

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 467**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2005 E 14195859 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2927238**

54 Título: **Métodos de amplificación LATE y secuenciación de un ácido nucleico**

30 Prioridad:

18.10.2004 US 619654 P

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

18.05.2018

73 Titular/es:

**BRANDEIS UNIVERSITY (100.0%)
415 South Street
Waltham, MA 02454-9110, US**

72 Inventor/es:

**WANGH, LAWRENCE J.;
RICE, JOHN;
PIERCE, KENNETH;
REIS, ARTHUR;
HARTSHORN, CRISTINA;
SANCHEZ, J. AQUILES y
SALK, JESSE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 668 467 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

Métodos de amplificación LATE y secuenciación de un ácido nucleico.

Campo de la invención

5 Esta descripción se refiere a reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, que incluyen amplificaciones que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa, y ensayos que utilizan tales reacciones en combinación con métodos de detección de sondas de hibridación y de secuenciación.

Antecedentes

10 Las técnicas y ensayos de amplificación de ácidos nucleicos son bien conocidos. Algunas reacciones de amplificación son isotérmicas, tal como la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA). Otras emplean ciclos térmicos, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ensayos de amplificación preferidos que emplean detección por fluorescencia del producto amplificado son homogéneos, es decir, no requieren la separación física de reactivos para permitir la detección (por ejemplo, la separación de las sondas unidas de las sondas no unidas) y pueden realizarse en un único recipiente cerrado. Tales ensayos pueden ser de puntos finales, en los que el producto se detecta después de la amplificación, o pueden ser a tiempo real, en donde se detecta el producto, a medida que avanza la amplificación.

15 La amplificación del ácido nucleico y los ensayos que emplean PCR se describen, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos 4.683.202, 4.683.195 y 4.965.188, y, en general, PCR PROTOCOLS, a guide to Methods and Applications, Innis et al. eds., Academic Press (San Diego, CA (EE.UU.) 1990). Se describen ensayos de PCR homogéneos, que incluyen ensayos en tiempo real, en los que se detecta el producto amplificado durante algunos o todos los ciclos de la PCR a medida que avanza la reacción, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. 5.994.056, 5.487.972, 5.925.517 y 6.150.097.

20 Las reacciones de amplificación por PCR generalmente están diseñadas para ser simétricas, es decir, para hacer amplicones bicatenarios exponencialmente mediante la utilización de cebadores directos y cebadores inversos en concentraciones equimolares e iguales temperaturas de fusión (T_m). Una técnica que ha encontrado un uso limitado para hacer ADN monocatenario directamente en una reacción de PCR es la "PCR asimétrica". Gyllensten y Erlich, "Generation of Single-Stranded DNA by the Polymerase Chain Reaction and its Application to Direct Sequencing of the HLA-DQA Locus", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 7652 - 7656 (1988); y la patente de Estados Unidos 5.066.584. La PCR asimétrica es un método de amplificación por PCR no simétrico que difiere de la PCR simétrica en que uno de los cebadores se diluye entre cinco y cien veces para estar presente en una cantidad límite de 1-20 por ciento de la concentración del otro cebador. Como consecuencia, la amplificación consiste en una fase exponencial en la que ambos cebadores se extienden, generando un producto bicatenario o amplicón, seguido de una amplificación lineal en la que solo queda un cebador, generando un amplicón monocatenario.

25 Más recientemente, los inventores han desarrollado un método de amplificación por PCR no simétrico conocido como PCR "lineal después del exponencial" o, para abreviar, "LATE-PCR". LATE-PCR es una amplificación por PCR no simétrica que consiste en una fase exponencial en la cual ambos cebadores son recocidos y extendidos, seguido de una fase lineal después del agotamiento del cebador limitante, cuando solo el cebador de exceso es recocado y extendido. Ver Sanchez et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 101: 1933-1938, solicitud de patente internacional publicada WO 03/054233 (3 de julio de 2003), y Pierce et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 102: 8609 - 8614.

30 Un método conveniente y económico para monitorizar la producción de amplicón bicatenario en una amplificación por PCR es usar un tinte que fluoresce al intercalarse o interactuar de otra forma con ADN bicatenario, tal como SYBR Green I o SYBR Gold. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 5.994.056. El análisis de la temperatura de fusión de amplicones realizado en tiempo real durante una amplificación por PCR o realizado después de la amplificación se usa para la identificación del producto. Un problema con la utilización de dicho análisis de temperatura de fusión es que la fluorescencia del colorante es una función del tamaño del amplicón. Otro problema es que los colorantes se redistribuyen desde los productos de amplificación, o amplicones, que tienen bajas temperaturas de fusión a los amplicones que tienen temperaturas de fusión más altas durante el análisis, distorsionando así los resultados. Se han avanzado dos enfoques para resolver estos problemas. Un enfoque, la inactivación G, impone severas restricciones en el diseño del cebador y causa una gran fluorescencia de fondo (Crockett AO, Wittwer CT. "Fluorescein-Labeled Oligonucleotides for Real-Time PCR: Using the Inherent Quenching of Deoxyguanosine Nucleotides", Anal. Biochem. 290:89-97 (2001)). El otro, que reemplaza los colorantes SYBR con el colorante LC Green, produce un porcentaje muy pequeño de señal para secuencias que no están presentes en abundancia y requiere un software y un hardware altamente especializados (Wittwer et al., "High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen", Clin. Chem. 49:853-860(2003).

35 Las sondas marcadas con fluorescencia se usan en ensayos de amplificación de ácidos nucleicos homogéneos, que incluyen ensayos de PCR, para medir la acumulación del amplicón deseado, en tiempo real o mediante análisis de punto final. Varios tipos de sondas disponibles son significativamente alelo-discriminantes en comparación con las sondas lineales monocatenarias. Las sondas en tiempo real incluyen sondas lineales doblemente marcadas que se escinden mediante la actividad de exonucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa durante la etapa de extensión de un

ciclo de PCR (véanse las patentes de EE.UU. 5.210.015, 5.487.972 y 5.538.848); sondas de baliza molecular (véanse las patentes de Estados Unidos 5.925.517, 6.103.476 y 6.365.729); sondas de unión de surco menor (ver Afonina et al. "Minor Groove Binder-Conjugated DNA Probes for Quantitative DNA Detection by Hybridization-Triggered Fluorescence", *Biotechniques* 32: 946-949 (2002)); sonda lineal que se empareja con FRET cuando se hibrida adyacente en una hebra diana; sondas lineales de doble cadena inactivadas para las cuales una diana compite para hibridar con la cadena de sonda marcada (véase Li, Q. et al (2002), *Nucl. Acid. Res.* 30: e5); y las denominadas sondas "iluminadas", que son oligómeros de ácido nucleico peptídico (PNA) unidos a un colorante de cianina asimétrico que fluoresce cuando la sonda se une a la diana para formar una región bicatenaria. Para LATE-PCR los inventores han utilizado sondas discriminantes de alelos de baja temperatura, tales como sondas de balizas moleculares de baja temperatura (Véase el documento WO 03/045233). Las sondas de oligonucleótidos marcadas se pueden unir a los cebadores por medio de enlazadores de manera que, durante la amplificación, las sondas no se copian sino que se hibridan libremente a una secuencia diana resultante de la extensión del cebador. Los ejemplos son Scorpions®, cebadores a los que se unen sondas de balizas moleculares y Anglers®, cebadores a los que se unen sondas lineales marcadas con fluoróforos. Lee, M.A. et al. (2002), *Analytica Clinica Acta* 457: 61:70; Whitcombe, D. et al. (1999), *Nature Biotechnology* 17: 804-807. La porción de sonda de tales estructuras compuestas, que lleva el marcador fluorescente, se hibrida por separado de la porción de cebador. Son, por lo tanto, sondas marcadas y cebadores no marcados, como esos términos se usan en este documento. Sin embargo, las sondas específicas de dianas carecen de la capacidad de controlar la producción total de productos de doble cadena.

Ciertas sondas son tolerantes a los errores de apareamiento. Las sondas tolerantes a los errores de apareamiento se hibridan y generan señales detectables para más de una secuencia diana a una temperatura de detección en un ensayo, y varios híbridos así formados tendrán diferentes puntos de fusión. Las sondas lineales, o de cola aleatoria, monocatenarias generalmente son tolerantes a los errores de apareamiento. Ejemplos de tales sondas son sondas lineales con un resto fluorescente interno cuyo nivel de fluorescencia aumenta tras la hibridación con una u otra cadena diana; sondas lineales fluorescentemente marcadas usadas en combinación con colorantes SYBR Gold y SYBR Green I, de modo que la fluorescencia del marcador se produce mediante FRET del colorante cuando la sonda se hibrida con una u otra diana (véase la publicación de patente estadounidense US 2002/0119450, 28 de agosto de 2002), las denominadas "balizas descuidadas" y variaciones de pares de sondas lineales que FRET (véase la patente de EE. UU. 6.472.156).

La utilización de múltiples sondas que se unen solo a un posible amplicón diana generado en una reacción de amplificación crea un problema para analizar mezclas de reacción complicadas o para detectar una o unas pocas dianas entre las numerosas dianas posibles. La detección de la fluorescencia disponible permite la resolución de un número limitado de fluoróforos, generalmente no más de ocho. La multiplexación limitada es posible, por ejemplo, diseñando una sonda de baliza molecular discriminante de alelos diferente para cada diana y marcando cada sonda de forma diferente. (Ver, por ejemplo, Tyagi et al. (2000) *Nature Biotechnology* 18: 1191 - 1196). Las mezclas de sondas discriminantes de alelos, que comprenden alícuotas de múltiples colores, amplían el número de firmas de sonda y funcionan bien si solo una de muchas (al menos hasta 56) dianas está realmente presente, pero encuentra resultados ambiguos si más de un diana está presente.

Hay muchas situaciones que involucran a dianas complejas o a una entre muchas posibles dianas. Se han desarrollado o propuesto varios esquemas para tales situaciones, pero todos tienen serios inconvenientes y limitaciones. Tyagi et al., solicitud de patente internacional publicada WO 01/31062, han descrito una técnica, a veces denominada "balizas descuidadas", que comprende a sondas de balizas moleculares que tienen largas secuencias de bucle, haciéndolas tolerantes a los errores de apareamiento y capaces de unirse en cierta medida a múltiples dianas en la temperatura de recocido de una reacción de amplificación por PCR. Dichas sondas adolecen de una mala cinética de reacción frente a las dianas tolerantes a los errores de apareamiento y es probable que permanezcan hibridadas con dianas perfectamente coincidentes a la temperatura de extensión de una amplificación por PCR y se escinden mediante ADN polimerasa Taq. Además, solo se obtiene una indicación indirecta de las temperaturas de fusión de los híbridos sonda-diana en las condiciones de ensayo, y eso supone que se ha alcanzado el equilibrio. Se ha descrito la multiplexación en tiempo real en amplificaciones PCR simétricas con sondas FRET. Para no interferir con la amplificación, las temperaturas de fusión de todos los híbridos sonda-diana están restringidas a estar en el estrecho intervalo de temperatura entre la temperatura de recocido del cebador y la temperatura de extensión del cebador. Además, ese esquema no es cuantitativo. Se han descrito ensayos de multisondas de post-amplificación que emplean sondas FRET de diferentes colores, Wittwer et al., "Real-Time Multiplex PCR Assays, *Methods*" 25: 430-442 (2001). La mezcla de reacción después de una amplificación por PCR simétrica se enfría rápidamente, luego se calienta lentamente para determinar las curvas de fusión para los diversos fluoróforos presentes. Este enfoque no es cuantitativo. Además, debido a la gran dispersión entre las amplificaciones de PCR simétricas replicadas, los ensayos de punto final en general tienden a ser solo cualitativos.

Los productos de reacción de secuenciación proporcionan una alternativa al sondeo. La secuenciación didesoxi tradicional puede utilizar productos de reacciones de amplificación, tales como PCR simétrica o LATE-PCR, como materiales de partida para la secuenciación cíclica. El producto amplificado se purifica utilizando precipitación con etanol o una columna de afinidad para eliminar los dNTP y cebadores sobrantes, se somete a una reacción de secuenciación cíclica utilizando un cebador de secuenciación y didesoxinucleótidos marcados fluorescentemente, y se somete a electroforesis capilar en gel. La "pisecuenciación" es un método isotérmico de secuencia por síntesis

a tiempo real conocido en la técnica. Si se usan métodos de amplificación exponencial, por ejemplo PCR, en la preparación del material de partida para la pirosecuenciación, el producto amplificado debe limpiarse mediante el aislamiento del producto monocatenario así como la eliminación de dNTP, pirofosfato y cebadores no incorporados de la reacción de amplificación. LATE-PCR simplifica la preparación de la muestra, ya que genera principalmente productos monocatenarios, pero en sí no elimina la necesidad de limpiar el producto.

Sumario de la invención

La invención proporciona un método secuencial de amplificación de ADN-secuenciación que comprende: a) amplificar al menos un ADN diana mediante un procedimiento LATE-PCR para generar un producto de amplificación que contiene copias de al menos una cadena de cebador en exceso y al menos una cadena de cebador limitante; b) procesar el producto de amplificación diluyendo el producto de amplificación por un factor de al menos ocho; y c) secuenciar directamente las copias de al menos una de dichas cadenas en el producto de amplificación.

Descripción detallada de la invención

Los inventores describen métodos para la detección homogénea de productos de reacción de reacciones de amplificación, ciclos de temperatura o isotermas, utilizando la detección de fluorescencia de cebadores de oligonucleótidos lineales marcados con fluoróforos excitados indirectamente excitando un colorante fluorescente de ADN tal como SYBR Green I o, preferiblemente, SYBR Gold. Dichos colorantes se vuelven fluorescentes cuando se asocian con ADN bicatenario, en el que se dice que se intercalan. Los métodos anteriores pueden realizarse a tiempo real o después de la reacción de amplificación, leyendo la fluorescencia a una temperatura de detección (detección de punto final) o determinando cambios en la fluorescencia en función de la temperatura mediante análisis de fusión posterior a la amplificación. A medida que la mezcla de reacción se calienta a través de las temperaturas de fusión de los diversos productos de reacción, la fluorescencia disminuye progresivamente a medida que diversos amplicones, que contienen un cebador que contiene el fluoróforo particular, alcanzan sus temperaturas de fusión y se vuelven monocatenarios. Los métodos preferidos incluyen calcular la proporción de señal de cebador a señal de colorante.

Los inventores describen kits de reactivos que incluyen tanto colorantes fluorescentes de ADN como al menos uno de dichos cebadores marcados, preferiblemente como parte de un par de cebadores y, opcionalmente, reactivos de amplificación.

Los inventores describen métodos homogéneos para detectar productos de reacción de reacciones de LATE-PCR que emplean una etapa de detección a baja temperatura. La mezcla de reacción puede incluir al menos una sonda discriminante de alelos, concretamente, una sonda bicatenaria inactivada, generalmente del tipo descrito por Li, Q. et al. (2002) Nucl. Acids Res. 30: e5, excepto que se trata de una sonda específica para la diana de baja temperatura (Baja- T_m o Super-Baja T_m) y que se excita indirectamente al excitar un colorante fluorescente de ADN intercalado en el híbrido sonda-diana como, preferiblemente, SYBR Gold. La mezcla de reacción puede incluir al menos una sonda tolerante a los errores de apareamiento indirectamente excitable, concretamente, una sonda monocatenaria inactivada, generalmente del tipo descrito por Lee y Furst en la solicitud de patente publicada de los Estados Unidos Pub. No. US 2002/0119450, excepto que es una sonda de baja temperatura inactivada. Estos diversos métodos incluyen excitar el colorante durante las etapas de detección a baja temperatura de una amplificación LATE-PCR y detectar la fluorescencia de las sondas en estas condiciones para proporcionar una medida de la secuencia monocatenaria diana. Los métodos pueden incluir además medir la cantidad total de producto(s) bicatenario(s) en la mezcla de reacción detectando la fluorescencia del colorante, preferiblemente durante o al final de la etapa de extensión de los ciclos de PCR mientras la temperatura de la mezcla de reacción está por encima de la(s) temperatura(s) de fusión de las sondas. Ciertos métodos preferidos incluyen calcular la proporción de señal de la sonda respecto a la señal del colorante. En el caso de muestras replicadas, dicha relación corrige las diferencias entre las muestras replicadas en los rendimientos de amplificación que se sabe que ocurren en las amplificaciones por PCR.

Los inventores describen sondas discriminantes de alelos a baja temperatura y tolerantes a los errores de apareamiento inactivadas, kits de LATE-PCR que incluyen al menos una de tales sondas específicas de diana a baja temperatura junto con reactivos de amplificación y preferiblemente el colorante de ADN fluorescente; y conjuntos de oligonucleótidos que comprenden cebadores de LATE-PCR y al menos una de tales sondas.

Los inventores describen métodos de detección homogéneos para su uso cuando están presentes o pueden estar presentes amplicones múltiples, comprendiendo dicho método incluir en una mezcla de reacción de amplificación LATE-PCR una o más sondas de detección tolerantes a los errores de apareamiento a baja temperatura que, debido a su baja T_m , no interfieren con la amplificación y no se hidrolizan (cortan) por una ADN polimerasa que tiene actividad 5'-3' de exonucleasa, y que emiten una señal fluorescente cuando se hibridan y excitan, ya sea directamente por una fuente de excitación adecuada o indirectamente por un colorante de ADN fluorescente que es excitado por una fuente de excitación adecuada. Dichos métodos incluyen ensayos de sonda única y ensayos de múltiples sondas para aplicaciones tales como el genotipado. Se puede marcar más de una sonda con el mismo fluoróforo, en cuyo caso la discriminación se basa en el cambio en la fluorescencia con la temperatura, al igual que cuando se usa una sola sonda. Las sondas pueden marcarse con diferentes fluoróforos, en cuyo caso la diferencia

de color también se usa para la discriminación. La discriminación entre las dianas con fines de identificación y cuantificación puede incluir relaciones de fluorescencia entre fluoróforos a la misma o diferente temperatura, así como las proporciones de fluoróforo a colorante. La detección se realiza preferiblemente durante la amplificación (tiempo real) y más preferiblemente durante una etapa de detección a baja temperatura incluida en un protocolo de amplificación LATE-PCR, y la etapa de detección puede incluir la detección a temperaturas múltiples. Los inventores describen una sonda lineal monocatenaria útil en dichos métodos de detección, siendo dicha sonda del tipo descrito en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos US 2002/0119450 (29 de agosto de 2002), es decir, una sonda excitada por la emisión de la fluorescencia de un colorante de ADN fluorescente, excepto que es una sonda de baja temperatura (baja- T_m o súper-baja- T_m), es tolerante a los errores de apareamiento, e incluye un resto atenuador que inactiva la fluorescencia que, de otro modo, resultaría de una estructura secundaria a baja temperatura.

Un aspecto de esta invención es un método de amplificación por secuenciación que permite que el producto de una amplificación LATE-PCR se prepare para la pirosecuenciación en la cámara de reacción de amplificación, recipiente, pocillo, portaobjetos o recipiente, una operación de "un solo tubo", que se puede utilizar con amplificaciones de LATE-PCR realizadas en pequeños volúmenes, preferiblemente 17 μ l o menos.

Un aspecto de esta invención es un método para preparar productos de LATE-PCR para la secuenciación didesoxi utilizando solo una dilución acuosa de amplificación posterior de mezclas de reacción de amplificación, que se puede realizar como una operación de "tubo único".

En esta descripción se hacen referencias a las temperaturas de fusión, T_m , de los cebadores de ácidos nucleicos, sondas y amplicones. La T_m significa la temperatura a la que la mitad del material objeto existe en forma bicatenaria y el resto es monocatenario. En general, a excepción de LATE-PCR, la T_m de un cebador es un valor calculado usando el método "% GC" (Wetmar, J.G. (1991) "DNA Probes: Applications of the Principles of Nucleic Acid Hybridization", Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26: 227-259) o el método "2 (A + T) más 4 (G + C)", siendo ambos bien conocidos, en una condición estándar de cebador y concentración de sal. La LATE-PCR, sin embargo, tiene en cuenta las temperaturas reales de fusión del cebador en una reacción particular, teniendo en cuenta las concentraciones del cebador al inicio de la amplificación. Ver Sanchez et al. (2004) PNAS (USA) 101: 1933-1938, y Pierce et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci (EE. UU.) 102: 8609 - 8614.

En esta descripción los inventores se refieren a tal temperatura de fusión ajustada por concentración al inicio de la amplificación como $T_{m[0]}$, que puede determinarse empíricamente, como es necesario cuando se usan nucleótidos no naturales, o calcularse de acuerdo con el método del "vecino más cercano" (Santa Lucia, J. (1998), PNAS (USA) 95: 1460-1465 y Allawi, HT y Santa Lucia, J. (1997), Biochem. 36: 10581-10594) usando un ajuste de concentración de sal, que en los ejemplos a continuación fue la concentración de catión monovalente 0,07 M. La LATE-PCR también puede tener en cuenta la temperatura de fusión del amplicón, que se calcula utilizando la fórmula: $T_m = 81,5 + 0,41 (\% G + \% C) - 500/L + 16,6 \log [M]/(1 + 0,7 [M])$, donde L es la longitud en nucleótidos y [M] es la concentración molar de cationes monovalentes. Las temperaturas de fusión de las sondas lineales o de cola aleatoria se calculan como cebadores. Las temperaturas de fusión de las sondas estructuradas, por ejemplo, las sondas de balizas moleculares, se pueden determinar empíricamente.

Tal como se usa en esta descripción, "LATE-PCR" significa una amplificación de ADN no simétrica que emplea el proceso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando un cebador oligonucleotídico (el "cebador en exceso") en al menos cinco veces en exceso con respecto al otro cebador (el "cebador limitante"), que a su vez se utiliza a baja concentración, hasta 200 nM, para ser agotado en ciclos de PCR aproximadamente suficientes para producir un amplicón bicatenario detectable fluorescentemente, en el que la temperatura de fusión ajustada por concentración del cebador limitante al comienzo de la amplificación, $T_{m[0]}^L$, no está más de 5°C por debajo de la temperatura de fusión ajustada por concentración del cebador en exceso al comienzo de la amplificación, $T_{m[0]}^X$, preferiblemente al menos tan alto y más preferiblemente 3-10°C más alto; y en el que el ciclo térmico se continúa durante ciclos múltiples después del agotamiento del cebador limitante para producir un producto monocatenario, a saber, el producto de extensión del cebador en exceso, a veces denominado la "cadena del cebador en exceso".

Los cebadores y las sondas útiles en los métodos y kits de esta invención son oligonucleótidos en sentido amplio, lo que significa que pueden ser de ADN, ARN, mezclas de ADN y ARN, y pueden incluir nucleótidos no naturales (por ejemplo, 2' o-metil ribonucleótidos) y enlaces internucleótidos no naturales (por ejemplo, enlaces fosforotioato). Tanto los cebadores como las sondas funcionan en parte hibridándose con una secuencia de interés en una mezcla de reacción. Un cebador es un oligonucleótido monocatenario que puede hibridarse con su secuencia complementaria a la temperatura de apareamiento del cebador de una reacción de amplificación y extenderse en su extremo 3' mediante una ADN polimerasa. Los inventores describen un cebador que señala la hibridación de su secuencia de cebado por medio de un fluoróforo que es indirectamente excitable. Una sonda útil en métodos y kits descritos en este documento es, o incluye, un oligonucleótido monocatenario que puede hibridarse con su secuencia diana deseada (o secuencias) a la temperatura (o temperaturas) de detección en o después de una reacción de amplificación y señalar fluorescentemente ese evento de hibridación por medio de un fluoróforo que es indirectamente excitable. Como se usa en el presente documento, una "sonda" no se extiende en la reacción de amplificación mediante una ADN polimerasa. Las sondas que son muy específicas para una secuencia diana perfectamente complementaria y que reflejan fuertemente las secuencias estrechamente relacionadas que tienen

una o unas pocas bases mal emparejadas son "alelo discriminadoras". "Las sondas que se hibridan en al menos una condición de detección aplicable no solo a las secuencias perfectamente complementarias sino también a las secuencias parcialmente complementarias que tienen una o más bases mal emparejadas son las sondas "tolerantes a los errores por apareamiento".

5 "Colorante de ADN fluorescente", como se usa en la presente memoria, significa una composición, por ejemplo, SYBR Green I o SYBR Gold, que se vuelve excitable como fluorescente cuando se asocia con ADN bicatenario. Se ha mostrado que los tintes de ADN fluorescentes se intercalan en ADN bicatenario, pero no se desea vincularse a ninguna teoría de la operación.

10 Los inventores describen cebadores que se usan junto con un colorante de ADN fluorescente y son oligonucleótidos monocatenarios lineales marcados con un fluoróforo que es excitable indirectamente, es decir, cuando el cebador se hibrida con una cadena plantilla en la mezcla de reacción forma una región de ADN bicatenario y luz (usualmente luz visible, pero no necesariamente) de una longitud de onda que excita, o que es absorbida, por el colorante fluorescente de ADN, aunque no se ilumine el fluoróforo en la muestra, el fluoróforo emite. Se ha mostrado que la energía se transfiere desde un colorante de ADN fluorescente a un fluoróforo cercano mediante transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), pero no se desea estar sujeto a ninguna teoría de operación. Los inventores se refieren a un fluoróforo que emite en esta circunstancia como un fluoróforo que está "excitado indirectamente". Los inventores describen sondas similares que se usan igualmente junto con un colorante fluorescente que se une al ADN bicatenario (un "colorante de ADN fluorescente") y se marcan con dicho fluoróforo indirectamente excitable de manera que cuando la sonda se hibrida con una cadena diana en la mezcla de reacción y el tinte se excita, el fluoróforo emite.

15 Tal como se usa en la presente memoria, "kit" significa una colección de reactivos para realizar una amplificación o ensayo. Un kit puede ser "completo", es decir, incluir todos los reactivos necesarios para todos los pasos de una amplificación o amplificación-detección. Alternativamente, un kit puede ser "parcial", omitiendo ciertos reactivos necesarios para esas operaciones. Tanto los kits completos como los parciales pueden incluir adicionalmente reactivos para la preparación de muestras, tales como el aislamiento de ácidos nucleicos y la transcripción inversa. La secuenciación puede incluir dos kits, por ejemplo, un kit completo de amplificación LATE-PCR y un kit completo de secuenciación cíclica, o los dos pueden combinarse en un solo kit.

20 Como se usa en el presente documento, un "conjunto de oligonucleótidos" significa una colección de cebadores o cebadores y sondas para realizar una amplificación o ensayo. Para la secuenciación, un conjunto de oligonucleótidos puede incluir, por ejemplo, el cebador limitante y el cebador en exceso para una amplificación de LATE-PCR y uno o más cebadores de secuenciación adicionales para la secuenciación de ciclos. Para un ensayo con sonda de hibridación, un conjunto de oligonucleótidos puede incluir, por ejemplo, el cebador limitante y el cebador en exceso para una amplificación por LATE-PCR y, al menos, una sonda de hibridación marcada con fluoróforo.

