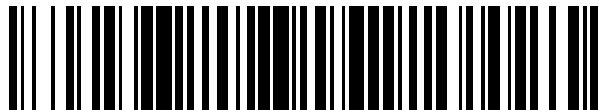


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 228**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2012 PCT/US2012/059816**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13055963**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2012 E 12778911 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2766711**

54 Título: **Ciclado térmico de onda cuadrada**

30 Prioridad:

14.10.2011 US 201161547199 P

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

21.03.2018

73 Titular/es:

**BECTON DICKINSON & COMPANY (100.0%)
One Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417, US**

72 Inventor/es:

STEEL, ADAM

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 660 228 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

Ciclado térmico de onda cuadrada

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 Las realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a métodos y sistemas para el análisis de temperaturas de fusión y, particularmente, el análisis de ácidos nucleicos de doble hebra.

Descripción de la técnica relacionada

10 Pueden usarse los análisis de la curva de fusión para deducir información sobre la longitud, secuencia, contenido de GC y complementariedad de ácidos nucleicos de doble hebra. Como tal, el análisis de la curva de fusión se usa ampliamente en una diversidad de aplicaciones, tales como detectar polimorfismos de nucleótido único (SNP) y distinguir entre homocigoto de tipo silvestre, heterocigoto y alelos mutantes homocigotos gracias a los patrones de disociación producidos. Además, puede usarse el análisis de la curva de fusión para detectar productos de amplificación espurios después de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El análisis del salto de temperatura inducido por láser, espectroscópico y termodinámico de los efectos de la sal sobre la formación de la doble hebra por dGCATGC se describió en Williams, 1989, Bioquímica, Vol. 28, Nº 10, pág. 4283-4291. Se describió la ferrocenilcarbodiimida como un reactivo de marcado electroquímicamente activo para ácidos nucleicos; véase Mukumoto, 2005, tetrahedron, Vol. 61, Nº 49, pág. 11705-11715. El panorama energético del plegamiento y fusión del ADN se describió en Hairong, 2007, PNAS, Vol. 104, Nº 3, pág. 712-716.

15 Sin embargo, las técnicas de análisis de la curva de fusión disponibles actualmente tienen limitaciones, especialmente con respecto al mantenimiento de la uniformidad entre muestras y entre análisis repetidos. Por lo tanto, hay necesidad de métodos y sistemas que mejoren la velocidad y exactitud del análisis de la curva de fusión de ácidos nucleicos.

Compendio de la invención

25 La presente tecnología se refiere a métodos y sistemas para el análisis de curvas de fusión de ácido nucleico, especialmente con respecto a moléculas de ácido nucleico de doble hebra. En algunas realizaciones de la presente tecnología, tales métodos y sistemas permiten el análisis de temperaturas de fusión con velocidad y exactitud mejoradas.

30 En algunas realizaciones de la tecnología presentada en la presente memoria, se proporcionan métodos para determinar la temperatura de fusión de una molécula de ácido nucleico de doble hebra que permiten una velocidad y exactitud mejoradas del análisis de la curva de fusión del ácido nucleico. Los métodos pueden incluir someter una disolución que comprende una molécula de ácido nucleico bicatenario a un gradiente de temperatura de onda cuadrada, comprendiendo el gradiente un intervalo de temperaturas que provoca al menos una transición de la molécula de ácido nucleico bicatenario a moléculas de ácido nucleico monocatenario; y detectar la al menos una transición durante el transcurso del gradiente de temperatura de onda cuadrada.

35 En algunas realizaciones, el gradiente de temperatura de onda cuadrada puede comprender una serie de pulsos de temperatura, comprendiendo cada pulso: aumentar la temperatura de la disolución a una primera temperatura alta; disminuir la temperatura de la disolución a una segunda temperatura baja; en donde la primera temperatura alta es mayor que la segunda temperatura baja; y en donde, en pulsos posteriores, se ajustan cada una de la primera temperatura alta y la segunda temperatura baja para que sean mayores que la primera y segunda temperaturas, respectivamente, en pulsos previos.

40 Se presenta también en la presente memoria un método para determinar la temperatura de fusión de una molécula de ácido nucleico de doble hebra, comprendiendo el método someter una disolución que comprende una pluralidad de moléculas de ácido nucleico monocatenario a un gradiente de temperatura de onda cuadrada, comprendiendo el gradiente un intervalo de temperaturas que provoca al menos una transición de las moléculas de ácido nucleico monocatenario a moléculas de ácido nucleico bicatenario; y detectar la al menos una transición durante el transcurso del gradiente de temperatura de onda cuadrada.

45 En algunas realizaciones, el gradiente de temperatura de onda cuadrada puede comprender una serie de pulsos de temperatura, comprendiendo cada pulso: aumentar la temperatura de la disolución a una primera temperatura alta; disminuir la temperatura de la disolución a una segunda temperatura baja, en donde la primera temperatura alta es mayor que la segunda temperatura baja; y en donde, en pulsos posteriores, se ajustan cada una de la primera temperatura alta y la segunda temperatura baja para que sean menores que la primera y segunda temperaturas, respectivamente, en pulsos previos.

Se presenta también en la presente memoria un sistema para determinar la temperatura de fusión de una molécula de ácido nucleico de doble hebra, comprendiendo el sistema un aparato de ciclado térmico programable; un

detector; y un programa para el ciclado térmico de onda cuadrada, comprendiendo el programa instrucciones para: someter una disolución que comprende una molécula de ácido nucleico bicatenario a un gradiente de temperatura de onda cuadrada, comprendiendo el gradiente un intervalo de temperaturas que provoca al menos una transición de la molécula de ácido nucleico bicatenario a una molécula de ácido nucleico monocatenario; y detectar la al menos una transición durante el transcurso del gradiente de temperatura de onda cuadrada.

En algunas realizaciones del sistema anterior, el gradiente de temperatura de onda cuadrada comprende una serie de pulsos de temperatura, comprendiendo cada pulso, aumentar la temperatura de la disolución a una primera temperatura alta; disminuir la temperatura de la disolución a una segunda temperatura baja; en donde la primera temperatura alta es mayor que la segunda temperatura baja; y en donde, en pulsos posteriores, se ajustan cada una de la primera temperatura alta y la segunda temperatura baja para que sean mayores que la primera y segunda temperaturas, respectivamente, en pulsos previos.

Se presenta también en la presente memoria un método para determinar la temperatura de fusión de una molécula de ácido nucleico bicatenario, comprendiendo el método: proporcionar una muestra que comprende moléculas de ácido nucleico bicatenario y un resto indicador que tiene una señal detectable del distintivo en presencia de ácido nucleico de doble hebra; someter la muestra a una serie de pulsos de temperatura, en donde al menos una pluralidad de los pulsos provocan que las moléculas de ácido nucleico bicatenario experimenten una transición hacia moléculas monocatenarias y de vuelta a moléculas bicatenarias; y detectar, usando la señal producida por el resto indicador, la temperatura de fusión de la molécula de ácido nucleico bicatenario.

En algunas realizaciones, cada uno de los pulsos de temperatura comprende: aumentar la temperatura de la disolución a una primera temperatura alta; disminuir la temperatura de la disolución a una segunda temperatura baja; en donde la primera temperatura alta es mayor que la segunda temperatura baja; y en donde, en pulsos posteriores, se ajustan cada una de la primera temperatura alta y la segunda temperatura baja para que sean mayores que la primera y segunda temperaturas, respectivamente, en pulsos previos.

Se proporciona también en la presente memoria un método para determinar información cinética sobre una transición de bicatenario a monocatenario para ácidos nucleicos, comprendiendo el método: proporcionar una muestra que comprende moléculas de ácido nucleico bicatenario y un resto indicador que tiene una señal detectable del distintivo en presencia de ácido nucleico de doble hebra; someter la muestra a una serie de pulsos de temperatura, en donde los pulsos provocan que las moléculas de ácido nucleico bicatenario experimenten una transición hacia moléculas monocatenarias y de vuelta a moléculas bicatenarias; y detectar, usando la señal producida por el resto indicador, la velocidad de transición entre los estados monocatenario y bicatenario, con lo que la velocidad de transición entre los estados proporciona información cinética sobre la transición.

Se presenta también en la presente memoria un método para determinar la temperatura de fusión de una molécula de ácido nucleico de doble hebra, comprendiendo el método: someter una disolución que comprende moléculas de ácido nucleico monocatenario a un gradiente de temperatura de onda cuadrada, comprendiendo el gradiente un intervalo de temperaturas que provoca al menos una transición de las moléculas de ácido nucleico monocatenario a moléculas de ácido nucleico bicatenario; y detectar la al menos una transición durante el transcurso del gradiente de temperatura de onda cuadrada.

En algunas realizaciones, el gradiente de temperatura de onda cuadrada puede comprender una serie de pulsos de temperatura, comprendiendo cada pulso: aumentar la temperatura de la disolución a una primera temperatura alta; disminuir la temperatura de la disolución a una segunda temperatura baja; en donde la primera temperatura alta es mayor que la segunda temperatura baja; y en donde, en pulsos posteriores, se ajustan cada una de la primera temperatura alta y la segunda temperatura baja para que sean menores que la primera y segunda temperaturas, respectivamente, en pulsos previos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra un ejemplo de un perfil de temperatura de onda cuadrada. Se muestra la temperatura en el eje Y y se muestra el tiempo en el eje X. Las estrellas indican los tiempos durante el perfil donde se realiza la detección de una señal.

La Figura 2 es un gráfico que muestra un ejemplo de un perfil de temperatura de onda cuadrada, mostrándose la temperatura en el eje Y y mostrándose el tiempo en el eje X.

La Figura 3 es un gráfico que muestra un análisis tradicional de la curva de fusión. Se muestra una señal fluorescente en el eje Y, indicativa de ácido nucleico bicatenario. Se muestra la temperatura en el eje X.

Descripción detallada de la realización preferida

Se proporcionan en la presente memoria métodos y sistemas para resolver estructuras de ácido nucleico basados en la temperatura de disociación entre formas mono y bicatenarias, conocido también como curva de fusión. Los métodos y sistemas hacen uso de un perfil térmico de onda cuadrada con etapas e implican la medición de fluorescencia en los puntos alto y bajo en cada etapa.

