la porción de direccionamiento del PO etiquetado en 5', o una de ellas está ubicada en la porción de direccionamiento y la otra está ubicada en la porción de etiquetado del PO etiquetado en 5'.
- La segunda forma de medición se ilustra en las Figs. 10-12.
- La Fig. 10 que usa el PO no etiquetado representa una realización para la medición de la señal de la molécula donante. Según una realización preferida, la secuencia de nucleótidos hibridable con el PO en el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de direccionamiento del PO. La reacción de hibridación en la etapa (c) se lleva a cabo en unas condiciones tales que el fragmento que contiene el donante no está hibridado con el CO; en el que el marcador doble interactivo está ubicado de tal forma que una señal de la molécula donante es inactivada por la molécula aceptora cuando se forma el dúplex de PO no escindido/CO, y la etapa (d) se lleva a cabo mediante la detección de una señal de la molécula donante.
- Como se ejemplifica en la Fig. 10, cuando la molécula donante y la molécula aceptora están conformacionalmente adyacentes entre sí en el PO no etiquetado hasta el punto de que la energía pasa entre la molécula donante y la molécula aceptora, el PO no etiquetado hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo es escindido para formar un fragmento que contiene la molécula donante y un fragmento que contiene la molécula aceptora. La hibridación se lleva a cabo en la etapa (c) en unas condiciones tales que el fragmento que contiene la molécula donante no está hibridado con el CO. Por lo tanto, la señal de la molécula donante no se proporciona en el sustrato sólido.
- En el caso de que la secuencia de ácidos nucleicos objetivo esté ausente, el PO no escindido no etiquetado está hibridado con el CO para separar la molécula donante y la molécula aceptora, dando como resultado que se impide la interacción entre la molécula donante y la molécula aceptora. La iluminación con luz con una longitud de onda de excitación para la molécula donante (por ejemplo, una molécula indicadora) genera fluorescencia desde la molécula donante que no es inactivada por la molécula aceptora, proporcionando finalmente una señal fluorescente del donante.
- En presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, el dúplex de PO no escindido/CO no se forma debido a la escisión del PO y el fragmento que contiene el donante no está hibridado con el CO, por lo tanto, no consigue proporcionar las señales del donante. La medición de la extinción (o de la reducción) de la señal de la molécula donante en el sustrato sólido permite la determinación de la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.
- Según una realización preferida, la molécula donante y la molécula aceptora están ubicadas en el PO no etiquetado en una dirección de 5' a 3' o en una dirección de 3' a 5', más preferentemente en una dirección de 5' a 3'.
- Las Figs. 11 y 12 que usan el PO etiquetado representan realizaciones para la medición de la señal de la molécula donante. Según una realización preferida, el PO es un PO etiquetado en 3' que comprende adicionalmente en su porción 3' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, o un PO etiquetado en 5' que comprende adicionalmente en su porción 5' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, y la secuencia de nucleótidos hibridable con el PO en el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado del PO. El fragmento que contiene el donante comprende la porción de etiquetado

hibridable con el CO y en la reacción de hibridación en la etapa (c), el fragmento que contiene el donante está hibridado con el CO. El marcador doble interactivo está ubicado preferentemente de tal forma que una señal de la molécula donante es inactivada por la molécula aceptora cuando se forma el dúplex de PO no escindido/CO, en el que la etapa (d) se lleva a cabo mediante la detección de una señal desde la molécula donante.

5 Como se ilustra en la Fig. 11 que usa el PO etiquetado en 3', cuando la molécula donante y la molécula aceptora están conformacionalmente adyacentes entre sí de tal forma que la energía pasa entre la molécula donante y la molécula aceptora, el PO etiquetado en 3' hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo es escindido para formar un fragmento que contiene la molécula donante y un fragmento que contiene la molécula aceptora. El
10 fragmento que contiene la molécula donante que comprende la porción de etiquetado está hibridado con el CO que comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado del PO etiquetado en 3' pero el fragmento que contiene la molécula aceptora no está implicado en la hibridación con el CO, proporcionando por lo tanto la señal desde el donante.

15 En el caso de que la secuencia de ácidos nucleicos objetivo esté ausente, el PO no escindido etiquetado en 3' está hibridado con el CO y se produce la interacción entre la molécula donante y la molécula aceptora para provocar el paso de energía desde la molécula donante a la molécula aceptora, no generando así ninguna fluorescencia desde la molécula donante.

20 En presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, el PO etiquetado en 3' es escindido, y el fragmento que contiene la molécula donante que comprende la porción de etiquetado está hibridado con el CO, proporcionando la señal desde la molécula donante. La medición de la generación (o del aumento) de la señal desde la molécula donante en el sustrato sólido permite la determinación de la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

25 Según una realización preferida, la molécula donante y la molécula aceptora del PO etiquetado en 3' están adyacentes entre sí de tal forma que la energía pasa entre ellas. La molécula aceptora y la molécula donante están ubicadas en el PO etiquetado en 3' en una dirección de 5' a 3'.

30 Según una realización preferida, tanto la molécula aceptora como la molécula donante están ubicadas en la porción de direccionamiento del PO etiquetado en 3', o la molécula aceptora está ubicada en la porción de direccionamiento y la molécula donante está ubicada en la porción de etiquetado del PO etiquetado en 3'.

35 Como se ilustra en la Fig. 12 que usa el PO etiquetado en 5', cuando la molécula donante y la molécula aceptora están conformacionalmente adyacentes entre sí de tal forma que la energía pasa entre la molécula donante y la molécula aceptora, el PO etiquetado en 5' hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo es escindido para formar un fragmento que contiene la molécula aceptora y un fragmento que contiene la molécula donante que comprende la porción de etiquetado. El fragmento que contiene la molécula donante que comprende la porción de etiquetado está hibridado con el CO que comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado del PO etiquetado en 5', pero el fragmento que contiene la molécula aceptora no está implicado en la
40 hibridación con el CO, proporcionando por lo tanto la señal desde el donante, indicativa de la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo. En el caso de que la secuencia de ácidos nucleicos objetivo esté ausente, el PO no escindido etiquetado en 5' está hibridado con el CO y se produce la interacción entre la molécula donante y la molécula aceptora para provocar el paso de energía de la molécula donante a la molécula aceptora, no generando así ninguna señal de fluorescencia desde la molécula donante.

45 En presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, el PO etiquetado en 5' es escindido, y el fragmento que contiene la molécula donante que comprende la porción de etiquetado está hibridado con el CO, proporcionando la señal desde la molécula donante. La medición de la generación (o del aumento) de la señal desde la molécula donante en el sustrato sólido permite la determinación de la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

50 Según una realización preferida, la molécula donante y la molécula aceptora del PO etiquetado en 5' están adyacentes entre sí de tal forma que la energía pasa entre ellas. La molécula donante y la molécula aceptora están ubicadas en el PO etiquetado en 5' en una dirección de 5' a 3'.

55 Según una realización preferida, tanto la molécula donante como la molécula aceptora están ubicadas en la porción de direccionamiento del PO etiquetado en 5', o la molécula aceptora está ubicada en la porción de direccionamiento y la molécula donante está ubicada en la porción de etiquetado del PO etiquetado en 5'.

60 En la alternativa que usa el PO etiquetado, el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con una parte de (o toda) la porción de etiquetado y con una parte de (o toda) la porción de direccionamiento del PO etiquetado. La posición del marcador doble interactivo en el PO se determina teniendo en consideración el método de escisión y el sitio de escisión, así como la secuencia del CO.

III. Proceso de detección del objetivo mediante un POCH que usa un agente intercalante

La presente invención también muestra un excelente comportamiento usando un agente intercalante en la detección de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

5 En otro aspecto de esta invención, se proporciona un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos objetivo a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo de POCH (escisión e hibridación de un PO) sobre un sustrato sólido, que comprende:

- 10 (a) hibridar la secuencia de ácidos nucleicos objetivo con un oligonucleótido secuencia arriba y un oligonucleótido de sondeo (PO); en el que el oligonucleótido secuencia arriba comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el PO comprende una porción de direccionamiento que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el oligonucleótido secuencia arriba está ubicado secuencia arriba del PO; el oligonucleótido secuencia arriba o su hebra extendida induce la escisión del PO por parte de una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5';
- 15 (b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' en unas condiciones para la escisión del PO; en el que cuando el PO está hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, el PO es escindido por la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' para producir un fragmento escindido;
- 20 (c) llevar a cabo una reacción de hibridación en presencia de un agente intercalante poniendo en contacto el resultante de la etapa (b) con un oligonucleótido de captura (CO) inmovilizado sobre el sustrato sólido; en el que el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con el PO; en el que la reacción de hibridación se lleva a cabo en unas condiciones tales que el fragmento escindido no está hibridado con el CO, y un PO no escindido está hibridado con el CO para formar un dúplex de PO no escindido/CO; y
- 25 (d) detectar el hecho de la escisión del PO mediante la medición de una señal del agente intercalante en el sustrato sólido; mediante lo cual, el hecho de la escisión del PO indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

30 Dado que la tercera realización de esta invención es la misma que la primera realización que usa el marcador único excepto por un sistema de marcador, las descripciones habituales entre ellas se han omitido con objeto de evitar una excesiva redundancia que produciría complejidad en esta memoria descriptiva.

35 Según una realización preferida, la reacción de hibridación se lleva a cabo en unas condiciones tales que el fragmento escindido producido por la escisión del PO no está hibridado con el CO.

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

45 Cuando está presente la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, el dúplex de PO no escindido/CO no se forma debido a la escisión del PO, y por lo tanto no se proporciona la señal desde el agente intercalante. La medición de la extinción (o de la reducción) de la señal del agente intercalante en el sustrato sólido permite la determinación de la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo (véase la Fig. 13).

50 Según una realización preferida, el método comprende adicionalmente la repetición de las etapas (a)-(b), (a)-(c) o (a)-(d) con una desnaturalización entre los ciclos repetidos. Esta repetición permite amplificar la secuencia de ácidos nucleicos objetivo y/o la señal del objetivo.

55 Según una realización preferida, las etapas (a)-(d) se llevan a cabo en un recipiente de reacción o en varios recipientes de reacción individuales. Más preferentemente, las etapas (a)-(b) y las etapas (c)-(d) se llevan a cabo en un recipiente de reacción o en varios recipientes de reacción individuales.

60 Preferiblemente, las etapas (a)-(b) y las etapas (c)-(d) pueden llevarse a cabo por separado incluso en un recipiente de reacción. Por ejemplo, cuando la hibridación entre la porción de direccionamiento del PO y la secuencia de ácidos nucleicos objetivo se produce en unas condiciones más rigurosas que las de la hibridación entre el fragmento del PO y el CO, la repetición de las etapas (a)-(b) puede llevarse a cabo sin realizar las etapas (c)-(d). Después de finalizar la repetición de las etapas (a)-(b), pueden llevarse a cabo las etapas (c)-(d) sucesivamente.

Cuando las etapas (a)-(b) y las etapas (c)-(d) pueden llevarse a cabo por separado, las etapas (a)-(b) se llevan a cabo de forma repetida con una desnaturalización entre los ciclos de repetición.

65 Cuando la presente invención que usa un cebador secuencia arriba se lleva a cabo mediante la repetición de las etapas con una desnaturalización entre los ciclos de repetición, es preferible llevar a cabo el método en presencia de

un cebador secuencia abajo. Lo más preferentemente, el presente método se lleva a cabo según una PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

5 Cuando la presente invención que usa una sonda secuencia arriba se lleva a cabo mediante etapas de repetición con una desnaturalización entre los ciclos de repetición, es preferible llevar a cabo el método en presencia de un cebador secuencia abajo.

10 La presente invención no requiere que las secuencias de ácidos nucleicos objetivo que se van a detectar y/o a amplificar tengan ninguna secuencia o longitud en particular, incluyendo cualquier molécula de ADN (ADNg y ADNc) y de ARN.

15 Cuando se emplea un ARNm como material de partida, es necesaria una etapa de transcripción inversa antes de llevar a cabo la etapa de apareamiento, cuyos detalles se encuentran en Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); y en Noonan, K. F. et al., Nucleic Acids Res. 16: 10366 (1988). Para la transcripción inversa puede usarse un hexámero aleatorio o un cebador oligonucleotídico de dT hibridable con el ARNm.

20 Las secuencias de ácidos nucleicos objetivo que pueden ser detectadas y/o amplificadas incluyen cualquier ácido nucleico natural, eucariota (por ejemplo, de protozoos y parásitos, de hongos, de levaduras, de plantas superiores, de animales inferiores y superiores, incluyendo mamíferos y seres humanos) o vírico (por ejemplo, de virus Herpes, del VIH, del virus de la gripe, del virus de Epstein-Barr, del virus de la hepatitis, del virus de la polio, etc.) o viroide.

25 La secuencia de ácidos nucleicos objetivo que va a ser detectada por la presente invención incluye una gran diversidad de secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo, secuencias en un genoma, secuencias aisladas o fragmentadas artificialmente y secuencias sintetizadas (por ejemplo, secuencias de ADNc y secuencias de código de barras). Por ejemplo, la secuencia de ácidos nucleicos objetivo incluye secuencias marcadoras de ácidos nucleicos para una inmuno-PCR (IPCR). La IPCR emplea conjugados entre secuencias marcadoras de ácidos nucleicos y anticuerpos junto con una PCR, que se aplica ampliamente para la detección de diversos tipos de objetivos que incluyen proteínas (véase Sano et al., Science 258 págs.: 120-122 (1992), Patente de EE.UU. nº 5.665.539, Niemeyer et al., Trends in Biotechnology 23 págs.: 208-216 (2005), Publicación de Patente de EE.UU. nº 2005/0239108, y Ye et al., Journal of Environmental Science 22 págs.: 796-800 (2010)).

35 El término "variación de nucleótido" usado en el presente documento se refiere a cualquier sustitución, delección o inserción única o múltiple de nucleótidos en una secuencia de ADN en una ubicación particular entre segmentos contiguos de ADN que por lo demás tienen una secuencia similar.

40 Dichos segmentos contiguos de ADN incluyen un gen o cualquier otra porción de un cromosoma. Estas variaciones de nucleótidos pueden ser variaciones de alelos mutantes o polimorfas. Por ejemplo, la variación de nucleótido detectada en la presente invención incluye un SNP (un polimorfismo de un único nucleótido), una mutación, una delección, una inserción, una sustitución y una translocación. Algunos ejemplos de variaciones de nucleótidos incluyen numerosas variaciones en un genoma humano (por ejemplo, variaciones en el MTHFR (el gen de la reductasa de metilentetrahidrofolato), variaciones implicadas en la resistencia a fármacos de patógenos y variaciones causantes de tumores. El término variación de nucleótido usado en el presente documento incluye cualquier variación en una ubicación particular de una molécula de ADN. En otras palabras, el término variación de nucleótido incluye una natural y cualquiera de sus mutantes en una ubicación particular de una molécula de ADN.

50 En la presente invención, para la detección de una variación de nucleótido en una secuencia de ácidos nucleicos objetivo, cuando los cebadores o las sondas usados tienen una secuencia complementaria de la variación de nucleótido en la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, la secuencia de ácidos nucleicos objetivo que contiene la variación de nucleótido se describe en el presente documento como un molde de emparejamiento. Cuando los cebadores o las sondas usados tienen una secuencia no complementaria de la variación de nucleótido en la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, la secuencia de ácidos nucleicos objetivo que contiene la variación de nucleótido se describe en el presente documento como un molde de mal emparejamiento.

55 Para la detección de las variaciones de nucleótido, puede diseñarse el extremo 3' del cebador secuencia arriba para que sea opuesto al sitio de una variación de nucleótido en una secuencia de ácidos nucleicos objetivo. Según una realización preferida, el extremo 3' del cebador secuencia arriba tiene una secuencia complementaria de la variación de nucleótido en una secuencia de ácidos nucleicos objetivo. El extremo 3' del cebador secuencia arriba que tiene una secuencia complementaria de la variación de nucleótido en la secuencia de ácidos nucleicos objetivo es apareado con el molde de emparejamiento y extendido para inducir la escisión del PTO. Por el contrario, cuando el extremo 3' del cebador secuencia arriba está mal emparejado con una variación de nucleótido en un molde de mal emparejamiento, no es extendido en unas condiciones tales que el apareamiento del extremo 3' de los cebadores sea esencial para la extensión, incluso cuando el cebador secuencia arriba está hibridado con el molde de mal emparejamiento, no dando así como resultado ninguna escisión del PTO.

65

Alternativamente, es posible el uso de la escisión del PO dependiendo de la hibridación del PO que tiene una secuencia complementaria de una variación de nucleótido en una secuencia de ácidos nucleicos objetivo. Por ejemplo, en unas condiciones controladas, un PO que tiene una secuencia complementaria de la variación de nucleótido en la secuencia de ácidos nucleicos objetivo es hibridado con el molde de emparejamiento y después escindido. Mientras que, en las condiciones controladas, el PO no está hibridado con un molde de mal emparejamiento que tiene una secuencia no complementaria en la posición de la variación de nucleótido, y no es escindido. Preferiblemente, en este caso, la secuencia complementaria de la variación de nucleótido en el PO está ubicada en la mitad de la porción de direccionamiento en 3' del PO.

Alternativamente, la presente invención usa el PO que tiene el sitio de discriminación de la variación de nucleótido posicionado en la parte del extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' para la selectividad del PO hacia una variación de nucleótido específica. La parte del extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' del PO está posicionada en una variación de nucleótido en una secuencia de ácidos nucleicos objetivo para la detección de la variación de nucleótido, y la parte del extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' del PO tiene una secuencia complementaria de la variación de nucleótido en una secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

El término usado en el presente documento "sitio de discriminación de la variación de nucleótido" con referencia al PO significa un sitio (i) que comprende una secuencia complementaria de la variación de nucleótido en el ácido nucleico objetivo y (ii) que está ubicado en una parte del extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3'.

Cuando el PO está hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo (es decir, el molde de emparejamiento) que tiene la variación de nucleótido complementaria del sitio de discriminación de la variación de nucleótido, la parte del extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' forma una doble hebra con el molde de emparejamiento; sin embargo, cuando el PO está hibridado con una secuencia de ácidos nucleicos objetivo (es decir, molde de mal emparejamiento) que tiene una variación de nucleótido no complementaria del sitio de discriminación de la variación de nucleótido, la parte del extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' no forma una doble hebra con el molde de mal emparejamiento.

Es notable que estos distintos patrones de hibridación en la variación de nucleótido de interés son responsables de las diferencias en los sitios de escisión inicial del PO.

La nucleasa en 5' usada en la presente invención es una enzima capaz de digerir una hebra de una molécula de un ácido nucleico bicatenario en una dirección de 5' a 3' exonucleolíticamente o endonucleolíticamente. Generalmente, el sitio de escisión en el PO por parte de la nucleasa en 5' puede variar dependiendo de la porción de hibridación del extremo 5' del PO.

Cuando el PO está hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo (es decir, el molde de emparejamiento) que tiene la variación de nucleótido complementaria del sitio de discriminación de la variación, la parte del extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' forma una doble hebra con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo para inducir la escisión desde un primer sitio de escisión inicial.

Cuando el PO está hibridado con una secuencia de ácidos nucleicos objetivo (es decir, el molde de mal emparejamiento) que tiene una variación de nucleótido no complementaria del sitio de discriminación de la variación, la parte del extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' no forma una doble hebra con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo para inducir la escisión desde un segundo sitio de escisión inicial ubicado secuencia abajo del primer sitio de escisión inicial.

Es notable que el segundo sitio de escisión inicial está ubicado secuencia abajo del primer sitio de escisión inicial.

El término usado en el presente documento "un primer sitio de escisión inicial" junto con el PO significa un sitio de escisión del PO que es escindido en primer lugar cuando el PO está hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo que tiene la variación de nucleótido complementaria del sitio de discriminación de la variación. El término usado en el presente documento "un segundo sitio de escisión inicial" junto con el PO significa un sitio de escisión del PO que es escindido en primer lugar cuando el PO está hibridado con una secuencia de ácidos nucleicos objetivo que tiene una variación de nucleótido no complementaria del sitio de discriminación de la variación.