25 Como se usa en la presente memoria, un método de "un solo tubo" significa una serie de al menos dos operaciones, por ejemplo, preparación, amplificación o secuenciación de muestra, que pueden realizarse sin transferir la muestra de un recipiente, ya sea un tubo de ensayo, un pocillo de reacción, una cámara en un dispositivo microfluídico, un portaobjetos de vidrio o cualquier otro aparato capaz de contener una mezcla de reacción, a otro recipiente.

30 Las sondas que tienen bajas temperaturas de fusión (es decir, las sondas que forman híbridos sonda-diana que tienen bajas temperaturas de fusión) pueden agregarse a las mezclas de reacción de amplificación antes del inicio de la amplificación y utilizarse solo cuando se desee. Manteniendo las temperaturas por encima de la temperatura de fusión de una sonda durante la totalidad o en parte de una reacción de amplificación, la sonda se mantiene hibridada con su diana, posiblemente reduciendo la eficacia de la reacción. Ciertas realizaciones de ensayos de LATE-PCR utilizan sondas de baja temperatura. Tal como se usa en el presente documento, "sonda de baja T_m " significa una sonda de hibridación que tiene una temperatura de fusión ajustada por concentración al comienzo de la amplificación, $T_{m[0]}$, al menos 5°C por debajo de la $T_{m[0]}$ del cebador limitante en un ensayo de LATE-PCR; y una "sonda súper baja- T_m " significa una sonda de hibridación que tiene una $T_{m[0]}$ que está al menos 5°C por debajo de la temperatura media de apareamiento del cebador de la fase exponencial de una reacción LATE-PCR. Con frecuencia se agregan sondas a las reacciones de LATE-PCR a una concentración de 1 micromolar (μM). Por lo tanto, al diseñar las sondas, a veces se utiliza una $T_{m[0]}$ nominal calculada como se describió anteriormente pero que utiliza una concentración nominal de 1 μM . La mayoría de las sondas de baja T_m y súper-baja T_m tienen una $T_{m[0]}$ calculada a una concentración de 1 μM en el intervalo de 30-55°C.

35 La detección que utiliza sondas de baja temperatura requiere una detección a baja temperatura, en la que la temperatura de la mezcla sonda-diana se reduce lo suficiente para que las sondas marcadas fluorescentemente se hibriden y señalicen. Esto puede hacerse al final de la amplificación (punto final) o en un análisis de fusión posterior a la amplificación. Alternativamente, puede incluirse una etapa de detección a baja temperatura en algunos o todos los ciclos de la fase lineal de una amplificación LATE-PCR para un ensayo a tiempo real. Preferiblemente, tal etapa ocurre después de la extensión del cebador y antes de la fusión de la cadena a alta temperatura (o "desnaturalización"), aunque podría incluirse en la etapa de recocido del cebador. Un paso de detección a baja

temperatura en un ensayo LATE-PCR significa una reducción de la temperatura de al menos 5°C por debajo de la temperatura de recocido del cebador.

5 Los inventores describen ciertos métodos que utilizan cebadores o sondas de hibridación marcados con fluoróforo en combinación con colorantes fluorescentes que se unen al ADN bicatenario y que incluyen estimular un colorante a una longitud de onda que excita el colorante pero no el fluoróforo o los fluoróforos y detectar la fluorescencia emitida por un fluoróforo estimulado indirectamente por este procedimiento. Algunos métodos descritos en este documento incluyen detectar la emisión de fluorescencia del tinte también. Ciertos métodos preferidos incluyen además calcular la relación de emisión de fluoróforo a emisión de colorante.

10 Los inventores describen añadir a una mezcla de amplificación de ácido nucleico un colorante de ADN fluorescente, tal como SYBR Green I, o preferiblemente SYBR Gold, y al menos un cebador de amplificación, es decir, un oligonucleótido monocatenario lineal que es extensible por una ADN polimerasa y que está marcado con un fluoróforo que es excitable indirectamente para señalar el cebado como se describió anteriormente; realizar una reacción de amplificación, preferiblemente una reacción de PCR (que incluye LATE-PCR), que incluye hibridar y extender ese cebador marcado; y o bien durante la amplificación (detección en tiempo real) o bien después de la finalización de la amplificación (ya sea una detección de punto final al final de la reacción de amplificación o durante un posterior análisis térmico (curva de fusión)) excitar el tinte y detectar la emisión de fluorescencia del fluoróforo, ya sea solo o en combinación con la detección de la emisión de fluorescencia del colorante. Mediante el diseño del protocolo de amplificación apropiado, se puede incluir el análisis de fusión de productos bicatenarios en los puntos deseados en una reacción de amplificación. Solo los cebadores que se incorporan en el ADN bicatenario fluorescerán. Los cebadores no incorporados no emitirán fluorescencia, por lo que no es necesario separar físicamente los cebadores no unidos. El método es homogéneo. Además, la emisión de fluoróforos solo proviene de regiones bicatenarias de productos que incluyen un cebador marcado, no de todos los productos bicatenarios. El ejemplo 1 a continuación demuestra estas mejoras. Muestra que en un ciclo de extensión única diseñado para producir productos de extensión mixta de varias longitudes, una curva de fusión basada en la detección de emisiones del fluoróforo del cebador mostró todos los productos, mientras que una curva de fusión basada en la detección de emisiones del tinte no. El Ejemplo 1 demuestra también el uso de este método en reacciones isotérmicas.

30 Como apreciará una persona versada en la técnica, generalmente es importante corregir la superposición de fluorescencia cuando se usa un colorante de ADN fluorescente, por ejemplo SYBR Green I, junto con un cebador o sonda marcado fluorescentemente que se excita con FRET del tinte intercalado. Este es el caso porque los tintes de ADN fluorescentes típicamente emiten luz en un amplio rango espectral que puede incluir la longitud de onda de la luz utilizada para medir la fluorescencia emitida por el cebador o la sonda. La corrección deseada se puede lograr: 1) estableciendo el espectro de emisión del colorante solo; 2) midiendo la intensidad de la emisión del colorante en cada muestra a una longitud de onda que es más corta que la longitud de onda de emisión del cebador o sonda; 3) calculando la intensidad de la emisión de colorante a la longitud de onda de emisión del cebador o sonda en el conocimiento de los pasos 1 y 2; y 4) restando esa intensidad de colorante calculada de la intensidad total medida a la longitud de onda de emisión del cebador o sonda. Muchas máquinas comerciales, tales como la ABI 7700 y la Cepheid Smart Cycler proporcionan un software para llevar a cabo esta corrección. Alternativamente, se pueden realizar las medidas del espectro del colorante, la emisión del colorante solo y la emisión total de colorante/sonda y se puede aplicar manualmente una fórmula satisfactoria para la corrección. Por ejemplo, Lee y Fuerst, Solicitud de Patente Publicada en los Estados Unidos, Pub. No. US 2002/0119450, describen una fórmula de este tipo para la medición y la corrección manual del solapamiento de fluorescencia SYBR Green I en el ciclador de luz.

40 Todos los ejemplos descritos en esta solicitud se llevaron a cabo en el ABI 7700 y el software de la máquina se utilizó para corregir el solapamiento de fluorescencia en todos los casos en que se utilizó un colorante fluorescente de ADN junto con un cebador o sonda fluorescente indirectamente excitado, independientemente de si solo se registró la fluorescencia del tinte.

50 Para amplificaciones por PCR que utilizan un único par de cebadores, en el que al menos un cebador está marcado con fluoróforo para la excitación indirecta como se describió anteriormente, un análisis de la curva del fundido puede distinguir entre el(los) producto(s) pretendido(s) y productos no específicos. Para amplificaciones por PCR multiplex que utilizan pares de cebadores múltiples, en donde al menos un miembro de cada par está marcado con fluoróforo y se utiliza un fluoróforo diferente para cada par, los diferentes productos previstos pueden distinguirse por el color y por las temperaturas de fusión asociadas con los diferentes fluoróforos. Para amplificaciones de PCR en general, las emisiones de fluoróforos y las emisiones del tinte se pueden controlar durante la reacción para rastrear la acumulación de productos específicos y rastrear la acumulación de todos los productos de doble cadena, respectivamente.

60 Los análisis de las reacciones de amplificación pueden utilizar la proporción de emisiones de fluoróforos, una señal específica para cebadores o sondas hibridadas, respecto a la señal de emisión del colorante, que no es tan específica. Tal relación, por ejemplo, corrige las variaciones entre reacciones repetidas. Además, los análisis pueden utilizar el pico de fusión de la plantilla de cebador, que disminuye en magnitud a medida que se incorpora el cebador marcado en los productos o los productos de extensión.

Los inventores describen kits de amplificación y kits parciales que incluyen un colorante de ADN fluorescente, al menos un par de cebadores que incluye un cebador marcado con un fluoróforo que se excita indirectamente cuando se excita el colorante, y reactivos para amplificar la región definida por los cebadores, preferiblemente por LATE-PCR.

- 5 Una realización de un método de acuerdo con esta invención incluye la adición a una mezcla de amplificación de ácido nucleico de un colorante de ADN fluorescente, tal como SYBR Green I o, preferiblemente, SYBR Gold, y al menos una sonda de hibridación de baja- T_m o super-baja- T_m discriminante de alelos, inactivada e indirectamente excitable, que puede ser una sonda descrita en este documento. Las sondas discriminantes de alelos descritas en este documento son el tipo de sondas bicatenarias descritas por Li, Q. et al. (2002), "A New Class of Homogeneous Nucleic Acid Probes Based on Specific Displacement Hybridization", Nucl. Acid Res. 30: (2) e5 (una cadena de sonda oligonucleotídica lineal marcada con fluoróforo complementaria a la diana, y una cadena complementaria marcada como atenuador que es más corta que la cadena de la sonda, generalmente por 2-10 nucleótidos), excepto que están marcadas con una fluoróforo que se excita indirectamente al excitar el colorante, y que tienen una temperatura de fusión baja adecuada para su uso en amplificaciones de LATE-PCR como sondas de baja- T_m o super-baja- T_m . La capacidad de discriminación de alelos de las sondas bicatenarias puede ajustarse como ha sido descrito por Li et al., al igual que el nivel de fluorescencia de fondo. Además, la fluorescencia de fondo puede reducirse incluyendo residuos de guanidina adyacentes al resto fluorescente, entonces llamado "G-apagamiento".

Los inventores describen la amplificación utilizando tal mezcla y la detección a una temperatura a la que la sonda se hibrida de una manera discriminante de alelos. Los métodos preferidos incluyen usar un paso de detección a baja temperatura durante la fase de amplificación lineal de una reacción LATE-PCR, en donde las sondas anteriores se hibridan con el amplicón monocatenario que se está sintetizando, excitándose el colorante fluorescente del ADN a una longitud de onda a la que no se excita el fluoróforo o fluoróforos directamente, y leyendo la fluorescencia del fluoróforo de la sonda o de los fluoróforos de las sondas, que se excita o se excita indirectamente de esta manera. Los inventores también describen la amplificación seguida de una detección a baja temperatura como una determinación del punto final. Los inventores describen además detectar la emisión desde el tinte, y ciertas realizaciones preferidas incluyen calcular una relación de emisión de sonda (s) a emisión de tinte. La detección de la emisión del colorante se realiza más preferiblemente al comienzo de la etapa de detección, mientras que la temperatura de la mezcla de reacción está por encima de las temperaturas de fusión de todas las sondas que están presentes. Los datos de las moléculas de doble cadena acumuladoras o acumuladas (la señal del colorante) y de las moléculas monocatenarias acumuladoras o acumuladas (la señal de cada sonda) se pueden usar para construir relaciones de la manera descrita. Estos métodos también incluyen el uso de sondas de balizas moleculares de baja temperatura, como se describe en la solicitud publicada WO 03/054233, si el marcador fluoróforo se estimula por la emisión del tinte pero no por la longitud de onda utilizada para excitar el tinte.

Los inventores describen kits de ensayo LATE-PCR y kits parciales que incluyen reactivos para realizar una amplificación no simétrica, preferiblemente una amplificación LATE-PCR, con un paso de detección a baja temperatura (punto final o tiempo real) y que incluyen un colorante fluorescente de ADN, al menos un par de cebadores, preferiblemente un par de cebadores de LATE-PCR que incluye un cebador en exceso y un cebador limitante y, al menos, una sonda de hibridación de baja- T_m o super-baja- T_m marcada con fluoróforo para un producto monocatenario de la reacción de amplificación (producto de extensión del cebador presente en exceso), en el que la sonda no es tolerante a los errores de apareamiento sino que es discriminante de alelos a la temperatura de detección prevista, y en el que el fluoróforo de la sonda se excita indirectamente por excitación del colorante. En kits preferidos y kits parciales, al menos una sonda es una sonda discriminante de alelos. Los inventores describen conjuntos de oligonucleótidos que incluyen al menos un par de cebadores para la amplificación no simétrica, preferiblemente la amplificación por LATE-PCR y, al menos, una sonda de doble cadena que discrimina alelos, inactivada de baja- T_m o super-baja- T_m marcada con un fluoróforo para ser excitable indirectamente como se describió anteriormente, preferiblemente mediante un colorante SYBR, así como también las propias sondas bicatenarias.

Los inventores describen la adición a una mezcla de reacción de amplificación no simétrica, preferiblemente una mezcla de reacción LATE-PCR, reactivos de detección que comprenden un colorante de ADN fluorescente tal como SYBR Gold y al menos una sonda de hibridación lineal de cadena sencilla tolerante a los errores de apareamiento que es perfectamente complementaria a una posible secuencia diana de amplicón monocatenario que puede o no estar presente para la amplificación en la reacción y es menos que perfectamente complementaria a al menos otra posible secuencia diana de amplicón monocatenario que puede estar presente. Las sondas pueden ser cadenas simples marcadas con un fluoróforo que se puede excitar indirectamente por emisión de fluorescencia del colorante. Son sondas de baja- T_m o, preferiblemente, super-baja- T_m con respecto a sus dianas más complementarias posibles que pueden estar presentes, generalmente significando una diana perfectamente coincidente. Se prefiere que tengan una $T_{m[0]}$ contra la diana perfectamente complementaria que no sea más que unos pocos grados más alta, y preferiblemente por debajo, más preferiblemente al menos 5°C por debajo de la temperatura de apareamiento del cebador durante la fase de amplificación exponencial de la reacción de amplificación. Las sondas pueden ser sondas lineales (o de cola aleatoria), o sondas de cola aleatoria, es decir, inactivadas para eliminar la señal debida a la formación de una estructura secundaria a bajas temperaturas. Las sondas lineales inactivadas tienen preferiblemente un fluoróforo en un extremo y un resto atenuador no fluorescente en el otro extremo, el que está en

el extremo 3' de la sonda reemplazando el tapón de fosfato agregado para evitar que la sonda se extienda; es decir, funcione como un cebador.

La mezcla anterior puede estar sometida a una amplificación no simétrica, preferiblemente LATE-PCR, para generar moléculas de amplicón monocatenario y someter la mezcla de reacción de amplificación a un análisis térmico que utiliza al menos una sonda tolerante a los errores de apareamiento que señala bajo la hibridación. El análisis térmico puede realizarse no solo después de que se complete la reacción de amplificación, sino también durante un paso de detección de baja temperatura LATE-PCR durante los ciclos térmicos en los que se produce el producto monocatenario; es decir, después del agotamiento del cebador limitante. El análisis térmico revela las dianas de cada sonda de acuerdo con las temperaturas de fusión de los híbridos sonda-diana que se forman o se desestabilizan a medida que se baja o aumenta la temperatura, respectivamente. A medida que baja la temperatura, una sonda se hibridará primero con su diana perfectamente apareada (si está presente) y emitirá una señal fluorescente. A medida que la temperatura se reduce aún más, la sonda se hibridará sucesivamente con dianas progresivamente "más desapareadas" y emitirá un aumento de la señal fluorescente en cada ocasión. Como se explica en conexión con las realizaciones previas, la emisión del colorante de ADN fluorescente también se puede detectar, preferiblemente cuando las sondas no se hibridan; es decir, a una temperatura superior a la T_m de la(s) sonda(s), para permitir el control de la acumulación de moléculas bicatenarias en la reacción y para permitir el uso de relaciones para reducir la dispersión entre las muestras replicadas.

Los inventores describen kits que contienen reactivos para la amplificación no simétrica, preferiblemente una amplificación por LATE-PCR, que incluye un colorante de ADN fluorescente, al menos un par de cebadores, preferiblemente un par de cebadores LATE-PCR que incluye un cebador en exceso y un cebador limitante, y al menos una sonda de cola aleatoria de baja- T_m o super-baja T_m tolerante a los errores de apareamiento, inactivada si fuera necesario, para uno o varios productos de amplificación monocatenario, así como kits parciales y conjuntos de oligonucleótidos que contienen dichos cebadores y sondas, y tales propias sondas.

Los métodos descritos en este documento que utilizan una etapa de detección a baja temperatura de los ensayos LATE-PCR, preferiblemente una etapa de detección a baja temperatura después de la extensión del cebador y antes de la fusión de la cadena, incluyen ensayos de sonda múltiple que contienen más de un par de cebadores y generan uno o más amplicones monocatenarios (una sonda para cada diana) así como ensayos de múltiples sondas que contienen al menos una sonda para dianas múltiples. Ciertos métodos preferidos con una etapa de detección a baja temperatura incluyen una etapa de detección a baja temperatura después de la extensión del cebador y antes de la fusión de la cadena. Durante la etapa de detección en dichos ensayos, la temperatura puede reducirse hasta 30°C o incluso 40°C por debajo de la temperatura de recocido del cebador, proporcionando una gran ventana de temperatura para la detección. Las sondas discriminantes de alelos, además de ser diferenciables por el color (longitud de onda de emisión de fluoróforo) se pueden diferenciar por las diferencias en la temperatura de fusión. Por ejemplo, cuatro diferentes sondas alelo-discriminantes marcadas con FAM con T_m de 30, 35, 40 y 45°C, respectivamente, contra sus dianas se pueden distinguir a tiempo real o después de la amplificación como una determinación del punto final, ya que la temperatura de reacción se reduce o aumenta, no solo por análisis de fusión posterior a la amplificación. Este grado adicional de libertad multiplica significativamente el número de sondas diferentes que se pueden usar en la misma reacción. Las sondas tolerantes a los errores de apareamiento tendrán menores T_m frente a las dianas no coincidentes que frente a las dianas perfectamente coincidentes. Las combinaciones de sondas tolerantes a los errores de apareamiento de baja temperatura de colores diferentes que dan señales bajo la hibridación producen patrones de curvas de emisión de fluorescencia dependientes de la temperatura durante la detección a baja temperatura. Dichos métodos incluyen el uso de tales curvas de emisión, curvas derivadas y relaciones de cualquiera de ellas a una temperatura o temperaturas diferentes para identificar los constituyentes de dianas mixtas con análisis de fusión posterior a la amplificación y también a tiempo real controlando la fluorescencia a varias temperaturas dentro de la ventana del paso de detección de baja temperatura LATE-PCR. Las relaciones pueden incluir la misma sonda/sonda, diferentes proporciones de sonda/sonda, relaciones sonda/colorante y combinaciones de los mismos.

Los kits de LATE-PCR, los kits parciales y los conjuntos de oligonucleótidos pueden incluir al menos dos sondas discriminantes de alelos del mismo color que pueden distinguirse por la T_m o al menos dos sondas tolerantes a los errores de apareamiento cuya hibridación con diferentes dianas puede distinguirse por la T_m , preferiblemente sondas de cola aleatoria inactivadas que se excitan indirectamente al excitar un colorante de ADN fluorescente.

Esta invención incluye métodos mejorados para preparar los productos de amplificación de amplificaciones de LATE-PCR para reacciones de secuenciación, ya sea secuenciación dideoxi o métodos de secuenciación por síntesis tales como la pirosecuenciación. En particular, los inventores han demostrado la generación y preparación de dichos materiales de partida en un único recipiente de reacción, por ejemplo, un tubo de microcentrífuga. Las realizaciones preferidas incluyen en la mezcla de reacción de LATE-PCR un reactivo para inhibir el cebado defectuoso.

Para la secuenciación dideoxi, los inventores han demostrado la preparación de productos de amplificación LATE-PCR para la secuenciación mediante el paso único de dilución de muestra, un método al que se hace referencia como "diluir y listo". Para la pirosecuenciación, los inventores han demostrado métodos que requieren solo la adición

de enzima de pirosecuenciación/reactivos de sustrato a la mezcla del producto LATE-PCR antes del recocido del cebador.

Los métodos de acuerdo con esta invención también incluyen la amplificación por LATE-PCR y la preparación de la muestra para la pirosecuenciación en el mismo recipiente, tal como el mismo tubo de reacción o la misma cámara de un dispositivo microfluídico, todos los cuales se denominan para abreviar como métodos de "un único tubo". En la pirosecuenciación tradicional, el ADN se amplifica mediante PCR simétrica en la que un cebador se marca en 5' con una molécula de biotina. Después de la amplificación, se usan perlas recubiertas con estreptavidina junto con un equipo magnético o de vacío para aislar el ADN monocatenario (ADNmc) y eliminar los componentes residuales de la reacción de PCR que interfieren con la pirosecuenciación, incluyendo el pirofosfato (PPi), los dNTP y los cebadores de la PCR. En virtud de su capacidad para generar ADNmc, la LATE-PCR elimina la necesidad de separación de cadenas y simplifica la preparación de muestras cuando se combina con un método que usa el mismo recipiente para eliminar los cuatro componentes interferentes que quedan de la PCR. En uno de estos métodos, la necesidad de eliminar los dNTP que quedan al final de la amplificación se minimiza usando cantidades limitantes de los dNTP en la mezcla de reacción de amplificación LATE-PCR, teniendo cuidado de utilizar una cantidad suficiente para producir suficiente ADNmc para la pirosecuenciación. Una enzima con actividad de pirofosfatasa, por ejemplo, una pirofosfatasa tal como una pirofosfatasa de levadura, se agrega al producto de amplificación para eliminar PPi y la mezcla se calienta para desnaturalizar esa enzima antes de proceder a la pirosecuenciación. Debido a que el cebador limitante no permanece después de la amplificación LATE-PCR y el cebador en exceso residual no puede cebar la cadena extendida del cebador en exceso durante la amplificación (cadena de cebador en exceso), no necesitan eliminarse los cebadores sobrantes en muchos casos. Sin embargo, se puede evitar el posible cebado defectuoso al incluir en la mezcla de reacción de LATE-PCR un oligonucleótido que se hibride con el cebador en exceso a temperaturas por debajo de la T_m del cebador en exceso, incluyendo la temperatura utilizada para la pirosecuenciación. Alternativamente, puede añadirse un oligonucleótido bloqueado para la extensión en el extremo 3' y completamente complementario al cebador en exceso después de la amplificación por LATE-PCR pero antes de la pirosecuenciación para evitar un potencial cebado defectuoso por el exceso de cebador a las temperaturas usadas para la pirosecuenciación. Una tercera estrategia para evitar el cebado defectuoso por el exceso de cebador en el extremo 3' de la cadena extendida desde el cebador limitante durante la amplificación (cadena de cebador limitante) implica el uso de una concentración suficiente de un oligonucleótido bloqueado en 3' que contiene la misma secuencia que el cebador en exceso para desplazar el cebador en exceso de los sitios de enlace.

El método de los inventores más preferido de preparación de muestras de "un solo tubo" evita la necesidad de determinar las concentraciones de dNTP limitantes apropiadas para amplificaciones particulares. En este método, los inventores primero agregaron los reactivos enzima de pirosecuenciación/sustrato al producto LATE-PCR, que elimina los dNTP y PPi. Los inventores siguieron esto con el recocido de cebadores usando un cebador de secuenciación agregado y luego se agregaron los dNTP individuales para la pirosecuenciación. Alternativamente, se pueden eliminar los dNTP mediante la adición de una enzima purificada con actividad de dNTPasa, tal como la apirasa de patata, seguido de calentamiento para inactivar la enzima y se puede eliminar el pirofosfato mediante la adición de una enzima purificada con actividad de pirofosfatasa, tal como la pirofosfatasa de levadura, seguido de calentamiento para inactivar la enzima. Si se emplean ambas enzimas, se pueden agregar al mismo tiempo.

Los ensayos de acuerdo con esta descripción, particularmente los ensayos de LATE-PCR, incluyen preferiblemente medios para evitar la formación de cebados defectuosos, lo que puede causar una disminución en la señal de la sonda en las últimas etapas de la reacción. Los inventores han evitado con éxito este "efecto de gancho" al incluir en la mezcla de reacción un reactivo supresor de cebados defectuosos. También los inventores han evitado ese efecto ajustando la concentración de polimerasa añadida a la reacción. Se puede observar una reducción de cebados defectuosos ajustando la polimerasa en términos de la cinética de la reacción de LATE-PCR usando una sonda del ADNmc, así como también por la composición del producto final revelada por diversos medios conocidos en la técnica.

Descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra el uso de cebadores marcados fluorescentemente para el análisis de la curva de fusión.

La Fig. 2 muestra la reducción de la dispersión de señal a través del uso de relaciones del producto monocatenario al producto bicatenario.

La Fig. 3 muestra una comparación de la identificación de cinco especies de micobacterias mediante el análisis de curvas de fusión obtenidas con sondas tolerantes a los errores de apareamiento convencionales frente al gen de ARN ribosómico 16S o dos versiones diferentes de sondas tolerantes a los errores de apareamiento inactivadas frente a la misma diana.

La Fig. 4 muestra la identificación de cinco especies de micobacterias usando solo dos sondas tolerantes a los errores de apareamiento frente al gen de ARN ribosómico 16S.