El análisis tradicional de la curva de fusión implica el muestreo óptico frecuente de un volumen de disolución que contiene un agente indicador que cambia su propiedad indicadora, por ejemplo intensidad, a medida que el ADN bicatenario se disocia como respuesta a un aumento en la temperatura. Sin embargo, los métodos de fusión de alta precisión están limitados en su capacidad de indicar de forma exacta y reproducible una temperatura de fusión debido a varias cuestiones. Por ejemplo, en el análisis convencional de la curva de fusión, es difícil obtener uniformidad de control térmico, y la exactitud de una disolución a otra es difícil de reproducir. Además, la fusión no es un fenómeno nítido, y la transición entre las formas bicatenaria y monocatenaria tiene una cierta amplitud porque la transición incluye una mezcla de aspectos termodinámicos y cinéticos. Asimismo, los métodos de fusión tradicionales normalmente dependen de la derivada de la fluorescencia frente al trazado de la temperatura para deconvolucionar distintivos de fusión superpuestos. Sin embargo, la resolución de los picos de la derivada a menudo está limitada por el ruido en las lecturas de fluorescencia.

Para conseguir una buena resolución de estructuras de ácido nucleico que tienen temperaturas de fusión similares, normalmente se recogen las curvas de fusión tradicionales con un control muy lento y preciso de la unidad de ciclado térmico. El perfil térmico usado en el análisis tradicional es lineal, con pendientes extremadamente superficiales, comparadas con las pendientes usadas en una reacción de amplificación. Sin embargo, en muchos casos, es difícil controlar de forma precisa la pendiente y esto se manifiesta como una variación del resultado de la temperatura de fusión debido a la incertidumbre de la temperatura aplicada. Como resultado, el tiempo de medición es largo para permitir una lenta transición en las mediciones de temperatura y ópticas que se toman frecuentemente en el dominio de la temperatura para superar los límites de ruido del sistema óptico.

Adicionalmente, los escáneres ópticos para algunos dispositivos no son muy adecuados para el análisis tradicional de la curva de fusión debido a que la frecuencia de las lecturas requeridas a menudo es mayor que la capacidad del escáner de leer todas las muestras. Como tal, las alternativas con los dispositivos de escaneo tradicionales incluyen cualquiera de: 1) ralentizar la velocidad de rampa térmica para el cabezal de escaneo óptico (sin embargo, esto aumenta el tiempo de ejecución y pone más limitaciones sobre el sistema de control térmico); o 2) realizar curvas de fusión sobre una muestra cada vez (aumentando también la longitud global del tiempo de ejecución).

En vista de las limitaciones anteriores del análisis tradicional de la curva de fusión, se ha descubierto sorprendentemente que el análisis de la curva de fusión puede realizarse en un formato análogo a la voltametría de escaneo. Específicamente, los problemas encontrados para resolver la electroquímica de disoluciones mixtas usando voltametría de escaneo son análogos, en ciertos aspectos, a los problemas encontrados en el análisis tradicional de la curva de fusión. La analogía para el perfil térmico es el escaneo de la tensión aplicada a un electrodo. Una resolución de mezclas en electroquímica es usar perfiles de onda cuadrada superpuestos sobre una rampa lineal.

Por consiguiente, se presenta en la presente memoria el sorprendente descubrimiento de un nuevo formato para el análisis de la curva de fusión que permite una determinación rápida de la temperatura de fusión de una molécula de ácido nucleico de doble hebra o una mezcla de diferentes moléculas de ácido nucleico de doble hebra. En ciertas realizaciones, el método comprende: someter una disolución que comprende una molécula de ácido nucleico bicatenario a un gradiente de temperatura de onda cuadrada, comprendiendo el gradiente un intervalo de temperaturas que provoca al menos una transición de la molécula de ácido nucleico bicatenario a moléculas de ácido nucleico monocatenario; y detectar la al menos una transición durante el transcurso del gradiente de temperatura de onda cuadrada.

Como se usa en la presente memoria, el término onda cuadrada se refiere a un patrón oscilante generalmente definido por un perfil escalonado. En el contexto de los perfiles térmicos, un patrón de onda cuadrada alterna entre temperaturas altas y temperaturas bajas, con transiciones instantáneas o casi instantáneas. Sin embargo, una onda cuadrada ideal típicamente no se consigue en la práctica debido a las limitaciones físicas del sistema que genera la forma de onda. Los tiempos que tarda la señal en subir desde el nivel bajo hasta el nivel alto y de vuelta de nuevo a menudo se denominan como tiempo de subida y tiempo de bajada, respectivamente. Dependiendo del sistema de ciclado térmico en uso, el tiempo de subida y el tiempo de bajada variarán de casi instantáneo a algún tiempo finito. Como tal, se apreciará que las transiciones entre los niveles alto y bajo, y entre los niveles bajos y los niveles altos, pueden no dar como resultado un perfil térmico que tenga transiciones verticales. Por lo tanto, el término onda cuadrada puede incluir patrones donde la pendiente de las transiciones de temperatura tiene parte de la pendiente positiva o negativa cuando se representa como una función de la temperatura con el tiempo.

Además, los perfiles de onda cuadrada presentados en la presente memoria pueden incluir un tiempo de mantenimiento a cada una de las temperaturas alta y baja. La duración del tiempo de mantenimiento puede variar según sea necesario para permitir la detección de transiciones entre ácido nucleico bicatenario y monocatenario. Por lo tanto, en realizaciones donde la detección es instantánea, el tiempo de mantenimiento puede ser de cero o casi cero. En otras realizaciones, la detección puede implicar un cierto tiempo finito y, por lo tanto, puede mantenerse la temperatura alta o baja todo el tiempo que sea necesario para detectar si los ácidos nucleicos están en forma monocatenaria o bicatenaria. En algunas realizaciones, el tiempo de mantenimiento puede ajustarse según sea necesario para permitir que las moléculas de ácido nucleico alcancen el equilibrio. En algunas realizaciones, el tiempo de mantenimiento puede ser de aproximadamente 0 segundos, menor que aproximadamente 1 nanosegundo, menor que aproximadamente 10 nanosegundos, menor que aproximadamente 100 nanosegundos,

menor que aproximadamente 1 microsegundo, menor que aproximadamente 10 microsegundos, menor que aproximadamente 100 microsegundos, menor que aproximadamente 1 milisegundo, menor que aproximadamente 10 milisegundos, menor que aproximadamente 100 milisegundos, menor que aproximadamente 1 segundo, menor que aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 segundos, o 10 segundos o mayor.

5 Los perfiles de temperatura de onda cuadrada presentados en la presente memoria típicamente se superponen sobre un gradiente de temperatura. Como se usa en la presente memoria, un gradiente de temperatura se refiere a un cambio en la temperatura con el tiempo. En el análisis tradicional de la curva de fusión, los gradientes de temperatura son lineales y tienen una pendiente superficial para controlar estrictamente la temperatura. En los perfiles de temperatura presentados en la presente memoria, los gradientes de temperatura pueden tener cualquiera de una pendiente global positiva o global negativa. Por lo tanto, cuando se superpone un patrón de onda cuadrada sobre un gradiente de temperatura de pendiente positiva o un gradiente de temperatura de pendiente negativa, el patrón resultante se parece a una escalera ascendente o descendente, como se muestra en las Figuras 1 y 2.

15 Por consiguiente, en ciertas realizaciones, el gradiente de temperatura de onda cuadrada comprende una serie de pulsos de temperatura, comprendiendo cada pulso: aumentar la temperatura de la disolución a una primera temperatura alta; disminuir la temperatura de la disolución a una segunda temperatura baja; en donde la primera temperatura alta es mayor que la segunda temperatura baja. En las realizaciones donde el perfil de temperatura tiene una pendiente global positiva, en pulsos posteriores, se ajusta típicamente cada una de la primera temperatura alta y la segunda temperatura baja para que sean mayores que la primera y segunda temperaturas, respectivamente, en pulsos previos. En las realizaciones donde el perfil de temperatura tiene una pendiente global negativa, en pulsos posteriores, se ajusta típicamente cada una de la primera temperatura alta y la segunda temperatura baja para que sean menores que la primera y segunda temperaturas, respectivamente, en pulsos previos. Se apreciará que en algunas realizaciones, las temperaturas alta y baja pueden permanecer iguales entre uno o más pulsos y aún dar como resultado un perfil de temperatura con una pendiente global positiva o negativa. Análogamente, en algunas realizaciones, las temperaturas alta y baja en uno o más pulsos pueden ser menores que los pulsos previos y aún dar como resultado un perfil de temperatura con una pendiente global positiva. Análogamente, en algunas realizaciones, las temperaturas alta y baja en uno o más pulsos pueden ser mayores que los pulsos previos y aún dar como resultado un perfil de temperatura con una pendiente global negativa.

25 En ciertas realizaciones, al menos uno de los pulsos de temperatura puede comprender un intervalo de temperaturas en donde ocurre una transición detectable entre moléculas de ácido nucleico bicatenario y moléculas de ácido nucleico monocatenario. Por ejemplo, un perfil con una pendiente global positiva típicamente comienza con pulsos que comprenden una temperatura alta y una baja, cada una de las cuales está por debajo del punto de fusión de un ácido nucleico de doble hebra. Análogamente, un perfil con una pendiente global negativa típicamente comienza con pulsos que comprenden una temperatura alta y una baja, cada una de las cuales están por encima del punto de fusión de un ácido nucleico de doble hebra. En tales realizaciones, uno o más pulsos posteriores pasan a través de la temperatura de fusión del ácido nucleico de doble hebra y la transición de ácido nucleico bicatenario a monocatenario, o se detecta la transición de ácido nucleico monocatenario a bicatenario.

30 Como se usa en la presente memoria, una transición detectable se refiere a un cambio en una señal que es indicativa de la presencia o ausencia de ácido nucleico de doble hebra. Para identificar transiciones detectables, los presentes métodos emplean detección de la señal en uno o más puntos en los pulsos de temperatura. En ciertas realizaciones, la detección ocurre durante cada uno de los pulsos de temperatura. Se apreciará que en realizaciones alternativas, no es necesario que ocurra detección en cada pulso de temperatura. Por ejemplo, en sistemas de detección donde un único detector no está configurado para la detección simultánea de múltiples muestras, el detector podría detectar la señal durante un primer pulso para una primera muestra, y después detectar una señal durante un segundo pulso para una segunda muestra.

35 Para identificar una o más transiciones detectables, la detección tiene lugar en múltiples puntos durante el perfil de temperatura. En ciertas realizaciones, la detección se programa para que tenga lugar en puntos discretos en un pulso. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la detección ocurre a la temperatura alta y la temperatura baja en cada uno de los pulsos de temperatura. En algunas realizaciones, la detección puede tener lugar a lo largo del perfil de temperatura, y es continua o casi continua.