Según una realización preferida, el sitio de discriminación de la variación de nucleótido está ubicado a 10 nucleótidos, más preferentemente a 8 nucleótidos, aún más preferentemente a 6 nucleótidos, aún mucho más preferentemente a 4 nucleótidos, a 3 nucleótidos, a 2 nucleótidos o a 1 nucleótido, del extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' del PO. Preferiblemente, el sitio de discriminación de la variación de nucleótido está ubicado en el extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' del PO.

El término "*smite*" con referencia bien a un sitio de discriminación de la variación de nucleótido de las sondas o bien al sitio de la variación de nucleótido en las secuencias objetivo, se usa en el presente documento para englobar no sólo un único nucleótido, sino también una pluralidad de nucleótidos.

El PO que tiene el sitio de discriminación de la variación de nucleótido posicionado en la parte del extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' puede emplearse para la detección de una variación de nucleótido junto con un bloqueante resistente a la escisión por parte de la enzima que tiene actividad de nucleasa en 5'.

5 Por ejemplo, el PO tiene una porción bloqueante que contiene, como bloqueante, al menos un nucleótido resistente a la escisión por parte de la enzima que tiene actividad de nucleasa en 5', y la porción bloqueante está posicionada en un sitio que va a ser inicialmente escindido tras la hibridación del PO con el molde de mal emparejamiento. Cuando el PO que tiene la porción bloqueante está hibridado con un molde de emparejamiento, la escisión desde un primer sitio de escisión inicial no se ve afectada. Sin embargo, cuando el PO que tiene la porción bloqueante está
10 hibridado con un molde de mal emparejamiento, la porción bloqueante impide la escisión desde un segundo sitio de escisión inicial.

El número de bloqueantes contenido en la porción bloqueante puede no estar limitado, preferentemente, 1-10, más preferentemente 2-10, aún más preferentemente 3-8, lo más preferentemente 3-6 bloqueantes. Los bloqueantes
15 presentes en las sondas pueden estar en una forma continua o intermitente, preferentemente en una forma continua. Los nucleótidos como bloqueantes con un esqueleto resistente a la actividad de exonucleasa de 5' a 3' incluyen cualquiera de los conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, incluyen diversos enlaces de fosforotioato, enlaces de fosfonato, enlaces de fosforoamidato y modificaciones de 2'-carbohidratos. Según una realización más preferida, los nucleótidos que tienen un esqueleto resistente a la exonucleasa de 5' a 3' incluyen un enlace de
20 fosforotioato, un enlace de alquil fosfotriéster, un enlace de aril fosfotriéster, un enlace de alquil fosfonato, un enlace de aril fosfonato, un enlace de hidrogenofosfonato, un enlace de alquil fosforoamidato, un enlace de aril fosforoamidato, un enlace de fosforoselenato, una modificación 2'-O-aminopropilo, una modificación 2'-O-alquilo, una modificación 2'-O-alilo, una modificación 2'-O-butilo, un oligodesoxinucleótido α -anomérico y una modificación 1-(4'-tio- β -D-ribofuranosilo).

25 Opcionalmente, la detección de las variaciones de nucleótido puede llevarse a cabo mediante una apropiada selección de la ubicación del marcador teniendo en consideración las ubicaciones del primer sitio de escisión inicial y del segundo sitio de escisión inicial sin el uso de bloqueantes.

30 Cuando se usa un único marcador, las adecuadas ubicaciones del marcador único permiten lo siguiente: un fragmento que contiene un único marcador formado por la escisión del PO hibridado con el molde de emparejamiento no está hibridado con el CO, pero un fragmento que contiene un único marcador formado por la escisión del PO hibridado con el molde de mal emparejamiento está hibridado con el CO. La hibridación entre el CO y el fragmento que contiene un único marcador formado por la escisión del PO hibridado con el molde de mal emparejamiento proporciona una señal idéntica a la proporcionada por la hibridación entre el PO no escindido y el
35 CO, permitiendo así la detección de las variaciones de nucleótido.

Según una realización más preferida, un único marcador unido al PO está ubicado en un nucleótido entre el primer sitio de escisión inicial y el segundo sitio de escisión inicial.

40 En el caso de que se use un marcador doble interactivo, las adecuadas ubicaciones del marcador doble permiten lo siguiente: (i) tras la escisión del PO hibridado con el molde de emparejamiento, el marcador doble se separa y al menos uno de un fragmento que contiene el donante y un fragmento que contiene el aceptor no está hibridado con el CO. (ii) Tras la escisión del PO hibridado con el molde de mal emparejamiento, el marcador doble no se separa y
45 un fragmento doble que contiene el marcador está hibridado con el CO. La hibridación entre el CO y el fragmento doble que contiene el marcador formado por la escisión del PO hibridado con el molde de mal emparejamiento proporciona una señal idéntica a la proporcionada por la hibridación entre el PO no escindido y el CO, permitiendo así la detección de las variaciones de nucleótido.

50 Según una realización más preferida, cuando se usa el PO con un marcador doble, uno del marcador doble está unido a un nucleótido presente secuencia arriba del primer sitio de escisión inicial y el otro a un nucleótido presente entre el primer sitio de escisión inicial y el segundo sitio de escisión inicial.

Por ejemplo, cuando se emplean el PO etiquetado en 5' que tiene el sitio de discriminación de la variación de nucleótido posicionado en la parte del extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' junto con el CO que se va a hibridar con la porción de etiquetado en 5', una adecuada ubicación de los marcadores permite las variaciones de nucleótido sin el uso de bloqueantes.

60 Cuando se usa el PO etiquetado en 5' con un único marcador, el marcador único unido al PO etiquetado en 5' está ubicado preferentemente en un nucleótido entre el primer sitio de escisión inicial y el segundo sitio de escisión inicial.

La Fig. 21 representa realizaciones para detectar la variación de nucleótido usando el PO etiquetado en 5' con un único marcador. El sitio de discriminación de la variación de nucleótido está posicionado a 1 nucleótido del extremo 5' de la parte del extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3'. El marcador único está unido al nucleótido
65 posicionado entre el primer sitio de escisión inicial y el segundo sitio de escisión inicial.

5 Cuando el PO etiquetado en 5' que contiene el marcador único está hibridado con el molde de emparejamiento, es escindido en el primer sitio de escisión inicial y se genera un fragmento que contiene la porción de etiquetado en 5' sin el marcador único. Como el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado del PO, el fragmento que contiene un único marcador formado por la escisión del PO hibridado con el molde de emparejamiento no está hibridado con el CO. Cuando el PO etiquetado en 5' que contiene el marcador único está hibridado con el molde de mal emparejamiento, es escindido en el segundo sitio de escisión inicial y se genera un fragmento que contiene la porción de etiquetado en 5' con el marcador único. Como el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado del PO, el fragmento que contiene un único marcador formado por la escisión del PO hibridado con el molde de mal emparejamiento está hibridado con el CO.

10 La hibridación entre el CO y el fragmento que contiene un único marcador formado por la escisión del PO hibridado con el molde de mal emparejamiento proporciona una señal idéntica a la proporcionada por la hibridación entre el PO no escindido y el CO.

15 Consecuentemente, pueden proporcionarse diferentes señales dependiendo de la presencia de variaciones de nucleótido.

20 Cuando se usa el PO etiquetado en 5' con un marcador doble, se prefiere que uno del marcador doble esté unido a un nucleótido presente secuencia arriba del primer sitio de escisión inicial (por ejemplo, en el extremo 5' de la porción de etiquetado en 5' del PO) y el otro a un nucleótido presente entre el primer sitio de escisión inicial y el segundo sitio de escisión inicial.

25 Cuando el PO etiquetado en 5' que contiene el marcador doble está hibridado con el molde de emparejamiento, es escindido en el primer sitio de escisión inicial y el marcador doble se separa para formar un fragmento que contiene la molécula donante y un fragmento que contiene la molécula aceptora. Uno de los fragmentos comprende la porción de etiquetado en 5' y está hibridado con el CO que comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado del PO etiquetado en 5'. Cuando el PO etiquetado en 5' que contiene el marcador doble está hibridado con el molde de mal emparejamiento, es escindido en el segundo sitio de escisión inicial, generando un fragmento que contiene la porción de etiquetado en 5' con el marcador doble. El fragmento que contiene la porción de etiquetado en 5' con el marcador doble está hibridado con el CO y el producto de la hibridación proporciona una señal idéntica a la de la hibridación entre el PO no escindido etiquetado en 5' y el CO.

35 Consecuentemente, pueden proporcionarse diferentes señales dependiendo de la presencia de variaciones de nucleótido.

Según una realización preferida, es preferible que la parte del extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' del PO comprenda una fracción de emparejamiento que no es una base ubicada a 1-10 nucleótidos (más preferentemente a 1-5 nucleótidos) del sitio de discriminación de la variación de nucleótido

40 La Fig. 22 representa realizaciones para detectar la variación de nucleótido usando la fracción de emparejamiento que no es una base.

45 La fracción de emparejamiento que no es una base impide que la parte del extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3' forme una doble hebra con la secuencia de nucleótidos objetivo cuando el PO está hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo que tiene la variación de nucleótido no complementaria del sitio de discriminación de la variación.

50 El uso de la fracción de emparejamiento que no es una base (por ejemplo, un nucleótido de malapareamiento) mejora la potencial discriminación del PO de las variaciones de nucleótido.

55 Según una realización preferida, la fracción de emparejamiento que no es una base no inhibe la formación de una doble hebra entre la parte del extremo 5' y la secuencia de ácidos nucleicos objetivo cuando el PO está hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo que tiene la variación de nucleótido complementaria del sitio de discriminación de la variación de nucleótido.

Según una realización preferida, la fracción de emparejamiento que no es una base amplía la distancia entre el primer sitio de escisión inicial del híbrido del PO y el molde de emparejamiento y el segundo sitio de escisión inicial del híbrido del PO y el molde de mal emparejamiento.

60 La fracción de emparejamiento que no es una base incluye cualquier fracción que no forme un par de bases entre las secuencias de ácidos nucleicos objetivo. Preferiblemente, la fracción de emparejamiento que no es una base es (i) un nucleótido que comprende una base de malapareamiento artificial, una base de emparejamiento que no es una base modificada para que sea incapaz de un emparejamiento de bases o una base universal, (ii) un nucleótido de emparejamiento que no es una base, modificado para que sea incapaz de un emparejamiento de bases, o (iii) un compuesto químico que no es una base.

Por ejemplo, la fracción de emparejamiento que no es una base incluye un grupo alquileo, ribofuranosil naftaleno, desoxirribofuranosil naftaleno, metafosfato, un enlace fosforioato, un enlace alquil fosfotriéster, un enlace aril fosfotriéster, un enlace alquil fosfonato, un enlace aril fosfonato, un enlace hidrogenofosfonato, un enlace alquil fosforoamidato y un enlace aril fosforoamidato. Los separadores de carbono convencionales también se usan como fracciones de emparejamiento que no son bases. Las bases universales como fracciones de emparejamiento que no son bases son útiles para ajustar los sitios de escisión del PO.

La fracción de emparejamiento que no es una base introducida en la parte del extremo 5' tiene preferentemente 1-10, más preferentemente 1-5, aún más preferentemente 1-2 fracciones. Puede haber presente una pluralidad de fracciones de emparejamiento que no son bases en la parte del extremo 5' de una forma consecutiva o intermitente. Preferiblemente, la fracción de emparejamiento que no es una base tiene 2-5 fracciones consecutivas.

Preferiblemente, la fracción de emparejamiento que no es una base es un compuesto químico de emparejamiento que no es una base.

Según una realización preferida, el sitio de discriminación de la variación de nucleótido y la fracción de emparejamiento que no es una base del PO están ubicados a 10 nucleótidos (más preferentemente a 8 nucleótidos, a 7 nucleótidos, a 6 nucleótidos, a 5 nucleótidos, a 4 nucleótidos, a 3 nucleótidos, a 2 nucleótidos o a 1 nucleótido, aún más preferentemente a 1 nucleótido) del extremo 5' de la porción de direccionamiento en 3'.

Según una realización preferida, la fracción de emparejamiento que no es una base está ubicada secuencia abajo del primer sitio de escisión inicial.

Según una realización preferida, la secuencia de ácidos nucleicos objetivo usada en la presente invención es una secuencia de ácidos nucleicos preamplificada por un cebador de amplificación.

Las ventajas de la presente invención pueden destacar en la detección simultánea (múltiple) de al menos dos secuencias de ácidos nucleicos objetivo. Según una realización preferida, el método se lleva a cabo para detectar al menos dos tipos (más preferentemente, al menos tres tipos, aún más preferentemente al menos cinco tipos) de secuencias de ácidos nucleicos objetivo. El oligonucleótido secuencia arriba comprende al menos dos tipos (más preferentemente, al menos tres tipos, aún más preferentemente al menos cinco tipos) de oligonucleótidos, el PO comprende al menos dos tipos (más preferentemente, al menos tres tipos, aún más preferentemente al menos cinco tipos) de los PO, y el CO comprende al menos dos tipos (más preferentemente, al menos tres tipos, aún más preferentemente al menos cinco tipos) del CO.

En la realización que usa el PO etiquetado, las porciones de etiquetado de al menos dos PO pueden tener una secuencia idéntica o una secuencia diferente entre sí. Por ejemplo, cuando la presente invención se lleva a cabo para el cribado de secuencias de ácidos nucleicos objetivo (por ejemplo, la detección de una secuencia de ácidos nucleicos entre una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos objetivo), pueden usarse los PO que tienen las porciones de etiquetado con una secuencia idéntica.

Adicionalmente, puede usarse un único tipo de CO para la detección de una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos objetivo. Por ejemplo, cuando los PO que tienen una secuencia idéntica en sus porciones de etiquetado se emplean para el cribado de secuencias de ácidos nucleicos objetivo, puede usarse un único tipo de CO.

Según una realización preferida, el presente método puede llevarse a cabo usando al menos dos cebadores secuencia abajo.

Realizaciones preferibles de la invención

Otra realización se refiere a un método para detectar unas secuencias de ácidos nucleicos objetivo a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo de POCH (escisión e hibridación de un PO) sobre un sustrato sólido, que comprende:

- (a) hibridar las secuencias de ácidos nucleicos objetivo con un par de cebadores que comprende un cebador secuencia arriba y un cebador secuencia abajo con un PO (oligonucleótido de sondeo); en el que cada uno del cebador secuencia arriba y el cebador secuencia abajo comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el PO comprende una porción de direccionamiento que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el PO tiene un único marcador; el PO está bloqueado en su extremo 3' para impedir su extensión; la porción de direccionamiento del PO está ubicada entre el cebador secuencia arriba y el cebador secuencia abajo; una hebra extendida del cebador secuencia arriba induce la escisión del PO por parte de una polimerasa de ácido nucleico dependiente del molde que tiene una actividad de nucleasa en 5';
- (b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una polimerasa de ácido nucleico dependiente del molde que tiene una actividad de nucleasa en 5' en unas condiciones para la extensión de los cebadores y para la escisión del PO; en el que cuando el PO está hibridado con las secuencias de ácidos nucleicos objetivo, el PO es

escindido por la polimerasa de ácido nucleico dependiente del molde que tiene la actividad de nucleasa en 5' para producir un fragmento que contiene un único marcador;

(c) llevar a cabo una reacción de hibridación poniendo en contacto el resultante de la etapa (b) con un oligonucleótido de captura (CO) inmovilizado sobre el sustrato sólido; en el que el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con el PO; en el que la reacción de hibridación se lleva a cabo en unas condiciones tales que el fragmento que contiene un único marcador no está hibridado con el CO y un PO no escindido está hibridado con el CO, para formar un dúplex de PO no escindido/CO;

(d) desnaturalizar el resultante de la etapa (c);

(e) repetir las etapas (a)-(d) al menos dos veces; y

(f) detectar el hecho de la escisión del PO mediante la medición de una señal del marcador único en el sustrato sólido; mediante lo cual, el hecho de la escisión del PO indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

Alternativamente, la etapa (b) está seguida por (b-1), la desnaturalización del resultante de la etapa (b), y (b-2) la repetición de las etapas (a)-(b-1) al menos dos veces. En este caso, las etapas (d) y (e) son opcionales.

La medición de la señal del marcador único puede llevarse a cabo para cada ciclo de la repetición, después de la repetición de la etapa (d) o a unos intervalos de tiempo predeterminados durante la repetición de la etapa (d).

Una realización adicional se refiere a un método para detectar unas secuencias de ácidos nucleicos objetivo a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo de POCH (escisión e hibridación de un PO) sobre un sustrato sólido, que comprende:

(a) hibridar las secuencias de ácidos nucleicos objetivo con un par de cebadores que comprende un cebador secuencia arriba y un cebador secuencia abajo con un PO (oligonucleótido de sondeo); en el que cada uno del cebador secuencia arriba y el cebador secuencia abajo comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el PO comprende una porción de direccionamiento que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el PO tiene un marcador doble interactivo que comprende una molécula donante y una molécula aceptora; el PO está bloqueado en su extremo 3' para impedir su extensión; la porción de direccionamiento del PO está ubicada entre el cebador secuencia arriba y el cebador secuencia abajo; una hebra extendida del cebador secuencia arriba induce la escisión del PO por parte de una polimerasa de ácido nucleico dependiente del molde que tiene una actividad de nucleasa en 5';

(b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una polimerasa de ácido nucleico dependiente del molde que tiene una actividad de nucleasa en 5' en unas condiciones para la extensión de los cebadores y para la escisión del PO; en el que cuando el PO está hibridado con las secuencias de ácidos nucleicos objetivo, el PO es escindido por la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' para separar el marcador doble interactivo, mediante lo cual se producen un fragmento que contiene el donante y un fragmento que contiene el aceptor;

(c) llevar a cabo una reacción de hibridación poniendo en contacto el resultante de la etapa (b) con un oligonucleótido de captura (CO) inmovilizado sobre el sustrato sólido; en el que la reacción de hibridación se lleva a cabo en unas condiciones tales que al menos uno del fragmento que contiene el donante y el fragmento que contiene el aceptor no está hibridado con el CO, y un PO no escindido está hibridado con el CO para formar un dúplex de PO no escindido/CO; en el que una señal del dúplex de PO no escindido/CO es diferenciada de una señal proporcionada en el momento en el que al menos uno del fragmento que contiene el donante y el fragmento que contiene el aceptor no está hibridado con el CO;

(d) desnaturalizar el resultante de la etapa (c);

(e) repetir las etapas (a)-(d) al menos dos veces; y

(f) detectar el hecho de la escisión del PO mediante la medición de una señal del marcador doble interactivo en el sustrato sólido; mediante lo cual, el hecho de la escisión del PO indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

Alternativamente, la etapa (b) está seguida por (b-1), la desnaturalización del resultante de la etapa (b), y (b-2) la repetición de las etapas (a)-(b-1) al menos dos veces. En este caso, las etapas (d) y (e) son opcionales.