- La Fig. 5 muestra la identificación de cinco especies de micobacterias mediante el primer análisis derivado de las curvas de fusión mostradas en la FIG. 3 usando dos sondas tolerantes a los errores de apareamiento frente al gen de ARN ribosómico 16S.
- 5 La Fig. 6 muestra la identificación de cinco especies de micobacterias usando relaciones de señales fluorescentes recogidas a diferentes temperaturas de dos sondas tolerantes a los errores de apareamiento frente al gen de ARN ribosómico 16S.
- La Fig. 7 muestra el genotipado de punto final de muestras homocigotas y heterocigóticas para la mutación G269 del gen Hex A humano usando LATE-PCR y una única sonda tolerante a los errores de apareamiento de baja- T_m frente al alelo de tipo silvestre.
- 10 La Fig. 8 muestra la identificación separada de tres alelos diferentes del gen del regulador transmembrana de la fibrosis quística humana (CFTR) usando LATE-PCR, sondas de baja- T_m discriminantes de alelos marcadas con el mismo color y análisis de primera derivación de curvas de fusión.
- La Fig. 9 muestra la identificación simultánea de diferentes combinaciones de diversos alelos del gen del regulador transmembrana de la fibrosis quística humana (CFTR) usando sondas de baja- T_m discriminantes de alelos marcadas con el mismo color, y análisis de primera derivación de curvas de fusión.
- 15 La Fig. 10 muestra la identificación de diferentes combinaciones de alelos del gen del regulador transmembrana de la fibrosis quística humana (CFTR) representando los cambios en la fluorescencia a dos temperaturas.
- La Fig. 11 muestra dos ensayos de normalización de temperatura (con corrección de fondo).
- La Fig. 12 muestra dos ensayos de normalización de temperatura (sin corrección de fondo).
- 20 La Fig. 13 muestra tres ensayos de normalización de temperatura.
- La Fig. 14 muestra una comparación del método de preparación de "diluir y listo" de muestras de LATE-PCR para la pirosecuenciación según los métodos de la invención en relación con el método convencional de preparación de las muestras de LATE-PCR para el mismo ensayo.
- 25 La Fig. 15 es un pirograma obtenido a partir de células individuales preparadas por el método de LATE-PCR de un solo tubo. Las flechas indican el sitio de la β -globina IVS 110 de: a) células homocigóticas de tipo salvaje, b) heterocigotas y c) mutantes homocigóticas.
- La Fig. 16 es el pirograma de una reacción de pirosecuenciación llevada a cabo para más de cincuenta pares de bases. El orden de dispensación de los nucleótidos se enumera debajo de cada pico y la secuencia esperada se anota por encima.
- 30 La Fig. 17 son cromatogramas de secuenciación didesoxi resultantes del método de "diluir y listo" de preparación de las muestras de LATE-PCR para la secuenciación didesoxi de acuerdo con los métodos de la invención y del método convencional de preparación de muestras de LATE-PCR para el mismo ensayo.
- La Fig. 18 es un gel de electroforesis de una amplificación LATE-PCR de más de un producto a partir de la misma plantilla de ADN en la misma reacción.
- 35 La Fig. 19 es un cromatograma de la secuenciación de didesoxi diluida y lista del producto de la amplificación por LATE-PCR de la Fig. 18.
- La Fig. 20 muestra que la cantidad de ADNmc y ADN de doble cadena generada por una amplificación por LATE-PCR se puede medir independientemente y se puede usar para calcular la relación ADNmc/ADNdc que, a su vez, se puede usar para determinar si la cantidad de ADNmc acumulada hasta el momento es suficiente para la secuenciación posterior mediante el método de "diluir y listo".
- 40 La Fig. 21 son cromatogramas de secuenciación didesoxi resultantes del método "diluir y listo" empleado en una mezcla 50:50 de amplicones de LATE-PCR que tienen dos secuencias estrechamente relacionadas, pero diferentes.
- La Fig. 22 muestra el rango de sensibilidad de amplicones LATE-PCR mixtos que tienen secuencias estrechamente relacionadas, pero diferentes que se pueden distinguir mediante el método de "diluir y listo".
- 45 La Fig. 23 muestra que puede usarse una LATE-PCR junto con al menos una única sonda tolerante a los errores de apareamiento para generar curvas de fusión de punto final que, a su vez, pueden usarse para cuantificar las cantidades relativas de dos o más amplicones de LATE-PCR mixtos que tienen secuencias estrechamente relacionadas, pero diferentes.
- 50 La Fig. 24 muestra la cinética de varios ensayos de LATE-PCR llevados a cabo usando dos concentraciones diferentes de Taq polimerasa con cada una de tres cantidades diferentes de ADN genómico.

Los símbolos de referencia similares en los diversos dibujos indican elementos similares.

Los inventores describen ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, ensayos de PCR, que incluyen la detección de la emisión de fluorescencia de al menos un cebador marcado con fósforo que se excita, no aplicando directamente luz (visible o no) de una longitud de onda fuertemente absorbida por el fluoróforo, pero indirectamente aplicando luz de una longitud de onda que excita un colorante de ADN fluorescente cercano, tal como SYBR Green o, preferiblemente, SYBR Gold, así como kits completos y parciales que contienen todos o algunos reactivos de amplificación y conjuntos de oligonucleótidos que contienen dichos cebadores marcados, y también los propios cebadores.

Los cebadores de amplificación son bien conocidos. Los cebadores son oligonucleótidos cortos, generalmente de menos de cincuenta bases de longitud que se hibridan con una cadena diana y se extienden mediante una polimerasa apropiada. Un cebador puede estar compuesto de nucleótidos naturales, o puede incluir nucleótidos no naturales y enlaces internucleótidos no naturales. Aunque los cebadores son generalmente oligonucleótidos lineales, pueden incluir una estructura secundaria. (Véase, por ejemplo, Nazarenko IA, Bhatnagar SK, Hohman RJ (1997), "A Closed Tube Format for Amplification and Detection of DNA Based on Energy Transfer", *Nucleic Acids Res.* 25:2516-2521). Las amplificaciones a menudo incluyen el uso de uno o más pares de cebadores que consisten cada uno en un cebador directo y un cebador inverso. En los métodos, kits y conjuntos de oligonucleótidos descritos en este documento, o bien un cebador de un par o ambos cebadores del par pueden marcarse con un fluoróforo unido covalentemente que fluoresce cuando se estimula el colorante de ADN fluorescente cercano. Cuando el cebador marcado se hibrida (o aparea) con su secuencia complementaria en una cadena molde, se forma una región bicatenaria. El colorante de ADN fluorescente se asocia con esa región, intercalándose en ella o no, y se vuelve fluorescente en esa región, que está cerca del fluoróforo del cebador, de modo que cuando el colorante se estimula a una longitud de onda que no excita directamente el fluoróforo, el fluoróforo emite a su longitud de onda característica. Estos cebadores pueden usarse para controlar la síntesis de productos resultante de la extensión de una ADN polimerasa tal como los resultantes de la PCR y de los ensayos de extensión de cebador en tiempo real o por detección de punto final y/o para evaluar la especificidad del producto mediante el análisis de la curva de fusión.

Los cebadores descritos en este documento, usados como sustrato para la extensión por una ADN polimerasa, que incluyen cebadores para la amplificación por PCR (simétricos o no simétricos, que incluyen particularmente LATE-PCR), están marcados en cualquier posición de nucleótido con un fluoróforo unido covalentemente de tal manera que el extremo 3' del cebador oligonucleotídico permanece disponible para la extensión. Los cebadores pueden tener el diseño de las sondas bicatenarias descritas por Li, Q. et al. (2002) ("A New Class of Homogeneous Nucleic Acid Probes Based on Specific Displacement Hybridization", *Nucl. Acid Res.* 30: (2) e5). La única restricción de secuencia en el oligonucleótido del cebador es que el oligonucleótido no debe tener ninguna estructura secundaria que por sí misma conduzca a la excitación fluorófora indirecta, lo que significa que generalmente no hay una estructura secundaria mayor que 2 pares de bases. El resto fluoróforo no debe excitarse apreciablemente directamente, sino que el colorante debe excitarse directamente mediante la longitud de onda de la fuente de excitación utilizada; el fluoróforo debe emitir cuando el colorante de ADN fluorescente se excita en su presencia inmediata, generalmente no mayor que la distancia a la que se somete el fluoróforo a la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET); y el espectro de emisión del fluoróforo elegido debe distinguirse del espectro de emisión del colorante de ADN fluorescente mediante el uso de filtros o deconvolución espectral. En estas condiciones, el fluoróforo fluoresce tras la incorporación al producto bicatenario después del recocido del cebador, incluida la extensión por una ADN polimerasa. La pérdida de fluorescencia tiene lugar durante el calentamiento cuando se alcanza la temperatura de fusión (T_m) del tramo particular de ADN bicatenario que contiene el fluoróforo.

Las condiciones para el uso de cebadores descritos en este documento junto con tintes de ADN fluorescentes (cebador y concentración de colorante de ADN, longitud de onda de excitación del colorante de ADN) son las mismas que las conocidas en la técnica para controlar la síntesis de productos de reacciones de extensión de cebador (incluyendo PCR) en el curso de la reacción y para evaluar la especificidad del producto de extensión por el análisis de la curva de fusión utilizando solo colorantes de ADN fluorescentes con la excepción de que la fluorescencia se recoge a la longitud de onda de emisión correspondiente al fluoróforo de impresión en lugar de o además de la longitud de onda de emisión del colorante. En estas condiciones, las señales de fluorescencia se originan a partir de secuencias bicatenarias que contienen los cebadores, en lugar de todas las secuencias bicatenarias en la reacción.

La comparación del rendimiento del colorante de ADN con los métodos y sistemas descritos en este documento se realizó mediante el experimento presentado a continuación en el Ejemplo 1 y en la FIG. 1. Un cebador marcado con fluoróforo se extendió mediante ADN polimerasa en presencia de colorante verde SYBR y en presencia de un oligonucleótido no extensible relativamente largo hibridado con la cadena plantilla cerca de la región de extensión del cebador. Esto dio como resultado una mezcla de producto que tenía híbridos de cebador de cadena plantilla-no extendidos, productos cortos de extensión de cebador, y el oligonucleótido no extensible, de modo que los híbridos con la plantilla tenían una T_m que oscilaba desde 60°C (el cebador marcado con fluoróforo (Cy5)) a 79°C (el oligonucleótido no extensible), con productos de extensión de cebador que caen entre esas dos T_m .

Se realizó un análisis de curva de fusión estándar sobre la mezcla de reacción final (muestras duplicadas) utilizando tanto las lecturas de fluorescencia del colorante como las lecturas de fluorescencia del fluoróforo. Las curvas de

fusión se presentan en la FIG. 1. El panel A es la curva de fusión 1 obtenida utilizando emisiones de tinte. El único pico es 79°C, la temperatura de fusión del oligonucleótido no extensible. No se ve ningún otro pico, ni siquiera el del cebador no extendido. El panel A demuestra la migración del colorante SYBR Green al híbrido de T_m superior durante la generación de una curva de fusión, que enmascara la presencia de híbridos de T_m inferior. El panel B es la curva de fusión 2 obtenida utilizando emisiones de fluoróforos. Muestra un pico a 60°C, la T_m del híbrido de plantilla de cebador no extendido, y un pico adicional a una temperatura entre 69°C y 79°C; es decir, un pico indicativo del producto de extensión de cebador. Las T_m inferiores se ven a pesar de la tendencia del tinte a migrar, como lo muestran las curvas de fusión 1. La monitorización de la emisión de fluoróforos revela cada especie híbrida marcada con el fluoróforo en la mezcla en su concentración correcta.

En el caso de amplificaciones por PCR que utilizan un único par de cebadores, en donde al menos un miembro del par es un cebador como el descrito en este documento, el análisis de curva de fusión puede distinguir entre productos específicos y no específicos usando un solo fluoróforo porque el producto específico tiene una temperatura de fusión esperada y el producto inespecífico tiene una temperatura de fusión inesperada. En el caso de amplificaciones multiplex por PCR, que utilizan más de un par de cebadores, en el que al menos un miembro de cada par de cebadores es un cebador como el descrito en este documento, se pueden distinguir dos productos específicos diferentes ya que tienen valores de T_m diferentes, pero esperados, y/o porque los dos cebadores diferentes empleados están marcados con diferentes fluoróforos. Además, el análisis de la curva de fusión usando cebadores como los descritos en este documento se puede llevar a cabo durante una reacción de amplificación en curso o al final de una reacción.

La incorporación de uno o más cebadores como los descritos en este documento durante el curso de una reacción también puede usarse para medir cuantitativamente el grado de amplificación de una o más dianas durante el curso de una PCR, o la síntesis de uno o más tramos de ADN bicatenario durante el curso de una reacción de extensión isotérmica. En cualquier caso, la cantidad de la molécula o moléculas del producto bicatenario de longitud completa puede seguirse a lo largo del tiempo mediante la detección repetida del aumento de la fluorescencia, o puede medirse al final de una reacción. Además, la incorporación de uno o más cebadores como los descritos en este documento durante el transcurso de reacciones isotérmicas o de ciclos térmicos puede usarse para medir la existencia y/o acumulación de productos parciales, es decir, aquellos que han comenzado la extensión a lo largo de una cadena molde pero no han alcanzado su longitud máxima posible. En tales casos, las temperaturas de fusión de los productos parciales son inferiores a la temperatura de fusión del producto de longitud completa, pero son superiores a la temperatura de fusión del cebador marcado del que se derivan. Además, concomitantemente con la incorporación del cebador marcado en una hebra de producto de longitud parcial o completa, la magnitud del pico de temperatura de fusión generado a partir del cebador/molde híbrido ADN-ADN disminuye, y puede usarse como una medida adicional de la síntesis del ADN.

Como se indicó anteriormente, cada tramo de ADN bicatenario o amplicón sintetizado por incorporación de un cebador como se describe en este documento genera una señal fluorescente a la longitud de onda de emisión del fluoróforo ligado covalentemente del cebador, cuando se estimula indirectamente por FRET u otro mecanismo del tinte SYBR unido, una "señal específica del cebador". El mismo ADN bicatenario también genera una señal fluorescente en la longitud de onda de emisión del colorante SYBR, la "señal SYBR total", la suma de todas las secuencias bicatenarias presentes en la reacción, ya que todas las secuencias bicatenarias fluorescen, independientemente de si tienen un cebador marcado incorporado. Por lo tanto, los cebadores como se describen en este documento se pueden usar para analizar las señales fluorescentes en términos de la siguiente relación: (cebador-señal específica/señal SYBR total), en lo sucesivo el valor (PSS/TSS). El análisis de los datos en términos del valor (PSS/TSS) corrige las variaciones en la señal del colorante del ADN fluorescente (TSS) entre las reacciones repetidas. Esto es particularmente útil en el caso de amplificaciones de LATE-PCR porque la velocidad de síntesis de amplicón monocatenario es proporcional a la cantidad de amplicón bicatenario acumulado al final de la fase exponencial de la reacción. Por lo tanto, pequeñas diferencias en el nivel de ADN bicatenario entre las reacciones de replicación alteran la tasa de acumulación del amplicón monocatenario.

También es posible utilizar más de un cebador marcado con el mismo fluoróforo, siempre que los amplicones sean diferenciables mediante un análisis de curva de fusión posterior a la amplificación. Ver FIG. 1, Panel B, para la ejemplificación de este principio. La señal del fluoróforo común al final de una etapa de extensión, que puede ser el paso de extensión final (punto final) o los pasos de extensión intermedios, da una indicación del total de amplicones que incorporan el fluoróforo. El análisis de curva de fusión distingue entre productos y proporciona una medida cuantitativa de sus concentraciones.

LATE-PCR es una amplificación por PCR no simétrica que, entre otras ventajas, proporciona un gran "espacio de temperatura" en el que se pueden tomar medidas. Ver el documento WO 03/054233 y Sánchez et al. (2004), citado anteriormente. LATE-PCR permite el uso de sondas de hibridación de "baja- T_m " y "super-baja- T_m " para detectar productos de amplificación ("amplicones") que son monocatenarios. Diversos tipos de sondas que son específicas de una sola diana en un ensayo particular, que incluyen sondas discriminantes de alelos capaces de discriminar frente a un solo par de bases- apareamiento erróneo, tales como las sondas de balizas moleculares que discriminan los alelos, pueden utilizarse con LATE-PCR como sondas de baja- T_m y super-baja- T_m , al igual que las sondas tolerantes a los errores de apareamiento tales como las sondas de balizas moleculares tolerantes a los errores de apareamiento o las sondas lineales (cola aleatoria) que tienen un fluoróforo excitable indirectamente por emisión de

un colorante SYBR. Los inventores han ideado una nueva clase de sondas alelo-discriminadoras útiles como sondas de baja- T_m y super-baja- T_m en ensayos de LATE-PCR que permiten la determinación de relaciones monocatenarias/bicatenarias dentro de una reacción, al igual que las sondas moleculares de baliza discriminantes de alelos marcadas con dicho fluoróforo.

5 Las sondas discriminantes de alelos descritas en esta invención son sondas inactivadas, modificadas de doble hebra, que discriminan los alelos, de acuerdo con Li, Q. et al. (2002), Nucl. Acid Res. 30: (2) e5). Tienen las siguientes modificaciones: están marcadas con un fluoróforo que es indirectamente excitable mediante la excitación de un colorante fluorescente de ADN de doble cadena, tal como SYBR Green o SBYR Gold, pero no directamente excitables por la longitud de onda utilizada para estimular el tinte (a este respecto similar a los cebadores discutidos anteriormente), y están construidas para ser sondas de baja- T_m y super-baja- T_m . Cuando no está unida a su secuencia diana, dicha sonda se une a un oligonucleótido complementario más corto. Se prefiere que el oligonucleótido complementario incluya un inactivador tal como un inhibidor de Dabcyl o Black Hole® para reducir la fluorescencia de fondo de la sonda. Alternativamente o además, la fluorescencia de fondo puede reducirse incluyendo residuos de guanidina adyacentes al fluoróforo (inactivación de G). En presencia de una cadena diana completamente complementaria, la cadena complementaria más corta se desplaza, la cadena marcada con fluoróforo más larga se hibrida con la diana, y el fluoróforo no se inactiva y se vuelve capaz de recibir energía del colorante para fluorescer a su longitud de onda característica. Varias de estas sondas para diferentes dianas, marcadas con diferentes fluoróforos, pueden usarse para ensayos múltiplex.

Dichas sondas discriminantes de alelos están diseñadas para tener una temperatura de fusión ajustada por concentración, $T_{m[0]}$, en el ensayo que la convierte en una baja- T_m o super-baja- T_m . La $T_{m[0]}$ del híbrido sonda-diana se determina convenientemente y se ajusta empíricamente, aunque se puede emplear un valor calculado al menos como un buen punto de partida para minimizar el ajuste. La longitud y la concentración de la cadena de la sonda complementaria con respecto a la cadena marcada con fluoróforo se ajustan empíricamente para la máxima discriminación de alelos. Se comienza con una longitud de 1-3 nucleótidos más corta que la cadena marcada con fluoróforo y una concentración de 1-1,2 veces la concentración de la cadena marcada con fluoróforo.

En un ensayo de LATE-PCR, estas sondas discriminantes de alelos se utilizan en una etapa de detección a baja temperatura, preferiblemente después de la etapa de extensión del cebador en ciclos después del agotamiento del cebador limitante. Para las lecturas en tiempo real en ciclos múltiples, el colorante SYBR se excita y la fluorescencia se lee tanto del colorante como del fluoróforo (o fluoróforos). Se prefiere leer la señal de colorante durante o al final del paso de extensión de PCR cuando la temperatura está por encima de la T_m de la sonda (o sondas), y leer la emisión del fluoróforo durante la temperatura de la etapa de detección baja cuando las sondas (una sonda discriminante de alelos como la descrita en este documento o una sonda de baliza molecular adecuadamente marcada) se hibridan. Luego se determina la relación de fluorescencia de cada sonda respecto a la señal SYBR total. Esta relación minimiza las diferencias entre los ensayos replicados debido a las diferencias en la acumulación del producto. Debido a que las diferencias se minimizan, tales relaciones se pueden usar también para el análisis de punto final.

El uso de proporciones de producto monocatenario respecto a producto bicatenario permitido por cebadores y sondas como las descritas en este documento es una técnica para reducir la dispersión entre ensayos replicados, como se ha indicado. Esto es particularmente importante para los ensayos de punto final, que no revelan la cinética de la reacción. Un ejemplo es un ensayo de LATE-PCR para distinguir muestras homocigóticas de muestras heterocigóticas utilizando un par de cebadores para ambos alelos y una sonda discriminante de alelos como se describe en este documento. La FIG. 2 ilustra la reducción en la dispersión lograda cuando se aplica a una amplificación LATE-PCR con un paso de detección a baja temperatura realizado con un colorante SYBR (en este caso SYBR Gold), una sonda discriminante de alelos para un alelo marcado con Cy5, excitación del colorante y lecturas de señales del tinte (a 72°C, la temperatura de extensión) y el fluoróforo (a 55°C, una detección a baja temperatura después de la extensión del cebador). El panel A presenta las lecturas en tiempo real del fluoróforo para muestras homocigóticas replicadas (círculo 21) y muestras heterocigóticas replicadas (círculo 22). Como es evidente, la dispersión entre las repeticiones difumina la diferencia. El panel B, sin embargo, traza la relación de las señales Cy5 respecto a las señales SYBR para las muestras homocigóticas (círculo 23) y las muestras heterocigóticas (círculo 24). La reducción de la dispersión es suficiente para permitir un ensayo de punto final.

Los inventores describen sondas lineales monocatenarias de baja- T_m o super-baja- T_m tolerantes a los errores de apareamiento que están marcadas, preferiblemente marcadas terminalmente, con un fluoróforo excitable por emisión de un colorante de ADN fluorescente (por ejemplo, SYBR Green I o SYBR Gold) y que se inactivan para reducir la fluorescencia de fondo. Estas sondas llevan un resto atenuador que suprime la fluorescencia en ausencia de la diana. Las sondas lineales tolerantes a los errores de apareamiento tienen tendencia a plegarse y formar regiones bicatenarias cortas a medida que disminuye la temperatura. El uso de un paso de detección de LATE-PCR a baja temperatura exacerba esta tendencia. Esto no ocurre cuando la secuencia de la sonda se hibrida con la secuencia diana. Si la sonda incluye un fluoróforo que se excita por la emisión de un colorante SBYR que está presente en la mezcla de reacción, el colorante se intercala o se asocia con la región no deseada de doble cadena de las moléculas de sonda no unidas y excita así el fluoróforo de la sonda por FRET. El resultado es un aumento en la fluorescencia de fondo a baja temperatura.

La inactivación de las sondas tolerantes a los errores de apareamiento, como se describe en este documento, se obtiene mediante la adición de un resto atenuador, por ejemplo, un inactivador DABCYL o Black Hole (BHQ), a la sonda en una ubicación en la que atenúa la fluorescencia del fluoróforo resultante de la estructura secundaria no pretendida dentro de la sonda desunida. Se prefiere agregar el inhibidor en el extremo opuesto al fluoróforo siempre que sea posible. El ejemplo 2 a continuación ejemplifica dos técnicas posibles, simplemente agregando un inhibidor o construyendo una horquilla inactivada; es decir, una estructura secundaria diseñada específicamente que acerca el inhibidor al fluoróforo, a la estructura secundaria, o a ambos. Preferiblemente, la T_m de la estructura secundaria construida es al menos 5°C mayor que la T_m de cualquier estructura secundaria alternativa, de modo que, en ausencia de la diana, la mayoría de las moléculas de la sonda están en la configuración de horquilla y la fluorescencia de fondo es baja. La T_m del vástago construido está por debajo de la T_m de la sonda hibridada con la diana perfectamente coincidente y es similar a la T_m de la sonda hibridada con sus dianas no apareadas, de modo que la hibridación a las dianas de la secuencia dentro del vástago no se previene mediante la formación del vástago.

La detección e identificación de dianas de ácidos nucleicos se puede lograr utilizando una o múltiples sondas tolerantes a los errores de apareamiento a baja temperatura que señalizan cuando se hibridan, incluyendo sondas de balizas moleculares tolerantes a los errores de apareamiento, sondas monocatenarias lineales que se excitan indirectamente excitando un colorante de ADN fluorescente, y sondas lineales inactivadas como se describen en este documento. Una mezcla de sonda puede incluir también al menos una sonda específica de alelo como se describe en este documento. Una técnica útil es utilizar la relación de fluorescencia de dos sondas en función de la temperatura para distinguir entre las dianas que tienen una T_m similar con respecto a al menos una de las sondas. A veces se hace referencia a curvas de tal proporción como una "firma de fluorescencia" de un diana.

Con la LATE-PCR que incluye un paso de detección a baja temperatura, es posible combinar el efecto de la temperatura de detección con el efecto de la firma de fluorescencia. Un ensayo que se ha usado con múltiples sondas tolerantes a los errores de apareamiento, que incluyen, pero no se limitan a, sondas indirectamente excitables, monocatenarias, inactivadas como se describe en este documento, es una amplificación LATE-PCR que consiste en un paso a alta temperatura para desnaturalizar el ADN bicatenario (95°C durante 2 min), seguido de la amplificación de fase exponencial utilizando tanto el cebador limitante como el cebador en exceso (30 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 60°C durante 15 segundos y 78°C durante 40 segundos), seguido de la finalización de la fase exponencial y la fase lineal posterior durante la cual se incluyen los pasos de detección de sonda (40 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 60°C durante 15 segundos, 78°C durante 40 segundos, 55°C durante 20 segundos, 50°C durante 20 segundos, 45°C durante 20 segundos y 40°C durante 20 segundos). Esto proporciona cuatro temperaturas de detección por debajo de la temperatura de recodido del cebador, 60°C. La producción de doble cadena se puede controlar mediante la emisión del colorante SYBR en la temperatura de extensión del cebador, 78°C, que está por encima de la T_m de cualquier sonda. La emisión del fluoróforo se puede controlar a cada baja temperatura desde 55°C hasta 40°C. Después del último ciclo, la temperatura puede reducirse a un valor bajo, por ejemplo 30°C y aumentar lentamente para el análisis de fusión. Además de los niveles de fluorescencia detectados, se pueden usar las proporciones de fluorescencia de fluoróforo para teñir la fluorescencia y las proporciones de fluorescencia de fluoróforo para generar información de diferenciación de amplicón.

Algunas de las figuras son ilustrativas de técnicas que aprovechan las posibilidades anteriores. La Fig. 4 muestra el comportamiento de fusión de dos sondas tolerantes a los errores de apareamiento frente al gen de ARN ribosómico 16s de varias especies de micobacterias. Se usaron dos sondas: la sonda inactivada que forma la horquilla descrita en el Ejemplo 2, que tiene la secuencia 5'-Cy5-CTG GAT AGG ACC ACG AGG CCA G-BHQ II -3' (SEQ ID N° 2) y una sonda marcada con TAMRA que tiene la secuencia 5'- G CAT GTC TTG TGG TGG - TAMRA - 3' (SEQ ID N° 3). Se encontró que la última sonda, que no se inactivó, dio señales discernibles por encima del fondo para varias especies. El Panel A de la FIG. 4 presenta curvas de fusión para la sonda en horquilla sin diana (línea 41), *M. asiaticum* (línea 42), *M. gordonae* (línea 43), *M. heidelbergense* (línea 44), *M. malmoense* (línea 45) y *M. marinum* (línea 46). El panel B presenta curvas de fusión para la sonda marcada con TAMRA sin diana (línea 47), *M. asiaticum* (línea 48), *M. gordonae* (línea 49), *M. heidelbergense* (línea 50) *M. malmoense* (línea 51), y *M. marinum* (línea 52). El Panel C de la FIG. 4 traza la relación de fluorescencia TAMRA frente a la fluorescencia Cy5, *M. asiaticum* (línea 53), *M. gordonae* (línea 54), *M. heidelbergense* (línea 55), *M. malmoense* (línea 56) y *M. marinum* (línea 57).

Otra técnica analítica es trazar la tasa de cambio de fluorescencia a partir de fluoróforos en función de la temperatura. La FIG. 5 presenta tales gráficos para la sonda de la horquilla inactivada marcada con Cy5 anterior y la sonda no inactivada marcada con TAMRA. El panel A es la sonda de horquilla inactivada y el panel B es la sonda marcada con TAMRA. Los gráficos muestran picos de fusión para *M. asiaticum* (líneas 61, 71), *M. gordonae* (líneas 62, 72), *M. heidelbergense* (líneas 63, 73), *M. malmoense* (líneas 64, 74) y *M. marinum* (líneas 65, 75). Usando ambas sondas, es posible distinguir las cinco dianas mediante picos de fusión. La sonda marcada con Cy5 por sí misma fue capaz de distinguir *M. gordonae* (línea 62) de los demás. La sonda marcada con TAMRA por sí misma pudo distinguir cada una de *M. asiaticum* (línea 71), *M. gordonae* (línea 72) y *M. marinum* (línea 75) entre sí. Tomadas en conjunto, las sondas pudieron distinguir *M. heidelbergense* de *M. asiaticum*, porque *M. heidelbergense* produjo un pico alto con la sonda Cy5 y un pico bajo con la sonda TAMRA, mientras que *M. asiaticum* produjo lo contrario. Con una sola sonda por amplicón, las alturas relativas de los picos pueden reflejar diferencias en la concentración del producto. Aquí, sin embargo, ambas sondas detectan el mismo amplicón, por lo que las alturas relativas de los picos reflejan las diferencias en las características de fusión de la sonda-diana.