40 Los métodos y sistemas proporcionados en la presente memoria pueden comprender, además, la identificación de un pulso de temperatura que tiene una transición detectable máxima de moléculas de ácido nucleico bicatenario a ácido nucleico monocatenario. A modo de analogía con las curvas de fusión tradicionales, la temperatura de fusión se identifica típicamente tomando una derivada de la señal frente a la curva de temperatura. La derivada sirve para identificar uno o más puntos de inflexión que son indicativos de la temperatura de fusión de una especie particular de ácido nucleico en la muestra. La temperatura de fusión de una especie de ácido nucleico comúnmente se denomina temperatura de disociación, donde 50% de la especie está en forma de doble hebra y 50% está en forma monocatenaria. La energía requerida para romper el enlace de hidrógeno base-base entre dos hebras de ácido nucleico y, por lo tanto, la temperatura de fusión, depende de su longitud, contenido de GC y su complementariedad. Otros factores que pueden afectar a la temperatura de fusión incluyen la concentración de sal de una disolución (Véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2d Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)), el pH de la disolución, y la presencia de detergentes, contraiones, disolventes y otros factores

conocidos por los expertos en la materia. En los métodos presentados en la presente memoria, la identificación de un pulso de temperatura que tiene una transición detectable máxima sirve para determinar la temperatura de fusión sin tener que realizar el análisis de derivada adicional que se requiere típicamente para las curvas de fusión tradicionales. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, identificar la transición detectable máxima comprende calcular la diferencia en una señal detectable medida a la temperatura alta y a la temperatura baja dentro de un único pulso de temperatura. Las diferencias en la señal detectable para cada uno de los pulsos se comparan después para identificar el pulso con la diferencia más grande en la señal entre la temperatura alta y la temperatura baja.

Las moléculas de ácido nucleico en una disolución particular pueden ser totalmente homogéneas, donde cada especie de ácido nucleico bicatenario tiene la misma secuencia principal y secuencia complementaria y, por lo tanto, la misma temperatura de fusión. En otras realizaciones, la disolución puede ser heterogénea, comprendiendo una pluralidad de especies de ácido nucleico, donde dos o más especies bicatenarias en la disolución tienen cada una una secuencia principal y una secuencia complementaria diferentes, comparadas con la secuencia principal y la secuencia complementaria de otras especies bicatenarias. Por lo tanto, pueden distinguirse incluso especies de ácido nucleico con únicamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o únicamente 20 o más diferencias en los pares de bases, basándose en la temperatura de fusión única de cada especie.

La especie de ácido nucleico en los métodos y sistemas presentados en la presente memoria puede ser cualquier especie de ácido nucleico que tenga una temperatura de fusión detectable. El término ácido nucleico u oligonucleótido o equivalentes gramaticales en la presente memoria significa al menos dos nucleótidos unidos covalentemente entre sí. Un ácido nucleico de la presente invención generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, como se detalla a continuación, se incluyen análogos de ácido nucleico que pueden tener estructuras básicas alternas, que comprenden, por ejemplo, fosforamida (Beaucage et al., *Tetrahedron* 49(10): 1925 (1993) y referencias en el mismo; Letsinger, *J. Org. Chem.* 35:3800 (1970); Sprinzl et al, *Eur. J. Biochem.* 81:579 (1977); Letsinger et al., *Nucl. Acids Res.* 14:3487 (1986); Sawai et al, *Chem. Lett.* 805 (1984), Letsinger et al., *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470 (1988); y Pauwels et al., *Chemica Scripta* 26:141 91986)), fosforotioato (Mag et al., *Nucleic Acids Res.* 19:1437 (1991); y Pat. U.S. N° 5.644.048), fosforoditioato (Briu et al., *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321 (1989), uniones O-metilfosforoamidita (véase Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press), y estructuras básicas y uniones de ácido péptidonucleico (véase Egholm, *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895 (1992); Meier et al., *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008 (1992); Nielsen, *Nature*, 365:566 (1993); Carlsson et al., *Nature* 380:207 (1996)). Otros análogos de ácidos nucleicos incluyen aquellos con estructuras básicas cargadas positivamente (Denpcy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6097 (1995); estructuras básicas no iónicas (Pat. U.S. Nos. 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; Kiedrowshi et al., *Angew. Chem. Inti. Ed. English* 30:423 (1991); Letsinger et al., *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470 (1988); Letsinger et al., *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597 (1994); Capítulos 2 y 3, *ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research"*, Ed. Y. S. Sanghui y P. Dan Cook; Mesmaecker et al., *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4:395 (1994); Jeffs et al., *J. Biomolecular RMN* 34:17 (1994); *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996)) y estructuras básicas distintas de ribosa, incluyendo aquellas descritas en las Pat. U.S. Nos. 5.235.033 y 5.034.506, y Capítulos 6 y 7, *ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research"*, Ed. Y. S. Sanghui y P. Dan Cook. Se incluyen también ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos dentro de la definición de ácidos nucleicos (véase Jenkins et al., *Chem. Soc. Rev.* (1995) pág. 69-176). Se describen varios análogos de ácido nucleico en Rawls, *C & E News Jun. 2, 1997 pág. 35*. Pueden hacerse modificaciones de la estructura básica ribosa-fosfato para facilitar la adición de etiquetas, o para aumentar la estabilidad y semi-vida de tales moléculas en entornos fisiológicos, por ejemplo. El término nucleósido incluye nucleótidos así como análogos de nucleósido y nucleótido, y nucleósidos modificados tales como nucleósidos modificados con amino. Además, el nucleósido incluye estructuras análogas que no se dan de forma natural. De esta manera, por ejemplo, las unidades individuales de un ácido péptidonucleico, cada una de las cuales contiene una base, se denominan en la presente memoria como nucleósido.

Por consiguiente, la especie de ácido nucleico puede ser de cualquier forma o análogo de ADN, ARN, así como variantes artificiales y sintéticas de los mismos. La especie de ácido nucleico puede comprender cualquier combinación de análogos de nucleótido de origen natural y no natural. La especie de ácido nucleico puede comprender uno o más nucleótidos donde el azúcar pentosa o la base nucleótido o uno o más de los ésteres de fosfato del nucleótido se han reemplazado con su análogo respectivo. En ciertas realizaciones, los análogos de éster de fosfato ejemplares incluyen, pero sin que ello pretenda ser limitante, alquilfosfonatos, metilfosfonatos, fosforamidatos, fosfotriésteres, fosforotioatos, fosforoditioatos, fosforoselenoatos, fosforodiselenoatos, fosforoanilitioatos, fosforoanilidatos, fosforoamidatos, boronofosfonatos, etc., y pueden incluir contraiones asociados. Se apreciará que la modificación indicada anteriormente, o cualquier otra, a la especie de ácido nucleico, puede afectar a la Tf de la especie comparado con su homólogo no modificado.

Las moléculas de ácido nucleico pueden comprender, pero sin que ello pretenda ser limitante, ADN genómico, ADNc, ARNhn, ARNm, ARNr, ARNt, moléculas pequeñas de ARN, incluyendo, sin que ello pretenda ser limitante, ARNm i y precursores de ARNm i, ARNsi, ARNst, ARNsno, otros ARN no codificantes (ARNnc), ácido nucleico fragmentado, ácido nucleico obtenido a partir del núcleo, el citoplasma, orgánulos subcelulares tales como mitocondrias o cloroplastos, y ácido nucleico obtenido a partir de microorganismos o virus de ADN o ARN que pueden estar presentes sobre o en una muestra biológica. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser, por ejemplo, lineales, circulares, en forma de horquilla o cualquier otra configuración que permita que al menos una parte de la

molécula de ácido nucleico forme interacciones bicatenarias con otra molécula, o consigo misma.

Las moléculas de ácido nucleico pueden comprender una o más bases universales. El término base universal pretende hacer referencia a análogos de nucleótido que forman menos enlaces de hidrógeno con nucleótidos de origen natural, es decir, adenosina, guanina, timina y citosina, que entre nucleótidos de origen natural. Las bases universales pueden ser análogos de base hidrófoba que carecen de grupos de enlace de hidrógeno, y aunque pueden empaquetarse eficientemente en ADN de doble hebra, pueden mostrar poca selectividad en el emparejamiento con bases natural. Millican, T.A., *et al.* (1984) *Nuc. Acids Res.* 12, 7435-7453; Schweitzer, B.A., *et al.* (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117:1863-1872; Matray, T.J., *et al.* (1999) *Nature* 399: 704-708; Ogawa, A.K., *et al.* (2000) *J. Am. Chem. Soc.* 122:3274-3287. Se han descrito análogos de nucleobase que pueden hibridarse de forma no selectiva a cada una de las bases nativas. Van Aerschot, A., *et al.* (1995) *Nucl. Acids Res.* 23: 4363-4370; Zhang, P., *et al.* (1998) *Nucl. Acids Res.* 26: 2208-2215; Seela, F. *et al.* (1999), *Nucleosides Nucleotides* 18:425- 441; Bergstrom, D.E., *et al.* (1997) *Nucl. Acids Res.* 25: 1935-1942; Asomova, O., *et al.* (1997) *Nucl. Acids Res.* 25: 1930-1934; Bergstrom, D.E., *et al.*, (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117: 1201- 1209; Loakes, D. *et al.* (1995) *Nucl. Acids Res.* 23: 2361-2366; Loakes, D. *et al.* (1995) *Nucl. Acids Res.* 22: 4039-4043; Nichols, R., *et al.*, (1994) *Nature* 369: 492-493. Como apreciarán los expertos en la materia, todos los análogos de ácido nucleico conocidos pueden encontrar uso en la presente invención. Algunos ejemplos no limitantes de bases universales útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria incluyen: desoxiinosina, desoxirribonucleótidos de 3-nitropirrol (1,2), o 4-,5-, o 6-nitro-indol, 1-(2'-desoxi-β-D ribofuranosil)-4-nitropirazol, y 1-(2'-desoxi-β-D ribofuranosil)-4-nitroimidazol.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos son ácidos péptidonucleicos (APN) que incluyen análogos de ácido péptidonucleico. Estas estructuras básicas son sustancialmente no iónicas en condiciones neutras, en contraste con la estructura básica altamente cargada del fosfodiéster de origen natural en ácidos nucleicos. Esto da como resultado dos ventajas. En primer lugar la estructura básica del APN presenta una cinética de hibridación mejorada. Los APN tienen mayores cambios en la temperatura de fusión (T_f) para pares de bases no coincidentes frente a pares perfectamente coincidentes. El ADN y el ARN típicamente presentan una caída de 2-4°C en la T_f para una falta de coincidencia interna. Con la estructura básica de APN no iónico, la caída es cercana a 7-9°C, permitiendo por lo tanto una mejor detección de las faltas de coincidencia. Análogamente, debido a su naturaleza no iónica, la hibridación de las bases fijadas a estas estructuras básicas es relativamente insensible a la concentración de sal.