Una realización adicional más se refiere a un método para detectar unas secuencias de ácidos nucleicos objetivo a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo de POCH (escisión e hibridación de un PO) sobre un sustrato sólido, que comprende:

(a) hibridar las secuencias de ácidos nucleicos objetivo con un par de cebadores que comprende un cebador secuencia arriba y un cebador secuencia abajo y un PO (oligonucleótido de sondeo); en el que cada uno del cebador secuencia arriba y el cebador secuencia abajo comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el PO comprende una porción de direccionamiento que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el PO está bloqueado en su extremo 3' para impedir su extensión; la porción de direccionamiento del PO está ubicada entre el cebador secuencia arriba y el cebador secuencia abajo; una hebra

extendida del cebador secuencia arriba induce la escisión del PO por parte de una polimerasa de ácido nucleico dependiente del molde que tiene una actividad de nucleasa en 5';

(b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una polimerasa de ácido nucleico dependiente del molde que tiene una actividad de nucleasa en 5' en unas condiciones para la extensión de los cebadores y para la escisión del PO; en el que cuando el PO está hibridado con las secuencias de ácidos nucleicos objetivo, el PO es escindido por la polimerasa de ácido nucleico dependiente del molde que tiene la actividad de nucleasa en 5' para producir un fragmento que contiene un único marcador;

(c) llevar a cabo una reacción de hibridación en presencia de un agente intercalante poniendo en contacto el resultante de la etapa (b) con un oligonucleótido de captura (CO) inmovilizado sobre el sustrato sólido; en el que el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con el PO; en el que la reacción de hibridación se lleva a cabo en unas condiciones tales que el fragmento que contiene un único marcador no está hibridado con el CO y un PO no escindido está hibridado con el CO para formar un dúplex de PO no escindido/CO;

(d) desnaturalizar el resultante de la etapa (c);

(e) repetir las etapas (a)-(d) al menos dos veces; y

(f) detectar el hecho de la escisión del PO mediante la medición de una señal del agente intercalante en el sustrato sólido; mediante lo cual, el hecho de la escisión del PO indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

Alternativamente, la etapa (b) está seguida por (b-1), la desnaturalización del resultante de la etapa (b), y (b-2) la repetición de las etapas (a)-(b-1) al menos dos veces. En este caso, las etapas (d) y (e) son opcionales.

IV. Proceso de detección del objetivo mediante un ensayo de POCH basado en una actividad de nucleasa en 5' independiente de un oligonucleótido secuencia arriba.

En un aspecto más de la presente invención, se proporciona un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos objetivo a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo de POCH (escisión e hibridación de un PO) sobre un sustrato sólido, que comprende:

(a) hibridar la secuencia de ácidos nucleicos objetivo con un oligonucleótido de sondeo (PO); en el que el PO comprende una porción de direccionamiento que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el PO tiene un único marcador;

(b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5' en unas condiciones para la escisión del PO; en el que cuando el PO está hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, el PO es escindido por la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' para producir un fragmento que contiene un único marcador;

(c) llevar a cabo una reacción de hibridación poniendo en contacto el resultante de la etapa (b) con un oligonucleótido de captura (CO) inmovilizado sobre el sustrato sólido; en el que el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con el PO; en el que la reacción de hibridación se lleva a cabo en unas condiciones tales que el fragmento que contiene un único marcador no está hibridado con el CO, y un PO no escindido está hibridado con el CO para formar un dúplex de PO no escindido/CO; y

(d) detectar el hecho de la escisión del PO mediante la medición de una señal del marcador único en el sustrato sólido; mediante lo cual, el hecho de la escisión del PO indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

En un aspecto adicional más de esta invención, se proporciona un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos objetivo a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo de POCH (escisión e hibridación de un PO) sobre un sustrato sólido, que comprende:

(a) hibridar la secuencia de ácidos nucleicos objetivo con un oligonucleótido de sondeo (PO); en el que el PO comprende una porción de direccionamiento que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el PO tiene un marcador doble interactivo que comprende una molécula donante y una molécula aceptora;

(b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5' en unas condiciones para la escisión del PO; en el que cuando el PO está hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, el PO es escindido por la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' para separar el marcador doble interactivo, mediante lo cual se producen un fragmento que contiene el donante y un fragmento que contiene el aceptor;

(c) llevar a cabo una reacción de hibridación poniendo en contacto el resultante de la etapa (b) con un oligonucleótido de captura (CO) inmovilizado sobre el sustrato sólido; en el que el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con el PO; en el que la reacción de hibridación se lleva a cabo en unas condiciones tales que al menos uno del fragmento que contiene el donante y el fragmento que contiene el aceptor no está hibridado con el CO, y un PO no escindido está hibridado con el CO para formar un dúplex de PO no escindido/CO; en el que una señal del dúplex de PO no escindido/CO es diferenciada de una señal proporcionada en el momento en el que al menos uno del fragmento que contiene el donante y el fragmento que contiene el aceptor no está hibridado con el CO; y

(d) detectar el hecho de la escisión del PO mediante la medición de una señal del marcador doble interactivo en el sustrato sólido; mediante lo cual, el hecho de la escisión del PO indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

5 En un aspecto adicional más de esta invención, se proporciona un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos objetivo a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo de POCH (escisión e hibridación de un PO) sobre un sustrato sólido, que comprende:

10 (a) hibridar la secuencia de ácidos nucleicos objetivo con un oligonucleótido de sondeo (PO); en el que el PO comprende una porción de direccionamiento que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo;

(b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5' en unas condiciones para la escisión del PO; en el que cuando el PO está hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, el PO es escindido por la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' para producir un fragmento escindido;

15 (c) llevar a cabo una reacción de hibridación en presencia de un agente intercalante poniendo en contacto el resultante de la etapa (b) con un oligonucleótido de captura (CO) inmovilizado sobre el sustrato sólido; en el que el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con el PO; en el que la reacción de hibridación se lleva a cabo en unas condiciones tales que el fragmento escindido no está hibridado con el CO, y un PO no escindido está hibridado con el CO para formar un dúplex de PO no escindido/CO; y

20 (d) detectar el hecho de la escisión del PO mediante la medición de una señal del agente intercalante en el sustrato sólido; mediante lo cual, el hecho de la escisión del PO indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

25 La presente invención puede llevarse a cabo sin el uso del oligonucleótido secuencia arriba. El PO puede ser escindido por la actividad de nucleasa en 5' independiente del oligonucleótido secuencia arriba. En dicho caso pueden usarse las enzimas convencionales que tienen actividad de nucleasa en 5' independiente del oligonucleótido secuencia arriba.

30 Por ejemplo, puede usarse una nucleasa FEN en 5' que tenga una actividad de exonucleasa en 5' independiente del oligonucleótido secuencia arriba y/o una actividad de endonucleasa en 5'.

Entre las polimerasas dependientes del molde, existen varias enzimas que tienen actividad de nucleasa en 5' independiente del oligonucleótido secuencia arriba (actividad de exonucleasa en 5' y/o actividad de endonucleasa en 5'), por ejemplo, la polimerasa *Taq* de ADN (véase, lawyer et al, Genome Res. 2 págs.: 275-287 (1993), el documento WO 2008/011004 y Lyamichev et. al., Science 260 págs.: 778-783 (993)).

Según una realización preferida, la escisión del PO por parte de la polimerasa dependiente del molde que tiene una actividad de nucleasa en 5' independiente del oligonucleótido secuencia arriba está afectada por la posición de los marcadores o por el tipo de enlace de los marcadores presentes en el PO. Preferiblemente, cuando un marcador está unido al extremo 5' del PO no etiquetado, la escisión del PO no etiquetado por parte de la polimerasa dependiente del molde que tiene una actividad de nucleasa en 5' puede ser más eficiente si el marcador está unido a un grupo fosfato del extremo 5' del PO no etiquetado, particularmente a través de un separador de carbono. Cuando el marcador está unido a una base del extremo 5' del PO no etiquetado o no se usa el separador de carbono, es improbable que se produzca la escisión del PO no etiquetado.

La eficacia de la escisión de la actividad de nucleasa en 5' dependiente del oligonucleótido secuencia arriba puede ser mayor que para la actividad de nucleasa en 5' independiente del oligonucleótido secuencia arriba.

50 La actividad de nucleasa en 5' independiente del oligonucleótido secuencia arriba es más susceptible a las condiciones de reacción (por ejemplo, a los tipos de enzimas, a las composiciones del tampón y a las secuencias del PO).

Considerando la amplificación de las secuencias de ácidos nucleicos objetivo y la eficacia de la escisión del PO, el ensayo de POCH de la presente invención se lleva a cabo preferentemente usando oligonucleótidos secuencia arriba.

Kits para la detección del objetivo

60 En un aspecto adicional de esta invención, se proporciona el uso de un kit en un método de la invención para detectar una secuencia de ácidos nucleicos objetivo a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo de POCH (escisión e hibridación de un PO) sobre un sustrato sólido, comprendiendo dicho kit:

65 (a) un oligonucleótido de sondeo (PO) que comprende una porción de direccionamiento que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo;

(b) un oligonucleótido secuencia arriba que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; en el que el oligonucleótido secuencia arriba está ubicado secuencia arriba del PO; el oligonucleótido secuencia arriba o su hebra extendida induce la escisión del PO por parte de una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5'; y

5 (c) un oligonucleótido de captura (CO) inmovilizado sobre el sustrato sólido; en el que el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con el PO, mediante lo cual un PO no escindido por la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' está hibridado con el CO para formar un dúplex de PO/CO no escindido.

10 Dado que el kit es construido para llevar a cabo el método de detección de la presente invención descrito anteriormente, las descripciones habituales entre ellos se han omitido con objeto de evitar una excesiva redundancia que produciría complejidad en esta memoria descriptiva.

Según una realización preferida, el PO tiene un único marcador o un marcador doble interactivo.

15 Según una realización preferida, el PO es un PO etiquetado en 3' que comprende adicionalmente en su porción 3' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo o un PO etiquetado en 5' que comprende adicionalmente en su porción 5' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, y la secuencia de nucleótidos hibridable con el PO en el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado del PO.

20 Según una realización preferida, el PO es un PO etiquetado en 3' que comprende adicionalmente en su porción 3' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo o un PO etiquetado en 5' que comprende adicionalmente en su porción 5' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, y la secuencia de nucleótidos hibridable con el PO en el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con una parte de la porción de etiquetado y una parte de la porción de direccionamiento del PO.

25 Según una realización preferida, el PO es un PO etiquetado en 3' que comprende adicionalmente en su porción 3' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, y el CO está inmovilizado sobre el sustrato a través de su extremo 5'.

30 Según una realización preferida, el PO es un PO etiquetado en 5' que comprende adicionalmente en su porción 5' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, y el CO está inmovilizado sobre el sustrato a través de su extremo 3'.

Según una realización preferida, el oligonucleótido secuencia arriba es un cebador secuencia arriba o una sonda secuencia arriba.

40 Según una realización preferida, el kit comprende adicionalmente una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5', más preferentemente una polimerasa de ADN termoestable que tiene una actividad de nucleasa en 5' o de nucleasa FEN.

45 Según una realización preferida, el oligonucleótido secuencia arriba está ubicado adyacente al PO hasta el punto de que el oligonucleótido secuencia arriba induce la escisión del PO por parte de una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5'.

Según una realización preferida, el oligonucleótido secuencia arriba tiene una secuencia de solapamiento parcial con la porción de direccionamiento del PO.

50 Según una realización preferida, el cebador secuencia arriba induce, a través de la hebra extendida, la escisión del PO por parte de la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5'.

55 Según una realización preferida, el oligonucleótido secuencia arriba es un cebador secuencia arriba, y la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' es una polimerasa de ácido nucleico dependiente del molde que tiene una actividad de nucleasa en 5'.

Según una realización preferida, el kit comprende adicionalmente un agente intercalante.

60 Según una realización preferida, el kit se usa para la detección de al menos dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos objetivo. El oligonucleótido secuencia arriba comprende al menos dos tipos de oligonucleótidos secuencia arriba, el PO comprende al menos dos tipos de PO, y el CO comprende al menos dos tipos de CO.

Según una realización preferida, el kit comprende adicionalmente un cebador secuencia abajo.

65

Otro aspecto se refiere a un kit para su uso en un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos objetivo a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo de POCH (escisión e hibridación de un PO) sobre un sustrato sólido, comprendiendo dicho kit:

- 5 (a) un oligonucleótido de sondeo (PO) que comprende una porción de direccionamiento que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; y
 (b) un oligonucleótido de captura (CO) inmovilizado sobre el sustrato sólido; en el que el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con el PO, mediante lo cual un PO no escindido por una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5' está hibridado con el CO para formar un dúplex de PO/CO no escindido.

10

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

- 15 (a) la presente invención detecta una secuencia de ácidos nucleicos objetivo mediante el uso de en el que el PO (oligonucleótido de sondeo) hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo es escindido, y la escisión del PO es detectada por la hibridación con el CO (oligonucleótido de captura). En la presente invención, una sonda no escindida está hibridada con un oligonucleótido inmovilizado sobre un sustrato sólido.

Según las tecnologías convencionales que emplean una sonda objetivo y una sonda de captura inmovilizada, es necesario impedir que las sondas objetivo no escindidas hibriden con los oligonucleótidos inmovilizados mediante (i) el diseño de la sonda objetivo para que tenga una estructura en horquilla y el control de ambas condiciones tanto de la hibridación con las secuencias objetivo como de las condiciones para la hibridación con los oligonucleótidos inmovilizados; o (ii) el diseño de los oligonucleótidos inmovilizados teniendo en consideración la orientación de la inmovilización de los oligonucleótidos inmovilizados y su distancia desde la superficie de un sustrato sólido. Por lo tanto, los métodos convencionales son muy inconvenientes en términos del diseño de las sondas objetivo y de los oligonucleótidos inmovilizados y del establecimiento de las condiciones de reacción.

20

Por el contrario, la presente invención está exenta de dichos inconvenientes y limitaciones. El diseño del PO y del CO es conveniente, y la optimización de las condiciones de reacción es rutinariamente fácil en la presente invención.

- 25 (b) cuando la detección de la señal del sustrato sólido se lleva a cabo de forma continua junto con la repetición de la escisión de los PO en la presente invención, el número de PO escindido aumenta al aumentar el número de repeticiones de la reacción de escisión y la señal cambia en paralelo con el número de PO escindidos. Después, la secuencia de ácidos nucleicos objetivo puede ser detectada en tiempo real.

30 (c) la presente invención puede detectar simultáneamente una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos objetivo incluso usando únicamente un tipo de marcador. Dado que la escisión del PO se detecta mediante la hibridación con el CO inmovilizado sobre el sustrato sólido, no es necesario que el PO tenga diferentes marcadores para cada ácido nucleico objetivo para la detección de una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos objetivo.

35 (d) generalmente, el experto en la materia comprendería que los métodos de detección de objetivos que usan una hibridación directa entre las secuencias de ácidos nucleicos objetivo y las sondas inmovilizadas sobre sustratos sólidos pueden no obtener unos resultados de hibridación eficaces y precisos debido a los restringidos entornos de reacción que son inherentes a una reacción en fase sólida. Es improbable que la presente invención emplee una hibridación entre el PO y el CO sin ninguna secuencia de ácidos nucleicos objetivo implicada en una fase sólida, proporcionando unos resultados más eficaces y precisos en los típicos entornos y condiciones de una reacción en fase sólida.

40 (e) cuando la presente invención usa el PO etiquetado y el CO que tiene una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado del PO, la secuencia de la porción de etiquetado del PO y la secuencia del CO pueden ser seleccionadas sin tener en consideración una secuencia de ácidos nucleicos objetivo. Esto hace posible prediseñar un conjunto de secuencias útil en la presente invención. En particular, el CO puede ser preparado de una forma prefabricada sin tener en consideración ningún conocimiento de las secuencias de ácidos nucleicos objetivo. Dichas características proporcionan unas ventajas notables en un ensayo con micromatriz que usa CO inmovilizados sobre un sustrato sólido.

45

La presente invención se describirá ahora con más detalle mediante los ejemplos. Para los expertos en la materia sería obvio que estos ejemplos pretenden ser más concretamente ilustrativos, y el ámbito de la presente invención según se establece en las reivindicaciones anexas no está limitado a, o por, los ejemplos.

50

Ejemplos

60 **EJEMPLO 1:** evaluación del ensayo de escisión e hibridación del oligonucleótido de sondeo (POCH) usando un oligonucleótido de sondeo no etiquetado con marcador único (PO)

Se evaluó un nuevo ensayo, un ensayo de escisión e hibridación del oligonucleótido de sondeo (POCH), para la detección de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo usando un PO con un único marcador no etiquetado (véase la Fig. 2). La escisión del PO se llevó a cabo en un tubo y se recogió una alícuota del resultante en una micromatriz donde estaba inmovilizado el oligonucleótido de captura (CO).

65

Se usó una polimerasa *Taq* de ADN que tiene actividad de nucleasa en 5' para la extensión del cebador secuencia arriba y la escisión del PO. El PO no etiquetado comprende una porción de direccionamiento complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, y tiene una Quasar570 como molécula indicadora fluorescente en su extremo 5'. El CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de direccionamiento del PO. El PO y el CO están bloqueados con un separador de carbono en sus extremos 3'. El CO tiene poli(T)₁₀ como brazo conector, y se inmovilizó en la superficie de un portaobjetos de vidrio mediante el uso de un grupo amino (AminoC6) en su extremo 5'. Se inmovilizó una sonda marcadora que tiene una molécula indicadora fluorescente (Quasar570) en su extremo 5' en la superficie de un portaobjetos de vidrio mediante el uso de un grupo amino en su extremo 3'. Se usó el oligonucleótido sintético para *Neisseria gonorrhoeae* (NG) como molde.

Las secuencias del molde sintético, del cebador secuencia arriba, del PO, del CO y del marcador usados en este Ejemplo son:

NG-T 5'-

AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTGTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATA

CCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

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

NG-PO-1 5'-[Quasar570]TGCCCTCATTGGCGTGTTCG[separador de C3]-3' (SEQ ID NO: 3)

NG-CO-1 5-[AminoC6]TTTTTTTTTTCGAAACACGCCAATGAGGGGCA[separador de C3]-3' (SEQ ID NO: 4)

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

Se usaron portaobjetos NSB9 NHS (NSBPOSTECH, Corea) para la fabricación del CO y del marcador (SEQ ID NO: 4 y 5). El CO y el marcador disueltos en tampón de moteado NSB a una concentración final de 50 µM se imprimieron en los portaobjetos NSB9 NHS con el PersonalArrayer™16 Microarray Spotter (CapitalBio, China). El CO y el marcador fueron moteados por ambos lados en un formato de 2 x 1 (moteados por duplicado), y la micromatriz resultante se incubó en una cámara mantenida a una humedad del ~ 85 % durante una noche. Después, los portaobjetos se lavaron con una solución tampón que contiene 2x SSPE (cloruro de sodio 0,3 M, hidrogenofosfato de sodio 0,02 M y EDTA 2,0 mM), a pH 7,4 y SDS 7,0 mM a 37 °C durante 30 min para retirar el CO y el marcador no unidos específicamente, y se aclararon con agua destilada. Después, los portaobjetos funcionalizados con ADN se secaron usando una centrifuga de portaobjetos y se almacenaron en la oscuridad a 4 °C hasta su uso.

La reacción de escisión se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl que contiene 2 pmol del molde sintético (SEQ ID NO: 1) para el gen de NG, 10 pmol del cebador secuencia arriba (SEQ ID NO: 2), 1 pmol del PO (SEQ ID NO: 3) y 25 µl de 2X Master Mix que contiene MgCl₂ 2,5 mM, 200 µM de dNTP y 4 unidades de polimerasa *H-Taq* de ADN (Solgent, Corea); el tubo que contiene la mezcla de reacción se puso en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 °C y se sometió a 30 ciclos de 30 s a 95 °C y 60 s a 60 °C.

Se aplicaron los 30 µl de la mezcla resultante a una cámara ensamblada en la superficie del portaobjetos de vidrio de NSB sobre el que se había reticulado el CO (SEQ ID NO: 4). El portaobjetos se puso en un bloque *in situ* en un termociclador (GenePro B4I, China). Se dejó proceder la reacción de hibridación durante 30 min a 55 °C. La adquisición de imágenes se llevó a cabo mediante el uso de un escáner de láser confocal, Axon GenePix4300A (Molecular Device, EE.UU.) con un barrido a una resolución de pixel de 5 µm. La intensidad de la fluorescencia se analizó mediante el uso de un programa informático de análisis en micromatriz cuantitativa, el programa informático GenePix pro7.0 (Molecular Device, EE.UU.). La intensidad de la fluorescencia se expresó como las medianas de las manchas después de restar el fondo local. Cada mancha se duplicó para evaluar la reproducibilidad de la prueba. La intensidad de la fluorescencia indica el valor medio de las manchas duplicadas.