Otra herramienta analítica, descrita anteriormente, es usar una o más relaciones de fluorescencia, tales como, la relación de fluorescencia TAMRA respecto a la fluorescencia Cy5 a la misma temperatura o a diferentes temperaturas durante la PCR. Una estrategia útil para el diseño de la sonda incluye diseñar una sonda para unirse a una región conservada común a múltiples especies para servir como referencia, o incluir, cuando sea necesario, utilizando una porción de la secuencia del cebador limitante como una región conservada. Esta es una opción para LATE-PCR, porque las T_m de la sonda están muy por debajo de la T_m del cebador limitante y la temperatura de recocido, por lo que una sonda con una secuencia común no interfiere con la amplificación. La FIG. 6 muestra los resultados usando una combinación de relaciones de fluorescencia. Se utilizaron como una relación los valores de fluorescencia TAMRA/Cy5, cada uno recogido a la temperatura de detección de 40°C y, como la otra relación, la relación de señales fluorescentes TAMRA/Cy5 recogidas a la temperatura de detección 45°C y 55°C, respectivamente. La FIG. 6 traza ambas relaciones en un ciclo particular, en este caso el ciclo 50. Seis réplicas produjeron datos no superpuestos para las diversas especies *M. asiaticum* (círculo 81), *M. gordonae* (círculo 82), *M. heidelbergense* (círculo 83), *M. malmoense* (círculo 84) y *M. marinum* (círculo 85).

Medir la fluorescencia de la sonda a diferentes temperaturas durante la PCR tiene ventajas sobre la limitación del análisis a las fusiones posteriores a la PCR. Una ventaja es la capacidad de comparar valores de fluorescencia en un número específico de ciclos después de que se alcanza el valor umbral, valor C_T . Esto permite el uso de relaciones con colorantes SYBR (u otros colorantes intercalantes) como se describió anteriormente. Otra ventaja es que cada muestra tiene una fluorescencia de fondo medida a cada temperatura durante los ciclos previos a la detección del amplicón. Por lo tanto, se pueden realizar ajustes precisos para las variaciones de muestra a muestra en la fluorescencia de fondo. Es posible medir la fluorescencia a muchas temperaturas durante la PCR, proporcionando un análisis de fusión casi completo en el rango de temperaturas al cual una sonda muestra diferencias en la hibridación con diferentes dianas. El número y la duración de estos pasos dependen en parte de las capacidades del equipo de detección. La detección continua de fluorescencia durante aumentos o disminuciones de temperatura es posible con algunos cicladores térmicos. La detección a temperaturas múltiples no necesita comenzar hasta cierto punto poco antes de que se espere un aumento inicial de la fluorescencia. La detección a temperaturas múltiples se puede realizar en cada ciclo o en cualquier otro intervalo, por ejemplo, cada quinto ciclo. La eliminación de múltiples pasos de detección durante los ciclos iniciales y la reducción de la frecuencia de esos pasos reduce el tiempo total requerido para completar la reacción de amplificación. Cuando se utiliza la relación de fluorescencia de sonda respecto a la fluorescencia de colorante, preferiblemente se mide la fluorescencia de la sonda a las temperaturas a las que la sonda hibrida con sus dianas, y se mide la fluorescencia SYBR a temperaturas a las que las sondas no están unidas. Más preferiblemente, la fluorescencia de SYBR se mide a la temperatura de extensión. Dado que la fluorescencia de la sonda aumenta a ciclos muy superiores al valor del ciclo umbral (C_T) mientras que la fluorescencia SYBR se estabiliza, estas relaciones cambiarán durante la reacción de amplificación. Por lo tanto, es importante comparar las proporciones de las muestras individuales en un número específico de ciclos más allá del valor C_T de cada muestra.

El análisis de los productos de ADN monocatenarios también se puede llevar a cabo usando una única sonda tolerante a los errores de apareamiento cuya señal se mide a más de una, por ejemplo dos o tres, diferentes temperaturas. Los datos resultantes pueden procesarse como relaciones usando los valores de fluorescencia a dos o más temperaturas. La relación reduce significativamente las diferencias de señal entre las muestras replicadas y proporciona una medida cuantitativa del alelo analizado. La FIG. 11 muestra los niveles de fluorescencia de la sonda a dos temperaturas. Como se ilustra en la FIG. 11, las señales de la sonda que surgen de la hibridación de la sonda con el cebador en exceso se recolectan a una alta temperatura, donde la sonda discrimina alelos y se une solo al alelo completamente complementario, así como a temperaturas más bajas donde la sonda es totalmente tolerante a los errores de apareamiento y se une a todas las variantes alélicas posibles de la secuencia diana. La medición de la fluorescencia a la temperatura alta y baja y el cálculo de las relaciones resultantes también se pueden llevar a cabo como un ensayo de punto final. Estos ensayos se denominan "Dos ensayos de normalización de temperatura (sin corrección del fondo)". Ellos distinguen fácilmente entre genotipos homocigotos y heterocigotos como se ilustra en la figura 11. Este tipo de ensayo se puede llevar a cabo como ensayos de LATE-PCR homogéneos de punto final, ensayos de QE-LATE-PCR.

La FIG. 11 muestra señales de fluorescencia corregidas basales. Como se discutió en el Ejemplo 5, se prefiere usar señales de fluorescencia corregidas basales del ABI 7700, como se muestra en la FIG. 12. La corrección de la línea de base introduce potencialmente artefactos en las proporciones fluorescentes normalizadas de muestras individuales, porque el factor de corrección es sensible a las fluctuaciones falsas en las señales de fluorescencia de fondo que se utilizan para definir la línea de base. Las lecturas de fluorescencia sin procesar no están sujetas a este artefacto. La confianza en las señales fluorescentes sin procesar hace que el ensayo sea aplicable a cualquier termociclador de PCR con capacidades de fluorímetros o termocicladores regulares utilizados en combinación con un fluorímetro regulado por la temperatura para lecturas de fluorescencia de punto final.

El genotipado QE-LATE-PCR se puede refinar aún más mediante la construcción de relaciones de señales detectadas a más de dos temperaturas. Un método de tres temperaturas para normalizar los datos del punto final se obtiene mediante la siguiente fórmula: Valor de fluorescencia normalizado = $(F_s - F_t) / (F_b - F_t)$, donde (F_t = fluorescencia a la temperatura superior), (F_b = fluorescencia en la temperatura del fondo), (F_s = fluorescencia en cualquier tercera temperatura dada). El método de las tres temperaturas aplicado a genotipos homocigóticos y heterocigóticos de un sitio SNP dentro del gen p53 humano se describe en el Ejemplo 6 y se ilustra en la FIG. 13.

La pirosecuenciación es un método isotérmico, de secuenciación por síntesis, en tiempo real, conocido en la técnica. Es catalizado por cuatro enzimas cinéticamente equilibradas: ADN polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa. El método incluye un cebador de secuenciación recocido al ADN monocatenario. Cada nucleótido se dispensa y prueba individualmente para su incorporación en el extremo 3' del cebador de secuenciación de acuerdo con la secuencia del ADN molde. Un evento de incorporación exitoso se acompaña de la liberación de pirofosfato (PPi) en una cantidad equimolar a la cantidad de nucleótidos incorporados. La ATP sulfurilasa convierte cuantitativamente el PPi liberado en ATP en presencia de adenosina 5' fosfosulfato. Luego, el ATP impulsa la conversión de luciferina mediada por luciferasa a oxiluciferina que genera luz visible en cantidades que son proporcionales a la cantidad de ATP. La luz es detectada por una cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD) y se muestra como un pico en un pirograma. El dNTP no incorporado y el exceso de ATP se degradan continuamente con Apirasa. La secuencia de nucleótidos se determina a partir del orden de dispensación de nucleótidos y las alturas de los picos en el pirograma, que son proporcionales a las cantidades de nucleótidos incorporados.

LATE-PCR genera eficientemente ADN monocatenario y, por lo tanto, elimina la necesidad de métodos de preparación de muestras de pirosecuenciación convencionales requeridos para generar plantillas monocatenarias a partir de productos de PCR bicatenarios tradicionales. Sin embargo, el uso de los productos LATE-PCR para la pirosecuenciación requiere una eliminación eficiente de los reactivos que quedan de la reacción de amplificación (dNTP, pirofosfato y cebadores en exceso que interferirán con la química de la pirosecuenciación). La eliminación de los reactivos sobrantes se puede llevar a cabo mediante purificación en columna, precipitación con etanol o cualquier enfoque conocido de purificación de productos de PCR para la eliminación de dNTP, pirofosfato y cebadores en exceso de la reacción de amplificación. Después de la limpieza, el ADN monocatenario de LATE-PCR se hibrida directamente con el cebador de secuenciación y se procesa para la pirosecuenciación de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Es importante que las muestras de LATE-PCR no se calienten a una temperatura que desnaturalice el producto bicatenario generado en la reacción para garantizar que las únicas plantillas disponibles para el cebador de secuenciación sean los productos de ADN monocatenario. De hecho, puede que no sea necesario calentar las muestras de LATE-PCR para el recocido del cebador, ya que el ADN plantilla ya es monocatenario.

Se han combinado la amplificación de LATE-PCR con métodos simplificados de limpieza para preparar muestras para operaciones de secuenciación. Ver el Ejemplo 7 y la FIG. 14. Se han diseñado dos métodos de preparación de muestras LATE-PCR para la pirosecuenciación que no implican la purificación física del producto de PCR y se pueden realizar en un solo tubo. En el primer método, el problema de los dNTP sobrantes de una amplificación LATE-PCR se aborda mediante el uso de cantidades límite de todos los dNTP durante la amplificación de forma que los dNTP se agoten en el curso de la reacción (pero no prematuramente para causar una producción insuficiente del ADN monocatenario, concretamente la cadena del cebador en exceso), que puede determinarse mediante un experimento de rutina. El problema del pirofosfato remanente de LATE-PCR se aborda tratando la muestra de LATE-PCR con una enzima que dispone de una actividad de pirofosfatasa, por ejemplo, una pirofosfatasa tal como pirofosfatasa de levadura, seguido de inactivación por calor. El cebador en exceso que queda de una amplificación LATE-PCR no debe interferir con la pirosecuenciación, ya que la secuencia diana coincidente para estos cebadores en el extremo 3' del producto de extensión del cebador limitante (la cadena de cebador limitante): A) está ligada en una forma bicatenaria y, por lo tanto, no está disponible fácilmente y B) es 5-20 veces menos abundante que la cadena del cebador en exceso, dependiendo de las proporciones de cebadores LATE-PCR. Sin embargo, para descartar cualquier posibilidad de cebado defectuoso por los cebadores en exceso en los productos de PCR a la temperatura utilizada para la pirosecuenciación, se puede agregar opcionalmente un oligonucleótido complementario al cebador en exceso al comienzo de la amplificación de LATE-PCR. Este oligonucleótido complementario debe tener una T_m al menos 5-10°C por debajo de la T_m del cebador en exceso, por ejemplo, siendo unos pocos nucleótidos más cortos que el cebador en exceso en su extremo 3', y debe bloquearse en el extremo 3' por cualquier método conocido por los expertos en la técnica para evitar la extensión del oligonucleótido por las ADN polimerasas (por ejemplo, mediante la inclusión de un grupo fosfato). Cuando se diseña de esta manera, el oligonucleótido complementario no interfiere con la amplificación por LATE-PCR pero forma un híbrido bicatenario estable con el cebador en exceso a la temperatura utilizada para la pirosecuenciación, evitando así que el cebador en exceso cebe incorrectamente otros sitios complementarios en el material amplificado. Alternativamente, el oligonucleótido complementario puede tener la misma longitud o una T_m que es menor que 5-10°C por debajo del cebador en exceso, o ambos, si se agrega después de la reacción de LATE-PCR. Además, un oligonucleótido bloqueado en 3' que contiene la misma secuencia que el cebador en exceso, con o sin otras modificaciones para aumentar su T_m (por ejemplo, bases adicionales en el extremo 3' o el uso de análogos de LNA, etc.), se puede agregar después de la reacción de LATE-PCR a una concentración suficiente para superar a los cebadores en exceso para el sitio complementario en el extremo 3' de la cadena del cebador limitante.

El segundo método incluye el pretratamiento de las muestras de LATE-PCR con la misma enzima y las mezclas de sustrato usadas para la pirosecuenciación seguido del recocido del cebador y la adición de dNTP individuales para la pirosecuenciación. En este método, el orden del protocolo recomendado por el fabricante se invierte (es decir, el protocolo normal requiere el recocido del cebador seguido de la adición de la mezcla de reacción de pirosecuenciación). En este método, la apirasa presente en la mezcla de pirosecuenciación degrada los dNTP mientras que la ATP sulfurilasa y la luciferasa convierten el pirofosfato en ATP y luz. La luciferasa y la luciferina contenidas en estas soluciones proporcionan un sistema útil para controlar la descomposición de PPi así como de

dNTP. Tanto el ATP como el dATP sirven como sustratos para la luciferasa, por lo que el cese de la salida de luz de la muestra, como lo detecta la cámara CCD en la máquina de pirosecuenciación, sirve como una buena aproximación para la limpieza. Si es necesario para una preparación particular, particularmente si los amplicones son más largos de aproximadamente 100 pares de bases o más de aproximadamente veinte pares de bases, los sustratos agotados por estas reacciones (adenosina 5' fosfosulfato y luciferina) se reponen antes del inicio de la secuenciación del ADN. En algunos casos, el tratamiento inicial requerirá más mezcla de sustrato que el protocolo del fabricante. En los casos en que se requiere calentamiento y enfriamiento para el posterior recocado del cebador, estos reactivos serán destruidos y deberán ser reemplazados antes de la pirosecuenciación.

Una variación del segundo método es añadir una enzima purificada con una actividad de dNTPasa, por ejemplo, una apirasa, tal como la apirasa de patata, y una enzima purificada con actividad de pirofosfatasa, por ejemplo, una pirofosfatasa tal como la pirofosfatasa de levadura, seguido de la inactivación por calor de estas enzimas, recocado del cebador y luego pirosecuenciación convencional. Una vez más, los cebadores en exceso restantes de LATE-PCR generalmente no interferirán con la pirosecuenciación, pero en el caso de que lo hagan, estos cebadores se pueden tratar usando la estrategia de oligonucleótidos complementaria descrita anteriormente. Este segundo método no requiere ajustes de la concentración de dNTP para diferentes amplificaciones de LATE-PCR y, por lo tanto, ahorra un tiempo apreciable.

La pirosecuenciación directa de los productos LATE-PCR requiere 0,5-4 pmoles, a veces 2-4 pmoles, de productos monocatenarios preparados recocidos a 3-15 pmoles, a veces 10-15 pmoles, de cebador de secuenciación dependiendo del instrumento de pirosecuenciación utilizado. En los métodos de preparación de muestras segundo y tercero, es importante que el volumen de la muestra de LATE-PCR agregada sea menos de la mitad, a veces menos de un tercio, de la reacción de pirosecuenciación total para conservar el pH óptimo de la mezcla de pirosecuenciación (pH 7,5 comparado con pH 8,0 o superior, por ejemplo 8,3, para la PCR). Alternativamente, los productos LATE-PCR pueden comprender más de la mitad del volumen de reacción si la concentración del tampón y el pH se ajustan en consecuencia. Los reactivos utilizados para controlar las diversas fases de una amplificación LATE-PCR, tales como tintes de ADN fluorescente y sondas de hibridación, son compatibles con la pirosecuenciación y no necesitan ser eliminados, excepto cuando una sonda de hibridación está diseñada para unirse a una región que se secuenciará o cuando el cebador de pirosecuenciación se una. En este caso, una de las estrategias descritas anteriormente para bloquear el cebador en exceso se puede emplear para bloquear la sonda de hibridación. Se ha determinado que los reactivos que inhiben el cebado defectuoso durante la amplificación son compatibles con la pirosecuenciación cuando la concentración final de estos compuestos en la reacción de pirosecuenciación es de 300 nM o inferior, preferiblemente de 200 nM o inferior, y se utiliza la ADN polimerasa estándar para la pirosecuenciación (fragmento de ADN polimerasa de Klenow deficiente en exonucleasa). Utilizando una técnica de preparación de muestras de PCR que permite la preparación y amplificación en la misma cámara o recipiente (véase, por ejemplo, la publicación de patente de los Estados Unidos US-2003-022231-A1), en combinación con una amplificación LATE-PCR llevada a cabo en volúmenes pequeños, preferiblemente menores o iguales a 10 µl, por ejemplo 2-10 µl, es posible obtener información de pirosecuenciación a partir de pequeños grupos de células (de una a 10.000 células) en un formato de tubo único. Según este ensayo de "célula a secuencia", se preparan grupos pequeños de células (de una a 10.000 células) para la amplificación de acuerdo con la técnica de preparación de muestras de PCR, como las descritas en Pierce et al. (2002) *Biotechniques* 32 (5): 1106-1111 (véase la publicación de patente de los Estados Unidos US-2003-022231-A1), sometida a amplificación por LATE-PCR, y procesada directamente para la pirosecuenciación en un único recipiente, pocillo, tubo o cámara de reacción como se describió anteriormente. Como se demuestra en el Ejemplo 8 a continuación y se muestra en la FIG. 15, el método de un solo tubo permite un genotipado preciso y exacto, incluso a nivel de una sola célula o molécula individual.

Una preocupación general de los enfoques de limpieza de PCR basados en enzimas para la pirosecuenciación es la sobreproducción de los subproductos de degradación que puede conducir a la inhibición por retroalimentación de las enzimas durante la secuenciación posterior y al acortamiento de la amplitud de la lectura. Estos incluyen SO_4^{2-} , oxiluciferina, fosfato inorgánico (Pi), dNMP y AMP. Una forma de limitar el conjunto de Pi y dNMP es reducir la concentración de los dNTP utilizados durante la PCR (aunque no necesariamente hasta el punto donde se consumen completamente durante la reacción como se discutió anteriormente en el método uno). A través de las observaciones cuantitativas de la PCR en amplicones de LATE-PCR de hasta seiscientas bases de longitud, se ha descubierto que las concentraciones de dNTP pueden reducirse rutinariamente a 100 nM sin afectar la eficacia de la amplificación. En tales condiciones, la pirosecuenciación en las reacciones LATE-PCR preparadas enzimáticamente se puede lograr para más de cincuenta bases consecutivas como se demuestra en el Ejemplo 9, FIG 16.

En el caso de la secuenciación didesoxi, se ha desarrollado un protocolo que incluye la dilución como el único tratamiento necesario del producto amplificado por LATE-PCR.

La secuenciación didesoxi convencional del amplicón monocatenario a partir de una amplificación LATE-PCR mediante secuenciación cíclica requiere 50 fmoles de ese producto y una cantidad conocida de producto, ya que la electroforesis capilar es sensible a la cantidad de producto. Utilizando colorante de unión a ADN fluorescente SYBR Green I para monitorizar la síntesis de ADN bicatenario y una sonda lineal marcada con Cy5 para monitorizar la síntesis del amplicón monocatenario, se puede monitorizar una amplificación por LATE-PCR que incluya preferiblemente un reactivo inhibidor del cebado deficiente en la Patente Provisional de los Estados Unidos de los

inventores titulada "Reagents and Methods for Improving Reproducibility and Reducing Mispriming in PCR Amplification". Ninguno de estos tres aditivos interfiere con las reacciones de secuenciación posteriores. En una reacción de LATE-PCR, la extensión de la amplificación exponencial y la síntesis del producto bicatenario se define por la cantidad de cebador limitante y es independiente de la cantidad de plantilla de partida. El alcance de la producción de una sola cadena se puede limitar restringiendo la cantidad de al menos un dNTP o restringiendo el número de ciclos de amplificación, si se desea.

Se ha determinado que, para la secuenciación de la cadena del cebador en exceso (es decir, la cadena preparada a partir del cebador en exceso en LATE-PCR), diluir la amplificación de LATE-PCR con agua un total de al menos 20 veces o más representa el producto de la cadena del cebador en exceso adecuado como material de partida para la secuenciación dideoxi. Para garantizar que la cantidad utilizada con el secuenciador capilar de los inventores contenga la cantidad mínima requerida de 50 fmoles de material a secuenciar después de la dilución, la fase lineal de la reacción de LATE-PCR debe producir al menos 200 femtomoles (fmoles) de ADN monocatenario/microlitro (μl) cuando la concentración de cebador limitante es de 25 nanomolar (nM) (25 fmoles/ μl) y, por lo tanto, se necesita aproximadamente un exceso de 8 veces de ADN monocatenario. Para estimar la concentración de ADN monocatenario generado por una amplificación LATE-PCR, se agregó a la concentración de las cadenas presentes en el ADN bicatenario al final de la reacción (que participa en la secuenciación cíclica, y cuya concentración está definida por la concentración del cebador limitante), más la concentración del ADN monocatenario hecho por ciclo (se estima que, en general, cada ciclo de síntesis lineal produce aproximadamente el 50% del producto teórico, siendo el producto teórico igual a la cantidad de ADN bicatenario en la reacción, multiplicada por el número de ciclos mientras que la reacción permanece lineal. Si la acumulación del producto deja de ser lineal en el curso de la reacción, como se muestra mediante el aplanamiento de la curva de fluorescencia en tiempo real para el fluoróforo, la cantidad de ADN monocatenario fabricado durante la fase no lineal se deduce del aumento de veces en señales fluorescentes entre el último ciclo cuando la reacción era lineal hasta el ciclo final de la reacción de amplificación. Típicamente, si la concentración de producto monocatenario producido en una amplificación LATE-PCR es de 200 fmoles/ μl , se diluye la cadena del cebador en exceso 1:8 a 25 fmoles/ μl y usa 2 μl de productos diluidos (50 fmoles) directamente en una reacción de secuenciación dideoxi de 20 μl . En estas condiciones, el factor de dilución total de los productos de LATE-PCR en la reacción de secuenciación es 80 veces mayor. Se pueden usar hasta 8 μl de los productos de LATE-PCR diluidos (200 fmoles) en la reacción de secuenciación para una dilución total de 20 veces y obtener aún cromatogramas de secuencia interpretables.

La purificación de la muestra es necesaria porque los reactivos sobrantes de la amplificación por PCR, tales como dNTP y cebadores, interferirán con la secuenciación dideoxi. LATE-PCR reemplaza la preparación de la muestra por precipitación con etanol o columnas de afinidad con un simple paso de dilución en agua. La preparación de LATE-PCR para la secuenciación dideoxi solo requiere la dilución del exceso de productos de ADN monocatenario en agua al menos 8-10 veces hasta una concentración de 25 fmoles/ μl , seguido de la adición de 50-200 fmoles del producto de ADN monocatenario a una reacción de secuenciación de dideoxi-ciclo que contiene 10 pmoles de cebador de secuenciación. El factor de dilución total en la mezcla de secuenciación dideoxi final es al menos 20 veces. Bajo estas condiciones, los dNTP sobrantes de LATE PCR están demasiado diluidos para interferir con la secuenciación dideoxi. El cebador en exceso de transferencia de LATE-PCR tampoco es un problema, porque la plantilla a la que se unen estos cebadores, la cadena del cebador limitante, está presente a una concentración muy baja después de la etapa de dilución y está completamente hibridada con la cadena de cebador en exceso. Por estas dos razones, el cebador en exceso no sirve como un cebador de secuenciación. El Ejemplo 10 y la FIG. 17 demuestran la efectividad de nuestro método de "diluir y listo". La FIG. 17 presenta cromatogramas de secuencia obtenidos utilizando PCR simétrica y el método de preparación de muestras tradicional (purificación de productos de ADN usando columnas de Qiagen, seguido de la cuantificación por electroforesis en gel, tiempo de preparación total: 1 hora) y cromatogramas de secuencia obtenidos usando LATE-PCR y dilución en agua (tiempo de preparación total: 30 segundos). Los cromatogramas de secuencia son casi idénticos. El Ejemplo 11 y las FIGS. 18-19 ilustran estrategias para la amplificación LATE-PCR de más de un producto a partir de la misma plantilla de ADN en la misma reacción. Por lo tanto, estas reacciones contienen dos pares de cebadores (cada uno compuesto por un cebador en exceso y un cebador limitante) que amplifican dos secuencias separadas dentro de una plantilla contigua. Los dos pares de cebadores se pueden disponer de manera que tanto los cebadores en exceso como ambos cebadores limitantes se hibriden con la misma hebra de la plantilla, o con hebras opuestas de la plantilla. Como apreciará cualquier experto en la técnica, cuando se hibridan cebadores similares con hebras opuestas de la plantilla, los dos cebadores en exceso pueden extenderse "hacia adentro" o "hacia afuera" en sus respectivos soportes de plantilla. La FIG. 19 también muestra que las secuencias de ambas hebras del cebador en exceso se pueden obtener a partir de la misma mezcla de reacción mediante el método de "diluir y listo".

El Ejemplo 12 y la FIG. 20 muestran que la cantidad de ADN_{mc} y ADN_{dc} generado por una amplificación por LATE-PCR se puede medir de forma independiente y se puede usar para calcular la relación ADN_{mc}/ADN_{dc} que, a su vez, puede usarse para determinar si la cantidad de ADN_{mc} acumulado es suficiente para la secuenciación posterior a través del método "diluir y listo".

El Ejemplo 13 y la FIG. 21 muestran el método "diluir y listo" empleado en una mezcla 50:50 de amplicones LATE-PCR que tienen dos secuencias estrechamente relacionadas, pero diferentes. La FIG. 22 muestra que las mezclas comprendidas en relaciones 90:10 y 10:90 de dos amplicones LATE-PCR que tienen secuencias estrechamente relacionadas, pero diferentes, pueden distinguirse de las mezclas 100:0 y 0:100 puras, así como de mezclas 30:70 y

70:30 a través del método "diluir y listo". Para lograr este tipo de análisis, es necesario corregir las amplitudes observadas de cada pico de nucleótidos en cada posición heteroplasmática en términos de la amplitud esperada del nucleótido "puro" equivalente en esa posición. Una vez hecho esto, las cantidades relativas de cada secuencia se pueden calcular como la relación de amplitudes (nucleótido corregido 1)/(nucleótido corregido 1 + nucleótido corregido 2). Por lo tanto, como en el caso de secuencias de ADN mitocondriales que difieren, los métodos de LATE-PCR y "diluir y listo" de didesoxi descritos en este documento pueden usarse para detectar heteroplasmia. El método didesoxi para medir la heteroplasmia es particularmente ventajoso porque se puede usar para estudiar muchos cientos de nucleótidos en un solo análisis. Aunque no deseamos vincularnos a ninguna teoría, se cree que los métodos descritos en este documento funcionan, a diferencia de los intentos anteriores basados en PCR simétrica y didesoxi-secuenciación, porque LATE-PCR genera poblaciones altamente homogéneas de amplicones monocatenarios. Por el contrario, la PCR simétrica tiende a generar poblaciones de moléculas de longitud completa junto con algunos amplicones parciales y algunos amplicones de cebado defectuoso.