La desoxiinosina ("di") es un ejemplo preferido de una base universal. La inosina es capaz de formar dos enlaces de hidrógeno con cualquiera de A, C, T o G (Véase, Barker, R., *Organic Chemistry of Biological Molecules*, Prentice-Hall, N.J. (1971); Véase también, Martin *et al.* (1985), *Nucl. Acids Res.* 13(24): 8927-8938). Otros ejemplos preferidos de bases universales incluyen 1-(2'-desoxi-β-D ribofuranosil)-3-nitropirrol, 1-(2'-desoxi-β-D ribofuranosil)-4-nitropirazol, 1-(2'-desoxi-β-D ribofuranosil)-4-nitroimidazol y 1-(2'-desoxi-β-D ribofuranosil)-4-nitroindol.

Las expresiones molécula de ácido nucleico bicatenario, ácido nucleico de doble hebra, y términos similares se refieren a un par de moléculas de ácido nucleico, o partes de una molécula, que existen en una matriz helicoidal, con enlaces de hidrógeno, típicamente asociada con el ADN. Las expresiones molécula de ácido nucleico bicatenario, ácido nucleico de doble hebra, y términos similares se refieren también a aquellas moléculas emparejadas que son esencialmente bicatenarias, lo que significa aquellas que contienen regiones cortas de falta de coincidencia, tales como un mono-, di- o tri-nucleótido, resultante del diseño o error bien en la síntesis química del sitio de cebado del oligonucleótido sobre la primera hebra de ácido nucleico o bien en la síntesis enzimática de la segunda hebra de ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico bicatenario puede existir como ADN o ARN bicatenario, un ARN/ADN heterohíbrido o un copolímero de ARN/ADN, en donde el término "copolímero" se refiere a una única hebra de ácido nucleico que comprende tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos. En realizaciones típicas, los ácidos nucleicos bicatenarios son aquellos que pueden detectarse usando cualquiera de un número de metodologías conocidas por los expertos en la materia para detectar moléculas de ácido nucleico bicatenario, tal como detección de fluorescencia a partir de tintes de intercalación. La expresión molécula de ácido nucleico monocatenario, se refiere a una molécula de ácido nucleico o una parte de la misma que no existe en forma bicatenaria.

La especie de ácido nucleico bicatenario típicamente comprenderá dos hebras que son complementarias o sustancialmente complementarias en una o más regiones. Como se usa en la presente memoria, los términos complementaria y sustancialmente complementaria se refieren a la hibridación o emparejamiento de bases entre nucleótidos o ácidos nucleicos, tal como, por ejemplo, entre las dos hebras de una molécula de ADN bicatenario o entre un cebador de oligonucleótido y un sitio de enlace del cebador en un ácido nucleico de una única hebra que se va a secuenciar o amplificar. Por consiguiente, secuencias sustancialmente complementarias pueden hacer referencia a secuencias que varían en su identidad porcentual de 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 85, 80, 75 o menos, o cualquier número entre ellos, comparado con la secuencia de referencia.

Los nucleótidos complementarios son, generalmente, A y T (o A y U), o C y G. Se dice que dos moléculas de ARN o ADN monocatenario son sustancialmente complementarias cuando los nucleótidos de una hebra, alineados óptimamente y comparados y con inserciones o deleciones apropiadas de nucleótido, se emparejan con al menos aproximadamente 80% de los nucleótidos de la otra hebra, normalmente al menos aproximadamente 90% a 95%, y más típicamente de aproximadamente 98 a 100%.

Ventajas

La presente tecnología proporciona múltiples sorprendentes ventajas sobre el análisis tradicional de la curva de fusión. En primer lugar, el ciclado térmico de onda cuadrada usa la intención de diseño de una unidad de ciclado térmico, en concreto la capacidad de cambiar la temperatura rápidamente, en lugar de intentar controlar la unidad de ciclado térmico de una manera que va contra la intención de diseño. El escaneado se realiza rápidamente usando rampas térmicas rápidas en lugar de gradientes térmicos lentos.

En segundo lugar, el método de onda cuadrada es inherentemente un método de derivada, de modo que no es necesario un tratamiento adicional de los datos para determinar la temperatura de fusión. La forma de onda permite una mayor resolución de transiciones superpuestas, suponiendo que se identifica una forma de onda optimizada, con un pequeño número de mediciones totales.

En tercer lugar, un perfil térmico de una función de paso es más sensible porque el indicador tiene la oportunidad de pasar de un estado a otro (es decir, fundido frente a hibridado) muchas veces durante el transcurso de un escaneo.

En cuarto lugar, el método es una técnica sustractiva, de modo que los niveles de fondo provocan significativamente menos interferencia con la señal analítica.

El perfil térmico de onda cuadrada proporciona información cinética porque el indicador pasa de un estado a otro repetidamente. Si la cinética fuera limitativa para una dirección, entonces la forma de la respuesta se desplazaría.

Los métodos presentados en la presente memoria tienen la ventaja adicional de realizarse fácilmente en cualquier unidad de termociclador con la programación apropiada.

Se apreciará que la onda cuadrada puede escalonarse de la temperatura baja a la alta o viceversa. La altura del pulso de cada pulso de onda cuadrada puede ajustarse para cubrir diferentes amplitudes de temperatura. Algunas realizaciones típicas pueden usar una altura de onda cuadrada que es igual a la mitad de la anchura de la transición medida usando curvas de fusión tradicionales. El número de pulsos medidos a una temperatura promedio dada puede variarse para disminuir el ruido y aumentar la precisión, a expensas del tiempo de medición global.

Los métodos presentados en la presente memoria tienen alguna analogía con la voltimetría de onda cuadrada que se aplica a sistemas electroquímicos. En electroquímica, se escalona la tensión en lugar de la temperatura.

La Figura 1 expone una realización del perfil térmico de onda cuadrada. Como se muestra en la Figura 1, un perfil de escalera de onda cuadrada incluye una onda cuadrada superpuesta sobre una rampa lineal. La rampa global es un gradiente de temperatura descendente con respecto al tiempo. El perfil comprende múltiples pulsos durante el transcurso de la rampa. A cada pulso, la disolución se somete a un intervalo amplio de temperatura, y se detecta una señal en dos puntos.

La Figura 2 representa otra rampa de perfil térmico con un aumento global de la temperatura con el tiempo. Como se indica en la Figura 2, el perfil de temperatura pasa a través de una serie de pulsos. Cada pulso incluye un salto de transición. Como se usa en la presente memoria, un salto de transición es un aumento en la temperatura a una temperatura alta (T_A), desde una temperatura baja (T_B). En la realización mostrada en la Figura 2, con cada pulso posterior, aumenta la T_B , de modo que la T_B en cada pulso posterior es mayor que la T_B en el pulso previo. Análogamente, se aumenta la T_A , de modo que la T_A en cada pulso posterior es mayor que la T_A en el pulso previo. Dentro de cada pulso, se define la temperatura promedio T_i como la mitad de la suma de T_B y T_A .

En algunas realizaciones, se detecta el ácido nucleico de doble hebra mediante un resto indicador que tiene una señal detectable del distintivo en presencia de ácido nucleico de doble hebra. En el perfil térmico ejemplificado en la Figura 2, se detecta el ácido nucleico de doble hebra mediante un resto indicador que tiene una señal fluorescente en presencia de ácido nucleico de doble hebra. Se toman lecturas de fluorescencia a T_B y T_A dentro de cada pulso, produciendo una lectura de temperatura baja (FL_B) y una lectura de temperatura alta (FL_A) para cada pulso. El cambio en la fluorescencia (ΔFL) para cada pulso es la diferencia entre FL_B y FL_A para ese pulso.

Etapas de temperatura entre pulsos

Como se usa en la presente memoria, puede describirse la etapa de temperatura para temperaturas bajas en cada pulso (ΔT_{etapaB}) como la diferencia entre la T_B en un pulso y la T_B en el pulso previo. Análogamente, puede describirse la etapa de temperatura para temperaturas altas en cada pulso (ΔT_{etapaA}) como la diferencia entre la T_A en un pulso y la T_A en el pulso previo. Se apreciará que ΔT_{etapaB} o ΔT_{etapaA} puede ser cualquier cambio en la temperatura que dé como resultado una pendiente global positiva o una pendiente global negativa en la temperatura con el tiempo. Por lo tanto, una serie de pulsos con un ΔT_{etapaB} y/o ΔT_{etapaA} positiva generaría una pendiente global positiva. Análogamente, una serie de pulsos con una ΔT_{etapaB} y/o ΔT_{etapaA} negativa generaría una pendiente global negativa.

Como se usa en la presente memoria, una pendiente global positiva se refiere a un perfil donde la ΔT_{etapaB} y/o ΔT_{etapaA} promedio es positiva. Típicamente, un perfil con una pendiente global positiva comienza con temperaturas

T_B y T_A que están por debajo del punto de fusión del ADN de doble hebra. Típicamente, un perfil con una pendiente global positiva termina con temperaturas T_B y T_A que están por encima del punto de fusión del ADN de doble hebra.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la pendiente global es positiva. En algunas de estas realizaciones, cada ΔT_{etapa} será positiva para todo el perfil. Por ejemplo, en realizaciones típicas, cada T_B posterior será mayor que cada uno de los valores de T_B precedentes. Se apreciará, sin embargo, que en ciertas realizaciones donde el perfil térmico tiene una pendiente positiva, uno o más valores T_B pueden ser menores que un valor de T_B precedente y aún dar como resultado un perfil con una pendiente de temperatura global positiva con el tiempo. Análogamente, en algunas realizaciones con una pendiente global positiva, cada valor de T_A posterior será mayor que cada uno de los valores de T_A precedentes. Se apreciará, sin embargo, que en ciertas realizaciones donde el perfil térmico tiene una pendiente positiva, uno o más valores de T_A pueden ser menores que un valor de T_A precedente y aún dar como resultado un perfil con una pendiente de temperatura global positiva con el tiempo.

Como se usa en la presente memoria, una pendiente global negativa se refiere a un perfil donde la ΔT_{etapaB} y/o ΔT_{etapaA} promedio es negativa. Típicamente, un perfil con una pendiente global negativa comienza con temperaturas T_B y T_A que están por encima del punto de fusión del ADN de doble hebra. Típicamente, un perfil con una pendiente global negativa termina con temperaturas T_B y T_A que están por debajo del punto de fusión del ADN de doble hebra.

Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la pendiente global es negativa. En algunas de estas realizaciones, cada ΔT_{etapa} será negativa para todo el perfil. Por ejemplo, en una realización típica, cada T_B posterior será menor que cada uno de los valores de T_B precedentes. Se apreciará, sin embargo, que en ciertas realizaciones donde el perfil térmico tiene una pendiente negativa, uno o más valores de T_B pueden ser mayores que un valor de T_B precedente y aún dar como resultado un perfil con una pendiente de temperatura global negativa con el tiempo. Análogamente, en un perfil térmico típico con una pendiente global negativa, cada valor de T_A posterior será menor que cada uno de los valores de T_A precedentes. Se apreciará, sin embargo, que en ciertas realizaciones donde el perfil térmico tiene una pendiente negativa, uno o más valores de T_A pueden ser mayores que un valor de T_A precedente y aún dar como resultado un perfil con una pendiente de temperatura global positiva con el tiempo.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, el valor absoluto de ΔT_{etapaB} puede ser, por ejemplo, menor que aproximadamente $0,001^\circ\text{C}$, o aproximadamente $0,001^\circ\text{C}$, $0,01^\circ\text{C}$, $0,1^\circ\text{C}$, $0,2^\circ\text{C}$, $0,3^\circ\text{C}$, $0,4^\circ\text{C}$, $0,5^\circ\text{C}$, $0,6^\circ\text{C}$, $0,7^\circ\text{C}$, $0,8^\circ\text{C}$, $0,9^\circ\text{C}$, $1,0^\circ\text{C}$, $1,1^\circ\text{C}$, $1,2^\circ\text{C}$, $1,3^\circ\text{C}$, $1,4^\circ\text{C}$, $1,5^\circ\text{C}$, $1,6^\circ\text{C}$, $1,7^\circ\text{C}$, $1,8^\circ\text{C}$, $1,9^\circ\text{C}$, $2,0^\circ\text{C}$, $2,1^\circ\text{C}$, $2,2^\circ\text{C}$, $2,3^\circ\text{C}$, $2,4^\circ\text{C}$, $2,5^\circ\text{C}$, $2,6^\circ\text{C}$, $2,7^\circ\text{C}$, $2,8^\circ\text{C}$, $2,9^\circ\text{C}$, $3,0^\circ\text{C}$, $3,1^\circ\text{C}$, $3,2^\circ\text{C}$, $3,3^\circ\text{C}$, $3,4^\circ\text{C}$, $3,5^\circ\text{C}$, $3,6^\circ\text{C}$, $3,7^\circ\text{C}$, $3,8^\circ\text{C}$, $3,9^\circ\text{C}$, $4,0^\circ\text{C}$, $4,1^\circ\text{C}$, $4,2^\circ\text{C}$, $4,3^\circ\text{C}$, $4,4^\circ\text{C}$, $4,5^\circ\text{C}$, $4,6^\circ\text{C}$, $4,7^\circ\text{C}$, $4,8^\circ\text{C}$, $4,9^\circ\text{C}$, $5,0^\circ\text{C}$, $5,1^\circ\text{C}$, $5,2^\circ\text{C}$, $5,3^\circ\text{C}$, $5,4^\circ\text{C}$, $5,5^\circ\text{C}$, $5,6^\circ\text{C}$, $5,7^\circ\text{C}$, $5,8^\circ\text{C}$, $5,9^\circ\text{C}$, 6°C , 7°C , 8°C , 9°C , 10°C , 11°C , 12°C , 13°C , 14°C , 15°C , 16°C , 17°C , 18°C , 19°C , aproximadamente 20°C , o mayor, así como cualquier valor de temperatura entre ellos. En realizaciones típicas, el valor absoluto de ΔT_{etapaB} varía entre aproximadamente $1,0^\circ\text{C}$ y aproximadamente $5,0^\circ\text{C}$. En algunas realizaciones, la ΔT_{etapaB} es la misma para cada pulso en el perfil. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 2, la ΔT_{etapaB} es la misma para cada pulso. Se apreciará que en otras realizaciones, la ΔT_{etapaB} puede ser diferente entre uno o más pulsos en el perfil.

Análogamente, en algunas realizaciones, el valor absoluto de ΔT_{etapaA} puede ser, por ejemplo, menor que aproximadamente $0,001^\circ\text{C}$, o aproximadamente $0,001^\circ\text{C}$, $0,01^\circ\text{C}$, $0,1^\circ\text{C}$, $0,2^\circ\text{C}$, $0,3^\circ\text{C}$, $0,4^\circ\text{C}$, $0,5^\circ\text{C}$, $0,6^\circ\text{C}$, $0,7^\circ\text{C}$, $0,8^\circ\text{C}$, $0,9^\circ\text{C}$, $1,0^\circ\text{C}$, $1,1^\circ\text{C}$, $1,2^\circ\text{C}$, $1,3^\circ\text{C}$, $1,4^\circ\text{C}$, $1,5^\circ\text{C}$, $1,6^\circ\text{C}$, $1,7^\circ\text{C}$, $1,8^\circ\text{C}$, $1,9^\circ\text{C}$, $2,0^\circ\text{C}$, $2,1^\circ\text{C}$, $2,2^\circ\text{C}$, $2,3^\circ\text{C}$, $2,4^\circ\text{C}$, $2,5^\circ\text{C}$, $2,6^\circ\text{C}$, $2,7^\circ\text{C}$, $2,8^\circ\text{C}$, $2,9^\circ\text{C}$, $3,0^\circ\text{C}$, $3,1^\circ\text{C}$, $3,2^\circ\text{C}$, $3,3^\circ\text{C}$, $3,4^\circ\text{C}$, $3,5^\circ\text{C}$, $3,6^\circ\text{C}$, $3,7^\circ\text{C}$, $3,8^\circ\text{C}$, $3,9^\circ\text{C}$, $4,0^\circ\text{C}$, $4,1^\circ\text{C}$, $4,2^\circ\text{C}$, $4,3^\circ\text{C}$, $4,4^\circ\text{C}$, $4,5^\circ\text{C}$, $4,6^\circ\text{C}$, $4,7^\circ\text{C}$, $4,8^\circ\text{C}$, $4,9^\circ\text{C}$, $5,0^\circ\text{C}$, $5,1^\circ\text{C}$, $5,2^\circ\text{C}$, $5,3^\circ\text{C}$, $5,4^\circ\text{C}$, $5,5^\circ\text{C}$, $5,6^\circ\text{C}$, $5,7^\circ\text{C}$, $5,8^\circ\text{C}$, $5,9^\circ\text{C}$, 6°C , 7°C , 8°C , 9°C , 10°C , 11°C , 12°C , 13°C , 14°C , 15°C , 16°C , 17°C , 18°C , 19°C , aproximadamente 20°C , o mayor, así como cualquier valor de temperatura entre ellos. En realizaciones típicas, el valor absoluto de ΔT_{etapaA} varía entre aproximadamente $1,0^\circ\text{C}$ y aproximadamente $5,0^\circ\text{C}$. En algunas realizaciones, la ΔT_{etapaA} es la misma para cada pulso en el perfil. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 2, la ΔT_{etapaA} es la misma para cada pulso. Se apreciará que en otras realizaciones, la ΔT_{etapaA} puede ser diferente entre uno o más pulsos en el perfil.

45 Transiciones de temperatura dentro de los pulsos

Como se usa en la presente memoria, la altura del salto de transición de temperatura (ΔT_{trans}) se refiere a la diferencia entre la temperatura alta T_A y la temperatura baja T_B dentro de un pulso. Se apreciará que ΔT_{trans} puede ser cualquier intervalo de temperatura adecuado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la ΔT_{trans} de un pulso puede ser, por ejemplo, menor que aproximadamente $0,001^\circ\text{C}$, o aproximadamente $0,001^\circ\text{C}$, $0,01^\circ\text{C}$, $0,1^\circ\text{C}$, $0,2^\circ\text{C}$, $0,3^\circ\text{C}$, $0,4^\circ\text{C}$, $0,5^\circ\text{C}$, $0,6^\circ\text{C}$, $0,7^\circ\text{C}$, $0,8^\circ\text{C}$, $0,9^\circ\text{C}$, $1,0^\circ\text{C}$, $1,1^\circ\text{C}$, $1,2^\circ\text{C}$, $1,3^\circ\text{C}$, $1,4^\circ\text{C}$, $1,5^\circ\text{C}$, $1,6^\circ\text{C}$, $1,7^\circ\text{C}$, $1,8^\circ\text{C}$, $1,9^\circ\text{C}$, $2,0^\circ\text{C}$, $2,1^\circ\text{C}$, $2,2^\circ\text{C}$, $2,3^\circ\text{C}$, $2,4^\circ\text{C}$, $2,5^\circ\text{C}$, $2,6^\circ\text{C}$, $2,7^\circ\text{C}$, $2,8^\circ\text{C}$, $2,9^\circ\text{C}$, $3,0^\circ\text{C}$, $3,1^\circ\text{C}$, $3,2^\circ\text{C}$, $3,3^\circ\text{C}$, $3,4^\circ\text{C}$, $3,5^\circ\text{C}$, $3,6^\circ\text{C}$, $3,7^\circ\text{C}$, $3,8^\circ\text{C}$, $3,9^\circ\text{C}$, $4,0^\circ\text{C}$, $4,1^\circ\text{C}$, $4,2^\circ\text{C}$, $4,3^\circ\text{C}$, $4,4^\circ\text{C}$, $4,5^\circ\text{C}$, $4,6^\circ\text{C}$, $4,7^\circ\text{C}$, $4,8^\circ\text{C}$, $4,9^\circ\text{C}$, $5,0^\circ\text{C}$, $5,1^\circ\text{C}$, $5,2^\circ\text{C}$, $5,3^\circ\text{C}$, $5,4^\circ\text{C}$, $5,5^\circ\text{C}$, $5,6^\circ\text{C}$, $5,7^\circ\text{C}$, $5,8^\circ\text{C}$, $5,9^\circ\text{C}$, 6°C , 7°C , 8°C , 9°C , 10°C , 11°C , 12°C , 13°C , 14°C , 15°C , 16°C , 17°C , 18°C , 19°C , aproximadamente 20°C , o mayor, así como cualquier valor de temperatura entre ellos. En realizaciones típicas, la ΔT_{trans} varía entre aproximadamente 5°C y aproximadamente 10°C . En algunas realizaciones, la ΔT_{trans} es la misma para cada pulso en el perfil. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 2, la ΔT_{trans} es la misma para cada pulso. Se apreciará que en otras realizaciones, la ΔT_{trans} puede ser diferente entre uno o más pulsos en el perfil.