Como se muestra en la Figura 14, se detectó una disminución en la señal fluorescente (RFU: 9,006 ± 20,5) en presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo en comparación con la señal fluorescente (RFU: 65,484 ± 0,7) en ausencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

Estos resultados indican que el ensayo de POCH es aplicable para la detección de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

EJEMPLO 2: evaluación del ensayo de POCH usando un PO con un único marcador etiquetado en 3'

Evaluamos adicionalmente el ensayo de POCH para la detección de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo usando un PO con un único marcador etiquetado en 3' (véase la Fig. 4). La escisión del PO se llevó a cabo en un tubo y se recogió una alícuota del resultante en una micromatriz donde estaba inmovilizado el CO.

Se usó una polimerasa *Taq* de ADN que tiene actividad de nucleasa en 5' para la extensión del cebador secuencia arriba y la escisión del PO. El PO etiquetado en 3' comprende una porción de direccionamiento complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo y una porción de etiquetado en 3' no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo. El PO etiquetado en 3' tiene una Quasar570 como molécula indicadora fluorescente en su extremo 5'. El CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado en 3' del PO. El PO etiquetado en 3' y el CO están bloqueados con un separador de carbono en sus extremos 3'. El CO tiene poli(T)₅ como brazo conector, y se inmovilizó en la superficie de un portaobjetos de vidrio mediante el uso de un grupo amino (AminnoC6) en su extremo 5'. Se inmovilizó una sonda marcadora que tiene una molécula indicadora fluorescente (Quasar570) en su extremo 5' en la superficie de un portaobjetos de vidrio mediante el uso de un grupo amino en su extremo 3'. Se usó el oligonucleótido sintético para *Neisseria gonorrhoeae* (NG) como molde.

Las secuencias del molde sintético, del cebador secuencia arriba, del PO etiquetado en 3', del CO y del marcador usados en este Ejemplo son:

NG-T 5'-

AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTGTTCCTGCTCGGCAGAGCGAGTGATA

15 CCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

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

NG-PO-2 5'-[Quasar570]TGCCCCTCATTGGCGTGTTCGACGACGGCTTGGCTTTACGA[separador de C3]-3' (SEQ ID NO: 6)

20 NG-CO-2 5'-[AminoC6]TTTTTTCGTAAAGCCAAGCCGTCGTC[separador de C3]-3' (SEQ ID NO: 7)

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

(Las letras subrayadas indican la porción de etiquetado en 3' del PO)

25 La preparación de los portaobjetos se llevó a cabo según el mismo protocolo usado en el Ejemplo 1 excepto porque se usó el CO de la SEQ ID NO: 7 en lugar del de la SEQ ID NO: 4.

30 La reacción de escisión se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl que contiene 2 pmol del molde sintético (SEQ ID NO: 1) para el gen de NG, 10 pmol del cebador secuencia arriba (SEQ ID NO: 2), 1 pmol del PO (SEQ ID NO: 6) y 25 µl de 2X Master Mix que contiene MgCl₂ 2,5 mM, 200 µM de dNTP y 4 unidades de polimerasa *H-Taq* de ADN (Solgent, Corea); el tubo que contiene la mezcla de reacción se puso en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 °C y se sometió a 30 ciclos de 30 s a 95 °C y 60 s a 60 °C.

35 Se aplicaron los 30 µl de la mezcla resultante a una cámara ensamblada en la superficie del portaobjetos de vidrio de NSB sobre el que se había reticulado el CO (SEQ ID NO: 7). El portaobjetos se puso en un bloque *in situ* en un termociclador (GenePro B4I, China). Se dejó proceder la reacción de hibridación durante 30 min a 55 °C. La adquisición de imágenes se llevó a cabo mediante el uso de un escáner de láser confocal, Axon GenePix4300A (Molecular Device, EE.UU.) con un barrido a una resolución de pixel de 5 µm. La intensidad de la fluorescencia se analizó mediante el uso de un programa informático de análisis en micromatriz cuantitativa, el programa informático GenePix pro7.0 (Molecular Device, EE.UU.). La intensidad de la fluorescencia se expresó como las medianas de las manchas después de restar el fondo local. Cada mancha se duplicó para evaluar la reproducibilidad de la prueba. La intensidad de la fluorescencia indica el valor medio de las manchas duplicadas.

45 Como se muestra en la Figura 15, se detectó una disminución en la señal fluorescente (RFU: 10,217 ± 73,5) en presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo en comparación con la señal fluorescente (RFU: 65,464 ± 6,4) en ausencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

50 Estos resultados indican que el ensayo de POCH que usa un PO con un único marcador etiquetado en 3' es aplicable para la detección de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

EJEMPLO 3: evaluación del ensayo de POCH usando un PO con un único marcador etiquetado en 5'

55 Evaluamos adicionalmente el ensayo de POCH usando un PO con un único marcador etiquetado en 5' (véase la Fig. 5). La escisión del PO se llevó a cabo en un tubo y se recogió una alícuota del resultante en una micromatriz donde estaba inmovilizado el CO.

60 Se usó una polimerasa *Taq* de ADN que tiene actividad de nucleasa en 5' para la extensión del cebador secuencia arriba y la escisión del PO. El PO etiquetado en 5' comprende una porción de direccionamiento complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo y una porción de etiquetado en 5' no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo. El PO etiquetado en 5' tiene una Quasar570 como molécula indicadora fluorescente en su

extremo 3'. El CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado en 5' del PO. El CO tiene poli(T)₁₀ como brazo conector, y se inmovilizó en la superficie de un portaobjetos de vidrio mediante el uso de un grupo amino (AminoC7) en su extremo 3'. Se inmovilizó una sonda marcadora que tiene una molécula indicadora fluorescente (Quasar570) en su extremo 5' en la superficie de un portaobjetos de vidrio mediante el uso de un grupo amino en su extremo 3'. Se usó el oligonucleótido sintético para *Neisseria gonorrhoeae* (NG) como molde.

Las secuencias del molde sintético, del cebador secuencia arriba, del PO etiquetado en 5', del CO y del marcador usados en este Ejemplo son:

NG-T 5'-

AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTTGTTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATA

CCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

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

NG-PO-3 5'-ACGACGGCTTGGCTGCCCTCATTGGCGTGTTCG[Quasar570]-3' (SEQ ID NO: 8)

NG-CO-3 5'-GCCAAGCCGTCGTTTTTTTTTT[AminoC7]-3' (SEQ ID NO: 9)

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

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

La preparación de los portaobjetos se llevó a cabo según el mismo protocolo usado en el Ejemplo 1, excepto porque se usó el CO de la SEQ ID NO: 9 en lugar del de la SEQ ID NO: 4.

La reacción de escisión se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl que contiene 2 pmol del molde sintético; (SEQ ID NO: 1) para el gen de NG, 10 pmol del cebador secuencia arriba (SEQ ID NO: 2), 1 pmol del PO (SEQ ID NO: 8) y 25 de 2X Master Mix que contiene MgCl₂ 2,5 mM, 200 µM de dNTP y 4 unidades de polimerasa *H-Taq* de ADN (Solgent, Corea); el tubo que contiene la mezcla de reacción se puso en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 °C y se sometió a 30 ciclos de 30 s a 95 °C y 60 s a 60 °C.

Se aplicaron los 30 µl de la mezcla resultante a una cámara ensamblada en la superficie del portaobjetos de vidrio de NSB sobre el que se había reticulado el CO (SEQ ID NO: 9). El portaobjetos se puso en un bloque *in situ* en un termociclador (GenePro B China). Se dejó proceder la reacción de hibridación durante 30 min a 55 °C. La adquisición de imágenes se llevó a cabo mediante el uso de un escáner de láser confocal, Axon GenePix4300A (Molecular Device, EE.UU.) con un barrido a una resolución de pixel de 5 µm. La intensidad de la fluorescencia se analizó mediante el uso de un programa informático de análisis en micromatriz cuantitativa, el programa informático GenePix pro7.0 (Molecular Device, EE.UU.). La intensidad de la fluorescencia se expresó como las medianas de las manchas después de restar el fondo local. Cada mancha se duplicó para evaluar la reproducibilidad de la prueba. La intensidad de la fluorescencia indica el valor medio de las manchas duplicadas.

Como se muestra en la Figura 16, se detectó una disminución en la señal fluorescente (RFU: 17,586 ± 152,0) en presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo en comparación con la señal fluorescente (RFU: 65,484 ± 0,7) en ausencia de secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

Estos resultados indican que el ensayo de POCH que usa un PO con un único marcador etiquetado en 5' es aplicable para la detección de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

EJEMPLO 4: evaluación del ensayo de POCH usando un PO con marcador doble etiquetado en 3'

Evaluamos adicionalmente el ensayo de POCH para la detección de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo usando un PO con marcador doble etiquetado en 3' (véase la Fig. 11). La escisión del PO se llevó a cabo en un tubo, y se recogió una alícuota del resultante en una micromatriz donde estaba inmovilizado el CO.

Se usó una polimerasa *Taq* de ADN que tiene actividad de nucleasa en 5' para la extensión del cebador secuencia arriba y la escisión del PO. El PO etiquetado en 3' comprende una porción de direccionamiento complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo y una porción de etiquetado en 3' no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo. El PO etiquetado en 3' tiene una BHQ-2 como molécula aceptora en su extremo 5' y una Quasar570 como molécula donante en su extremo 3' de la porción de direccionamiento. El CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado en 3' del PO. Se midió una señal desde la molécula donante para la detección de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo. El PO etiquetado en 3' y el CO están bloqueados con un separador de carbono en sus extremos 3'. El CO tiene poli(T)₅ como brazo conector, y se inmovilizó en la superficie de un portaobjetos de vidrio mediante el uso de un grupo amino (AminoC6) en su

extremo 5'. Se inmovilizó una sonda marcadora que tiene una molécula indicadora fluorescente (Quasar570) en su extremo 5' en la superficie de un portaobjetos de vidrio mediante el uso de un grupo amino en su extremo 3'. Se usó el oligonucleótido sintético para *Neisseria gonorrhoeae* (NG) como molde.

- 5 Las secuencias del molde sintético, del cebador secuencia arriba, del PO etiquetado en 3', del CO y del marcador usados en este Ejemplo son:

NG-T 5'-

AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTTGTTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATA

CCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

- 10 NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
 NG-PO-4 5'-[BHQ-]TGCCCTCATTGGCGTGTTCG[T(Quasar570)]GACGACGGCTTGCTTTACGA[separador de C3]-3' (SEQ ID NO: 10)
 NG-CO-2 5'-[AminoC6]TTTTTTCGTAAAGCCAAGCCGTCGTC[separador de C3]-3' (SEQ ID NO: 7)
 Marcador 5'-[Quasar570]ATATATATAT[AminoC7]-3' (SEQ ID NO: 5)

15 (Las letras subrayadas indican la porción de etiquetado en 3' del PO)

La preparación de los portaobjetos se llevó a cabo según el mismo protocolo usado en el Ejemplo 1, excepto porque se usó el CO de la SEQ ID NO: 7 se usa en lugar del de la SEQ ID NO: 4.

- 20 La reacción de escisión se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl que contiene 2 pmol del molde sintético (SEQ ID NO: 1) para el gen de NG, 10 pmol del cebador secuencia arriba (SEQ ID NO: 2), 1 pmol del PO (SEQ ID NO: 10), y 25 µl de 2X Master Mix que contiene MgCl₂ 2,5 mM, 200 µM de dNTP y 4 unidades de polimerasa *H-Taq* de ADN (Solgent, Corea); el tubo que contiene la mezcla de reacción se puso en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 °C y se sometió a 30 ciclos de 30 s a 95 °C y 60 s a 60 °C.

- 30 Se aplicaron los 30 µl de la mezcla resultante a una cámara ensamblada en la superficie del portaobjetos de vidrio de NSB sobre el que se había reticulado el CO (SEQ ID NO: 7). El portaobjetos se puso en un bloque *in situ* en un termociclador (GenePro B4I, China). Se dejó proceder la reacción de hibridación durante 30 min a 55 °C. La adquisición de imágenes se llevó a cabo mediante el uso de un escáner de láser confocal, Axon GenePix4300A (Molecular Device, EE.UU.) con un barrido a una resolución de pixel de 5 µm. La intensidad de la fluorescencia se analizó mediante el uso de un programa informático de análisis en micromatriz cuantitativa, el programa informático GenePix pro7.0 (Molecular Device, EE.UU.). La intensidad de la fluorescencia se expresó como las medianas de las manchas después de restar el fondo local. Cada mancha se duplicó para evaluar la reproducibilidad de la prueba. La intensidad de la fluorescencia indica el valor medio de las manchas duplicadas.

- 40 Dado que el aceptor inactiva la señal fluorescente del donante, no hay ninguna señal del donante en el dúplex de PO no escindido etiquetado en 3'/CO. Sin embargo, el fragmento que contiene el donante del PO etiquetado en 3' escindido hibridado con el CO es capaz de proporcionar una señal fluorescente.

- 45 Como se muestra en la Figura 17, se observó un aumento en la señal fluorescente (RFU: 65,484 ± 0,7) en presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo en comparación con la señal fluorescente (RFU: 13,349 ± 441,2) en ausencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

- Estos resultados indican que el ensayo de POCH usando un PO con marcador doble etiquetado en 3' es aplicable para la detección de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

EJEMPLO 5: detección de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo mediante el ensayo de POCH

- 50 Aplicamos el ensayo de POCH para detectar una secuencia de ácidos nucleicos objetivo acompañada por una amplificación de la secuencia objetivo. Se usaron un PO con un único marcador no etiquetado y un PO con un único marcador etiquetado en 3' respectivamente para analizar esta aplicación. La escisión del PO durante la amplificación del objetivo mediante el proceso de PCR se llevó a cabo en un tubo, y se recogió una alícuota del resultante en una micromatriz donde estaba inmovilizado el CO.

- 60 El cebador secuencia arriba está implicado en la escisión del PO por parte de una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5', y también está implicado en la amplificación de la secuencia de ácidos objetivo con el cebador secuencia abajo mediante un proceso de PCR. Se usó una polimerasa *Taq* de ADN que tiene una actividad de nucleasa en 5' para la extensión del cebador secuencia arriba y del cebador secuencia abajo, y la escisión del PO.

El PO no etiquetado comprende una porción de direccionamiento complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo. El CO para el PO no etiquetado comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de direccionamiento del PO. El PO etiquetado en 3' comprende una porción de direccionamiento complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo y una porción de etiquetado en 3' no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo. El CO para el PO etiquetado en 3' comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado en 3' del PO.

El PO no etiquetado y el PO etiquetado en 3' tienen una Quasar570 como molécula indicadora fluorescente en sus extremos 5'. Los PO y los CO están bloqueados con un separador de carbono en sus extremos 3'. El CO para el PO no etiquetado tiene poli(T)₁₀ como brazo conector, y se inmovilizó en la superficie de un portaobjetos de vidrio mediante el uso de un grupo amino (AminnoC6) en su extremo 5'. El CO para el PO etiquetado en 3' tiene poli(T)₅ como brazo conector, y se inmovilizó en la superficie de un portaobjetos de vidrio mediante el uso de un grupo amino (AminnoC6) en su extremo 5'. Se inmovilizó una sonda marcadora que tiene una molécula indicadora fluorescente (Quasar570) en su extremo 5' en la superficie de un portaobjetos de vidrio mediante el uso de un grupo amino en su extremo 3'. Se usó ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) como molde objetivo.

5-1. Ensayo de POCH que usa un PO con un único marcador no etiquetado

Las secuencias del cebador secuencia arriba, del cebador secuencia abajo, del PO, del CO y del marcador usados en este Ejemplo son:

NG-F 5'-TACGCCTGCTACTTTTCACGCT-3' (SEQ ID NO: 11)
 NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
 NG-PO-1 5'-[Quasar570]TGCCCTCATTGGCGTGTTCG[separador de C3]-3' (SEQ ID NO: 3)
 NG-CO-1 5-[AminoC6]TTTTTTTTTCGAAACACGCCAATGAGGGGCA[separador de C3]-3' (SEQ ID NO: 4)
 Marcador 5'-[Quasar570]ATATATATAT[AminoC7]-3' (SEQ ID NO: 5)

La preparación de los portaobjetos se llevó a cabo según el mismo protocolo usado en el Ejemplo 1.

La reacción de escisión se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl que contiene cada uno de 100 pg de ADN genómico de NG, 10 pmol del cebador secuencia abajo (SEQ ID NO: 11), 10 pmol del cebador secuencia arriba (SEQ ID NO: 2), 1 pmol del PO (SEQ ID NO: 3) y 25 µl de 2X Master Mix que contiene MgCl₂ 2,5 mM, 200 µM de dNTP y 4 unidades de polimerasa *H-Taq* de ADN (Solgent, Corea); el tubo que contiene la mezcla de reacción se puso en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 °C y se sometió a 60 ciclos de 30 s a 95 °C y 60 s a 60 °C. Se aplicaron los 30 µl de la mezcla resultante a una cámara ensamblada en la superficie del portaobjetos de vidrio de NSB sobre el que se había reticulado el CO (SEQ ID NO: 4). El portaobjetos se puso en un bloque *in situ* en un termociclador (GenePro B4I, China). Se dejó proceder la reacción de hibridación durante 30 min a 55 °C. La adquisición de imágenes se llevó a cabo después de cada lavado mediante el uso de un escáner de láser confocal, Axon GenePix4300A (Molecular Device, EE.UU.) con un barrido a una resolución de pixel de 5 µm. La intensidad de la fluorescencia se analizó mediante el uso de un programa informático de análisis en micromatriz cuantitativa, el programa informático GenePix pro7.0 (Molecular Device, EE.UU.). La intensidad de la fluorescencia se expresó como las medianas de las manchas después de restar el fondo local. Cada mancha se duplicó para evaluar la reproducibilidad de la prueba. La intensidad de la fluorescencia indica el valor medio de las manchas duplicadas.

Como se muestra en la Figura 18, se observó una disminución en la señal fluorescente (RFU: 1,650 ± 97,6) en presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo en comparación con la señal fluorescente (RFU: 64,474 ± 0,0) en ausencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

5-2. Ensayo de POCH que usa un PO con un único marcador etiquetado en 3'

Las secuencias del cebador secuencia arriba, del cebador secuencia abajo, del PO etiquetado en 3', del CO y del marcador usados en este Ejemplo son:

NG-F 5'-TACGCCTGCTACTTTTCACGCT-3' (SEQ ID NO: 11)
 NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
 NG-PO-2 2 5'-[Quasar570]TGCCCTCATTGGCGTGTTCGGACGACGGCTTGGCTTTACGA[separador de C3]-3' (SEQ ID NO: 6)
 NG-CO-2 5'-[AminoC6]TTTTTTCGTAAAGCCAAGCCGTCGTC[separador de C3]-3' (SEQ ID NO: 7)
 Marcador 5'-[Quasar570]ATATATATAT[AminoC7]-3' (SEQ ID NO: 5)

(Las letras subrayadas indican la porción de etiquetado en 3' del PO)

La preparación de los portaobjetos se llevó a cabo según el mismo protocolo usado en el Ejemplo 2.

La reacción de escisión se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l que contiene cada uno de 100 pg de ADN genómico de NG, 10 pmol del cebador secuencia abajo (SEQ ID NO: 11), 10 pmol del cebador secuencia arriba (SEQ ID NO: 2), 1 pmol del PO (SEQ ID NO: 6) y 25 μ l de 2X Master Mix que contiene $MgCl_2$ 2,5 mM, 200 μ M de dNTP y 4 unidades de polimerasa *H-Taq* de ADN (Solgent, Corea); el tubo que contiene la mezcla de reacción se puso en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 °C y se sometió a 60 ciclos de 30 s a 95 °C y 60 s a 60 °C. Se aplicaron los 30 μ l de la mezcla resultante a una cámara ensamblada en la superficie del portaobjetos de vidrio de NSB sobre el que se había reticulado el CO (SEQ ID NO: 7). El portaobjetos se puso en un bloque *in situ* en un termociclador (GenePro B4I, China). Se dejó proceder la reacción de hibridación durante 30 min a 55 °C. La adquisición de imágenes se llevó a cabo después de cada lavado mediante el uso de un escáner de láser confocal, Axon GenePix4300A (Molecular Device, EE.UU.) con un barrido a una resolución de pixel de 5 μ m. La intensidad de la fluorescencia se analizó mediante el uso de un programa informático de análisis en micromatriz cuantitativa, el programa informático GenePix pro7.0 (Molecular Device, EE.UU.). La intensidad de la fluorescencia se expresó como las medianas de las manchas después de restar el fondo local. Cada mancha se duplicó para evaluar la reproducibilidad de la prueba. La intensidad de la fluorescencia indica el valor medio de las manchas duplicadas.