El Ejemplo 14 y la FIG. 23 muestran que se puede usar una LATE-PCR junto con al menos una única sonda tolerante a los errores de apareamiento para generar curvas de fusión de punto final que a su vez pueden usarse para cuantificar las cantidades relativas de dos o más amplicones de LATE-PCR mezclados que tienen secuencias estrechamente relacionadas, pero diferentes. El análisis de fusión del punto final cuantitativo (QE) LATE-PCR de mezclas de amplicones relacionados se hace posible en virtud del hecho de que LATE-PCR genera productos de cadena simple. Por lo tanto, cuando están presentes en la reacción una o más sondas tolerantes a los errores de apareamiento marcadas, la(s) sonda(s) se hibrida(n) primero con la secuencia diana más complementaria y luego, si la temperatura baja lo suficiente, con todas las secuencias diana relacionadas. Por lo tanto, cada híbrido sonda/diana en el conjunto tiene su propia temperatura de fusión y la magnitud del pico de fusión derivado de cada híbrido sonda/diana refleja con precisión la cantidad de cada secuencia diana acumulada. Las mediciones cuantitativas de la amplitud o de las dos áreas bidimensionales de cada curva de fusión se pueden usar para calcular la abundancia relativa de cada secuencia diana. Los datos mostrados en la FIG. 23 demuestran que este método se puede usar con un 99,7% de confianza para distinguir entre mezclas 0:100 - 10:90 - 50:50 - 90:10 - 100:0 de dos secuencias que difieren en un solo nucleótido.

Los ensayos, según esta descripción, pueden optimizarse de forma independiente para evitar o minimizar el cebado defectuoso ajustando la concentración de la ADN polimerasa, por ejemplo, Taq polimerasa, agregada a la reacción. Se puede observar una reducción del cebado defectuoso ajustando la polimerasa en términos de la cinética de la reacción de LATE-PCR usando una sonda del ADNmc, así como también por la composición del producto final revelada por diversos medios conocidos en la técnica. Se ha encontrado que es experimentalmente conveniente comenzar con una concentración en exceso típica de Taq polimerasa y luego disminuir esta concentración en etapas. Mientras que muy poca polimerasa puede causar que la reacción se vuelva ineficiente (se manifiesta como una disminución significativa en la velocidad o extensión de la amplificación del producto), los niveles óptimos de polimerasa resultan en un ensayo de amplificación LATE-PCR con amplificación eficiente de ADNdc y síntesis sostenida de ADNdc durante muchos ciclos. El Ejemplo 15 demuestra que el nivel óptimo de polimerasa se puede evaluar mediante la señal de ADN de doble cadena que se observa usando un colorante de doble cadena tal como SYBR Green más la curva de fusión del producto de ADN de doble cadena, también observado usando SYBR Green. El Ejemplo 16 y la FIG. 24 muestran que, cuando tales ensayos se prueban para un producto de ADNmc específico generado a partir de diferentes cantidades de material de partida, los gráficos resultantes son lineales y paralelos durante muchos ciclos de producción de ADNmc.

Ejemplos

Ejemplo 1. Colorante de unión versus colorante de unión más cebadores marcados

Para comparar el rendimiento de un colorante intercalante con el rendimiento del colorante usado en combinación con un cebador que incluye un fluoróforo que interactúa, se realizó un ensayo de extensión. El colorante utilizado fue SYBR Green I a una dilución de 1:40.000.

Se incluyeron tres cadenas de nucleótidos. Una plantilla de ADN, un cebador de ADN extensible (5' marcado con Cy5, complementario a la plantilla, y que tiene una T_m de 60°C), y un oligonucleótido de ADN no extensible (extremo 3' bloqueado con un grupo fosfato) también complementario a la diana, en una ubicación 3' del cebador, también marcado con el fluoróforo Cy5, y que tiene una T_m superior de 79°C. La separación entre el cebador y el nucleótido no extensible se eligió de manera que los productos de extensión del cebador hasta el oligonucleótido no extensible tuvieran todos una T_m por debajo de 79°C.

La mezcla de reacción para el ensayo de extensión del cebador incluyó la plantilla de ADN 0,5 micromolar (μ M), cebador 1,5 μ M y 1,5 μ M del oligonucleótido no extensible. La mezcla también incluía 1X tampón de PCR, 3 milimolar (mM) de $MgCl_2$, 250 nanomolar (nM) de cada dNTP, 1:40.000X de SYBR Green I, y Taq DNA polimerasa. La mezcla de reacción se calentó a 50°C durante 2 minutos para unir el cebador y el oligonucleótido no extensible, y generar productos de extensión del cebador antes de alcanzar el oligonucleótido no extensible. Se corrieron muestras duplicadas.

Después de la reacción de extensión del cebador, el producto se sometió a un análisis de fusión en el que se excitó el colorante SYBR Green a medida que se cambiaba la temperatura. Las lecturas de fluorescencia se tomaron a la longitud de onda de la emisión del tinte y a la longitud de onda de la emisión del fluoróforo a medida que la temperatura aumentaba a través del intervalo de las temperaturas de fusión que abarca el cebador no extendido y el oligonucleótido no extensible. Las curvas de fusión, la primera derivada de fluorescencia con respecto a la temperatura representada frente a la temperatura, se presentan en la FIG. 1, en donde el Panel A presenta las curvas 1 para las dos muestras, los datos de las emisiones de tinte y el Panel B presenta las curvas 2 para las dos muestras, datos de las emisiones de Cy5.

Ejemplo 2. Sondas inactivadas tolerantes a los errores de apareamiento.

Una sonda marcada se diseñó para tener una secuencia consenso complementaria al gen de ARN ribosómico 16S de *Mycobacterium*. La estructura secundaria se predijo de acuerdo con los programas Mfold (Zucker, M (2003), "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction", *Nucleic Acids Res* 31: 3406-3415) con una concentración de sodio de 70 milimolar (mM) y una concentración de magnesio a 3 mM. La secuencia de la sonda fue Cy5-AATACTGGATAGGACC ACG AGG (SEQ ID N° 1), con una estructura secundaria predicha formada por hibridación de las regiones subrayadas. La T_m predicha de la estructura secundaria de la sonda fue 37°C. Esta sonda se ensayó en muestras que no contenían ninguna diana, *M. gordonae* o *M. asiaticum* en mezclas que contenían el colorante SYBR Green I, en donde el colorante se excitaba directamente y el fluoróforo se excitaba a su vez indirectamente. Los resultados de la fluorescencia Cy5 frente a la temperatura se presentan en la FIG. 3, panel A. La línea 31 (sin diana) muestra una fluorescencia de fondo alta, pero la línea 32 (*M. gordonae*) y la línea 33 (*M. asiaticum*) muestran señales discernibles por encima del fondo. Para apagar la fluorescencia de fondo, se añadió un inhibidor no fluorescente (un inhibidor Black Hole™ II) al nucleótido 3' terminal de la sonda. La sonda modificada se probó de manera similar, y los resultados se muestran en el Panel B de la FIG. 3. Como puede verse, la fluorescencia de fondo (línea 34, sin diana) disminuyó notablemente, y las señales de *M. gordonae* (línea 35) y *M. asiaticum* (línea 36) fueron mucho más altas por encima del fondo.

Otra técnica para inactivar una sonda es construir la sonda para que tenga una estructura de horquilla marcada terminalmente con un fluoróforo apropiado en un extremo y un inhibidor en el otro. Se construyó una sonda que tenía la secuencia Cy5-CTGGATAGGACCACGAGGCCAG-BHQII (SEQ ID N° 2), en la que las secuencias subrayadas son complementarias y forman un vástago en horquilla. Se agregaron los tres nucleótidos del extremo 3' con el propósito de lograr el vástago. La temperatura de fusión prevista de esta sonda con un diana perfectamente apareada es 60°C. La T_m predicha del vástago es de aproximadamente 48°C (basado en la T_m del vástago del nucleótido no modificado predicho de 40°C que no da cuenta de la afinidad incrementada de la interacción fluoróforo-desactivador). Esta sonda también se probó como se describió anteriormente, y los resultados se presentan en el Panel C de la FIG. 3. La fluorescencia de fondo (línea 37, sin diana) fue bastante baja, y las señales de *M. gordonae* (línea 38) y *M. asiaticum* (línea 39) estaban muy por encima del fondo.

Ejemplo 3. Genotipado en tiempo real y de punto final utilizando sondas tolerantes a los errores de apareamiento.

Este ejemplo ilustra la identificación de muestras homocigotas y muestras heterocigóticas para el alelo G269 del gen de hexosaminidasa A humana (Hex A) responsable de la enfermedad de Tay-Sachs usando la amplificación LATE-PCR en tiempo real y una sonda lineal tolerante a los defectos de apareamiento, de baja T_m , marcada con Cy5 excitada indirectamente por la emisión de un colorante SYBR. La hibridación de la sonda se controló dos veces durante cada ciclo de amplificación dentro del espacio de temperatura de detección de LATE-PCR, primero a 55°C, una temperatura a la cual la sonda discrimina los alelos en este ensayo y se une exclusivamente a su diana perfectamente coincidente, y luego a 40°C, una temperatura a la cual la sonda es tolerante a los errores de apareamientos y se une a la totalidad de alelos de su secuencia diana en la reacción de amplificación. La detección de alelos específicos y alelos totales con la sonda tolerante a los errores de apareamiento permite la corrección de variaciones estocásticas de tubo a tubo en el rendimiento de amplicones entre muestras replicadas. La relación de alelos específicos a alelos totales en la reacción (Cy5 a 55°C/Cy 5 a 40°C) permite la normalización de la muestra duplicada para el genotipado de punto final. La información genotípica se deriva de los valores de relación. En el caso de muestras homocigotas, las señales de sonda detectadas en condiciones de discriminación de alelos son las mismas que las señales de sonda detectadas en condiciones de tolerancia a los errores de apareamiento, ya que en ambos casos la sonda se une al 100% de los alelos de la secuencia diana. Por el contrario, en el caso de muestras heterocigotas, las señales de sondas detectadas en condiciones de discriminación de alelos son la mitad de intensas que las señales de sonda detectadas en condiciones de tolerancia a los errores de apareamiento, ya que la sonda se une solo al 50% de los alelos de la secuencia diana en condiciones alelo-discriminatorias pero al 100% de los alelos en condiciones de tolerancia a los errores de apareamiento. Por lo tanto, las muestras homocigotas tienen una relación mayor Cy5 a 55°C/Cy5 a 40°C que las muestras heterocigotas. Este método de genotipado solo se basa en la detección de un único alelo.

Las secuencias y la temperatura de fusión ajustada a la concentración, $T_{m[0]}$, de los cebadores LATE-PCR y la sonda son las siguientes. El cebador limitante tiene la secuencia 5'CGAGGTCATTGAATACGCACGGCTCC 3' (SEQ ID N° 3). Tiene una $T_{m[0]}$ ajustada a la concentración de 63,2°C a 25 nM. El cebador en exceso tiene la secuencia 5'TACAAGCAGAGTCCCTCTGGT 3' (SEQ ID N° 4). Tiene una $T_{m[0]}$ ajustada a la concentración de 61,8°C a 1 μ M.

La sonda tiene la secuencia 5' Cy5-GGGACCAGGTAAGAA 3' (SEQ ID N° 5). Tiene una T_m de 56,3°C. Es una sonda de baja- T_m y cuando se usa con una temperatura de recocido de 65°C, también una sonda super-baja- T_m .

Se prepararon ensayos de LATE-PCR replicados ($n = 15$) para cada genotipo diferente (homocigoto G269 y heterocigoto G269) en tampón 1XPCR, $MgCl_2$ 3 mM, dNTP 250 micromolar (μM), cebador limitante 25 nM, cebador en exceso 1000 nM, 1,25 unidades de ADN polimerasa Taq, sonda marcada con Cy5 0,6 μM , y una dilución 1:40.000 SYBR Gold I. Los parámetros de los ciclos de PCR fueron 95°C durante 3 minutos, luego 25 ciclos a 95°C durante 10 segundos, 65°C durante 20 segundos y 72°C durante 20 segundos, seguido de 30 ciclos a 95°C durante 10 segundos, 65°C durante 20 segundos, 72°C durante 20 segundos, 55°C durante 20 segundos y 40°C durante 20 segundos con adquisición de fluorescencia a 55°C y 40°C en el canal Cy5. La FIG. 7 muestra el análisis de las relaciones de las señales de Cy5 a 55°C respecto a las señales de Cy5 a 40°C y demuestra que estas relaciones son adecuadas para el genotipado del punto final para cualquier ciclo de amplificación después del umbral de detección de la sonda. En esta figura, las muestras homocigotas (círculo 91) tienen relaciones aproximadamente dos veces la proporción de muestras heterocigóticas (círculo 92).

Ejemplo 4. Análisis de múltiples dianas utilizando sondas específicas para cada diana con diferentes temperaturas de fusión.

Se pueden usar múltiples sondas, cada una marcada con el mismo fluoróforo, en combinación para detectar y cuantificar diferentes secuencias a lo largo de un único oligonucleótido más largo (por ejemplo, un producto de PCR asimétrica, LATE-PCR o amplificación de círculo rodante) o en diferentes oligonucleótidos. El uso de sondas de baja- T_m aumenta la especificidad para tales dianas, reduciendo o eliminando en gran medida las señales generadas a partir de dianas desiguales. Una posible aplicación de esta tecnología es la genotipificación del ADN humano para identificar alelos conocidos que causan enfermedades genéticas. Este ejemplo describe los análisis de temperatura para el diseño de la sonda y para la detección de productos.

Como punto de partida se eligieron las siguientes dianas que potencialmente podrían estar presentes en un producto de amplificación: la secuencia normal del gen del regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) en la región que codifica el aminoácido 542 de la proteína; la secuencia de la mutación Delta F508, la mutación CFTR más común; y la secuencia normal correspondiente a la mutación Delta F508.

Se diseñaron sondas discriminantes de alelos de baja- T_m para cada una de las tres secuencias diana. Las sondas eran sondas de balizas moleculares de baja temperatura, cada una marcada con el fluoróforo FAM y un inhibidor. Las tres sondas se diseñaron para tener diferentes T_m frente a sus dianas en mezclas que contenían Tris-HCl 70 mM y $MgCl_2$ 3 mM. La "sonda 542" tenía una T_m de 40°C (valor predicho 41°C mediante el cálculo del vecino más cercano); la "sonda normal 508" tenía una T_m de 47°C (valor predicho 46°C por el cálculo del vecino más cercano); y la "sonda Delta F508" tenía una T_m de 54°C (valor predicho de 53°C por el cálculo del vecino más cercano). La FIG. 8 presenta las curvas de fusión a partir de las cuales se obtuvieron los valores de T_m . La Fig. 8 muestra la primera derivada negativa de las lecturas de fluorescencia en función de la temperatura para la sonda 542 (línea 96), la sonda DF508 (línea 97) y la sonda normal 508 (líneas 98) para muestras duplicadas. Se obtuvieron alturas de pico aproximadamente iguales usando concentraciones diana de 1 μM , y una concentración de la sonda 542 de 2 μM . Se probó cada sonda contra la diana no coincidente para verificar la discriminación de alelos, y se encontró que la fluorescencia contra la diana perfecta era 5-10 veces la fluorescencia contra la diana no coincidente.

Se puede observar en la FIG. 8 que incluso las pequeñas diferencias de T_m se habrían podido resolver fácilmente. De una gráfica tal como la FIG. 8, las diferencias de 4-5°C podrían resolverse. La deconvolución que utiliza el software suministrado con termocicladores de PCR en tiempo real puede permitir la resolución de T_m que difiere en la mitad de esa cantidad.

Examinar la primera derivada negativa de la fluorescencia es un método para determinar qué dianas de oligonucleótidos están presentes en una muestra dada. La FIG. 9 muestra dicho análisis, utilizando la fluorescencia por encima del fondo. Las muestras que contienen la diana 508 normal, pero no la diana Delta F508 (círculo 101) tienen un pico de fusión a 54°C, indicativo de ese híbrido de baliza molecular-diana. Las muestras que contienen la diana Delta F508, pero no la diana normal (círculo 102) tienen un pico de fusión a aproximadamente 47°C, indicativo de la hibridación a la baliza con la secuencia mutante. Las muestras que contienen ambas dianas (círculo 103) tienen un pico amplio en ese intervalo de temperaturas, lo que indica la fluorescencia de ambos híbridos de baliza molecular-diana. La presencia y la concentración relativa de la secuencia normal en el aminoácido 542 está indicada por la presencia y la altura relativa del pico de fusión a aproximadamente 40°C. Las muestras con la diana 542 normal (línea continua para cada grupo numerado) tienen un pico grande a esa temperatura, muestras con la diana mutante 542 que contienen un cambio de nucleótido único en esta región idéntico a la segunda mutación CFTR más común (línea punteada para cada grupo numerado) no tienen un pico a esa temperatura, y las muestras con ambas dianas 542 (línea punteada para cada grupo numerado) tienen picos de altura intermedia. La altura del pico en las muestras con ambas dianas 542 se ve afectada por la presencia del pico de fusión Delta F508 vecino.

Puede que no siempre sea posible o deseable obtener un perfil de fusión completo durante el curso de una reacción de amplificación. El análisis adicional de las muestras descritas anteriormente muestra que un número limitado de

etapas de detección podría proporcionar la información requerida para identificar los oligonucleótidos específicos en una mezcla.

Se puede usar la disminución, en lugar del aumento de la temperatura. Las muestras se calentaron a 70°C, y luego se enfriaron a decrementos de 5°C a 30°C con una detección de 30 segundos en cada paso. Las muestras que contienen la diana 508 normal pero no la diana Delta F508, o que contienen la diana Delta F508 pero no un diana normal, se pueden distinguir en función de los cambios en la fluorescencia entre 60°C y 50°C. Cada combinación de oligonucleótidos diana produjo un patrón único de cambio de fluorescencia. Un gráfico de dispersión del cambio porcentual en el aumento de fluorescencia a 55°C frente al cambio porcentual en el aumento de fluorescencia a 45°C se muestra en la FIG. 10. Este análisis distingue la combinación de dianas que están presentes en cada muestra. Al usar los cambios en la fluorescencia en lugar de la intensidad de fluorescencia en sí misma, se puede realizar una evaluación precisa incluso cuando las muestras difieren considerablemente en la concentración total de las dianas, como podría ocurrir en las muestras de amplificación replicadas. La FIG. 10 incluye muestras duplicadas para cada combinación de las dianas 508 normal más 542 normal (marcas en el círculo 111), dianas 508 normal más ambas 542 (112), dianas 508 normal más 542 mutante (113), dianas ambas 508 más 542 normal (114), dianas ambas 508 más ambas 542 (115), dianas ambas 508 más 542 mutante (116), dianas Delta 508 más 542 normal (117), dianas Delta 508 más 542 (118) y dianas Delta 508 más 542 mutante (119). Se podría hacer un análisis similar usando este perfil de temperatura durante cada ciclo o ciclos seleccionados de una reacción de amplificación. Varias muestras con ADN de genotipos conocidos podrían amplificarse y los datos de detección ser utilizados para establecer un rango esperado de valores. Esto proporcionaría un método para la determinación rápida de genotipos a partir de muestras desconocidas.

Aunque solo se usaron 3 sondas en este ejemplo, es posible el uso combinado de un número mucho mayor de sondas. Las principales limitaciones en el número total de sondas son el rango de temperaturas para la detección y la diferencia mínima de T_m entre el híbrido sonda-diana. Estos, a su vez, dependen de la naturaleza de la reacción de amplificación y las capacidades del equipo y el software de deconvolución. Por ejemplo, se podrían distinguir 10 combinaciones diferentes de sonda y diana en un rango de temperaturas de 30 grados si la diferencia mínima de T_m para la desconvolución fuera de 3 grados. Este número puede aumentarse varias veces mediante el uso de fluoróforos múltiples.

Ejemplo 5. Dos temperaturas de normalización con y sin corrección de fondo.

El genotipado de QE LATE-PCR del SNP rs858521 se realizó con muestras de ADN desconocidas y control homocigótico rs858521 (alelos CC) y control heterocigótico (alelos CG) usando una única sonda tolerante a los errores de apareamiento marcada con Cy5. La amplificación y detección se realizaron usando un Prism Sequence Detector 7700 de ABI (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.), que normalmente genera señales fluorescentes corregidas en la línea base. Para el análisis de los inventores utilizando relaciones, sin embargo, se obtuvieron relaciones de señal fluorescente tanto a partir de señales de fluorescencia corregidas basales (Figura 11) como a partir de señales fluorescentes en bruto (Figura 12). La FIG. 11 presenta la relación de la fluorescencia de la sonda a 50°C respecto a su fluorescencia a 25°C como una función del número de ciclo de la reacción de amplificación utilizando las señales fluorescentes corregidas en la línea base del instrumento. En la FIG. 11, el círculo 113 es una réplica del control homocigoto, el círculo 114 es la réplica del control heterocigoto, mientras que los círculos 111 y 112 son las incógnitas. La FIG. 12 presenta los mismos resultados utilizando señales de fluorescencia en bruto. En la Fig. 12, el círculo 116 es una réplica del control homocigoto, el círculo 117 es una réplica del control heterocigoto, y el círculo 115 es la incógnita. El uso de señales de fluorescencia corregidas basales para la normalización dio como resultado el genotipo ambiguo para una muestra FIG. 11, círculo 112. Por el contrario, el uso de señales de fluorescencia en bruto para la normalización proporcionó el genotipo correcto para todas las muestras. Este resultado demuestra que la corrección de línea de base en el software ABI Prism 7700 Sequence Detector puede introducir artefactos que afectan a la normalización de la señal y, preferiblemente, no deberían utilizarse.

Ejemplo 6. Tres temperaturas de normalización.

Las reacciones de amplificación LATE-PCR replicadas que contienen los cebadores SNP rs858521 y una única sonda resonensiva tolerante a los errores de apareamiento se realizaron con ADN genómico purificado para cada genotipo del gen SNP rs858521 (1800 genomas equivalentes, 18 reacciones replicadas de cada genotipo CC homocigoto, CG heterocigoto y GG homocigoto). Los productos amplificados se analizaron mediante curvas de fusión, mostradas en la FIG. 13, panel A y normalizando los datos, como se muestra en el Panel B y el panel C. La FIG. 13A muestra un gráfico de las señales de fluorescencia en bruto recogidas durante el análisis de la curva de fusión después de la amplificación por LATE-PCR. La sonda que se utilizó discriminaba los alelos a temperaturas más altas, pero se volvió progresivamente más tolerante a los errores de apareamiento a medida que se reducía la temperatura. La variabilidad intrínseca en el rendimiento del producto entre muestras replicadas imposibilita la discriminación de estos genotipos por señales de fluorescencia en bruto (círculo 131) dentro de la ventana de temperaturas de discriminación de alelos para esta sonda (40°C-60°C, previamente determinado con dianas de oligonucleótidos sintéticas, datos no mostrados). La FIG. 13B muestra las señales de cada muestra normalizada a cada temperatura frente a la señal recogida a una temperatura totalmente tolerante a los errores de apareamiento (25°C) para esa muestra. En la Fig. 13B las señales normalizadas para los alelos CC homocigóticos son el círculo

132, las señales normalizadas para los alelos CG heterocigóticos son el círculo 133, y las señales normalizadas para los alelos GG homocigóticos son el círculo 134. Como muestra la figura, la normalización reduce la dispersión de la señal y permite la identificación de cada genotipo dentro de la ventana de la discriminación de alelos. La máxima separación se observó a 52°C, que corresponde a la T_m de la sonda de resonancia que se utilizó. Aunque la dispersión de la señal se redujo significativamente en la FIG. 13B en comparación con la FIG. 13 A, todavía hubo cierta variabilidad en la intensidad de la señal entre las muestras replicadas a juzgar por la dispersión en las gráficas cinéticas. La FIG. 13C muestra que el mejor método para eliminar esta dispersión de señal residual era normalizando las señales fluorescentes a cada temperatura respecto a las señales fluorescentes recogidas a las temperaturas superior e inferior de la ventana de discriminación de alelos observada en la FIG. 13B donde las curvas de fusión comienzan a divergir (es decir, 40°C y 60°C respectivamente). En la Fig. 13C, las señales normalizadas para los alelos CC homocigóticos son el círculo 135, las señales normalizadas para los alelos CG heterocigóticos son el círculo 136, y las señales normalizadas para los alelos GG homocigóticos son el círculo 137. Si Fb y Ft son las lecturas de fluorescencia hacia la parte inferior y la parte superior de la ventana de temperaturas de discriminación de alelos, respectivamente, y Fs es la lectura fluorescente a cualquier temperatura dada durante el análisis de fusión, entonces las relaciones fluorescentes normalizadas se calculan como:

$$\text{Coeficiente de fluorescencia normalizada a tres temperaturas} = (F_s - F_t) / (F_b - F_t)$$

La normalización simultánea de las señales fluorescentes a cada temperatura respecto a las señales fluorescentes a 40°C y 60°C dentro de cualquier muestra dada redujo aún más la dispersión de la señal fluorescente y provocó que las curvas de fusión repetidas de cada genotipo se volvieran muy apretadas (véase la figura 13C). Proporciones fluorescentes calculadas a una sola temperatura, concretamente, la T_m de la sonda (52°C) normalizada usando las señales fluorescentes hacia las temperaturas superior e inferior de la ventana de discriminación de alelos (es decir, a 60°C, 40°C) define de forma única cada genotipo con una certeza superior al 99,7% (es decir, los cuadros de error que constan de tres desviaciones estándar que abarcan el 99,7% de todas las relaciones fluorescentes posibles para cada genotipo están bien separados unos de otros, datos no mostrados). De forma similar, se obtuvieron resultados mejorados para el sitio de SNP rs2270517 cuando las señales fluorescentes se calcularon a la T_m de la sonda (57°C) normalizada a las correspondientes temperaturas superior e inferior de la ventana de discriminación de alelos (es decir, a 71°C, 45°C).

Ejemplo 7. Pirosecuenciación directa del producto LATE-PCR.