Aunque la ΔT_{trans} puede ser cualquier intervalo de temperatura adecuado, una manera de determinar una ΔT_{trans} útil para un perfil térmico de onda cuadrada es medir el intervalo de temperatura correspondiente a la mitad de la

anchura del pulso en una curva de fusión tradicional. Específicamente, como se muestra en la Figura 3, una curva de fusión tradicional mide la fluorescencia de un tinte de intercalación sobre el intervalo de temperatura desde baja hasta alta. La curva de fusión tradicional típicamente puede segmentarse en tres intervalos de temperatura: 1) una región de menores temperaturas donde la fluorescencia es relativamente alta y constante; 2) una región de transición donde los niveles de fluorescencia caen a medida que aumenta la temperatura; y 3) una región de mayor temperatura donde la fluorescencia es relativamente baja y constante. La temperatura de fusión generalmente cae en el punto en el que la caída en la fluorescencia alcanza un punto de inflexión. Por lo tanto, por ejemplo, una región de transición en una curva de fusión tradicional podría abarcar la región de 20°C que varía de 50°C a 70°C. En tal ejemplo, una mitad de la anchura de transición sería un tramo de 10°C. Por lo tanto, cuando se tiene que analizar el mismo ácido nucleico de doble hebra usando los perfiles térmicos presentados en la presente memoria, una altura útil del salto de transición ΔT_{trans} sería de 10°C, o una mitad de la anchura de transición en la curva de fusión tradicional.

Sistemas y dispositivos

Se proporcionan también en la presente memoria sistemas para determinar la temperatura de fusión de una molécula de ácido nucleico de doble hebra. Los sistemas pueden incluir un aparato de ciclado térmico programable; un detector; y un programa para el ciclado térmico de onda cuadrada, en donde el programa comprende instrucciones para: someter una disolución que comprende una molécula de ácido nucleico bicatenario a un gradiente de temperatura de onda cuadrada, comprendiendo el gradiente un intervalo de temperaturas que provoca al menos una transición de la molécula de ácido nucleico bicatenario a moléculas de ácido nucleico monocatenario; y detectar la al menos una transición durante el transcurso del gradiente de temperatura de onda cuadrada.

El aparato de ciclado térmico programable puede ser cualquier aparato adecuado que permita acceso para que un detector detecte la transición en una o más muestras de ácido nucleico. Los dispositivos de ciclado térmico programables son conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, los dispositivos usados para la reacción en cadena de la polimerasa son capaces de un ciclado rápido entre temperaturas.

El detector puede ser cualquier detector adecuado que sea capaz de detectar la transición entre ácido nucleico monocatenario y bicatenario. Se conocen bien en la técnica detectores para detectar la fluorescencia de restos indicadores tales como los tintes de intercalación. Análogamente, se conocen bien en la técnica detectores para detectar absorbancia UV. En algunas realizaciones, el sistema comprende además una fuente de luz. La fuente de luz puede usarse donde se usa absorbancia o fluorescencia como la señal detectable del distintivo en presencia de ácido nucleico de doble hebra. Se conocen bien en la técnica las fuentes de luz para absorbancia UV, así como las fuentes de luz para proporcionar luz de excitación para fluorescencia.

Como se usa en la presente memoria, el término programa se refiere a instrucciones u órdenes para realizar una tarea o proceso. El término programa puede usarse de forma intercambiable con el término módulo. En ciertas realizaciones, un programa puede ser una compilación de varias instrucciones ejecutadas bajo el mismo conjunto de órdenes. En otras realizaciones, un programa puede hacer referencia a un lote o archivo discreto.

El programa, así como los datos de señal adquiridos por el detector, pueden almacenarse en cualquier capacidad de almacenamiento adecuada. Como se usa en la presente memoria, los términos almacenamiento, dispositivo de almacenamiento, capacidad de almacenamiento y similares pueden hacer referencia a cualquier medio, dispositivo o medio de almacenamiento de información. El almacenamiento puede incluir, pero sin que ello pretenda ser limitante, un dispositivo de unidad de disco tal como un disco duro, un disco flexible, un disco óptico o magneto-óptico, una memoria tal como chips de RAM o ROM, y cualquier otro medio usado para registrar o almacenar datos. En algunas realizaciones, una capacidad de almacenamiento está conectada con un procesador que envía información que se va a registrar en la capacidad de almacenamiento después de adquirir esta. En realizaciones específicas, se adquieren datos de señal por un sistema y se registran en una capacidad de almacenamiento. En otras realizaciones, se adquieren datos de señal por un sistema y la información se procesa en primer lugar, y la información procesada se registra en una capacidad de almacenamiento.

Detección de ácido nucleico de doble hebra

En los métodos proporcionados en la presente memoria, se supervisan las transiciones entre ácido nucleico monocatenario y bicatenario mediante la detección de una señal indicativa del nivel de ácido nucleico de doble hebra. La detección de los niveles de ácido nucleico de doble hebra puede realizarse por cualquier metodología adecuada, como se sabe en la técnica. Por ejemplo, pueden detectarse los niveles de ácido nucleico de doble hebra usando un resto indicador que tiene una señal detectable del distintivo en presencia de ácido nucleico de doble hebra. Los restos indicadores que tienen una señal detectable del distintivo en presencia de ácido nucleico de doble hebra los conocen bien los expertos en la materia, y pueden producir cualquier señal detectable. Típicamente, la señal es una señal óptica, tal como fluorescente, colorimétrica, luminiscente o turbida. En algunas realizaciones, la señal puede ser eléctrica, tal como un cambio en tensión, resistencia o cambio de corriente.

En realizaciones típicas, el resto indicador es un tinte de intercalación. Los tintes de intercalación muestran una emisión de fluorescencia diferencial dependiente de su asociación con ADN bicatenario o monocatenario.

Específicamente, se unen específicamente a ADN bicatenario y, cuando están unidos, fluorescen brillantemente. En ausencia de ADN bicatenario, no tienen nada a lo que unirse y sólo fluorescen a un bajo nivel. Algunos ejemplos de tintes fluorescentes adecuados disponibles en el mercado incluyen SYBR Green, LC Green, LC Green Plus, ResoLight, EvaGreen, Chromofy, SYTO 9, bromuro de etidio, YO-PRO-1, Hoechst 33258, y Pico Green. Se apreciará que puede usarse cualquier tinte de intercalación adecuado que presente una señal detectable del distintivo en presencia de ácido nucleico de doble hebra.

En realizaciones típicas, la señal detectable del distintivo es reversible. Como tal, la señal detectable del distintivo puede "activarse" y desactivarse, en efecto, repetidamente, a medida que el perfil de temperatura pasa repetidamente a través de la temperatura de fusión de un ácido nucleico de doble hebra en múltiples pulsos. Por lo tanto, los tintes de intercalación son bastante adecuados como restos indicadores porque se unen preferencialmente a ácido nucleico de doble hebra, y cuando el aumento de temperatura provoca la fusión de la doble hebra, la señal disminuye entonces hasta que la temperatura alcanza de nuevo niveles donde puede tener lugar la hibridación. Se apreciará que puede utilizarse cualquier resto indicador adecuado que produzca una señal reversible en los métodos presentados en la presente memoria.

En algunas realizaciones, la detección no implica un resto indicador, sino que puede implicar supervisar una propiedad inherente del ácido nucleico bicatenario o monocatenario. La propiedad inherente puede ser cualquier propiedad adecuada del ácido nucleico bicatenario o monocatenario que permita supervisar las transiciones entre ácido nucleico monocatenario y bicatenario. En algunas realizaciones, la propiedad inherente es la absorbencia de UV. Por ejemplo, el ADN monocatenario absorbe luz ultravioleta a 260 nm más fuertemente que el ADN bicatenario. Por consiguiente, pueden usarse los cambios en la absorbencia a 260 nm, o cualquier otra longitud de onda adecuada, como una herramienta para detectar los niveles de ácidos nucleicos bicatenarios comparados con ácidos nucleicos monocatenarios.

Información cinética

La fusión del ácido nucleico de doble hebra es un fenómeno que incluye una mezcla de aspectos termodinámicos y cinéticos. En un análisis tradicional de la curva de fusión, los datos cinéticos, vistos a menudo como una asimetría en la curva de fusión, pueden quedar enmascarados por el ruido. Ventajosamente, los presentes métodos pueden proporcionar una visión interna en la cinética de la transición, porque las moléculas de ácido nucleico pasan de un estado a otro repetidamente. Si hay una tendencia para que la transición ocurra más rápido en una dirección en comparación con la otra, esta puede identificarse cuando el perfil pasa repetidamente a través de la temperatura de transición.

Por consiguiente, se presenta en la presente memoria un método para determinar información cinética sobre una transición de bicatenario a monocatenario para ácidos nucleicos, comprendiendo el método: proporcionar una muestra que comprende moléculas de ácido nucleico bicatenario y un resto indicador que tiene una señal detectable del distintivo en presencia de ácido nucleico de doble hebra; someter la muestra a una serie de pulsos de temperatura, en donde los pulsos provocan que las moléculas de ácido nucleico bicatenario experimenten una transición hacia moléculas monocatenarias y de vuelta a moléculas bicatenarias; y detectar, usando la señal producida por el resto indicador, la velocidad de transición entre los estados monocatenario y bicatenario, con lo que la velocidad de transición entre los estados proporciona información cinética sobre la transición.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Uso de un perfil térmico de onda cuadrada para detectar heterocigosidad de un polimorfismo en una población de pacientes

El siguiente ejemplo prospectivo ilustra una aplicación de los perfiles térmicos de onda cuadrada descritos anteriormente en la presente memoria. Para detectar la presencia de un polimorfismo dentro de una población de pacientes, se recogen muestras de ADN genómico de un panel de pacientes en la población. La región de interés se amplifica por la reacción en cadena de la polimerasa, usando cebadores que flanquean el polimorfismo potencial. Específicamente, los cebadores están diseñados para amplificar la región que contiene el polimorfismo. Como resultado del cebador se producen productos de amplificación de diseño que tienen una secuencia distinta en la región del polimorfismo, dependiendo de qué alelo específico se amplifique. Por lo tanto, los productos tendrán también temperaturas de fusión que difieren en al menos 1,5°C, dependiendo de qué alelo se amplifique.