Como se muestra en la Figura 19, se observó una disminución en la señal fluorescente (RFU: 9,969 \pm 217,1) en presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo en comparación con la señal fluorescente (RFU: 65,470 \pm 1,4) en ausencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

Estos resultados indican que una secuencia de ácidos nucleicos objetivo puede ser detectada mediante el ensayo de POCH acompañada por la amplificación del objetivo mediante un proceso de PCR.

EJEMPLO 6: detección en tiempo real de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo mediante el ensayo de POCH

Aplicamos el ensayo de POCH para la detección en tiempo real de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo. Se usó un PO etiquetado en 3' para analizar esta aplicación. La escisión del PO y la hibridación del PO con el CO se llevaron a cabo con la amplificación del objetivo mediante un proceso de PCR en una micromatriz donde estaba inmovilizado el CO. Se midió el cambio en la señal fluorescente dependiendo del número de ciclos. Se usó el ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) como molde objetivo.

En este Ejemplo se usaron los mismos oligonucleótidos (cebador secuencia arriba, cebador secuencia abajo, PO etiquetado en 3', CO y marcador) usados en el Ejemplo 5-2. La preparación de los portaobjetos se llevó a cabo según el mismo protocolo usado en el Ejemplo 2.

Se preparó una mezcla para el ensayo de POCH en un volumen final de 30 μ l que contiene 100 pg de ADN genómico de NG, 10 pmol del cebador secuencia abajo (SEQ ID NO: 11), 10 pmol del cebador secuencia arriba (SEQ ID NO: 2), 1 pmol del PO (SEQ ID NO: 6) y 25 μ l de 2X Master Mix que contiene $MgCl_2$ 2,5 mM, 200 μ M de dNTP y 4 unidades de polimerasa *H-Taq* de ADN (Solgent, Corea); se aplicó la totalidad de la mezcla a una cámara ensamblada en la superficie del portaobjetos de vidrio NSB sobre el que se había reticulado el CO (SEQ ID NO: 7).

El portaobjetos se puso en un bloque *in situ* en un termociclador (GenePro B4I, China). Se prepararon cinco portaobjetos iguales para el análisis de ciclado. La reacción de POCH se llevó a cabo como sigue: 15 min de desnaturalización a 95 °C, y 0, 20, 30, 40 o 60 ciclos de 30 s a 95 °C, 60 s a 60 °C y 30 min a 55 °C. Después del correspondiente número de ciclos, se llevó a cabo la adquisición de imágenes mediante el uso de un escáner de láser confocal, Axon GenePix4300A (Molecular Device, EE.UU.) con un barrido a una resolución de pixel de 5 μ m.

La intensidad de la fluorescencia se analizó mediante el uso de un programa informático de análisis en micromatriz cuantitativa, el programa informático GenePix pro7.0 (Molecular Device, EE.UU.). La intensidad de la fluorescencia se expresó como las medianas de las manchas después de restar el fondo local. Cada mancha se duplicó para evaluar la reproducibilidad de la prueba. La intensidad de la fluorescencia indica el valor medio de las manchas duplicadas.

Como se muestra en las Figuras 20A y 20B, la señal fluorescente disminuyó después de 30 ciclos (0 ciclo_RFU: 65,438 \pm 0,0; 20 ciclos_RFU: 65,445 \pm 2,1; 30 ciclos_RFU: 65,480 \pm 0,0; 40 ciclos_RFU: 8,844 \pm 1,485,6; y 60 ciclos_RFU: 4,878 \pm 169,7) en presencia del molde. No se produjo ningún cambio en la señal fluorescente dependiendo del número de ciclos en ausencia del molde.

Estos resultados indican que puede detectarse una secuencia de ácidos nucleicos objetivo en tiempo real mediante el ensayo de POCH.

EJEMPLO 7: evaluación del ensayo de POCH usando una escisión del PO independiente del oligonucleótido secuencia arriba

Evaluamos adicionalmente el ensayo de POCH para la detección de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo sin el oligonucleótido secuencia arriba. La escisión del PO independiente del oligonucleótido secuencia arriba se llevó a

cabo sin un oligonucleótido secuencia arriba en un tubo, y se recogió una alícuota del resultante en una micromatriz donde estaba inmovilizado el CO.

5 Se usó polimerasa *Taq* de ADN que tiene actividad de nucleasa en 5' para la escisión del PO independiente del oligonucleótido secuencia arriba. El PO no etiquetado comprende una porción de direccionamiento complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo y tiene una FAM como molécula indicadora fluorescente en su extremo 5'. El CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de direccionamiento del PO. El PO y CO están bloqueados con un separador de carbono en sus extremos 3'. El CO tiene poli(T)₁₀ como brazo conector, y se inmovilizó en la superficie de un portaobjetos de vidrio mediante el uso de un grupo amino (Amino C6) en su extremo 5'. Se inmovilizó una sonda marcadora que tiene una molécula indicadora fluorescente (Quasar570) en su extremo 5' en la superficie de un portaobjetos de vidrio mediante el uso de un grupo amino en su extremo 3'. Se usó el oligonucleótido sintético para *Neisseria gonorrhoeae* (NG) como molde.

15 Las secuencias del molde sintético, del PO, CO y del marcador usados en este Ejemplo son:

NG-T 5'-AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTTGTTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGAT
ACCGATCCATTGAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

20 NG-PO-5 5'-[FAM]TGCCCCTCATTGGCGTGTTTCG[separador de C3]-3' (SEQ ID NO: 12)
NG-CO-1 5-[AminoC6]TTTTTTTTTTTCGAAACACGCCAATGAGGGGCA[separador de C3]-3' (SEQ ID NO: 4)
Marcador 5'-[Quasar570]ATATATATAT[AminoC7]-3' (SEQ ID NO: 5)

25 Se usaron portaobjetos de NSB9 NHS (NSBPOSTECH, Corea) para la fabricación del CO y del marcador (SEQ ID NO: 4 y 5). El CO y el marcador disueltos en tampón de moteado NSB a una concentración final de 50 µM se imprimieron en los portaobjetos NSB9 NHS con el PersonalArrayer™16 Microarray Spotter (CapitalBio, China). El CO y el marcador fueron moteados por ambos lados en un formato de 2 x 1 (moteados por duplicado), y la micromatriz resultante se incubó en una cámara mantenida a una humedad del ~ 85 % durante una noche. Después, los portaobjetos se lavaron con una solución tampón que contiene 2x SSPE (cloruro de sodio 0,3 M, hidrogenofosfato de sodio 0,02 M y EDTA 2,0 mM), a pH 7,4 y SDS 7,0 mM a 37 °C durante 30 min para retirar el CO y el marcador no unidos específicamente, y se aclararon con agua destilada. Después, los portaobjetos funcionalizados con ADN se secaron usando una centrifuga de portaobjetos y se almacenaron en la oscuridad a 4 °C hasta su uso.

35 La reacción de escisión se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl que contiene 2 pmol del molde sintético (SEQ ID NO: 1) para el gen de NG, 1 pmol del PO (SEQ ID NO: 12) y 25 µl de 2X Master Mix que contiene MgCl₂ 2,5 mM, 200 µM de dNTP y 4 unidades de polimerasa *H-Taq* de ADN (Solgent, Corea); el tubo que contiene la mezcla de reacción se puso en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 °C y se sometió a 30 ciclos de 30 s a 95 °C y 60 s a 60 °C.

40 Se aplicaron los 30 µl de la mezcla resultante a una cámara ensamblada en la superficie del portaobjetos de vidrio de NSB sobre el que se había reticulado el CO (SEQ ID NO: 4). El portaobjetos se puso en un bloque *in situ* en un termociclador (GenePro B4I, China). Se dejó proceder la reacción de hibridación durante 30 min a 55 °C. La adquisición de imágenes se llevó a cabo mediante el uso de un escáner de láser confocal, Axon GenePix4300A (Molecular Device, EE.UU.) con un barrido a una resolución de pixel de 5 µm. La intensidad de la fluorescencia se analizó mediante el uso de un programa informático de análisis en micromatriz cuantitativa, el programa informático GenePix pro7.0 (Molecular Device, EE.UU.). La intensidad de la fluorescencia se expresó como las medianas de las manchas después de restar el fondo local. Cada mancha se duplicó para evaluar la reproducibilidad de la prueba. La intensidad de la fluorescencia indica el valor medio de las manchas duplicadas.

50 Se detecta una disminución en la señal fluorescente en presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo en comparación con la señal fluorescente en ausencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

Estos resultados indican que el ensayo de POCH que usa una escisión del PO independiente del oligonucleótido secuencia arriba es aplicable para la detección de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

55 Habiendo descrito una realización preferida de la presente invención, debe entenderse que el ámbito de esta invención va a estar determinado por las reivindicaciones anexas.

<110> Seegene, Inc.

60 <120> DETECCIÓN DE SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS OBJETIVO MEDIANTE UNA ESCISIÓN Y UNA HIBRIDACIÓN DE UN PO

<130> PP120047

ES 2 657 906 T3

<150> KR 10-2011-0068888
 <151> 12-07-2011

5
 <150> KR 10-2011-0042332
 <151> 04-05-2011

<150> PCT/KR 2011/009317
 <151> 02-12-2011

10
 <160> 12
 <170> Kopatent In 2.0

15
 <210> 1
 <211> 86
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> NG-T
 <400 1
 aaataagcga aacacgccaat tgaggggcat gatgctttct ttttgtfctt gctcggcaga 60
 gcgagtgata ccgatccatt gaaaaa 86

25
 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> NG-R
 <400 2
 caatggatcg gtatcactcg c 21

35
 <210> 3
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> NG-PO-1

45
 <400 3
 tgcccctcat tggcgtgttt cg 22

50
 <210> 4
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> NG-CO-1
 <400 4
 tttttttt cgaaacacgc caatgagggg ca 32

60
 <210> 5
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 657 906 T3

<220>
 <223> Marcador

 5 <400 5
 atatatatat 10

 <210> 6
 <211> 43
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> NG-PO-2

 15 <400 6
 tgcccctcat tggcgtgttt cggacgacgg cttggcttta cga 43

 <210> 7
 <211> 26
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> NG-CO-2

 25 <400 7
 ttttttcgta aagccaagcc gtcgtc 26

 <210> 8
 <211> 35
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> NG-PO-3

 35 <400 8
 acgacggctt ggctgcccct cattggcgtg tttcg 35

 <210> 9
 <211> 23
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> NG-CO-3

 45 <400 9
 gccaaagccgt cgttttttt ttt 23

 <210> 10
 <211> 44
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> NG-PO-4

 55 <400 10
 tgcccctcat tggcgtgttt cgtgacgacg gcttggcttt acga 44

 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 65

ES 2 657 906 T3

<220>
<223> NG-F

5 <400 11
tacgcctgct actttcacgc t 21

10 <210> 12
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> NG-PO-5
<400 12
tgcccctcat tggcgtgttt cg 22

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos objetivo a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo de POCH (escisión e hibridación de un PO) sobre un sustrato sólido, que comprende:
- 10 (a) hibridar la secuencia de ácidos nucleicos objetivo con un oligonucleótido secuencia arriba y un oligonucleótido de sondeo (PO); en el que el oligonucleótido secuencia arriba comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el PO comprende una porción de direccionamiento que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el PO tiene un único marcador; el oligonucleótido secuencia arriba está ubicado secuencia arriba del PO; el oligonucleótido secuencia arriba o la hebra extendida induce la escisión del PO por parte de una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5';
- 15 (b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' en unas condiciones para la escisión del PO; en el que cuando el PO está hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, el PO es escindido por la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' para producir un fragmento que contiene un único marcador;
- 20 (c) llevar a cabo una reacción de hibridación poniendo en contacto el resultante de la etapa (b) con un oligonucleótido de captura (CO) inmovilizado sobre el sustrato sólido; en el que el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con el PO; en el que la reacción de hibridación se lleva a cabo en unas condiciones tales que el fragmento que contiene un único marcador no está hibridado con el CO, y un PO no escindido está hibridado con el CO para formar un dúplex de PO no escindido/CO; y
- 25 (d) detectar el hecho de la escisión del PO mediante la medición de una señal del marcador único en el sustrato sólido; mediante lo cual, el hecho de la escisión del PO indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos hibridable con el PO en el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de direccionamiento del PO.
- 30 3. El método según la reivindicación 1, en el que el PO es un PO etiquetado en 3' que comprende adicionalmente en su porción 3' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo o un PO etiquetado en 5' que comprende adicionalmente en su porción 5' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, y la secuencia de nucleótidos hibridable con el PO en el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado del PO.
- 35 4. El método según la reivindicación 3, en el que el marcador único está posicionado de tal forma que el marcador único no se queda en un fragmento que contiene la porción de etiquetado liberado por la escisión del PO.
- 40 5. El método según la reivindicación 1, en el que el PO es un PO etiquetado en 3' que comprende adicionalmente en su porción 3' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, o un PO etiquetado en 5' que comprende adicionalmente en su porción 5' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, y la secuencia de nucleótidos hibridable con el PO en el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con una parte de la porción de etiquetado y una parte de la porción de direccionamiento del PO.
- 45 6. El método según la reivindicación 1, en el que el PO y/o el CO están bloqueados en su extremo 3' para impedir su extensión.
- 50 7. El método según la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido secuencia arriba tiene una secuencia de solapamiento parcial con la porción de direccionamiento del PO.
8. El método según la reivindicación 1, en el que la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' es una polimerasa de ADN termoestable que tiene una actividad de nucleasa en 5' o de nucleasa FEN.
- 55 9. El método según la reivindicación 1, en el que el método comprende adicionalmente la repetición de las etapas (a)-(b), (a)-(c) o (a)-(d) con una desnaturalización entre los ciclos de repetición.
- 60 10. El método según la reivindicación 1, en el que las etapas (a)-(d) se llevan a cabo en un recipiente de reacción o en recipientes de reacción por separado.
11. El método según la reivindicación 1, en el que la secuencia de ácidos nucleicos objetivo comprende al menos dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos objetivo.

12. El método según la reivindicación 1, en el que la secuencia de ácidos nucleicos objetivo comprende una variación de nucleótido.

13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el método se lleva a cabo en presencia de un cebador secuencia abajo.

14. Un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos objetivo a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo de POCH (escisión e hibridación de un PO) sobre un sustrato sólido, que comprende:

(a) hibridar la secuencia de ácidos nucleicos objetivo con un oligonucleótido secuencia arriba y un oligonucleótido de sondeo (PO); en el que el oligonucleótido secuencia arriba comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el PO comprende una porción de direccionamiento que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el PO tiene un marcador doble interactivo que comprende una molécula donante y una molécula aceptora; el oligonucleótido secuencia arriba está ubicado secuencia arriba del PO; el oligonucleótido secuencia arriba o la hebra extendida induce la escisión del PO por parte de una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5';

(b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' en unas condiciones para la escisión del PO; en el que cuando el PO está hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, el PO es escindido por la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' para separar el marcador doble interactivo, mediante lo cual se producen un fragmento que contiene el donante y un fragmento que contiene el aceptor;

(c) llevar a cabo una reacción de hibridación poniendo en contacto el resultante de la etapa (b) con un oligonucleótido de captura (CO) inmovilizado sobre el sustrato sólido; en el que el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con el PO; en el que la reacción de hibridación se lleva a cabo en unas condiciones tales que al menos uno del fragmento que contiene el donante y el fragmento que contiene el aceptor no está hibridado con el CO, y un PO no escindido está hibridado con el CO para formar un dúplex de PO no escindido/CO; en el que una señal del dúplex de PO no escindido/CO es diferenciada de una señal proporcionada en el momento en el que al menos uno del fragmento que contiene el donante y el fragmento que contiene el aceptor no está hibridado con el CO; y

(d) detectar el hecho de la escisión del PO mediante la medición de una señal del marcador doble interactivo en el sustrato sólido; mediante lo cual, el hecho de la escisión del PO indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

15. El método según la reivindicación 14, en el que la secuencia de nucleótidos hibridable con el PO en el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de direccionamiento del PO, y el marcador doble interactivo está ubicado de tal forma que una señal de la molécula donante es inactivada por la molécula aceptora cuando se forma el dúplex de PO no escindido/CO, en el que la etapa (d) se lleva a cabo mediante la detección de una señal de la molécula aceptora.

16. El método según la reivindicación 14, en el que el PO es un PO etiquetado en 3' que comprende adicionalmente en su porción 3' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, o un PO etiquetado en 5' que comprende adicionalmente en su porción 5' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, y la secuencia de nucleótidos hibridable con el PO en el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado del PO, y el marcador doble interactivo está ubicado de tal forma que una señal de la molécula donante es inactivada por la molécula aceptora cuando se forma el dúplex de PO no escindido/CO, en el que la etapa (d) se lleva a cabo mediante la detección de una señal de la molécula aceptora.

17. El método según la reivindicación 14, en el que la secuencia de nucleótidos hibridable con el PO en el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de direccionamiento del PO, y la reacción de hibridación en la etapa (c) se lleva a cabo en unas condiciones tales que el fragmento que contiene el donante no está hibridado con el CO; en el que el marcador doble interactivo está ubicado de tal forma que una señal de la molécula donante es inactivada por la molécula aceptora cuando se forma el dúplex de PO no escindido/CO, y la etapa (d) se lleva a cabo mediante la detección de una señal de la molécula donante.

18. El método según la reivindicación 14, en el que el PO es un PO etiquetado en 3' que comprende adicionalmente en su porción 3' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, o un PO etiquetado en 5' que comprende adicionalmente en su porción 5' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; la secuencia de nucleótidos hibridable con el PO en el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado del PO; el fragmento que contiene el donante comprende la porción de etiquetado hibridable con el CO, y en la reacción de hibridación de la etapa (c), el fragmento que contiene el donante está hibridado con el CO; en el que el marcador doble interactivo está ubicado de tal forma que una señal

de la molécula donante es inactivada por la molécula aceptora cuando se forma el dúplex de PO no escindido/CO, y la etapa (d) se lleva a cabo mediante la detección de una señal de la molécula donante.

5 19. El método según la reivindicación 14, en el que el PO es un PO etiquetado en 3' que comprende adicionalmente en su porción 3' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, o un PO etiquetado en 5' que comprende adicionalmente en su porción 5' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, y la secuencia de nucleótidos hibridable con el PO en el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con una parte de la porción de etiquetado y una parte de la porción de direccionamiento del PO.

20. El método según la reivindicación 14, en el que el método comprende adicionalmente la repetición de las etapas (a)-(b), (a)-(c) o (a)-(d) con una desnaturalización entre los ciclos de repetición.

15 21. El método según la reivindicación 14, en el que las etapas (a)-(d) se llevan a cabo en un recipiente de reacción o en recipientes de reacción por separado.

22. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 14-21, en el que el método se lleva a cabo en presencia de un cebador secuencia abajo.