Las amplificaciones de LATE-PCR replicadas se llevaron a cabo en 25 µl de volumen que consiste en 1X tampón PCR, MgCl₂ 3 mM, 20 nanomolar (nM) de dNTP, 25 nM de cebador limitante, 1000 nM de cebador en exceso, 1,25 unidades de Platinum Taq DNA polimerasa, y 100 genomas de ADN humano. La secuencia del cebador limitante fue 5' CCGCCCTTCTCTCTGCCCCCTGGT 3' (SEQ. ID N° 6) y la secuencia del cebador en exceso fue 5' GCCAGGGGTTCCACTACGTAGA 3' (SEQ ID N° 7). Estas secuencias amplifican un segmento de 94 pares de bases del exón 11 del gen de la Hexosaminidasa A humana. Para la amplificación LATE-PCR, el perfil del ciclo térmico fue de 95°C durante 3 minutos seguido de 10 ciclos de 95°C durante 10 segundos, y 72°C durante 20 segundos, seguido de 55 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 67°C durante 20 segundos y 72°C durante 20 segundos. Después de la reacción, se mezclaron 16,6 µl (el equivalente de 3 pmoles de ADN monocatenario (ADNmc) según se estimó empíricamente a partir de experimentos previos de pirosecuenciación) con 20 microlitros (µl) de Tris-Cl 10 mM, pH 8,5, y se colocaron en un pocillo de una placa de microtitulación utilizada para pirosecuenciación. Para la eliminación de dNTP y pirofosfato transferidos del producto amplificado por LATE-PCR, la mezcla de enzima de pirosecuenciación estándar que consiste en ADN polimerasa de Klenow deficiente en exonucleasa, apirasa, luciferasa, ATP sulfúrilasa y mezcla de sustrato de pirosecuenciación estándar que consiste en luciferina y adenosina 5' fosfosulfato como se proporciona en el Kit PSQ 96 SNP Reagent (Pyrosequencing, Inc, Westboro, MA) se dispensaron secuencialmente en el pocillo que contenía la muestra LATE-PCR utilizando un instrumento PSQ 96 (Pyrosequencing, Inc., Westboro, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se incubaron durante 60 segundos a 37°C. Las posteriores adiciones de dNTP normalmente llevadas a cabo automáticamente por el instrumento PSQ 96 se reemplazaron por una sola adición de Tris-Cl 10 mM, pH 7,5 utilizando el volumen predeterminado programado en el instrumento. Después de esta etapa, el pocillo que contenía la muestra de LATE-PCR recibió 2,5 µl de cebador de secuenciación 10 µM (5' CTGGTACCTGAACCGTAT 3') (SEQ ID No. 8). Teniendo en cuenta el volumen de la enzima de pirosecuenciación y las mezclas de sustrato añadidas a la muestra de LATE-PCR, se estimó que la concentración final del cebador de secuenciación fue de 0,5 µM y el volumen final de 50 µl. La muestra con el cebador de secuenciación se devolvió al instrumento PSQ 96 nuevamente y se procesó según las instrucciones del fabricante, excepto que la enzima de pirosecuenciación y las adiciones de sustrato normalmente llevadas a cabo por el instrumento se reemplazaron por la adición de volúmenes similares de Tris-Cl 10 mM, pH 7,5 seguido de la adición de dNTP. El pirograma resultante se muestra en la FIG. 14, Panel A, que muestra la señal de luz que resulta de la incorporación de nucleótidos particulares. La altura de los picos corresponde al número de nucleótidos incorporados durante cada adición. Con referencia al panel C de la FIG. 14, se ve que uno de cada uno de los dos primeros nucleótidos (A, T) se incorporó a la plantilla, seguido por dos del siguiente nucleótido (C, C), y así sucesivamente. Basándose en la altura de los picos y el orden de las adiciones de nucleótidos, se derivó una secuencia: 5' ATCCTATGGCCC 3' (SEQ ID No. N° 9) y posteriormente se confirmó usando la secuencia GenBank para el gen de la Hexosaminidasa A humana (número de acceso GenBank: S62068). Estos resultados demuestran que el pretratamiento de las muestras de LATE-PCR con la enzima y las mezclas de sustratos utilizadas para la pirosecuenciación permite la pirosecuenciación directa del producto amplificado por

LATE-PCR después del recocido del cebador y la adición de dNTP iterativa. Alterar el protocolo anterior para seguir las instrucciones del fabricante (es decir, realizar el recocido del cebador seguido de la adición de la enzima de pirosecuenciación y mezclas de sustrato) dio como resultado 80% de picos falsos positivos después de la adición de dNTP que no se suponía que se incorporaba en la plantilla. Estos picos positivos falsos se debieron a la extensión parcial del cebador de secuenciación del dNTP sobrante de la amplificación por LATE-PCR antes de la pirosecuenciación.

En un experimento separado, la misma muestra de LATE-PCR descrita anteriormente se sometió a purificación usando un kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se recuperó a 0,375 pmoles/μl en Tris-Cl 10 mM pH 7,5. Se mezclaron ocho microlitros (μl) de esta solución (3 pmoles en total) con el cebador de secuenciación descrito anteriormente hasta una concentración final de cebador de secuenciación de 0,5 μM en un volumen final de 50 μl en Tris-Cl 10 mM, pH 7,5. La muestra se sometió a pirosecuenciación usando el instrumento PSQ 96 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El pirograma resultante se muestra en la FIG. 14, panel B. La preparación tradicional, aunque requirió más tiempo y dinero, no proporcionó datos superiores en comparación con el método de los inventores que produjo el Panel A.

Ejemplo 8. Pirosecuenciación directa de productos LATE-PCR.

Para genotipar células individuales, se llevaron a cabo amplificaciones replicadas de LATE-PCR en un volumen de 25 μL que constaba de 1X tampón de PCR, 3 mM de MgCl₂, 100 μM de dNTP, 100 nM de cebador limitante, 1000 nM de cebador en exceso, 1,25 unidades de AmpliTaq Gold DNA polimerasa (Applied Biosystems, EE.UU.). Cada reacción se inició con un solo linfoblasto humano preparado como se describe en Pierce et al. (2002) *Biotechniques* 32 (5): 1106-1111 (véase la publicación de patente de los Estados Unidos US-2003-022231-A1) con uno de los tres genotipos posibles para la mutación IVS-110. La secuencia del cebador limitante fue 5' GGCCATCACTAAAGGCACCGAGCACT 3' (SEQ ID N° 10) y la secuencia del cebador en exceso fue 5' GGGTTTCTGATACGCACTGACTCTCTC 3' (SEQ ID N° 11). Estas secuencias amplifican un segmento de 191 pares de bases del gen de la beta-globina en el cromosoma 11p humano. Para la amplificación LATE-PCR, el perfil de ciclo térmico fue de 95°C durante 10 min seguido de 65 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 66°C durante 15 segundos y 72°C durante 20 seg. Después de la amplificación, se mezclaron 5 μl con 6,64 μl de Tris-acetato 20 mM, pH 7,6, y se colocaron en un pocillo de una placa óptica utilizada para la pirosecuenciación. Para la eliminación de los dNTP transferidos y PPI del producto de amplificación LATE-PCR, un volumen estándar de mezcla de enzima de pirosecuenciación (que consiste en ADN polimerasa de Klenow deficiente en exonucleasa, apirasa, luciferasa, ATP sulfurilasa) y aproximadamente el doble del volumen estándar de mezcla de sustrato (que consiste en luciferina y adenosina 5' fosfosulfato) como se proporciona en el Pyro Gold Reagent Kit (Biotage AB, Uppsala, Suecia) se dispensaron secuencialmente en los pocillos que contienen las muestras LATE-PCR usando un instrumento PSQ HS 96A (Biotage AB, Uppsala, Suecia) utilizando los siguientes ajustes del instrumento: tiempo de pulso de mezcla enzimática: 23,5 ms; tiempo de pulso de mezcla de sustrato: 44,0 ms; presión de dispensación de reactivo: 400 mbar. Las muestras se incubaron durante 60 segundos a 28°C hasta que la producción de luz cayó por debajo del fondo. A continuación, se añadieron 0,36 μl de un cebador de secuenciación 10 μM: 5' GACCACCAGCAGCCTAAG 3' (SEQ ID N° 12) a cada muestra para un volumen de reacción total de 12 μl y luego se recoció a 80°C durante 2 min seguido de enfriamiento a temperatura ambiente durante 10 min. Además, una concentración de 900 μM de una versión 3' fosforilada del cebador limitante LATE-PCR (SEQ ID NO. 7) también se añadió aquí para evitar que el extremo 3' de la cadena plantilla se plegara sobre sí misma y se extendiera. Las muestras con el cebador de secuenciación se devolvieron luego al instrumento PSQ HS 96A de nuevo y se procesaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, incluidas las adiciones normales de enzimas y la mezcla del sustrato. Los pirogramas resultantes de las células con genotipos homocigóticos de tipo salvaje, heterocigotos y homocigóticos mutantes se muestran en la FIG. 15, paneles A-C, respectivamente. Las unidades de luz y las alturas de los picos son como se explica en el Ejemplo 7. La altura relativa de los picos corresponde al número de nucleótidos incorporados en cada posición. Con referencia al panel A de la FIG. 15, se ve que el segundo pico (T) es la mitad de alto que el primer pico (G), un tercio tan alto como el tercer pico (G), un cuarto tan alto como el cuarto pico (A) y la misma altura que los picos 5-8 (TAGA). La secuencia para los primeros ocho picos se lee así: GGTGGGAAAATAGA (SEQ ID N° 13). En base a la altura de los picos y el orden de las adiciones de nucleótidos, la secuencia de la β-Globina de tipo salvaje en la FIG. 15, se derivó el panel A y se confirmó posteriormente usando la secuencia de GenBank para el gen de la β-Globina humana. Se confirmó una mutación heterocigótica (Panel B) u homocigota (Panel C) en el sitio IVS-110, indicado por flechas. Es de notar en el panel B que el pico de "C" de 1,5 unidades seguido de un pico "T" de 0,5 unidades indica una base "C" en ambos alelos seguido de una "C" en un alelo y una "T" en el otro alelo. Estos resultados demuestran que el pretratamiento de las muestras de LATE-PCR con la enzima y las mezclas de sustratos utilizadas para la pirosecuenciación permite la pirosecuenciación directa de LATE-PCR después del recocido del cebador y las adiciones iterativas de dNTP. Alterar el protocolo anterior para seguir las instrucciones del fabricante (es decir, realizar el recocido del cebador seguido de la adición de la enzima de pirosecuenciación y mezclas de sustrato) dio como resultado un 80% de picos falsos positivos tras la adición de dNTP que no se suponía que se incorporaban en la plantilla. Estos picos falsos positivos se debieron a la extensión parcial del cebador de secuenciación con los dNTP sobrantes.

Ejemplo 9. Pirosecuenciación de productos LATE-PCR para secuencias largas.

Se llevó a cabo una amplificación por LATE-PCR en un volumen de 25 µL que consistía en 1X tampón PCR, 3 mM de MgCl₂, 100 µM de dNTP, 100 nM de cebador limitante, 1000 nM de cebador en exceso, 1,25 unidades de AmpliTaq Gold DNA polimerasa (Applied Biosystems, EE.UU.) y 50 nM del reactivo 9-22DD reductor de defectos de cebado.

5 El reactivo 9-22DD es un oligonucleótido en horquilla que tiene un vástago de nueve nucleótidos de longitud y un bucle de cadena única de 22 nucleótidos de longitud. El oligonucleótido se modifica mediante la adición de restos Dabcilo 5' terminales y 3' terminales. Su secuencia de nucleótidos es 5' CGCGGCGTCAGGCATATAGGATACCGGGACAGACGCCGCG 3' (SEQ. ID. No. 14). La reacción se inició con 20 equivalentes de genoma del ADN humano. La secuencia del cebador limitante fue 5' GGTCAGCGCCGGGCTGCAAGTGTAGA 3' (SEQ ID N° 15) y la secuencia del cebador en exceso fue 5' GATGGGTGGAGCTTGTCTTGAGG 3' (SEQ ID N° 16). Estas secuencias amplifican un segmento de 78 pares de bases cerca del gen p53 en el cromosoma humano 17p. Para la amplificación LATE-PCR, el perfil del ciclo térmico fue de 95°C durante 10 min seguido de 60 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 66°C durante 10 segundos y 72°C durante 20 segundos. Después de la amplificación, se mezclaron 7,5 µl de producto con 9,96 µl de Tris-acetato 20 mM a pH 7,6 y se colocaron en un pocillo de una placa óptica utilizada para la pirosecuenciación. Para la eliminación de los dNTP transferidos y PPi de LATE-PCR, un volumen estándar de mezcla de enzima de pirosecuenciación (que consistía en ADN polimerasa de Klenow deficiente en exonucleasa, apirasa, luciferasa, ATP sulfurilasa) y aproximadamente el doble del volumen estándar de la mezcla de sustrato (que consistía en luciferina y adenosina 5' fosfosulfato) como se proporciona en el Pyro Gold Reagent Kit (Biotage AB, Uppsala, Suecia) se dispuso secuencialmente en el pocillo que contenía las muestras LATE-PCR usando un instrumento PSQ HS 96A (Biotage AB, Uppsala, Suecia) usando los siguientes ajustes del instrumento: tiempo de pulso de mezcla enzimática: 23,5 ms; tiempo de pulso de mezcla de sustrato: 44,0 ms; presión de dispensación de reactivo: 400 mbar. La muestra se incubó luego durante 60 segundos a 28°C hasta que la salida de luz cayó por debajo del fondo. En este amplicón, se utilizó el cebador LATE-PCR limitante (SEQ ID N° 10) como el cebador de pirosecuenciación y se añadieron 0,54 µl de una solución 10 µM a cada muestra para un volumen de reacción total de 18 µl y luego se recocieron a 80°C durante 2 min seguido de enfriamiento a temperatura ambiente durante 10 min. Las muestras con el cebador de secuenciación se devolvieron luego al instrumento PSQ HS 96A de nuevo y se procesaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, incluidas las adiciones normales de enzimas y la mezcla de sustrato. El pirograma resultante se muestra en la FIG. 16. La altura relativa de los picos corresponde al número de nucleótidos incorporados en cada posición como se describe en el Ejemplo 8. La secuencia esperada de coincidencia correcta, según se determina a partir de la base de datos GenBank, se anota arriba de los picos con subíndices que indican el número de una base dada en una fila (es decir G₁C₁A₁G₂ = GCAGG). Estos resultados demuestran que el pretratamiento de las muestras de LATE-PCR con la enzima y las mezclas de sustratos utilizados para la pirosecuenciación permite lecturas de más de cincuenta pares de bases de longitud.

35 Ejemplo 10. Secuenciación didesoxi directa del producto LATE-PCR

Las amplificaciones por PCR se realizaron utilizando un Prism Sequence Detector 7700 de ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) para amplificar un segmento del exón 7 del gen de la Hexosaminidasa A humana que contiene la mutación G269, responsable de la enfermedad de Tay-Sachs. La secuencia corresponde al número de acceso de GenBank M16417. Una amplificación fue una amplificación LATE-PCR, y el producto se sometió directamente a la secuenciación didesoxi. Como control, las concentraciones de cebador se cambiaron a equimolares, se realizó una amplificación de PCR simétrica convencional, y el producto amplificado se sometió a purificación convencional antes de la secuenciación didesoxi.

Mezclas de reacción de amplificación (concentraciones finales)

Volumen: 25 µl

45 Tampón de PCR 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.)

MgCl₂ 3 mM

dNTPs 10 µM

Sonda (solo LATE-PCR) 0,6 µM

dilución 1:41.666 del colorante SYBR Gold (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.)

50 1,25 Unidades de Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen)

6 ng de ADN genómico humano (equivalente a 1000 genomas)

Cebadores: para LATE-PCR, cebador limitante 25 nM y cebador en exceso 1000 nM; (para el control, 300 nM de cada uno de los mismos cebadores).

Secuencias de oligonucleótidos

Cebador limitante: 5' CGAGGTCATTGAATACGCACGGCTCC 3' (SEQ ID. No. 17)

Cebador en exceso: 5' TAACAAGCAGAGTCCCTCTGGT 3' (SEQ ID No. 18)

Sonda: 5' Cy5 GGGACCAGGTAAGAA- Fosfato 3' (SEQ ID No. 19)

Mezcla de reacción de secuencia de ciclo

5 Volumen: 20 µl

producto de 100 femtomoles (fmoles) que se secuencia

5 picomoles (pmoles) de cebador de secuenciación (el cebador limitante o el cebador en exceso)

Mezcla maestra de Quick Start 1x DTC5 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EE.UU.)

[incluye dNTPs, ddNTP, tampón, MgCl₂].

10 Secuenciación Didesoxi

Las mezclas de reacción de secuenciación se sometieron a secuenciación cíclica y electroforesis capilar en una secuencia de ADN CEQ 2000XL (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EE.UU.) utilizando el kit de secuenciación de ciclo de terminación vencida CEQ 2000 (Beckman Coulter) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Preparación de amplificación y secuenciación de LATE-PCR

15 La mezcla de reacción de amplificación LATE-PCR se sometió a ciclos térmicos de la siguiente manera: 95°C durante 3 minutos; 20 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 65°C durante 20 segundos y 72°C durante 20 segundos y 70 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 65°C durante 20 segundos, 72°C durante 20 segundos, 55°C durante 20 segundos y 40°C durante 20 s. La síntesis del amplicón bicatenario se controló excitando el colorante SYBR y leyendo su fluorescencia durante la etapa de 72°C de extensión del cebador. La síntesis del producto monocatenario
20 después del agotamiento del cebador limitante se controló mediante la excitación del colorante SYBR y la lectura de la fluorescencia del fluoróforo Cy5 de la sonda de baja-T_m durante el paso de detección de temperatura baja de 40°C.

Para obtener 100 fmoles del producto de extensión del cebador en exceso, se necesitó la dilución del producto de amplificación. Se estimó la cantidad de producto en los 25 µl de producto de reacción de la siguiente manera. En
25 primer lugar, la cantidad de ese producto en el producto bicatenario fabricado durante los ciclos de amplificación iniciales viene dictada por la cantidad de cebador limitante. En este ejemplo, fue de 25 nM, lo que se traduce en 25 fmoles/µl. La concentración del producto de extensión monocatenario fabricado durante la fase lineal de la amplificación LATE-PCR, es decir, después del agotamiento del cebador limitante, se estimó dividiendo esa fase en
30 dos partes determinadas mediante la inspección de la curva de fluorescencia Cy5: una primera parte en la que la amplificación procede aritméticamente, y una segunda parte en la que la acumulación del producto se ha ralentizado. Para la primera parte, que en este ejemplo fue de seis ciclos, se asumió una eficiencia de amplificación del 50%, basada en Gyllensten, U.B.H. y Erlich, A. (1988), "Generation of Single-Stranded DNA by the Polymerase Chain Reaction and its Application to Direct Sequencing of the HLA-DQA LOCUS", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7652-7656. La producción de cadenas simples durante los seis ciclos se calculó como la concentración inicial (25 fmoles/µl) multiplicada por el número de ciclos (6) multiplicada por la eficiencia (0,5). Se estimó la producción
35 adicional como el aumento porcentual en la señal de Cy5 durante el resto de la reacción, que en este caso fue del 233,3%. La producción total durante la fase lineal fue de 175 fmoles/µl (25 x 6 x 0,5x 2,333) y se estimó que la concentración total de ese producto, incluyendo 25 fmoles/µl en amplicón bicatenario, era 200 fmoles/µl. Para obtener 100 fmoles en la mezcla de reacción de secuenciación cíclica, se diluyó el producto de amplificación 1:8 con
40 agua y se usaron 4 µl del producto diluido en la mezcla de reacción de 20 µl. Como se apreciará, esto significa que el producto de amplificación finalmente se diluyó 1:40.

Para obtener 100 fmoles del producto de extensión del cebador limitante, el punto de partida de los inventores fue que el producto de la reacción de amplificación contenía 25 nM de ese producto, o 25 fmoles/µl. Simplemente se
45 utilizaron 4 µl del producto de amplificación en la mezcla de reacción de secuenciación de ciclo de 20 µl para obtener la cantidad inicial deseada de 100 fmoles.

Control de amplificación y preparación de secuencia.

La mezcla de reacción de amplificación se sometió al mismo perfil de ciclo térmico, excepto que solo se llevaron a
50 cabo 18 (en lugar de 70) de los ciclos de cinco temperaturas, porque un gráfico en tiempo real de la señal de colorante intercalante indicó que la amplificación se estabilizó en este punto y el único producto de amplificación deseado se hizo en ese punto. Los productos de amplificación en la mezcla de amplificación al final de la amplificación se purificaron de manera convencional usando el kit de purificación rápida de PCR QUIA (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los amplicones purificados se cuantificaron mediante electroforesis en gel en un gel de agarosa al 3% en 0,5x TBE frente a diferentes cantidades conocidas de

marcadores de ADN Φ X174 Hind III después de la visualización por tinción con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml). Se utilizó un volumen que contenía 100 fmoles en la mezcla de reacción de secuenciación cíclica con cada cebador de secuenciación.

Resultados

- 5 Los métodos de LATE-PCR y control produjeron las secuencias correspondientes a la información de la secuencia de Genbank (número de acceso M 16417). La FIG. 17 incluye cuatro cromatogramas obtenidos de la secuenciación de didesoxi. El panel A es del método LATE-PCR con secuenciación cíclica que utiliza el cebador limitante como el cebador de secuenciación. El panel B es del método LATE-PCR con la secuenciación cíclica que utiliza el cebador en exceso como cebador de secuenciación. El panel C es el método de control que utiliza el cebador en exceso como cebador de secuenciación. El panel D es el método de control que utiliza el cebador limitante como cebador de secuenciación. Cada cromatograma incluye las curvas de fluorescencia obtenidas de los didesoxinucleótidos marcados y la secuencia de nucleótidos determinada.

Ejemplo 11. Estrategias para la amplificación por LATE-PCR de más de un producto de la misma plantilla de ADN en la misma reacción.

- 15 Las amplificaciones por PCR se realizaron utilizando un ABI Prism Sequence Detector 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) para amplificar dos amplicones de 549 y 464 bases designadas como cadenas H y L de HV1 y HV2 en la misma reacción dúplex dentro de la región del bucle d del ADN mitocondrial humano en base a la cual las secuencias se amplificaron usando un cebador en exceso.

Mezclas de reacción de amplificación (concentraciones finales)

- 20 Volumen: 25 μ l
 Tampón de PCR 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.)
 MgCl₂ 3 mM (Invitrogen)
 dNTPs 250 μ M (Promega)
 Sonda 1,0 μ M (solo LATE-PCR)
- 25 Dilución 10x de colorante SYBR Green (FMC Bioproducts, Rockland ME, EE.UU.)
 1,25 Unidades de Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen)
 ADN genómico de linfocitos de sangre humana (equivalente a 100 genotipos de mtDNA)
 Cebadores: para LATE-PCR, cebador limitante 50 nM y cebador en exceso 1000 nM.
 Secuencias de oligonucleótidos
- 30 Sonda: 5' Cy5 - TGCTAATGGTGGAG-Fosfato 3' (SEQ ID No. 20)
 HV1-H
 Cebador limitante: 5' GCCCGGAGCGAGGAGAGTAGCACTCTTG 3' (SEQ ID N° 21)
 Cebador en exceso: 5' CACCAGTCTTGTAACCGGAGATGAA 3' (SEQ ID No. 22)
 HV2-H
- 35 Cebador limitante: 5' GTATGGGAGTGGGAGGGGAAAATAATGTGTTAG 3' (SEQ ID No. 23)
 Cebador en exceso: 5' AGGTCTATCACCTATTAACCACTCA 3' (SEQ ID No. 24)
 HV1-L
 Cebador limitante: 5' CACCAGTCTTGTAACCGGAGATGAAAACC 3' (SEQ ID No. 25)
 Cebador en exceso: 5' CGAGGAGAGTAGCACTCTT3' (SEQ ID No. 26)
- 40 HV2-L
 Cebador limitante: 5' AGGTCTATCACCTATTAACCACTCACGGG 3' (SEQ ID No. 27)
 Cebador en exceso: 5' GGAGGGGAAAATAATGTGTTAGT 3' (SEQ ID No. 28)

Mezcla de reacción de secuenciación del ciclo:

Volumen: 25 µl

100 fmoles de producto que se está secuenciando

5 pmoles de cebador de secuenciación (el cebador limitante o el cebador en exceso)

5 Mezcla maestra de inicio rápido 1x DTC5 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EE.UU.)

[incluye dNTP, ddNTP, tampón, MgCl₂].

Secuenciación didesoxi

10 Las mezclas de reacción de secuenciación se sometieron a secuenciación cíclica y electroforesis capilar en una secuencia de ADN CEQ 2000XL (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EE.UU.) utilizando el kit de secuenciación de ciclo de terminación de colorante CEQ 2000 (Beckman Coulter) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Preparación de amplificación y secuenciación de LATE-PCR

15 La mezcla de reacción de amplificación LATE-PCR se sometió a ciclos térmicos de la siguiente manera: 95°C durante 3 minutos; 15 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 64°C durante 10 segundos y 72°C durante 45 segundos, y 50 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 64°C durante 10 segundos, 72°C durante 45 segundos, y para HV1-H solo 50°C durante 20 segundos. La síntesis del amplicón bicatenario se controló excitando el colorante SYBR Green y leyendo su fluorescencia durante el paso de extensión del cebador de 72°C. La síntesis del producto monocatenario después del agotamiento del cebador limitante se controló excitando el colorante SYBR y leyendo la fluorescencia del fluoróforo Cy5 de la sonda de baja T_m durante el paso de detección a baja temperatura de 50°C solo para la región HV1-H.

20 Para obtener 100 fmoles del producto de extensión del cebador en exceso, se necesitó la dilución del producto de amplificación. Se estimó la cantidad de producto en los 25 µl del producto de reacción de la siguiente manera. En primer lugar, la cantidad de ese producto en el producto bicatenario fabricado durante los ciclos de amplificación iniciales está dictada por la cantidad de cebador limitante. En este ejemplo que era 50 nM, que se traduce en 50 fmoles/µ. La concentración del producto de extensión monocatenario fabricado durante la fase lineal de la
25 amplificación LATE-PCR, es decir, después del agotamiento del cebador limitante, se estimó dividiendo esa fase en dos partes determinadas mediante la inspección de la curva de fluorescencia Cy5: una primera parte en la que la amplificación procede aritméticamente, y una segunda parte en la que la acumulación del producto se ha ralentizado. Para la primera parte, que en este ejemplo fue de once ciclos, se asumió una eficiencia de amplificación del 50%, basada en Gyllensten, U.B.H. y Erlich, A. (1988), "Generation of Single-Stranded DNA by the Polymerase
30 Chain Reaction and its Application to Direct Sequencing of the HLA-DQA LOCUS", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7652-7656. La producción de hebras únicas durante los once ciclos se calculó como la concentración de partida (50 fmoles/µl) multiplicada por el número de ciclos (11) multiplicada por la eficacia (0,5). Se estimó la producción adicional como el aumento porcentual en la señal de Cy5 durante el resto de la reacción, que en este caso fue del 100%. La producción total durante la fase lineal fue, por lo tanto, 275 fmoles/µl (50 x 11 x 0,5 x 1,0), y se estimó que
35 la concentración total de ese producto, incluyendo 50 fmoles/µl en el amplicón bicatenario, era 325 fmoles/µl. Para obtener 100 fmoles en la mezcla de reacción de secuenciación cíclica, se diluyó el producto de amplificación 1:13 con agua y se utilizaron 4 µl del producto diluido en la mezcla de reacción de 25 µl.