Cada uno de los productos de PCR se somete a un análisis de la curva de fusión. Se añade SYBR Green a cada muestra, que después se pone en el aparato de ciclado térmico/detección. El perfil de temperatura de la curva de fusión comienza a 45°C y sigue un patrón de onda cuadrada, con transiciones de 5°C y etapas de 2°C para las temperaturas baja y alta para cada pulso. El perfil sigue este patrón de pulsos hasta que alcanza una temperatura final de 76°C.

El análisis de los datos identifica pulsos con transiciones máximas en los valores de fluorescencia. En algunas de las muestras, se identifican dos puntos de T_f a temperaturas que difieren en 1,5 a 2,0°C. En otras muestras, se identifica un único punto de T_f a cualquiera de las dos temperaturas. Basándose en estos hallazgos, se clasifican las muestras de los pacientes como heterocigoto para el polimorfismo u homocigoto positivo o negativo.

La expresión "que comprende", como se usa en la presente memoria, es sinónimo de "que incluye", "que contiene" o "caracterizado por" y es inclusivo o abierto y no excluye elementos adicionales no citados o etapas del método.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la temperatura de fusión de una molécula de ácido nucleico de doble hebra, comprendiendo dicho método
- 5 someter una disolución que comprende una molécula de ácido nucleico bicatenario a un gradiente de temperatura de onda cuadrada, comprendiendo dicho gradiente un intervalo de temperaturas que provoca al menos una transición de dicha molécula de ácido nucleico bicatenario a moléculas de ácido nucleico monocatenario, comprendiendo dicho gradiente una serie de pulsos de temperatura, comprendiendo cada pulso:
- a) aumentar la temperatura de dicha disolución a una primera temperatura alta;
- 10 b) disminuir la temperatura de dicha disolución a una segunda temperatura baja; en donde dicha primera temperatura alta es mayor que dicha segunda temperatura baja; y en donde, en pulsos posteriores, se ajusta cada una de dicha primera temperatura alta y dicha segunda temperatura baja para que sean mayores que la primera y segunda temperaturas, respectivamente, en pulsos previos; y
- detectar dicha al menos una transición durante el transcurso de dicho gradiente de temperatura de onda cuadrada.
2. El método de la reivindicación 1, en donde al menos uno de dichos pulsos de temperatura comprende un intervalo de temperaturas en donde ocurre una transición detectable entre dicha molécula de ácido nucleico bicatenario y dichas moléculas de ácido nucleico monocatenario.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en donde dicha detección ocurre a dicha primera temperatura alta y dicha segunda temperatura baja en cada uno de dichos pulsos de temperatura.
4. El método de la reivindicación 1, en donde dicho método comprende además:
- 20 identificar un pulso de temperatura que tiene una transición detectable máxima de moléculas de ácido nucleico bicatenario a ácido nucleico monocatenario.
5. El método de la reivindicación 4, en donde dicha identificación comprende calcular la diferencia en una señal detectable, midiéndose dicha señal detectable a dicha primera temperatura alta y a dicha segunda temperatura baja dentro de un único pulso de temperatura.
- 25 6. El método de la reivindicación 1, en donde dicha disolución comprende una pluralidad de especies de ácido nucleico bicatenario, comprendiendo cada una de dichas especies una secuencia diferente.
7. El método de la reivindicación 6, en donde cada una de dicha pluralidad de especies de ácido nucleico bicatenario comprende una temperatura de fusión diferente.
- 30 8. El método de la reivindicación 1, en donde dicha detección comprende detectar un resto indicador que tiene una señal detectable del distintivo en presencia de ácido nucleico de doble hebra.
9. El método de la reivindicación 8, en donde dicha señal detectable del distintivo es reversible.
10. El método de la reivindicación 8, en donde dicho resto indicador comprende un tinte fluorescente.
11. El método de la reivindicación 8, en donde dicho resto indicador se selecciona del grupo que consiste en:
- bromuro de etidio, YO-PRO-1, Hoechst 33258, Pico Green y SYBRGreen.
- 35 12. El método de la reivindicación 1, en donde dicha detección comprende supervisar la absorbencia ultravioleta (UV).
13. El método de la reivindicación 1, en donde dicho gradiente de temperatura de onda cuadrada se genera usando un termociclador programable.
- 40 14. Un sistema para determinar la temperatura de fusión de una molécula de ácido nucleico de doble hebra, comprendiendo dicho sistema
- un aparato de ciclado térmico programable;
- un detector; y
- un programa para el ciclado térmico de onda cuadrada, comprendiendo dicho programa instrucciones para:
- 45 someter una disolución que comprende una molécula de ácido nucleico bicatenario a un gradiente de temperatura de onda cuadrada, comprendiendo dicho gradiente un intervalo de temperaturas que provoca al menos una transición de dicha molécula de ácido nucleico bicatenario a moléculas de ácido nucleico monocatenario, comprendiendo dicho gradiente una serie de pulsos de temperatura, comprendiendo cada pulso: aumentar la

- 5 temperatura de dicha disolución a una primera temperatura alta; disminuir la temperatura de dicha disolución a una segunda temperatura baja; en donde dicha primera temperatura alta es mayor que dicha segunda temperatura baja; y en donde, en pulsos posteriores, se ajusta cada una de dicha primera temperatura alta y dicha segunda temperatura baja para que sean mayores que la primera y segunda temperaturas, respectivamente, en pulsos previos; y
- detectar dicha al menos una transición durante el transcurso de dicho gradiente de temperatura de onda cuadrada.
- 10 15. El sistema de la reivindicación 14, en donde al menos uno de dichos pulsos de temperatura comprende un intervalo de temperaturas en donde ocurre una transición detectable entre dicha molécula de ácido nucleico bicatenario y dichas moléculas de ácido nucleico monocatenario.
16. El sistema de la reivindicación 14, en donde dicha detección ocurre a dicha primera temperatura alta y dicha segunda temperatura baja en cada uno de dichos pulsos de temperatura.
- 15 17. El sistema de la reivindicación 14, en donde dicho programa comprende además instrucciones para: identificar un pulso de temperatura que tiene una transición detectable máxima de moléculas de ácido nucleico bicatenario a ácido nucleico monocatenario.
18. El sistema de la reivindicación 17, en donde dicha identificación comprende calcular la diferencia en una señal detectable, midiéndose dicha señal detectable a dicha primera temperatura alta y dicha segunda temperatura baja dentro de un único pulso de temperatura.
- 20 19. El sistema de la reivindicación 14, en donde dicha detección comprende supervisar la absorbencia ultravioleta (UV).
20. El sistema de la reivindicación 14, en donde el gradiente de temperatura de onda cuadrada se genera usando un termociclador programable.
21. Un método para determinar la temperatura de fusión de una molécula de ácido nucleico bicatenario, comprendiendo dicho método:
- 25 proporcionar una muestra que comprende moléculas de ácido nucleico bicatenario y un resto indicador que tiene una señal detectable del distintivo en presencia de ácido nucleico de doble hebra; someter dicha muestra a un gradiente de temperatura de onda cuadrada que comprende una serie de pulsos de temperatura, en donde al menos una pluralidad de dichos pulsos provoca que dicha moléculas de ácido nucleico bicatenario experimenten una transición hacia moléculas monocatenarias y de vuelta a moléculas bicatenarias, y
- 30 en donde cada uno de dichos pulsos de temperatura comprende:
- aumentar la temperatura de dicha disolución a una primera temperatura alta;
- disminuir la temperatura de dicha disolución a una segunda temperatura baja; en donde dicha primera temperatura alta es mayor que dicha segunda temperatura baja; y en donde, en pulsos posteriores, se ajusta cada una de dicha primera temperatura alta y dicha segunda temperatura para que sean mayores que la
- 35 primera y segunda temperaturas, respectivamente, en pulsos previos; y
- detectar, usando la señal producida por dicho resto indicador, la temperatura de fusión de dicha molécula de ácido nucleico bicatenario.
- 40 22. El método de la reivindicación 21, en donde al menos uno de dichos pulsos de temperatura comprende un intervalo de temperaturas en donde ocurre una transición detectable entre dicha molécula de ácido nucleico bicatenario y dichas moléculas de ácido nucleico monocatenario.
23. El método de la reivindicación 21, en donde dicha detección ocurre a dicha primera temperatura alta y dicha segunda temperatura baja en cada uno de dichos pulsos de temperatura.
24. El método de la reivindicación 21, en donde dicho método comprende además:
- 45 identificar un pulso de temperatura que tiene una transición detectable máxima de moléculas de ácido nucleico bicatenario a ácido nucleico monocatenario.
25. El método de la reivindicación 24, en donde dicha identificación comprende calcular la diferencia en una señal detectable, midiéndose dicha señal detectable a dicha primera temperatura alta y dicha segunda temperatura baja dentro de un único pulso de temperatura.
- 50 26. El método de la reivindicación 21, en donde dicha disolución comprende una pluralidad de especies de ácido nucleico bicatenario, comprendiendo cada una de dichas especies una secuencia diferente.