20 23. Un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos objetivo a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo de POCH (escisión e hibridación de un PO) sobre un sustrato sólido, que comprende:

25 (a) hibridar la secuencia de ácidos nucleicos objetivo con un oligonucleótido secuencia arriba y un oligonucleótido de sondeo (PO); en el que el oligonucleótido secuencia arriba comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el PO comprende una porción de direccionamiento que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el oligonucleótido secuencia arriba está ubicado secuencia arriba del PO; el oligonucleótido secuencia arriba o la hebra extendida induce escisión del PO por parte de una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5';

30 (b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' en unas condiciones para la escisión del PO; en el que cuando el PO está hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, el PO es escindido por la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' para producir un fragmento escindido;

35 (c) llevar a cabo una reacción de hibridación en presencia de un agente intercalante poniendo en contacto el resultante de la etapa (b) con un oligonucleótido de captura (CO) inmovilizado sobre el sustrato sólido; en el que el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con el PO; en el que la reacción de hibridación se lleva a cabo en unas condiciones tales que el fragmento escindido no está hibridado con el CO, y un PO no escindido está hibridado con el CO para formar un dúplex de PO no escindido/CO; y

40 (d) detectar el hecho de la escisión del PO mediante la medición de una señal del agente intercalante en el sustrato sólido; mediante lo cual, el hecho de la escisión del PO indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

45 24. El método según la reivindicación 23, en el que la secuencia de nucleótidos hibridable con el PO en el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de direccionamiento del PO.

50 25. El método según la reivindicación 23, en el que el método comprende adicionalmente la repetición de las etapas (a)-(b), (a)-(c) o (a)-(d) con una desnaturalización entre los ciclos de repetición.

26. El método según la reivindicación 23, en el que las etapas (a)-(d) se llevan a cabo en un recipiente de reacción o en recipientes de reacción por separado.

55 27. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 23-26, en el que el método se lleva a cabo en presencia de un cebador secuencia abajo.

28. Un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos objetivo a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo de POCH (escisión e hibridación de un PO) sobre un sustrato sólido, que comprende:

60 (a) hibridar la secuencia de ácidos nucleicos objetivo con un oligonucleótido de sondeo (PO); en el que el PO comprende una porción de direccionamiento que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el PO tiene un único marcador;

65 (b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5' en unas condiciones para la escisión del PO; en el que cuando el PO está hibridado con la secuencia de ácidos

nucleicos objetivo, el PO es escindido por la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' para producir un fragmento que contiene un único marcador;

(c) llevar a cabo una reacción de hibridación poniendo en contacto el resultante de la etapa (b) con un oligonucleótido de captura (CO) inmovilizado sobre el sustrato sólido; en el que el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con el PO; en el que la reacción de hibridación se lleva a cabo en unas condiciones tales que el fragmento que contiene un único marcador no está hibridado con el CO, y un PO no escindido está hibridado con el CO para formar un dúplex de PO no escindido/CO; y

(d) detectar el hecho de la escisión del PO mediante la medición de una señal del marcador único en el sustrato sólido; mediante lo cual, el hecho de la escisión del PO indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

29. Un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos objetivo a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo de POCH (escisión e hibridación de un PO) sobre un sustrato sólido, que comprende:

(a) hibridar la secuencia de ácidos nucleicos objetivo con un oligonucleótido de sondeo (PO); en el que el PO comprende una porción de direccionamiento que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; el PO tiene un marcador doble interactivo que comprende una molécula donante y una molécula aceptora;

(b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5' en unas condiciones para la escisión del PO; en el que cuando el PO está hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, el PO es escindido por la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' para separar el marcador doble interactivo, mediante lo cual se producen un fragmento que contiene el donante y un fragmento que contiene el aceptor;

(c) llevar a cabo una reacción de hibridación poniendo en contacto el resultante de la etapa (b) con un oligonucleótido de captura (CO) inmovilizado sobre el sustrato sólido; en el que el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con el PO; en el que la reacción de hibridación se lleva a cabo en unas condiciones tales que al menos uno del fragmento que contiene el donante y el fragmento que contiene el aceptor no está hibridado con el CO, y un PO no escindido está hibridado con el CO para formar un dúplex de PO no escindido/CO; en el que una señal del dúplex de PO no escindido/CO es diferenciada de una señal proporcionada en el momento en el que al menos uno del fragmento que contiene el donante y el fragmento que contiene el aceptor no está hibridado con el CO; y

(d) detectar el hecho de la escisión del PO mediante la medición de una señal del marcador doble interactivo en el sustrato sólido; mediante lo cual, el hecho de la escisión del PO indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

30. Un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos objetivo a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo de POCH (escisión e hibridación de un PO) sobre un sustrato sólido, que comprende:

(a) hibridar la secuencia de ácidos nucleicos objetivo con un oligonucleótido de sondeo (PO); en el que el PO comprende una porción de direccionamiento que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo;

(b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5' en unas condiciones para la escisión del PO; en el que cuando el PO está hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, el PO es escindido por la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' para producir un fragmento escindido;

(c) llevar a cabo una reacción de hibridación en presencia de un agente intercalante poniendo en contacto el resultante de la etapa (b) con un oligonucleótido de captura (CO) inmovilizado sobre el sustrato sólido; en el que el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con el PO; en el que la reacción de hibridación se lleva a cabo en unas condiciones tales que el fragmento escindido no está hibridado con el CO, y un PO no escindido está hibridado con el CO para formar un dúplex de PO no escindido/CO; y

(d) detectar el hecho de la escisión del PO mediante la medición de una señal del agente intercalante en el sustrato sólido; mediante lo cual, el hecho de la escisión del PO indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

31. Uso de un kit según un método de cualquiera de las reivindicaciones 1-27, en el que el kit comprende:

(a) un oligonucleótido de sondeo (PO) que comprende una porción de direccionamiento que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo;

(b) un oligonucleótido secuencia arriba que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo; en el que el oligonucleótido secuencia arriba está ubicado secuencia arriba del PO; el oligonucleótido secuencia arriba o la hebra extendida induce la escisión del PO por parte de una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5'; y

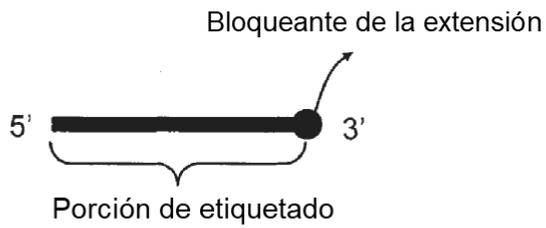
(c) un oligonucleótido de captura (CO) inmovilizado sobre el sustrato sólido; en el que el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con el PO, mediante lo cual un PO no escindido por la enzima que tiene la actividad de nucleasa en 5' está hibridado con el CO para formar un dúplex de PO no escindido/CO.

- 5 32. El uso según la reivindicación 31, en el que el PO tiene un único marcador o un marcador doble interactivo.
33. El uso según la reivindicación 31, en el que el PO es un PO etiquetado en 3' que comprende adicionalmente en su porción 3' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, o un PO etiquetado en 5' que comprende adicionalmente en su porción 5' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, y la secuencia de nucleótidos hibridable con el PO en el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado del PO.
- 10
- 15 34. El uso según la reivindicación 31, en el que el PO es un PO etiquetado en 3' que comprende adicionalmente en su porción 3' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, o un PO etiquetado en 5' que comprende adicionalmente en su porción 5' una porción de etiquetado que tiene una secuencia de nucleótidos no complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo, y la secuencia de nucleótidos hibridable con el PO en el CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con una parte de la porción de etiquetado y una parte de la porción de direccionamiento del PO.
- 20
35. El uso según la reivindicación 31, en el que el kit comprende adicionalmente una enzima que tiene una actividad de nucleasa en 5'.
- 25 36. El uso según la reivindicación 31, en el que el oligonucleótido secuencia arriba tiene una secuencia de solapamiento parcial con la porción de direccionamiento del PO.

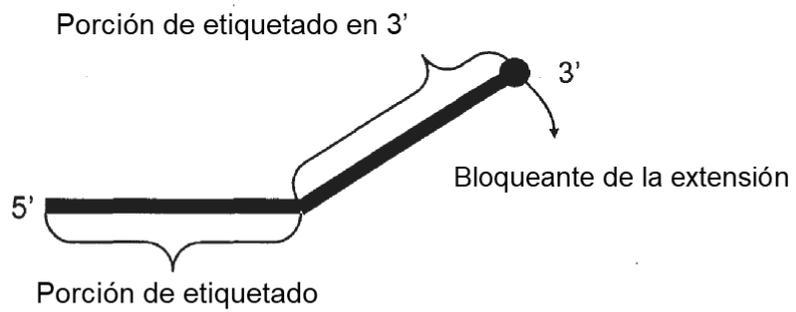
Fig. 1A

Oligonucleótido de sondeo (PO)

A. PO no etiquetado



B. PO etiquetado en 3'



C. PO etiquetado en 5'

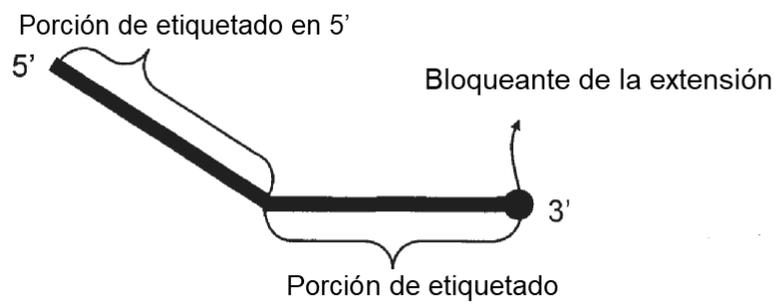
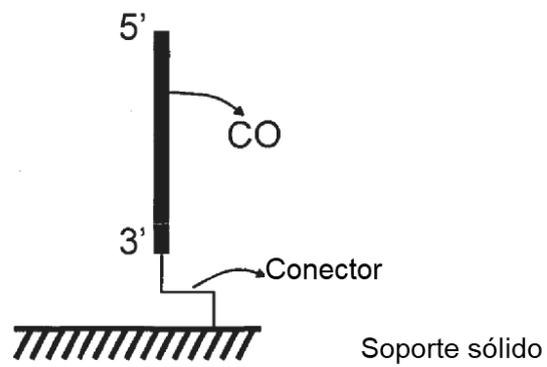


Fig. 1B

Oligonucleótido de captura (CO) sobre un soporte sólido

A. Inmovilización del CO a través de su extremo 3'



B. Inmovilización del CO a través de su extremo 5'

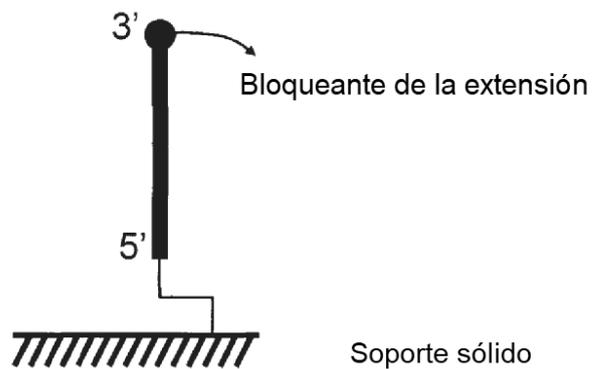
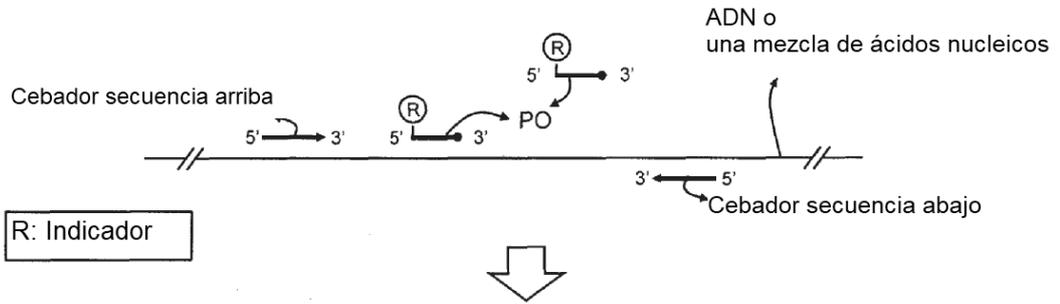
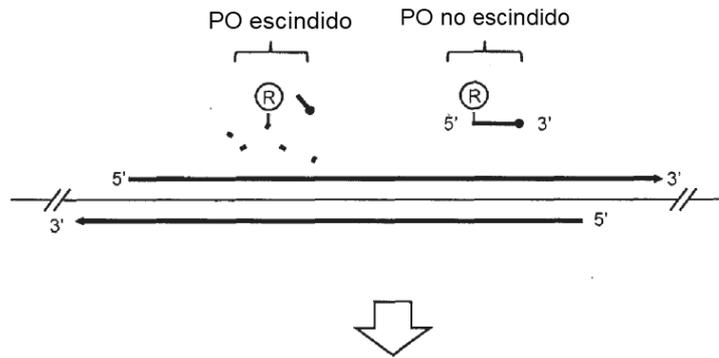


Fig. 2

A. Hibridación



B. Extensión del cebador & escisión del PO



C. Hibridación del PO con el CO & detección

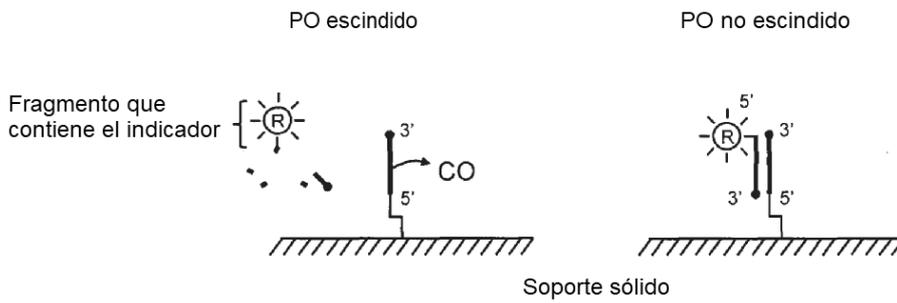
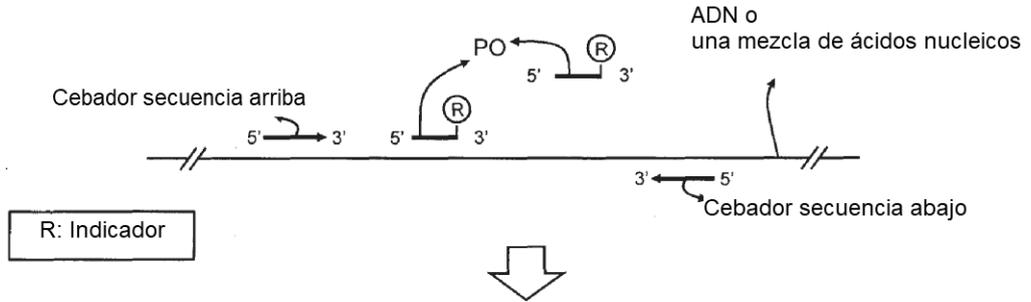
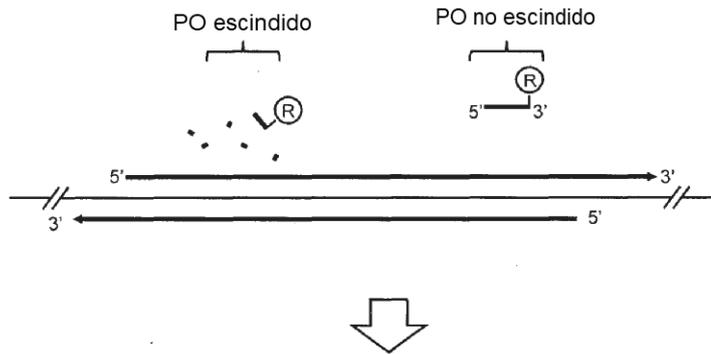


Fig. 3

A. Hibridación



B. Extensión del cebador & escisión del PO



C. Hibridación del PO con el CO & detección

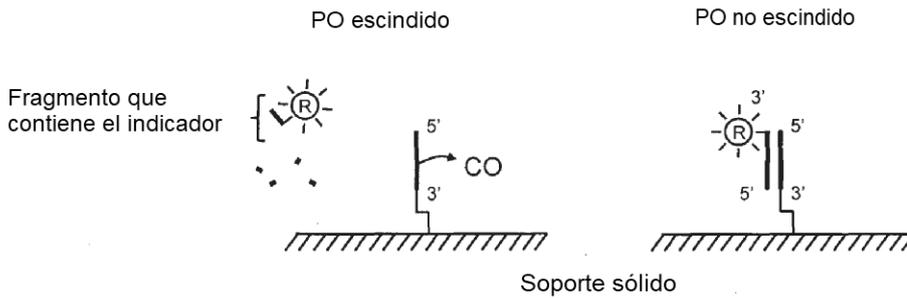
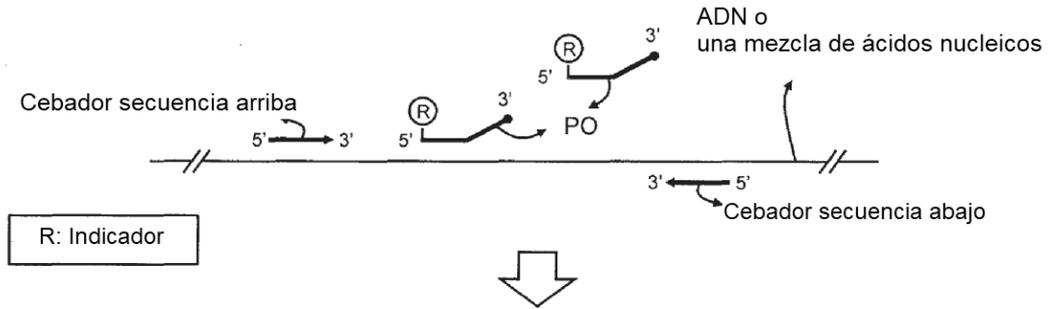
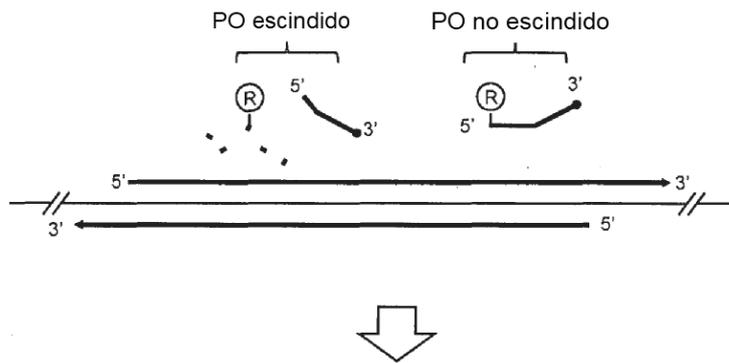


Fig. 4

A. Hibridación



B. Extensión del cebador & escisión del PO



C. Hibridación del PO con el CO & detección

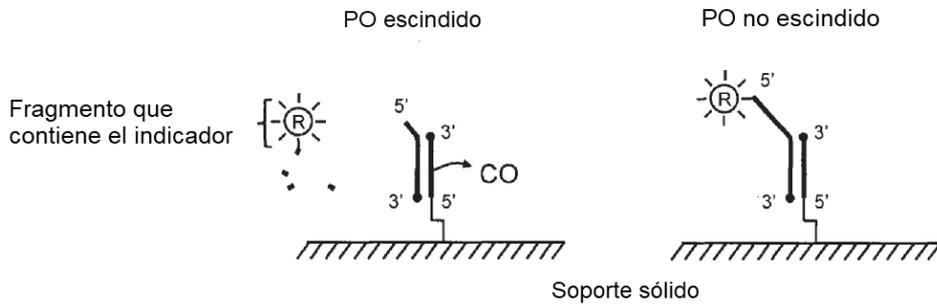
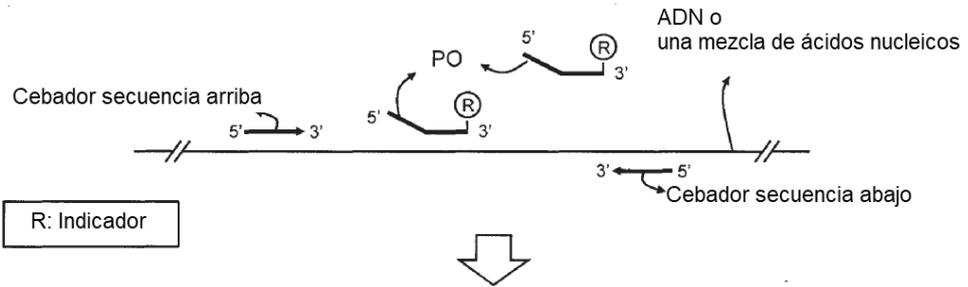
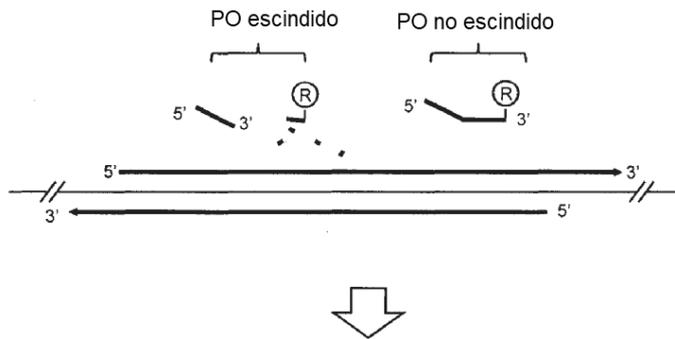