Resultados

40 Hay cuatro combinaciones posibles: 1) HV1-H con HV2-H, 2) HV1-L con HV2-L, 3) HV1-H con HV2-L, 4) HV1-L con HV2-H. La FIG. 18 muestra un gel de agarosa al 4% de electroforesis de controles sin plantilla (NTC), tres líneas restantes; amplicones de reacciones iniciadas con 100 copias de ADN genómico, las siguientes tres líneas; y en el carril de la derecha, una escalera de 100 pares de bases. La Fig. 18 muestra la formación de los amplicones de dsDNA HV1-H y HV2-H de 549 y 464 pares de bases utilizando 100 copias de ADN genómico al comienzo de la reacción. No se amplificaron los controles de plantilla, NTC.

45 Como cualquier persona versada en la técnica entenderá, al amplificar dos amplicones monocatenarios en la misma reacción a partir de una única plantilla, las dos cadenas de cebador en exceso pueden generarse a partir de la misma cadena de ADN o de hebras complementarias de ADN. Se han empleado con éxito ambos enfoques. En las combinaciones HV1-H con HV2-H y HV1-L con HV2-L, ambos amplicones se generan a partir de la misma cadena de ADN plantilla. En las combinaciones HV1-H con HV2-L y HV1-L con HV2-H, los dos amplicones se generan a partir de cadenas complementarias de ADN. La FIG. 19A muestra información de secuencia para el amplicón HV1-H en el dúplex HV1-H con HV2-H en la región de las bases 16209-16169. La figura 19B muestra información de secuencia para el amplicón HV2-H en la HV1-H dúplex con HV2-H en las bases de región 289-326. La FIG. 19C muestra información de secuencia para el amplicón HV1-H en el HV1-H dúplex con HV2-L en las bases de región 16209-16169. La FIG. 19D muestra información de secuencia para el amplicón HV2-L en el HV1-H dúplex con HV2-

L en las bases de región 289-326. La LATE-PCR produjo secuencias correspondientes a la información de secuencia de GenBank.

Ejemplo 12. Determinación de la necesidad de ADNmc.

5 La cantidad de ADN monocatenario y ADN bicatenario generado por una amplificación LATE-PCR se puede usar para determinar la cantidad de ADNmc necesario para la secuenciación didesoxi "diluir y listo". Las amplificaciones por PCR se realizaron utilizando un Prism Sequence Detector 7700 de ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) para amplificar el amplicón de base 549 designado como HV1H dentro de la región de bucle d del ADN mitocondrial humano. El MtDNA fue extraído en condiciones de lisis (como se describe en Peirce et al. (2002) Biotechniques 32 (5); 1106 - 1111 con la inclusión de 4 µl de DTT en 100 µl de la mezcla de reacción de lisis) de un tallo del cabello humano. Todas las amplificaciones fueron amplificaciones LATE-PCR, y el producto se sometió directamente a la secuenciación didesoxi.

Mezclas de reacción de amplificación (concentraciones finales)

Volumen: 25 µl

Tampón de PCR 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.)

15 MgCl₂ 3 mM (Invitrogen)

dNTP 250 µM (Promega)

Sonda 1,0 µM (solo LATE-PCR)

10x dilución de colorante SYBR Green (Subproductos FMC, Rockland ME, EE.UU.)

1,25 Unidades de Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen)

20 1 µl de solución de lisis de ADN (equivalente a ~10 genomas de ADN mitocondrial)

Cebadores: para LATE-PCR, cebador limitante 50 nM y cebador en exceso 1000 nM.

Secuencias de oligonucleótidos

HV1H: cebador limitante, cebador en exceso y sonda como en el ejemplo 11.

Mezcla de Reacción de Secuencia de Ciclo

25 Como en el Ejemplo 11.

Secuenciación Didesoxi

Como en el Ejemplo 11.

Preparación de amplificación y secuenciación de LATE-PCR

30 Como en el Ejemplo 11. Los datos de fluorescencia en bruto de CY5 y SYBR Green se usaron para determinar la cantidad de producto disponible para una reacción de secuenciación. La relación CY5/SYBR Green se usó para normalizar todas las fluctuaciones en los datos brutos.

Resultados

35 Los datos de fluorescencia de las amplificaciones LATE-PCR se presentan en la FIG. 20, paneles A y B. La FIG. 20A, por ejemplo, la línea 201 muestra todos los datos del tallo del pelo trazados contra los números del ciclo de amplificación como la relación ADNmc/ADNdc (señal de sonda frente a señal de colorante). Este método de análisis minimiza la variación debida a cuando comienza la amplificación exponencial, o en qué nivel se estabiliza, y demuestra que la eficacia de la amplificación del ADNmc es prácticamente la misma en todas las muestras excepto en la que comenzó muy tarde.

40 La FIG. 20B muestra un método para controlar un conjunto de ensayo LATE-PCR con el fin de establecer su preparación para la secuencia de diluir y listo. El gráfico muestra las relaciones calculadas ADNmc/ADNdc (señal de la sonda a la señal de colorante frente a la señal de colorante) para todas las muestras amplificadas en el ciclo 45 (cuadrados) y el ciclo 65 (diamantes). Solo las muestras que tienen relaciones entre 0,06 y 0,10 y los valores SYBR entre 300 y 600 (los que están en la caja) están listos para la secuencia. La FIG. 20B amplía el uso del análisis cuantitativo de punto final (QE LATE-PCR) para demostrar que después de 65 ciclos, todas las muestras menos una acumularon suficientes ADNmc para su uso en la secuencia de "diluir y listo".

45 Ejemplo 13. Amplicones que tienen múltiples SNP.

La sensibilidad de LATE-PCR y el método de secuenciación "diluir y listo" puede distinguir una mezcla de amplicones que tienen múltiples SNP con un nivel de resolución del 10%. Las amplificaciones por PCR fueron de un tallo de cabello humano de 2 mm o una sola huella digital humana adherida a un portaobjetos de vidrio. Todas las amplificaciones fueron amplificaciones LATE-PCR, y el producto se sometió directamente a la secuenciación didesoxi. Las mezclas de reacción de amplificación finales, secuencias de oligonucleótidos (HV1-H), mezcla de reacciones de secuenciación de ciclos, y secuenciación didesoxi, y preparación de amplificación y secuenciación de LATE-PCR fueron todas como en el Ejemplo 11.

Las mezclas de 10:90 a 90:10 de los productos LATE-PCR monocatenarios de cada una de las tres reacciones se secuenciaron usando el protocolo didesoxi "diluir y listo" descrito previamente. Los resultados se muestran en la fig. 21 y FIG. 22.

La FIG. 21 muestra un segmento base de 10 que rodea las bases 16320 y 16311 de la mezcla 50:50 de linfocitos de sangre humana y huella digital humana. Las alturas de los picos reflejan las alturas reales del 100% en la secuencia didesoxi y no las alturas iguales esperadas de una mezcla 50:50. La línea 211 muestra el pico para la base G en esta secuencia y la línea 202 muestra el pico para la base A en la misma posición en la secuencia. El pico 212 es más alto que el pico 211 en una mezcla 50:50 de linfocitos de sangre humana y tallo del cabello humano que tiene diferentes secuencias genéticas, debido a las características fluorométricas de la secuenciación didesoxi como es demostrable por el análisis de secuencias puras para la misma región.

La FIG. 22 muestra los porcentajes recíprocos (90:10, 70:30, 50:50, 30:70 y 10:90) de dos muestras en cada una de las cinco ubicaciones de SNP. La muestra 1 provino de un tallo de cabello humano y la muestra 2 provino de una huella digital humana de otra persona. Las alturas de cada pico en cada posición se midieron a partir de las impresiones de las secuencias didesoxi y luego se ajustaron a escala basándose en la misma base de un control del 100% de la Muestra 1 o del 100% de la Muestra 2. En la Fig. 22, la línea 222 es el porcentaje deseado de la Muestra 1 en la mezcla trazada frente al porcentaje deseado de la Muestra 2 en la mezcla. La línea 221 es una línea ajustada a los resultados reales, es decir, el porcentaje observado de la Muestra 1 en la mezcla representada frente al porcentaje previsto de la Muestra 2. El porcentaje observado para cada porcentaje previsto de la Muestra 2 es de cinco puntos, uno para cada base. Los datos demuestran que hay muy poca dispersión entre las diferentes bases en cada porcentaje, pero los datos también muestran que la línea 221 de los valores observados no se encuentra en la parte superior de la línea de los valores predichos (línea 222), probablemente debido a que la cantidad de la Muestra 1 y la Muestra 2 en la mezcla no fueron exactamente iguales.

Ejemplo 14. Distinción de mezclas.

Para distinguir muestras que consisten en 100% de ADN genómico heterocigótico de muestras que consisten en 90% de ADN heterocigoto y 10% de ADN genómico homocigótico para un único cambio de nucleótido, primero se creó una mezcla de ADN que consistía en 90% de ADN heterocigótico para el sitio de SNP rs858521 ubicado en el cromosoma humano 17 (alelos C/G) más 10% de ADN homocigótico para el mismo sitio de SNP (alelos C/C). El sitio de SNP se encuentra en la base de datos NCBI dbSNP accesible a través de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=SNP>. Esta mezcla de ADN se preparó mezclando concentraciones coincidentes de los ADN heterocigotos y homocigóticos correspondientes proporcionados por el Laboratorio Reid en la Universidad de Washington en Seattle. Las concentraciones de ADN para cada ADN genómico con fines de mezclado se estimaron basándose en los valores de Ct de la fluorescencia SYBR derivados del análisis en tiempo real de muestras de LATE-PCR similares a las descritas a continuación. Una vez que se preparó la mezcla de ADN, se establecieron reacciones replicadas de LATE-PCR que contenían ADN heterocigótico al 100% o ADN heterocigótico al 90% + homocigótico al 10%. Cada muestra de LATE-PCR consistió en tampón 1X Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA), 3 mM de MgCl₂, 250 μM de mezcla de dNTP, 0,24X SyberGold I (Invitrogen, Carlsbad, CA), 200 nM de reactivo de prevención de cebado defectuoso que se llama compuesto Elixir 9-3iDD, 1,25 unidades de Platinum Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 μM de cebador en exceso rs858521, 50 nM de cebador limitante rs858521, y 2,4 μM de sonda de resonancia contra el alelo rs858521 SNP G, y genoma 1800 equivalente del ADN genómico apropiado en un volumen final de 25 μl. La secuencia del cebador en exceso rs858521 es

5' CAATCCCTTGACCTGTTGTGGAGAGAA 3' (SEQ ID No. 29)

La secuencia del cebador limitante rs858521 es

5' TCCCCAGAGCCCAGCCGGTGTCATTTTC 3' (SEQ ID NO. 30)

La secuencia de la sonda de resonancia contra el alelo SNP G rs858521 es

5' [Cy5] CTTACGCTCAAACAATA [Phos] (SEQ ID N° 31)

La secuencia del reactivo de prevención de cebados defectuosos es 5' Dabcilo-CGCTATAATGAAATTATAGCG-Dabcilo (SEQ ID No. 32)

Estas muestras se sometieron a amplificación en un ABI 7700 usando un perfil de ciclo térmico que consistía en un ciclo de 95°C durante 3 min, seguido de 45 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 66°C por 10 s y 72°C durante 20 s. Al final de la reacción, la reacción se fundió de 95°C a 25°C a intervalos de 1°C durante 1 min a cada temperatura con adquisición de fluorescencia en el canal Cy5. Las señales de fluorescencia Cy5 recortadas sin corrección de línea de base se exportaron al programa informático Excel. El cálculo de la primera derivada de las señales de fluorescencia se realizó sustrayendo las señales de fluorescencia de una temperatura de las señales de fluorescencia de la siguiente temperatura durante la fusión. Los resultados se muestran en la FIG. 23, paneles A y B. La FIG. 23A muestra el gráfico de la primera derivada de las señales de fluorescencia frente a la temperatura, es decir, las curvas de fusión. Las curvas de fusión en la FIG. 23A se suavizaron utilizando la función de promedio móvil de Excel para eliminar el ruido debido a las fluctuaciones térmicas en el ABI 7700. La FIG. 23A reveló los picos de fusión correspondientes a la unión de la sonda a su diana de alelo G coincidente a temperaturas más altas y a la diana del alelo C no coincidente a temperaturas más bajas. La FIG. 23A muestra que las muestras 90% heterocigotas + 10% homocigotas, círculo 231, exhiben un pico de alelo G más bajo y un pico de fusión de alelo C mayor en relación con las alturas del alelo C y los picos de fusión del alelo G en muestras 100% heterocigotas, círculo 232. Estas diferencias concuerdan con la mayor proporción esperada del alelo C en la muestra 90% heterocigotas + 10% homocigotas (55% de alelo C: 45% de alelo G) en comparación con la muestra heterocigota al 100% (50% de alelo G: 50% de alelo C). La relación de la altura del pico del alelo C a la altura del pico del alelo G se muestra como un gráfico de barras en la FIG. 23B. El conjunto de barras a la derecha son para las muestras 90% heterocigotas + 10% homocigotas, que corresponden al círculo 231. Las barras más oscuras a la izquierda son para muestras 100% heterocigotas. Las cajas de error convencionales 233 y 234 se muestran para conjuntos de barras, respectivamente. Esta relación distingue muestras heterocigotas al 100% de muestras 90% heterocigotas + 10% homocigotas con una certeza del 99,7% en función de la falta de superposición de las cajas de error que reflejan tres desviaciones estándar del error de la media.

Ejemplo 15. Sensibilidad de las reacciones de LATE-PCR a la concentración inicial de polimerasa.

Las amplificaciones por PCR se realizaron utilizando un ABI 7700 para amplificar el amplicón de base 549 designado como HVI-H dentro de la región de bucle d del ADN mitocondrial humano. Las mezclas de reacción para el ADN humano genómico, secuencias de oligonucleótidos (HV1-H) y amplificaciones LATE-PCR fueron como se describe en el ejemplo 11, excepto que las unidades de ADN polimerasa Platinum Taq variaron entre muestras, como sigue: 0,125, 0,250, 0,375, 0,50, 0,625 y 1,25 Unidades.

Se realizaron análisis de curva de fusión (fluorescencia verde SYBR frente a temperatura). Las curvas de fusión mostraron cómo la concentración de Taq influía en la especificidad del producto de ADNdc para esta reacción de LATE-PCR. Como Platinum Taq, la concentración disminuyó de 1,25 unidades a 0,375 unidades, la especificidad de la reacción aumentó, como se refleja en los picos de fusión de las réplicas. Bajando aún más la concentración, a 0,250 unidades, disminuyó la especificidad. A 0,125 unidades la reacción no ocurrió. La mayor especificidad ocurrió con una concentración de Taq de 0,375 unidades.

Ejemplo 16. Variación de la pendiente como una función de la concentración de Taq en un LATE-PCR a tiempo real y en un LATE-PCR Duplex a tiempo real.

Se diseñó un ensayo dúplex a tiempo real LATE-PCR para la amplificación simultánea de secuencias dentro de los exones de los genes murinos Oct4 y Xist (número de acceso GenBank NM 013633 y L04961, respectivamente). Cada reacción se realizó en un volumen final de 50 µl y contenía los siguientes reactivos: tampón de PCR 1 X (Invitrogen, Carlsbad, CA) comprendido por 20 mM de Tris-HCl, pH 8,4, y 50 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP, cebador limitante de Oct4 50 nM que tiene la secuencia 5' TGGCTGGACACCTGGCTTCAGACT 3' (SEQ ID N°: 33), cebador en exceso Oct4 2 µM que tiene la secuencia 5' CAACTTGGGGGACTAGGC 3' (SEQ ID N°: 34), cebador limitante Xist 100 nM que tiene la secuencia 5' GGTCGTACAGGAAAAGATGGCGGCTCAA 3' (SEQ ID NO: 35), cebador en exceso Xist 2 µM que tiene la secuencia 5' TGAAAGAAACCACTAGAGGGCA 3' (SEQ ID NO: 36), 1 µM de una sonda de baliza molecular Oct4 de bajo punto de fusión que tiene la secuencia 5' TET-CCG CCT GGG ATG GCA TAC TGT GGA AGG CGG-Dabcilo 3' (SEQ ID NO: 37) y 300 nM de un reactivo de prevención de cebado defectuoso (al que nos referimos como el compuesto 9-3bDD) que tiene la secuencia 5' Dabcilo-CGTTATAATGAAATTATAACG-Dabcilo 3' (SEQ ID N° 38). La ADN polimerasa Taq de Platinum® complejada con anticuerpos (Invitrogen, Carlsbad, CA) también se incluyó en la mezcla de PCR a concentraciones de 1, 2 ó 3 unidades por ensayo. En este ejemplo, no se añadió una sonda de baliza molecular para la detección de amplicones de Xist.

En paralelo con estos LATE-PCR dúplex, también se realizó una serie de ensayos para la amplificación LATE-PCR del amplicón Oct4 solamente. Estos ensayos tenían una composición idéntica a los dúplex mencionados anteriormente, a excepción de la omisión del cebador limitante Xist y el cebador en exceso Xist.

Se añadió ADN genómico de ratón (Sigma, St Louis, MO) a todos los ensayos y se proporcionaron las plantillas para la amplificación por PCR. El número de genomas añadidos a cada tubo se calculó como 1000, en base a un tamaño de 6 pg/genoma (véase Vendrely y Vendrely (1949) *Experientia* 5: 327-329).

5 Todos los ensayos se realizaron por duplicado. La amplificación se llevó a cabo en un detector de secuencia ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, CA) con un perfil de ciclo térmico compuesto por 1 ciclo a 95°C durante 5 minutos; 6 ciclos a 95°C durante 10 segundos, 63°C durante 20 segundos, y 72°C durante 30 segundos; y 54 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 55°C durante 25 segundos, 72°C durante 35 segundos y 45°C durante 30 segundos, con adquisición de fluorescencia a 45°C en el canal TET.

10 Los resultados de este experimento se muestran en la FIG. 24, que representa las señales fluorescentes generadas por la acumulación de amplicones Oct4 a través de la hibridación con la sonda de baliza molecular TET-Oct4. Cuando solo estaban presentes un par de cebadores, el aumento de la concentración de Taq polimerasa de 1 Unidad/ensayo (círculo 241) a 2 Unidades/ensayo (círculos 242) o 3 Unidades/ensayo (círculos 243) tuvo el efecto de hacer que la pendiente de las señales fuera más pronunciada, debido a la mayor eficiencia de amplificación. Las señales identificadas por los Círculos 242 y 243 (2 y 3 Unidades/ensayo, respectivamente) se intercalaron, lo que sugiere que se había alcanzado la máxima eficiencia en aproximadamente estos niveles. Como se esperaba, las pendientes de las líneas generadas por las reacciones dúplex (círculos 244, 245 y 246) fueron en todos los casos inferiores a las generadas por la amplificación de un único amplicón, porque la Taq polimerasa se utilizó al doble de esa velocidad. Como en el caso de la LATE-PCR de amplicón simple, el aumento de la concentración de Taq en la reacción dúplex de 1 Unidad/ensayo (círculo 244) a 2 Unidades/ensayo (círculo 245) o 3 Unidades/ensayo (círculo 246) dio como resultado un aumento en la pendiente de la señal. No hubo ningún aumento adicional en la pendiente inicial de las 3 unidades/ensayo (círculo 246) cuando se comparó con la pendiente inicial de las 2 unidades/ensayo (círculo 245), sugiriendo de nuevo que se había alcanzado la máxima eficacia. Sin embargo, las 3 unidades/muestras de ensayo (círculo 246) rápidamente alcanzaron una meseta y la pendiente comenzó a declinar, a diferencia de una de las 2 unidades/muestras de ensayo (círculo 245), indicando la probabilidad de aparición de cebado defectuoso en presencia de la concentración más alta de Taq probada, que no fue el caso para las muestras 243, que también contenían 3 unidades Taq/ensayo pero solo un par de cebadores. A pesar de la mayor cantidad de Taq disponible en los ensayos de un solo amplicón en comparación con los dúplex (siendo usadas 3 unidades para generar un amplicón en lugar de dos amplicones al mismo tiempo), se produjo un mayor cebado defectuoso en los dúplex debido a la adición de los cebadores Xist. Con el fin de obtener la máxima eficacia sin cebado defectuoso, la concentración de polimerasa Taq necesita, por lo tanto, optimizarse en consideración del número y las secuencias de los cebadores añadidos a la reacción.

Párrafos de la descripción:

30 A. Un método para analizar al menos un producto de amplificación monocatenario de un proceso de amplificación de ácidos nucleicos no simétrico que genera amplicones de doble cadena y de cadena sencilla por extensión de cebadores de oligonucleótidos mediante una ADN polimerasa y que incluye al menos una temperatura de apareamiento de cebador, que comprende:

detectar amplicones bicatenarios mediante la detección de fluorescencia homogénea,

35 detectar dicho al menos un producto de amplificación monocatenario mediante la detección de fluorescencia homogénea específica de secuencia a una temperatura por debajo de al menos una temperatura de apareamiento de cebadores, y

calcular la relación de la fluorescencia de dicho producto monocatenario frente a la fluorescencia de dichos amplicones bicatenarios.

40 B. El método de acuerdo con el párrafo A en el que los reactivos de detección son añadidos al comienzo del proceso de amplificación del ácido nucleico.

C. El método de acuerdo con el párrafo A o el párrafo B en el que la detección de los amplicones bicatenarios es por medio de un colorante de ADN fluorescente.

45 D. El método de acuerdo con cualquiera de los párrafos A-C, en el que la detección de dicho al menos un producto monocatenario incluye una sonda de hibridación marcada con fluoróforo que se une a dicho producto monocatenario durante la etapa de detección a baja temperatura pero no a dicha al menos una temperatura de recocido del cebador.

E. El método de acuerdo con el párrafo D, en el que la sonda de hibridación para dicho al menos un producto de amplificación monocatenario es una sonda de doble cadena inactivada discriminante de alelo.

50 F. El método de acuerdo con el párrafo E que comprende al menos dos sondas para diferentes productos de amplificación monocatenarios que están marcados con el mismo fluoróforo pero tienen diferentes temperaturas de fusión con respecto a sus dianas, en donde dicha etapa de detección a baja temperatura incluye detectar la emisión de dicho fluoróforo a una temperatura a la que solo una sonda se une a su diana y a una temperatura en la que al menos dos sondas se unen a sus dianas respectivas.

55 G. El método de acuerdo con el párrafo C, en el que el cebador cuya extensión genera amplicones monocatenarios se marca con un fluoróforo que se estimula indirectamente por emisión de fluorescencia desde dicho colorante, y en

donde la detección de dicho al menos un producto monocatenario incluye la estimulación del colorante y la detección de la fluorescencia emitida por dicho cebador.

- 5 H. El método de acuerdo con el párrafo C que comprende al menos una sonda de hibridación tolerante a los errores de apareamientos que se une a al menos dos posibles productos de amplificación monocatenarios para formar híbridos que tienen diferentes temperaturas de fusión por debajo de la temperatura utilizada para cebar los cebadores en dicha amplificación y que se marca con un fluoróforo que es estimulado indirectamente por la emisión de fluorescencia de dicho tinte, en el que la detección del producto monocatenario incluye la detección a baja temperatura a múltiples temperaturas determinadas por dichas diferentes temperaturas de fusión.
- 10 I. El método de acuerdo con el párrafo H, en donde dicha sonda de hibridación tolerante a los errores de apareamientos es una sonda de hibridación lineal que forma una estructura secundaria que comprende una región bicatenaria de 1-4 nucleótidos de longitud durante dicha detección a baja temperatura, en donde la fluorescencia resultante de dicha estructura secundaria está internamente inactivada.
- J. El método del párrafo H en el que dicha sonda de hibridación tolerante a los errores de apareamiento es una sonda de baliza molecular.
- 15 K. El método de acuerdo con el párrafo H que comprende una pluralidad de sondas de hibridación a baja temperatura marcadas fluorescentemente de manera diferente, cada una de las cuales tiene una temperatura de fusión con respecto a cualquier diana que está por debajo de la temperatura de recocido del cebador y que en combinación se hibridan con múltiples secuencias dianas posibles, siendo, al menos dos sondas, sondas tolerantes a los errores de apareamiento que se hibridan con una pluralidad de posibles dianas a diferentes temperaturas y que
- 20 tienen fluoróforos que se excitan por la emisión de fluorescencia desde dicho colorante, en donde la detección de amplicones monocatenarios incluye estimular dicha mezcla de reacción a al menos tres temperaturas por debajo de dicha temperatura de apareamiento de cebador con luz que excita el tinte pero no los fluoróforos de dichas sondas tolerantes a los errores de apareamiento y detectar las emisiones de las sondas.
- L. El método de cualquiera de los párrafos A-K, en el que el proceso de amplificación es un proceso de amplificación de PCR lineal posterior a la exponencial (LATE-PCR).
- 25 M. El método de cualquiera de los párrafos A-L, en el que dicha detección es una detección de punto final después de la finalización del proceso de amplificación.
- N. Un kit de reactivos para realizar el método de cualquiera de los párrafos A-M que comprende al menos todos los cebadores y sondas que se utilizarán en el método.
- 30 O. El kit de acuerdo con el párrafo N que incluye además todos los reactivos de amplificación.
- P. Una sonda de hibridación de ácido nucleico bicatenario para una secuencia diana de ácido nucleico preseleccionada que comprende:
- 35 a) un primer oligonucleótido que comprende una primera secuencia perfectamente complementaria a dicha secuencia diana y que tiene una temperatura de fusión calculada (T_m) con respecto a dicha secuencia diana de 30-55°C;
- b) un segundo oligonucleótido que comprende una segunda secuencia que es complementaria a dicha primera secuencia, pero es más corto que dicha primera secuencia en hasta diez nucleótidos;
- c) un marcador fluoróforo unido a dicha primera secuencia que es excitable por emisión de fluorescencia desde un colorante de ADN fluorescente pero no es excitable a la longitud de onda de absorción máxima de dicho colorante; y
- 40 d) un inhibidor no fluorescente unido a dicha segunda secuencia.
- Q. Un conjunto de oligonucleótidos que comprende un par de cebadores LATE-PCR para amplificar una secuencia diana preseleccionada y una sonda según el párrafo P.
- R. Una sonda de hibridación de oligonucleótidos monocatenaria tolerante a los errores por apareamiento a baja temperatura que tiene una primera temperatura de fusión calculada con respecto a su complemento perfecto de no más de 60°C, preferiblemente no más de 50°C, incluyendo dicha sonda una horquilla de bucle de vástago que tiene un vástago cuya temperatura de fusión calculada es al menos 10°C menor que dicha primera temperatura de fusión pero no inferior a 30°C, incluyendo dicha sonda un fluoróforo capaz de absorber la energía de fluorescencia emitida por un colorante de ADN fluorescente y medios para inactivar la fluorescencia que resultaría de exponer dicha sonda a dicho colorante y excitar el colorante en ausencia de una diana para la sonda.
- 45 S. Una sonda de hibridación de oligonucleótidos lineal a baja temperatura
- 50 a) que es tolerante a los errores de apareamiento a temperaturas en el intervalo de 30-60°C;

- b) que forma una estructura secundaria en el intervalo de temperaturas de 30°C a 50°C; y
 - c) está marcado doblemente con
 - (i) un fluoróforo que es excitable por emisión de fluorescencia desde al menos un colorante de ADN fluorescente pero no es excitable a la longitud de onda apropiada para excitar dicho colorante; y
 - (ii) un inhibidor no fluorescente situado de manera que inhibe sustancialmente la fluorescencia asociada con dicha estructura secundaria pero no la fluorescencia asociada con un híbrido sonda-diana.
- T. La sonda de acuerdo con el párrafo S, en donde dicha estructura secundaria es un vástago formado por nucleótidos terminales complementarios, teniendo dicho vástago una T_m mayor que la T_m de cualquier otra estructura secundaria que la sonda formaría en ausencia del vástago.
- 10 U. Un método de amplificación secuencial-pirosecuenciación que comprende,
- a) amplificar un sustrato de ADN mediante una reacción de amplificación de LATE-PCR para preparar un producto de ADN monocatenario;
 - b) eliminar el pirofosfato y, si están presentes, los dNTP sobrantes,
 - c) si es necesario, agregar un oligonucleótido para bloquear el cebador en exceso
- 15 d) añadir reactivos de pirosecuenciación antes de añadir el cebador de secuenciación si el pirofosfato y los dNTP no se han eliminado ya como en b) anterior;
- e) añadir el cebador de secuenciación; y
 - f) realizar la pirosecuenciación.
- 20 V. El método del párrafo U, en el que la etapa b) comprende añadir reactivos de pirosecuenciación y la etapa d) comprende la reposición de tales reactivos.
- W. El método del párrafo U, en el que el pirofosfato se elimina mediante la adición de una enzima con actividad de pirofosfatasa.
- X. El método del párrafo U, en el que los dNTP se eliminan mediante la adición de una enzima con actividad de dNTPasa.