27. El método de la reivindicación 26, en donde cada una de dicha pluralidad de especies de ácido nucleico bicatenario comprende una temperatura de fusión diferente.
28. El método de la reivindicación 21, en donde dicho resto indicador produce una señal diferencial en presencia de ácidos nucleicos bicatenarios en comparación con ácidos nucleicos monocatenarios.
- 5 29. El método de la reivindicación 28, en donde dicha señal diferencial es reversible.
30. El método de la reivindicación 28, en donde dicho resto indicador comprende un tinte fluorescente.
31. El método de la reivindicación 28, en donde dicho resto indicador se selecciona del grupo que consiste en: bromuro de etidio, YO-PRO-1, Hoechst 33258, Pico Green y SYBR Green.
- 10 32. El método de la reivindicación 21, en donde dicha detección comprende supervisar la absorbencia ultravioleta (UV).
33. El método de la reivindicación 21, en donde dichos pulsos de temperatura se generan usando un termociclador programable.
34. Un método para determinar información cinética sobre una transición de bicatenario a monocatenario para ácidos nucleicos, comprendiendo dicho método:
- 15 proporcionar una muestra que comprende moléculas de ácido nucleico bicatenario y un resto indicador que tiene una señal detectable del distintivo en presencia de ácido nucleico de doble hebra; someter dicha muestra a un gradiente de temperatura de onda cuadrada que comprende una serie de pulsos de temperatura, en donde dichos pulsos provocan que dichas moléculas de ácido nucleico bicatenario experimenten una transición hacia moléculas monocatenarias y de vuelta a moléculas bicatenarias, y en donde cada pulso comprende
- 20 aumentar la temperatura de dicha disolución a una primera temperatura alta;
- disminuir la temperatura de dicha disolución a una segunda temperatura baja; en donde dicha primera temperatura alta es mayor que dicha segunda temperatura baja; y en donde, en pulsos posteriores, se ajusta cada una de dicha primera temperatura alta y dicha segunda temperatura baja para que sean menores que la primera y segunda temperaturas, respectivamente, en pulsos previos; y
- 25 detectar, usando la señal producida por dicho resto indicador, la velocidad de transición entre los estados monocatenario y bicatenario, con lo que dicha velocidad de transición entre dichos estados proporciona información cinética sobre dicha transición.
35. Un método para determinar la temperatura de fusión de una molécula de ácido nucleico de doble hebra, comprendiendo dicho método
- 30 someter una disolución que comprende una pluralidad de moléculas de ácido nucleico monocatenario a un gradiente de temperatura de onda cuadrada, comprendiendo dicho gradiente un intervalo de temperaturas que provoca al menos una transición de dichas moléculas de ácido nucleico monocatenario a moléculas de ácido nucleico bicatenario, y en donde dicho gradiente comprende una serie de pulsos de temperatura, comprendiendo cada pulso
- 35 aumentar la temperatura de dicha disolución a una primera temperatura alta;
- disminuir la temperatura de dicha disolución a una segunda temperatura baja; en donde dicha primera temperatura alta es mayor que dicha segunda temperatura baja; y en donde, en pulsos posteriores, se ajusta cada una de dicha primera temperatura alta y dicha segunda temperatura baja para que sean menores que la primera y segunda temperaturas, respectivamente, en pulsos previos; y
- 40 detectar dicha al menos una transición durante el transcurso de dicho gradiente de temperatura de onda cuadrada.
36. El método de la reivindicación 35, en donde al menos uno de dichos pulsos de temperatura comprende un intervalo de temperaturas en donde ocurre una transición detectable entre dicha molécula de ácido nucleico bicatenario y dichas moléculas de ácido nucleico monocatenario.
- 45 37. El método de la reivindicación 35, en donde dicha detección ocurre a dicha primera temperatura alta y dicha segunda temperatura baja en cada uno de dichos pulsos de temperatura.
38. El método de la reivindicación 35, en donde dicho método comprende además:
- identificar un pulso de temperatura que tiene una transición detectable máxima de moléculas de ácido nucleico monocatenario a ácido nucleico bicatenario.

39. El método de la reivindicación 37, en donde dicha identificación comprende calcular la diferencia en una señal detectable, midiéndose dicha señal detectable a dicha primera temperatura alta y a dicha segunda temperatura baja dentro de un único pulso de temperatura.

Fig. 1

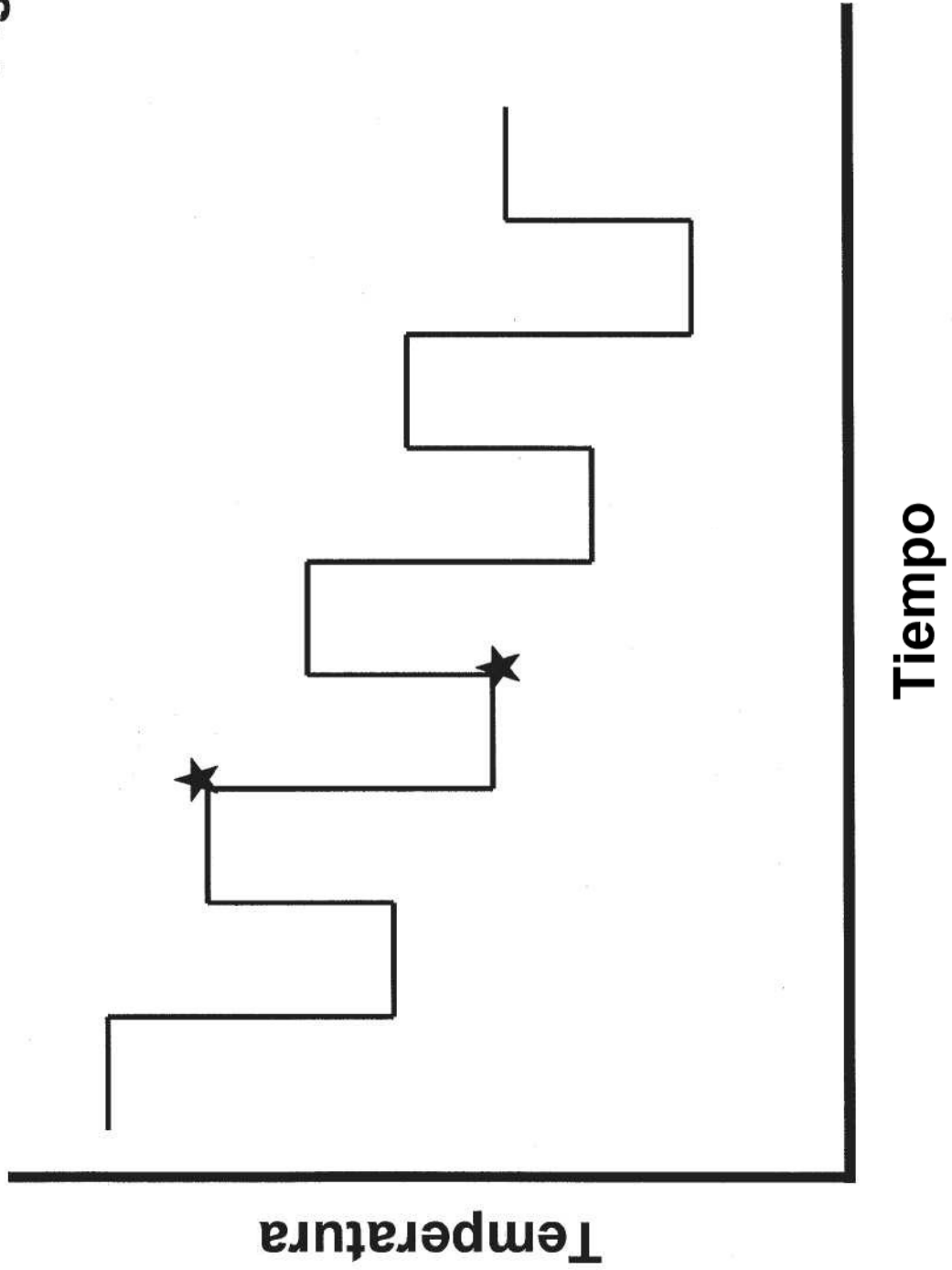


Fig. 2

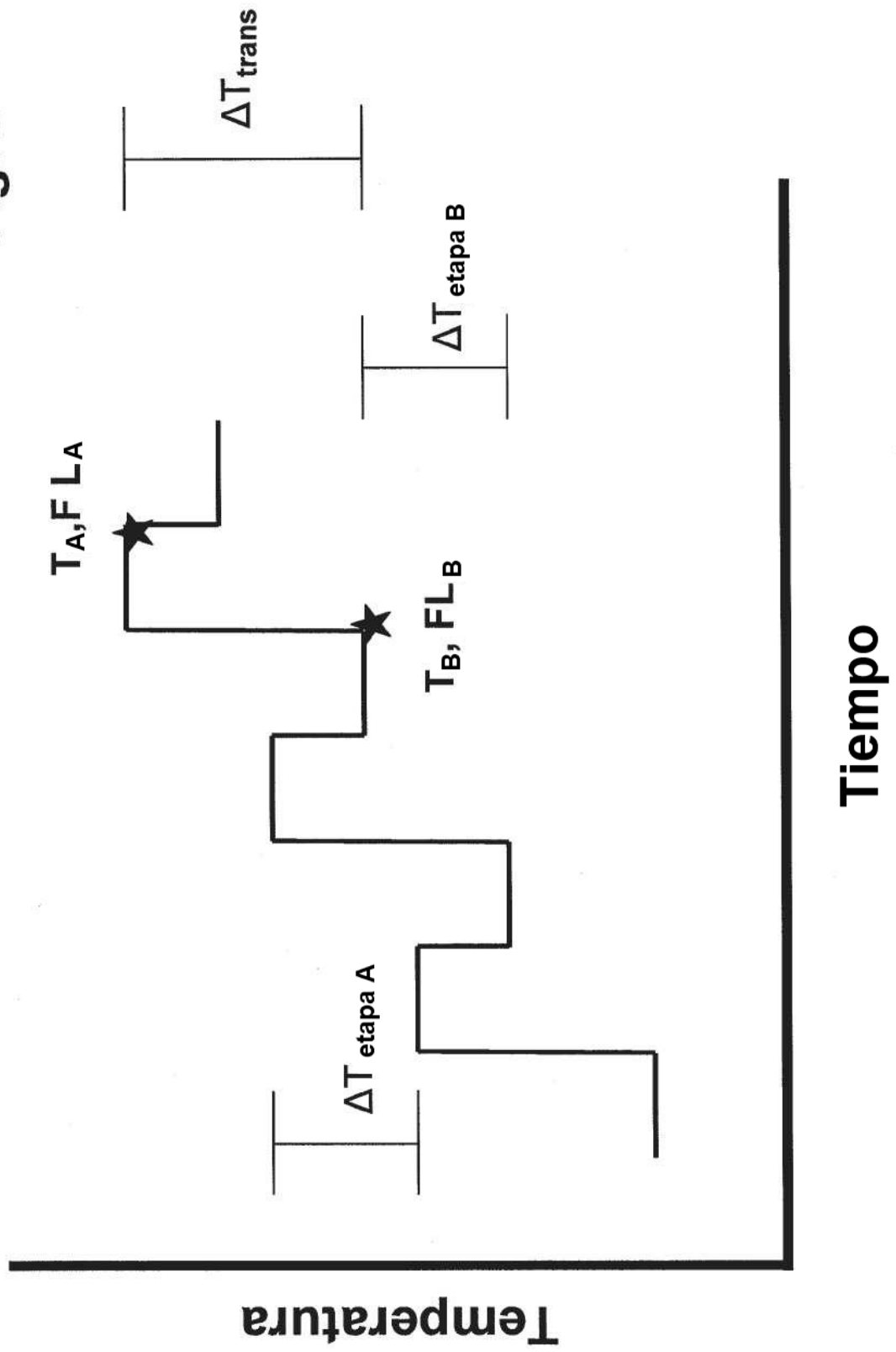


Fig. 3