Fig. 5

A. Hibridación



B. Extensión del cebador & escisión del PO



C. Hibridación del PO con el CO & detección

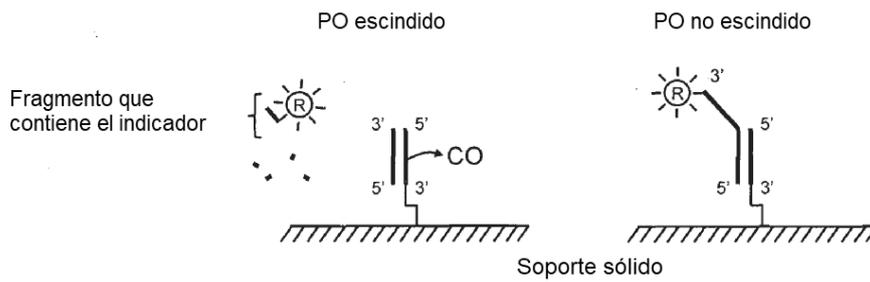
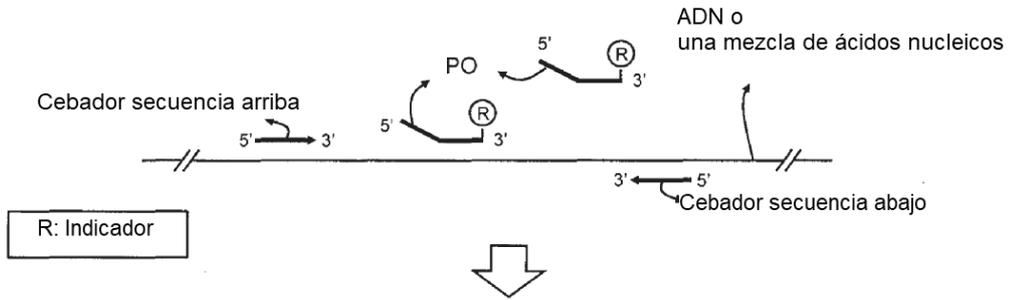
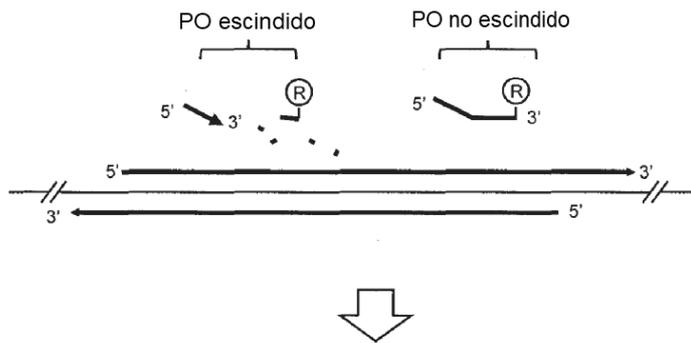


Fig. 6

A. Hibridación



B. Extensión del cebador & escisión del PO



C. Hibridación del PO con el CO & detección

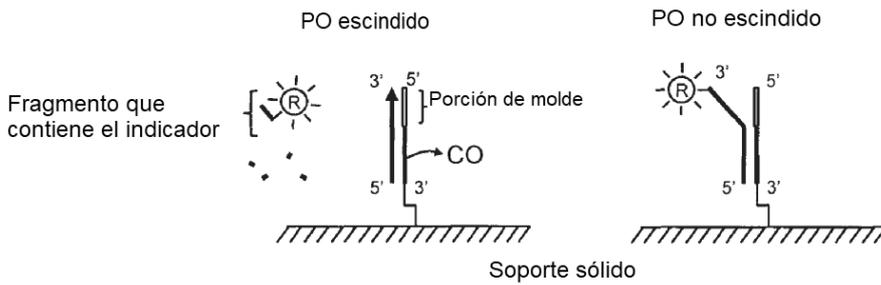
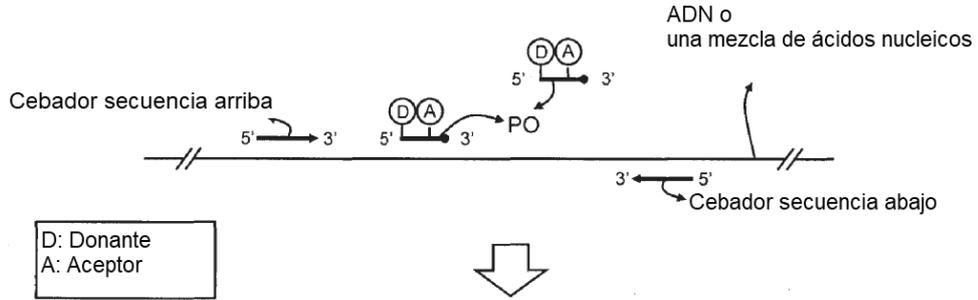
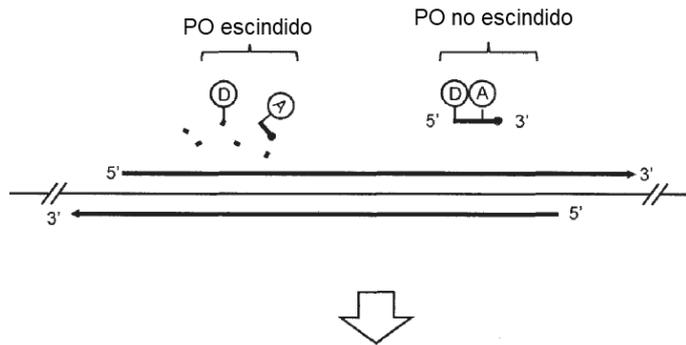


Fig. 7

A. Hibridación



B. Extensión del cebador & escisión del PO



C. Hibridación del PO con el CO & detección

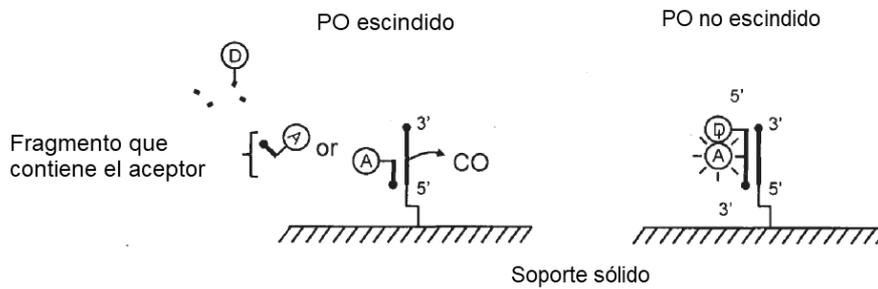
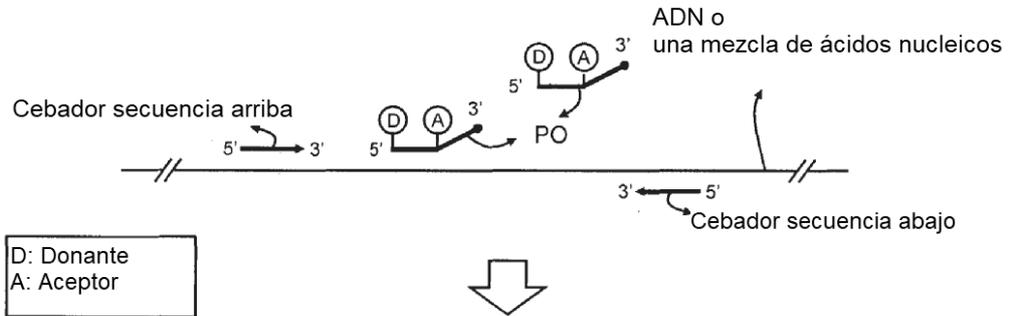
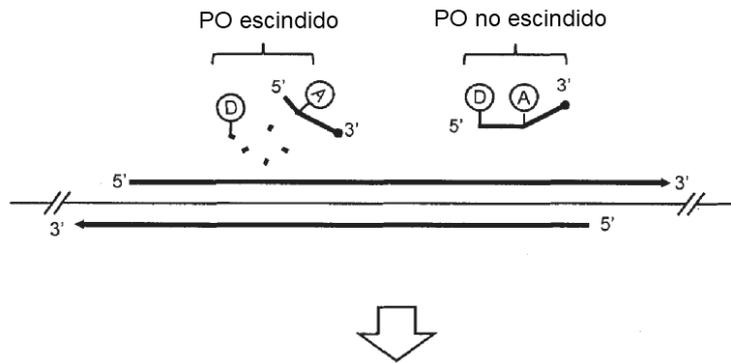


Fig. 8

A. Hibridación



B. Extensión del cebador & escisión del PO



C. Hibridación del PO con el CO & detección

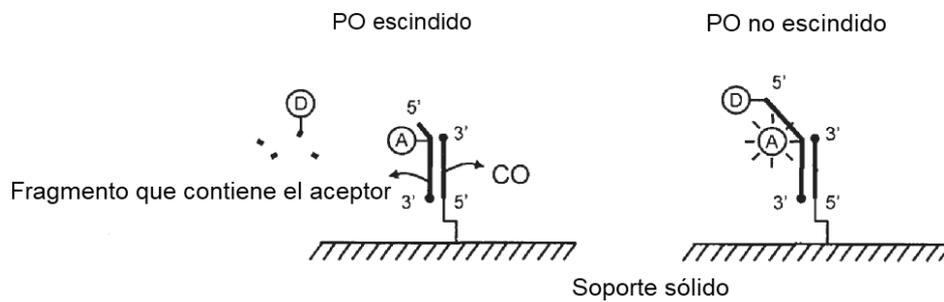
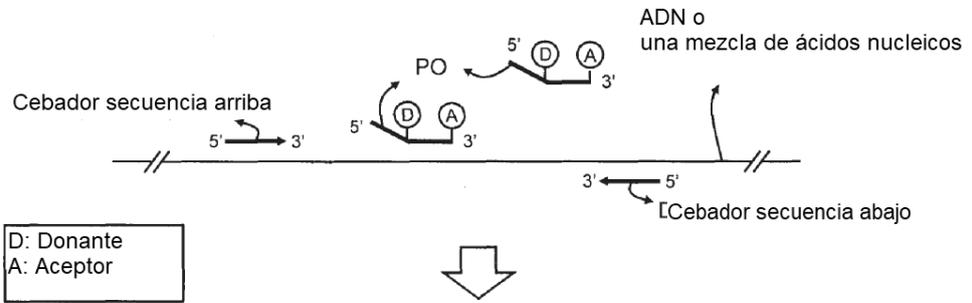
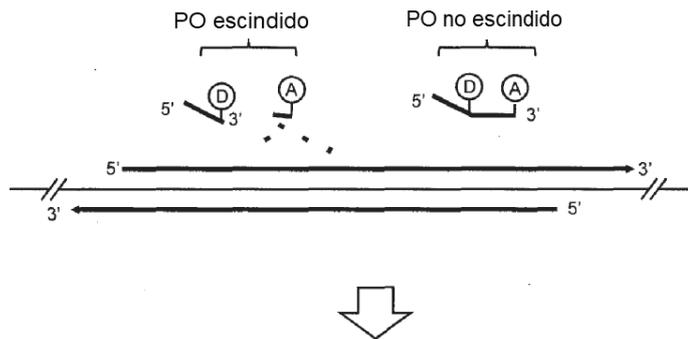


Fig. 9

A. Hibridación



B. Extensión del cebador & escisión del PO



C. Hibridación del PO con el CO & detección

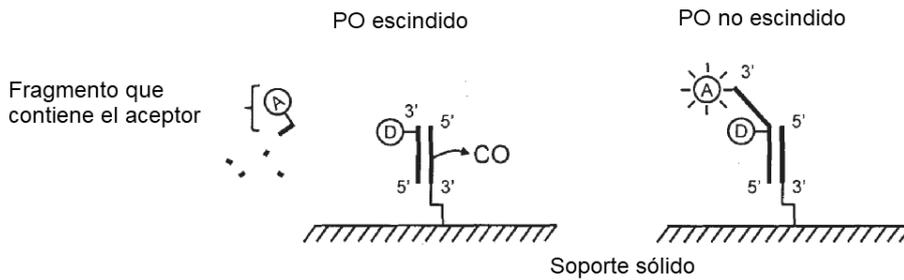
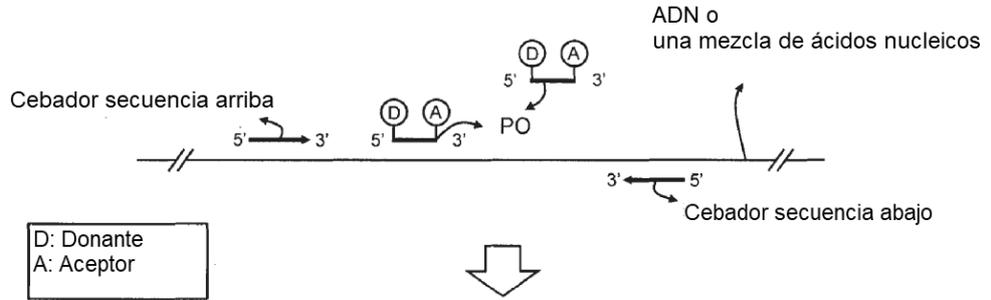
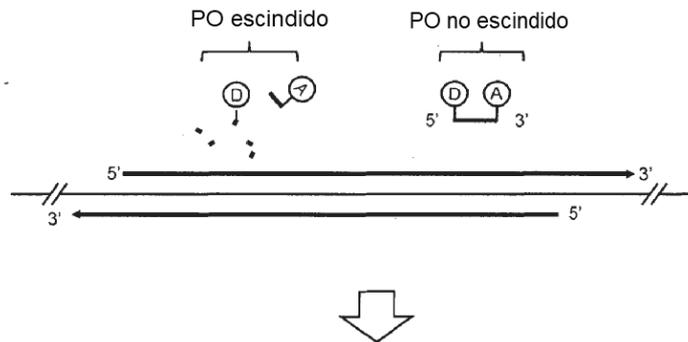


Fig. 10

A. Hibridación



B. Extensión del cebador & escisión del PO



C. Hibridación del PO con el CO & detección

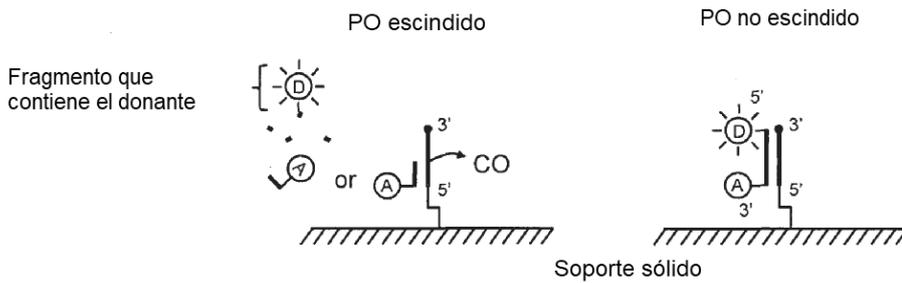
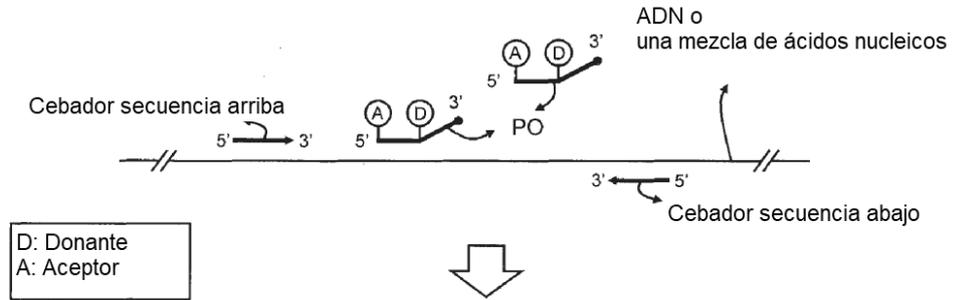
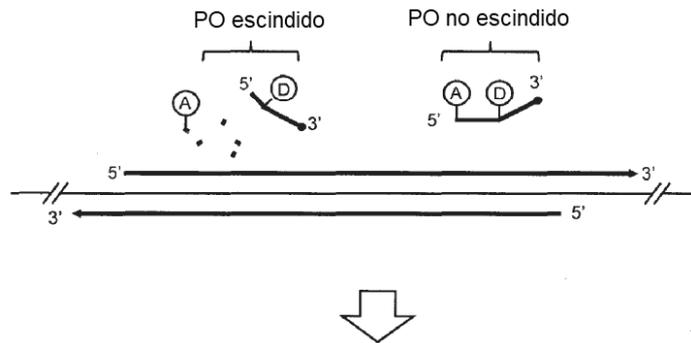


Fig. 11

A. Hibridación



B. Extensión del cebador & escisión del PO



C. Hibridación del PO con el CO & detección

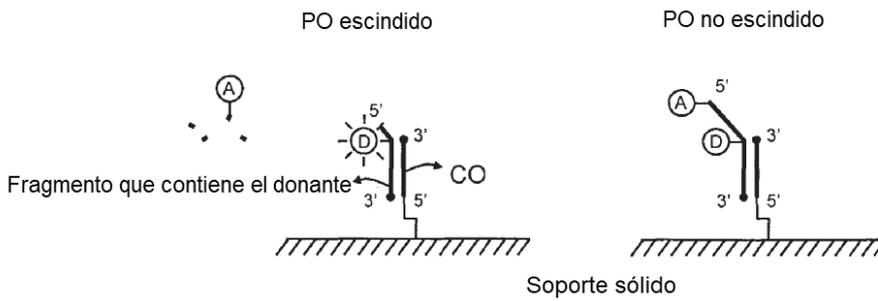
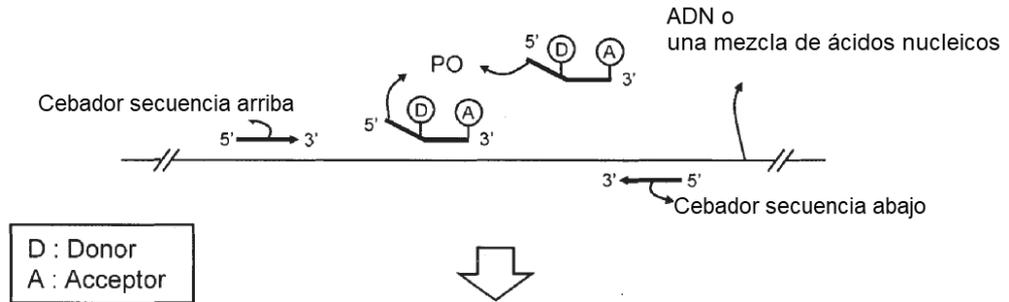
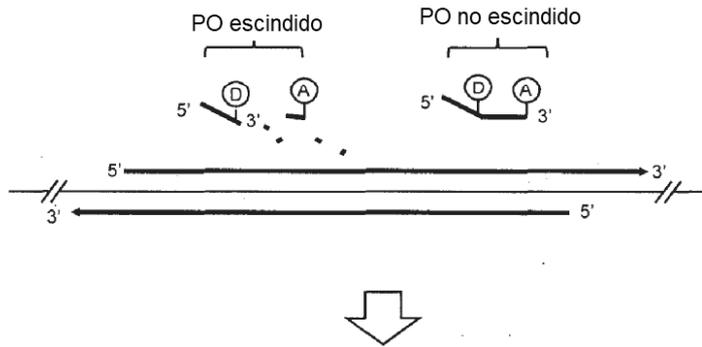


Fig. 12

A. Hibridación



B. Extensión del cebador & escisión del PO



C. Hibridación del PO con el CO & detección

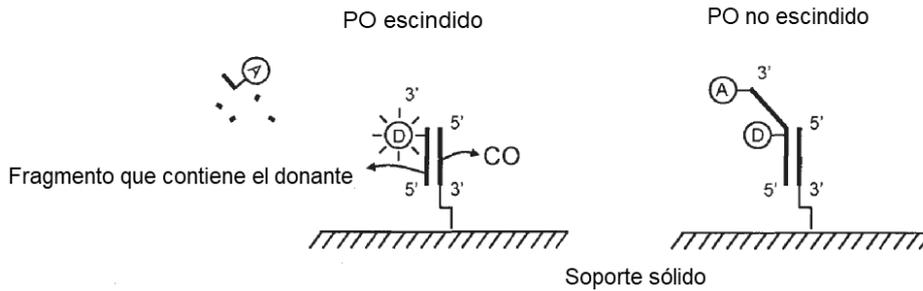
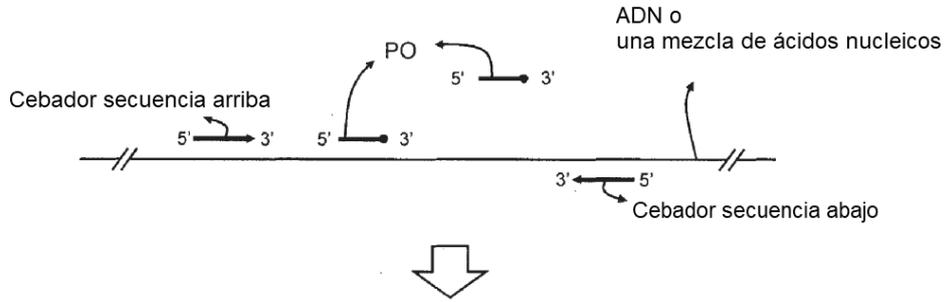
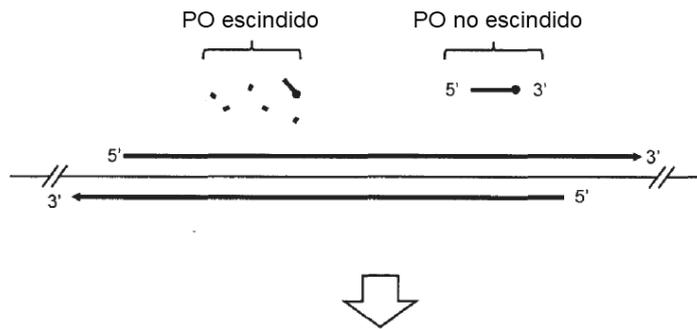


Fig. 13

A. Hibridación



B. Extensión del cebador & escisión del PO



C. Hibridación del PO con el CO & detección

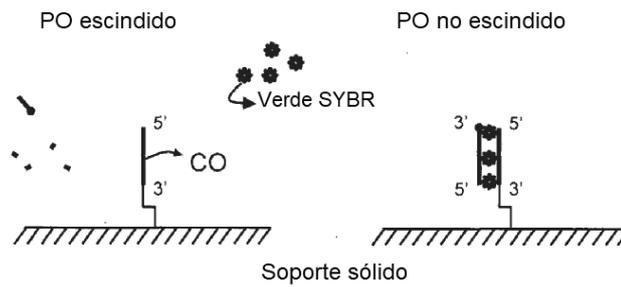
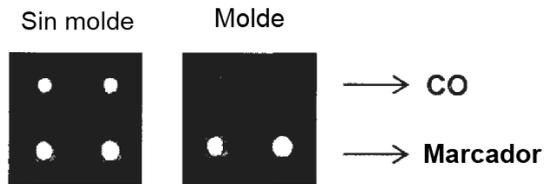


Fig. 14

Ensayo de POCH con un PO no etiquetado con un marcador único

A. Imagen fluorescente en la micromatriz



B. Intensidad fluorescente en la micromatriz

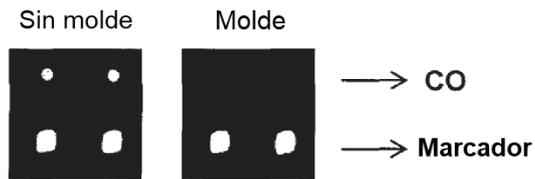
| Molde ¹⁾ | Cebador secuencia arriba | PO no etiquetado ²⁾ | CO ³⁾ | RFU ⁴⁾ |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------|-------------------|
| - | + | + | + | 65.484 (±0,7) |
| + | + | + | + | 9.006 (±20,5) |

- 1) El molde es un oligonucleótido sintético para el gen de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) El PO no etiquetado tiene una molécula indicadora fluorescente en su extremo 5'.
- 3) El CO está modificado por el separador C3 en su extremo 3' e inmovilizado sobre la superficie del sustrato sólido mediante el uso de un grupo amino en su extremo 5'.
- 4) RFU representa las unidades de fluorescencia relativas.

Fig. 15

Ensayo de POCH un PO etiquetado en 3' con un marcador único

A. Imagen fluorescente en la micromatriz



B. Intensidad fluorescente en la micromatriz

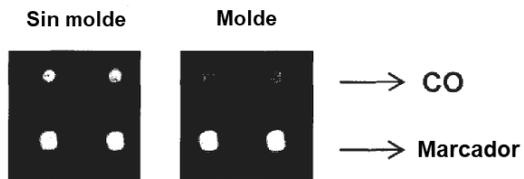
| Molde ¹⁾ | Cebador secuencia arriba | PO etiquetado en 3' ²⁾ | CO ³⁾ | RFU ⁴⁾ |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------------------|------------------|-------------------|
| - | + | + | + | 65.464 (±6,4) |
| + | + | + | + | 10.217 (±73,5) |

- 1) El molde es un oligonucleótido sintético para el gen de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) Un PO etiquetado en 3' tiene una molécula indicadora fluorescente en su extremo 5'.
- 3) El CO está modificado por el separador C3 en su extremo 3' e inmovilizado sobre la superficie del sustrato sólido mediante el uso de un grupo amino en su extremo 5'. El CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado en 3' del PO.
- 4) RFU representa las unidades de fluorescencia relativas.

Fig. 16

Ensayo de POCH un PO etiquetado en 5' con un marcador único

A. Imagen fluorescente en la micromatriz



B. Intensidad fluorescente en la micromatriz

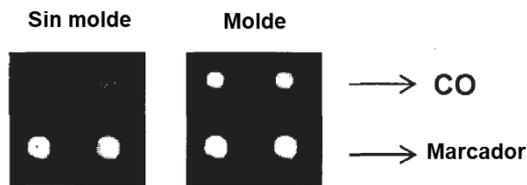
| Molde ¹⁾ | Cebador secuencia arriba | PO etiquetado en 5' ²⁾ | CO ³⁾ | RFU ⁴⁾ |
|---------------------|--------------------------|-----------------------------------|------------------|--------------------|
| - | + | + | + | 65.455 (±0,7) |
| + | + | + | + | 17.586 (±152,0) |

- 1) El molde es un oligonucleótido sintético para el gen de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) Un PO etiquetado en 5' tiene una molécula indicadora fluorescente en su extremo 3'.
- 3) El CO está inmovilizado sobre la superficie del sustrato sólido mediante el uso de un grupo amino en su extremo 3'. El CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado en 5' del PO.
- 4) RFU representa las unidades de fluorescencia relativas.

Fig. 17

Ensayo de POCH con un PO etiquetado en 3' con un marcador doble

A. Imagen fluorescente en la micromatriz



B. Intensidad fluorescente en la micromatriz

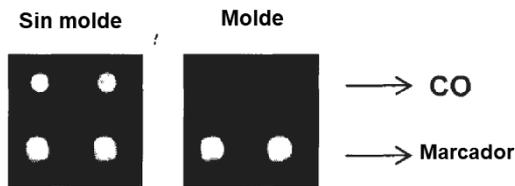
| Molde ¹⁾ | Cebador secuencia arriba | PO etiquetado en 3' ²⁾ | CO ³⁾ | RFU ⁴⁾ |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------------------|------------------|--------------------|
| - | + | + | + | 13.349 (±441,2) |
| + | + | + | + | 65.469 (±0,7) |

- 1) El molde es un oligonucleótido sintético para el gen de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) Un PO etiquetado en 3' tiene una molécula aceptora en su extremo 5' y una molécula donante en su porción 3'.
- 3) El CO está modificado por el separador C3 en su extremo 3' e inmovilizado sobre la superficie del sustrato sólido mediante el uso de un grupo amino en su extremo 5'. El CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado en 3' del PO.
- 4) RFU representa las unidades de fluorescencia relativas.

Fig. 18

Ensayo de POCH con un PO no etiquetado con un marcador único

A. Imagen fluorescente en la micromatriz



B. Intensidad fluorescente en la micromatriz

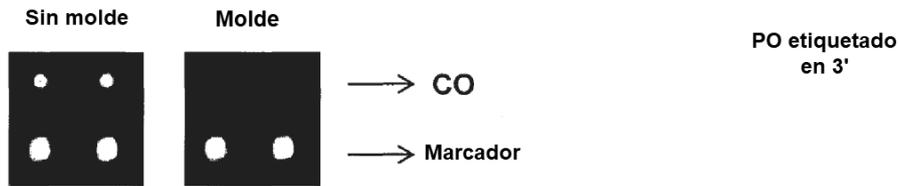
| Molde ¹⁾ | Cebadores ²⁾ | PO no etiquetado ³⁾ | CO ⁴⁾ | RFU ⁵⁾ |
|---------------------|-------------------------|--------------------------------|------------------|-------------------|
| - | + | + | + | 65.474 (±0,0) |
| + | + | + | + | 1.650 (±97,6) |

- 1) El molde es un ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) Los cebadores son un cebador secuencia arriba y uno secuencia abajo para la PCR.
- 3) El PO no etiquetado tiene una molécula indicadora fluorescente en su extremo 5'.
- 4) El CO está modificado por el separador C3 en su extremo 3' e inmovilizado sobre la superficie del sustrato sólido mediante el uso de un grupo amino en su extremo 5'.
- 5) RFU representa las unidades de fluorescencia relativas.

Fig. 19

Ensayo de POCH un PO etiquetado en 3' con un marcador único

A. Imagen fluorescente en la micromatriz



B. Intensidad fluorescente en la micromatriz

| Molde ¹⁾ | Cebadores ²⁾ | PO etiquetado en 3' ³⁾ | CO ⁴⁾ | RFU ⁵⁾ |
|---------------------|-------------------------|-----------------------------------|------------------|-------------------|
| - | + | + | + | 65.470 (±1,4) |
| + | + | + | + | 9.969 (±217,1) |

- 1) El molde es un ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) Los cebadores son un cebador secuencia arriba y uno secuencia abajo para la PCR.
- 3) Un PO etiquetado en 3' tiene una molécula indicadora fluorescente en su extremo 5'.
- 4) El CO está modificado por el separador C3 en su extremo 3' e inmovilizado sobre la superficie del sustrato sólido mediante el uso de un grupo amino en su extremo 5'. El CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado en 3' del PO.
- 5) RFU representa las unidades de fluorescencia relativas.

Fig. 20A

Imágenes fluorescentes que dependen del número de ciclos durante el ensayo de POCH con un PO etiquetado en 3' con un marcador único

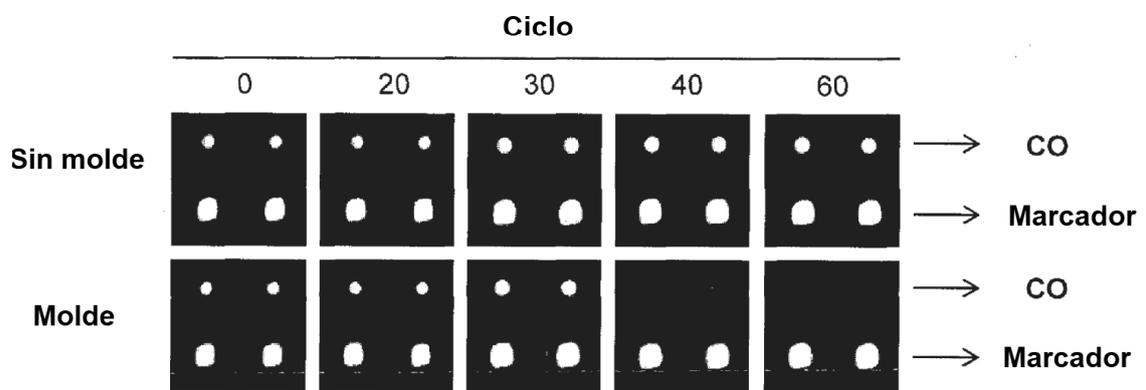
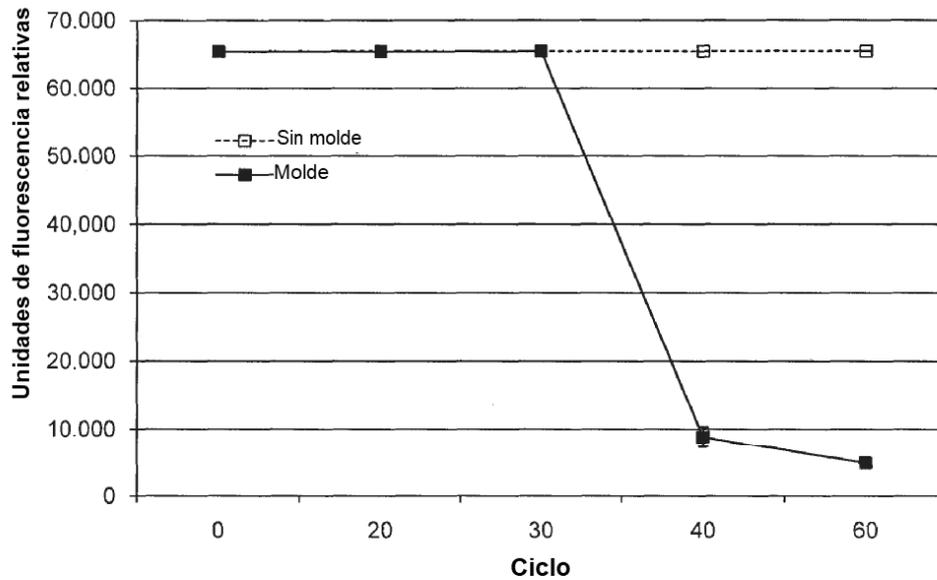


Fig. 20B

Cambio en la intensidad de la fluorescencia que depende del número de ciclos durante el ensayo de POCH con un PO etiquetado en 3' con un marcador único



| Molde | 1) Cebadores 2) | PO etiquetado en 3' 3) | CO 4) | Nº de ciclos: | RFU 5) | | | | |
|-------|-----------------|------------------------|-------|---------------|------------------|------------------|------------------|---------------------|-------------------|
| | | | | | 0 | 20 | 30 | 40 | 60 |
| - | + | + | + | | 65.441 (±3,5) | 65.444 (±1,4) | 65.478 (±2,1) | 65.459 (±11,3) | 65.455 (±8,5) |
| + | + | + | + | | 65.438 (±0,0) | 65.445 (±2,1) | 65.480 (±0,0) | 8.844 (±1.485,6) | 4.878 (±169,7) |

- 1) El molde es un ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 2) Los cebadores son un cebador secuencia arriba y uno secuencia abajo para la PCR.
- 3) Un PO etiquetado en 3' tiene una molécula indicadora fluorescente en su extremo 5'.
- 4) El CO está modificado por el separador C3 en su extremo 3' e inmovilizado sobre la superficie del sustrato sólido mediante el uso de un grupo amino en su extremo 5'. El CO comprende una secuencia de nucleótidos hibridable con la porción de etiquetado en 3' del PO.
- 5) RFU representa las unidades de fluorescencia relativas.

Fig. 21

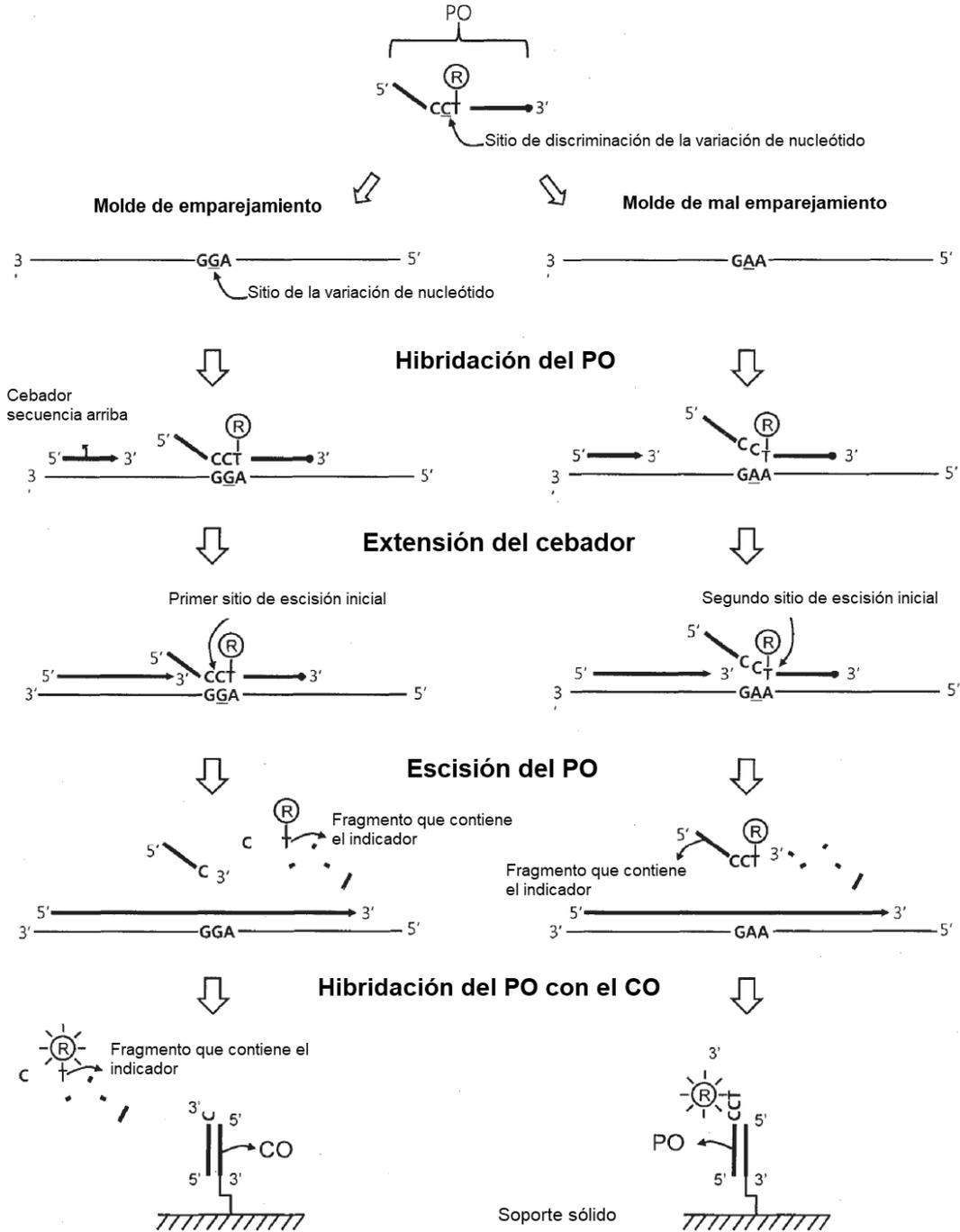


Fig. 22