25

REIVINDICACIONES

1. Un método de amplificación de ADN secuencial-secuenciación que comprende:
 - a) amplificar al menos un ADN diana mediante un proceso de LATE-PCR para generar un producto de amplificación que contiene copias de al menos una cadena de cebador en exceso y al menos una cadena de cebador limitante;
 - b) procesar el producto de amplificación diluyendo el producto de amplificación por un factor de al menos ocho; y
 - c) secuenciar directamente las copias de al menos una de dichas cadenas en el producto de amplificación.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho producto de amplificación se diluye en un factor de al menos veinte.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la dilución del producto de amplificación se realiza en dos etapas.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la dilución comprende combinar el producto de amplificación con una mezcla de reactivos de secuenciación.
5. El método de la reivindicación 1, en el que el al menos un ADN diana comprende al menos dos dianas.
6. El método de la reivindicación 1, en el que el al menos un ADN diana comprende al menos dos secuencias variantes.
7. El método de la reivindicación 1, en el que dicha secuenciación es una secuenciación de ciclo didesoxi.
8. El método de la reivindicación 1, en el que dicha secuenciación es una pirosecuenciación.
9. El método de la reivindicación 8, en el que dicho procesamiento comprende añadir reactivos de pirosecuenciación.
10. El método de la reivindicación 8, en el que dicho procesamiento comprende añadir pirofosfatasa.
11. El método de la reivindicación 8, en el que se usan cantidades límite de desoxinucleótido trifosfatos en el proceso LATE-PCR.

FIGURA 1

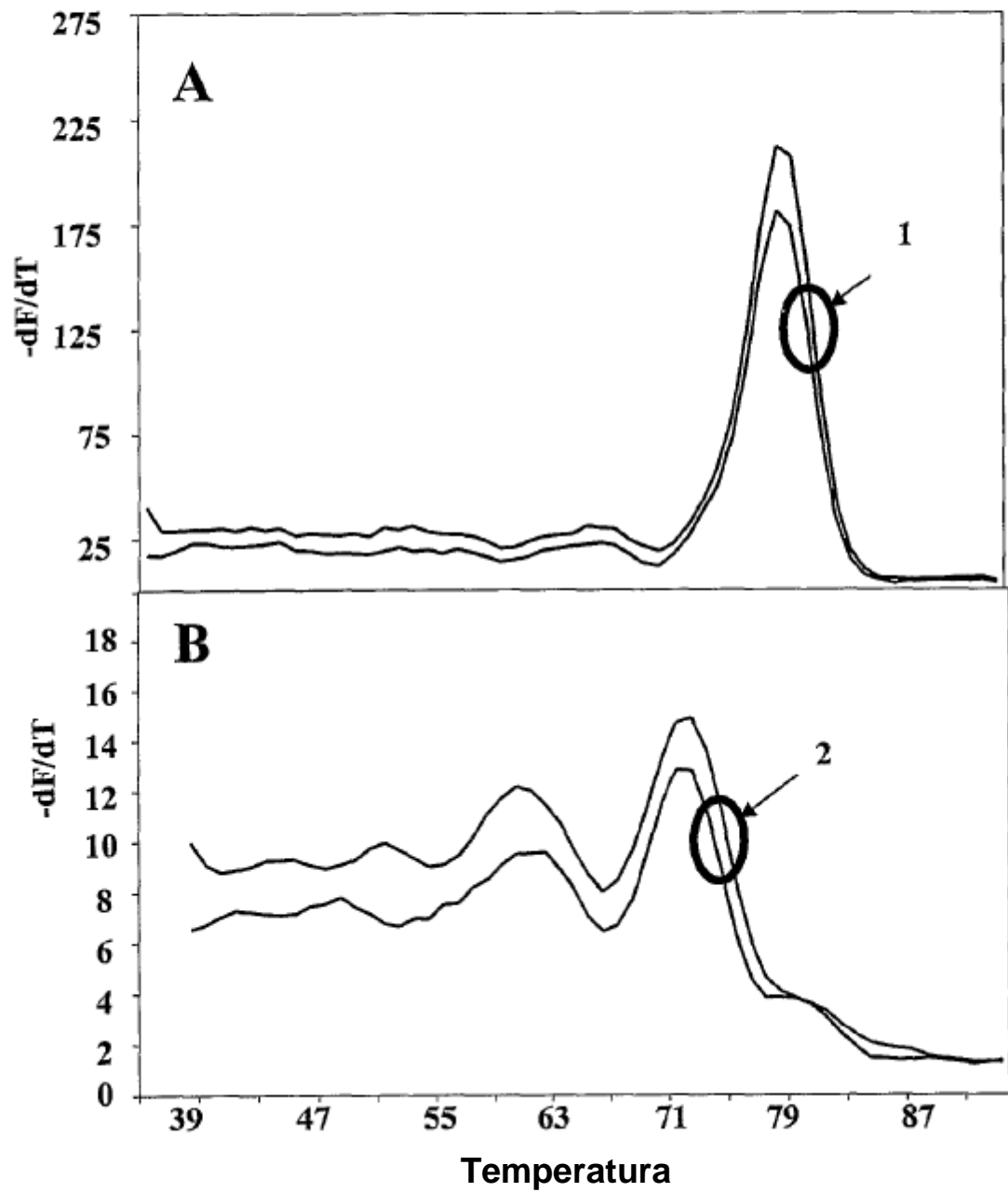


FIGURA 2

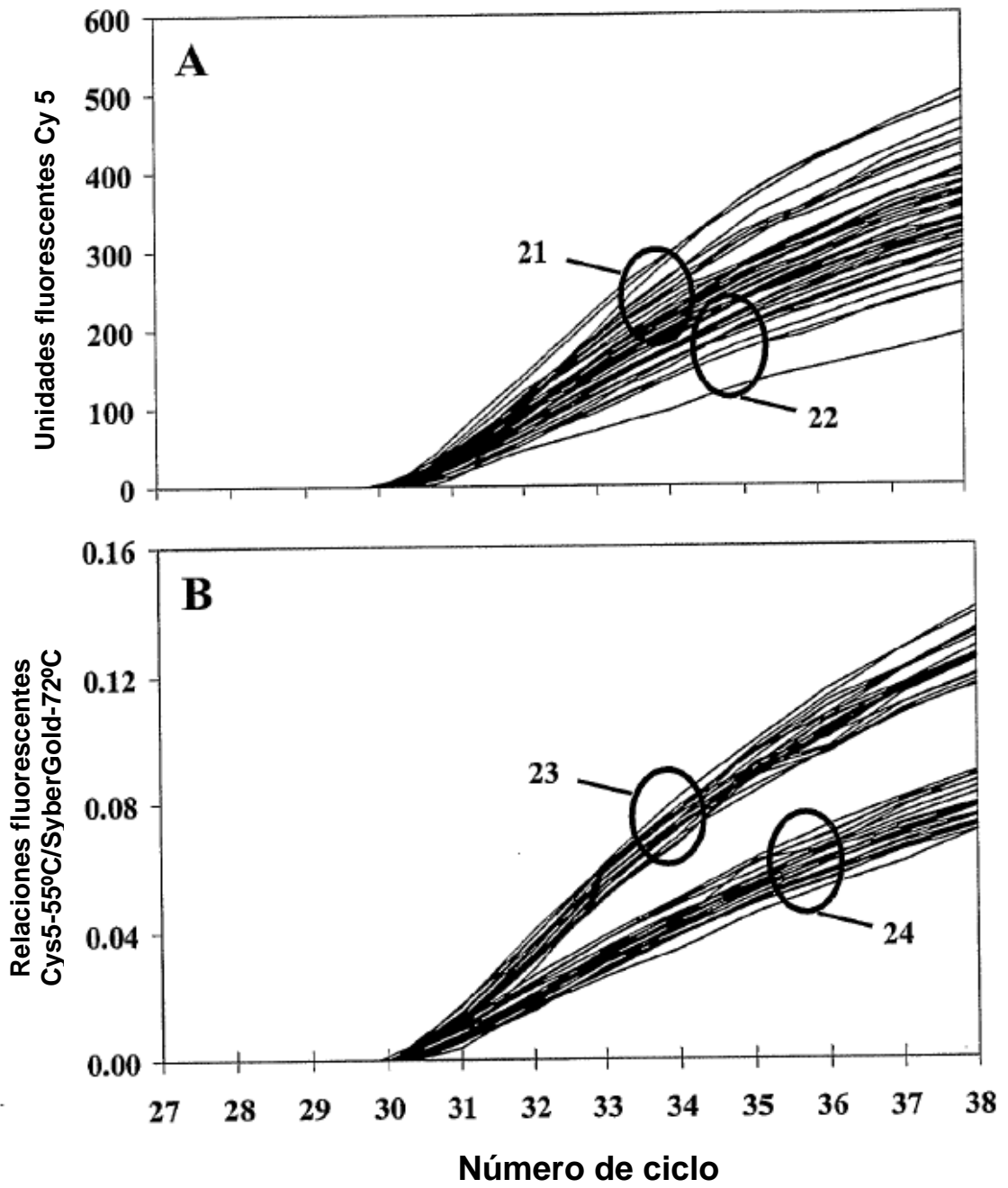


FIGURA 3

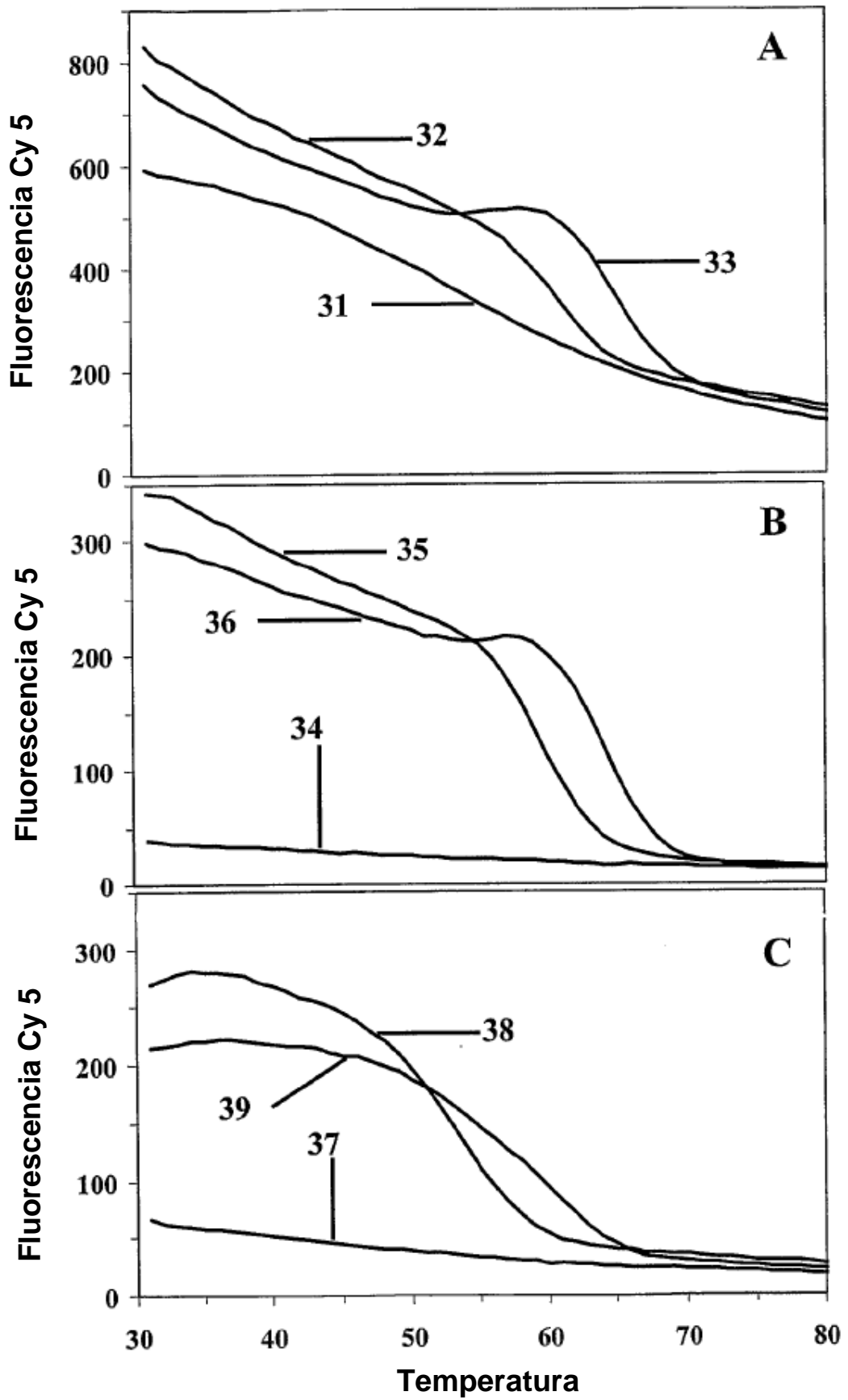


FIGURA 4

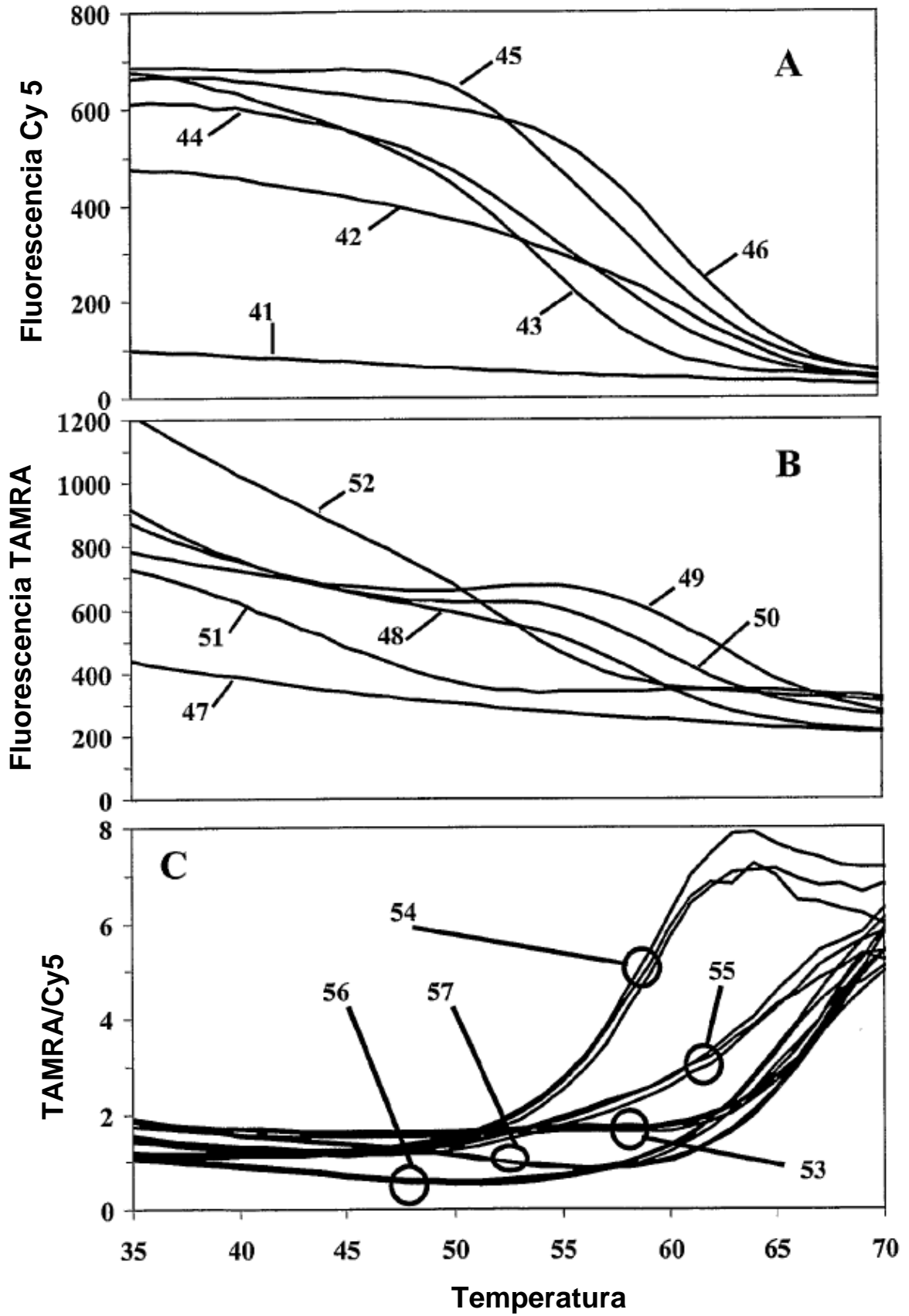


FIGURA 5

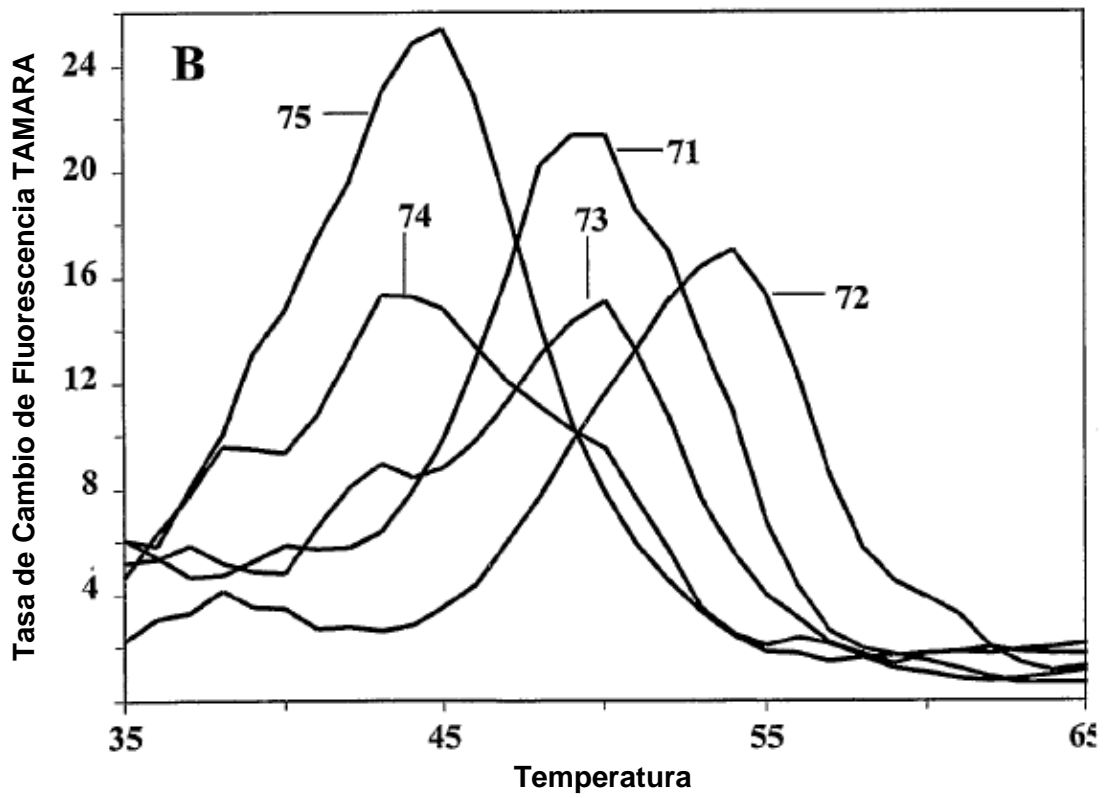
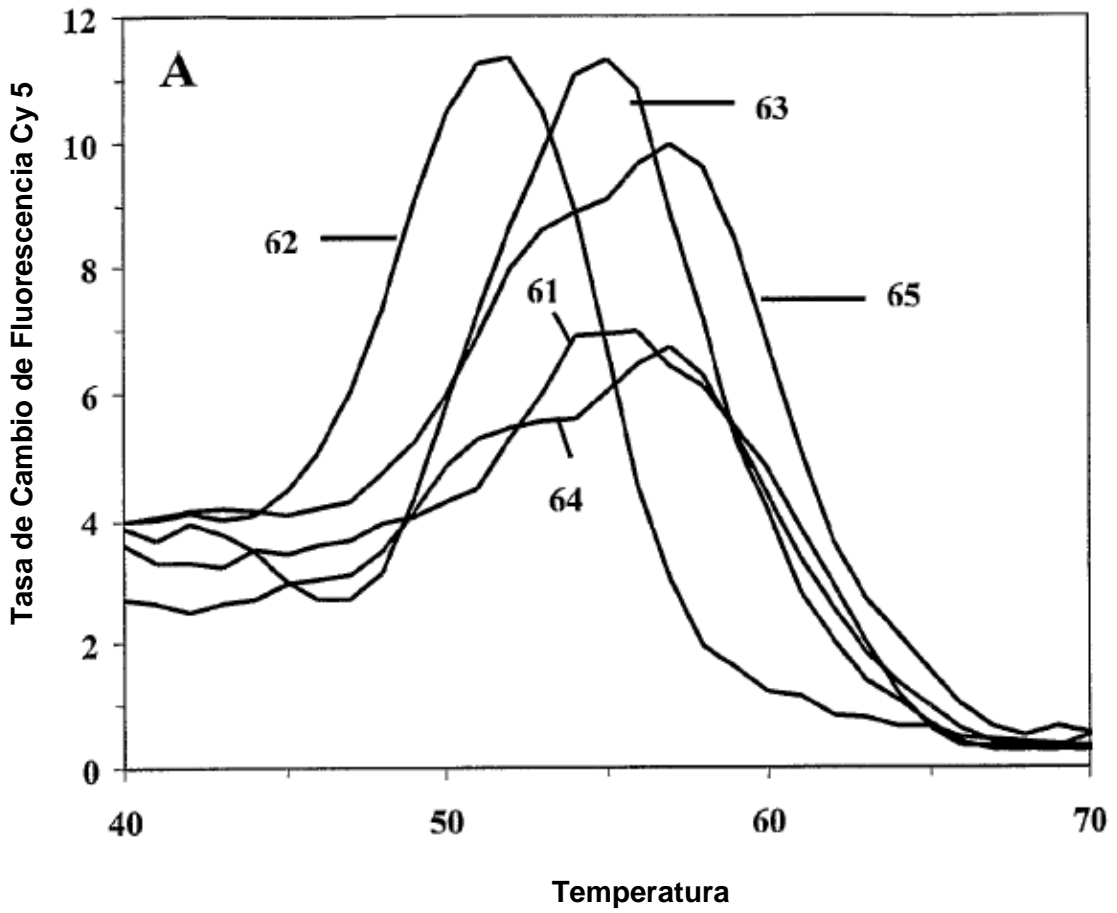


FIGURA 6

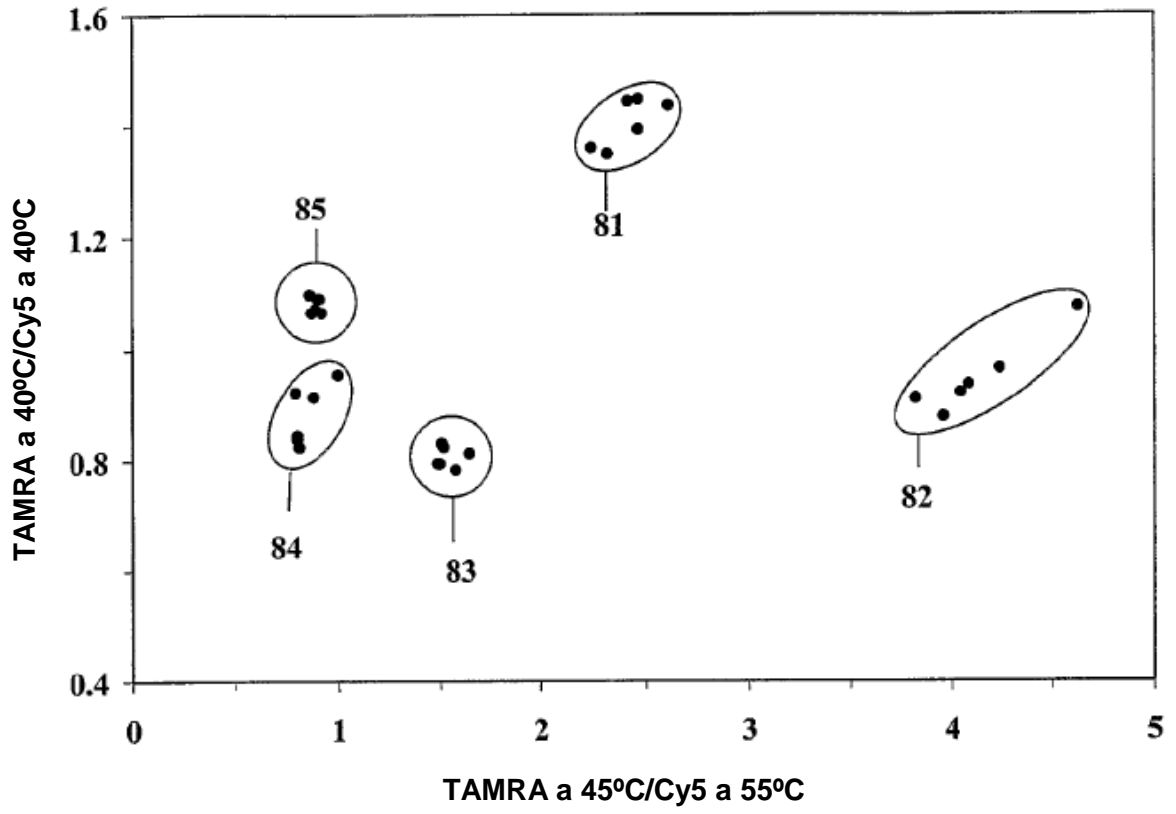


FIGURA 7

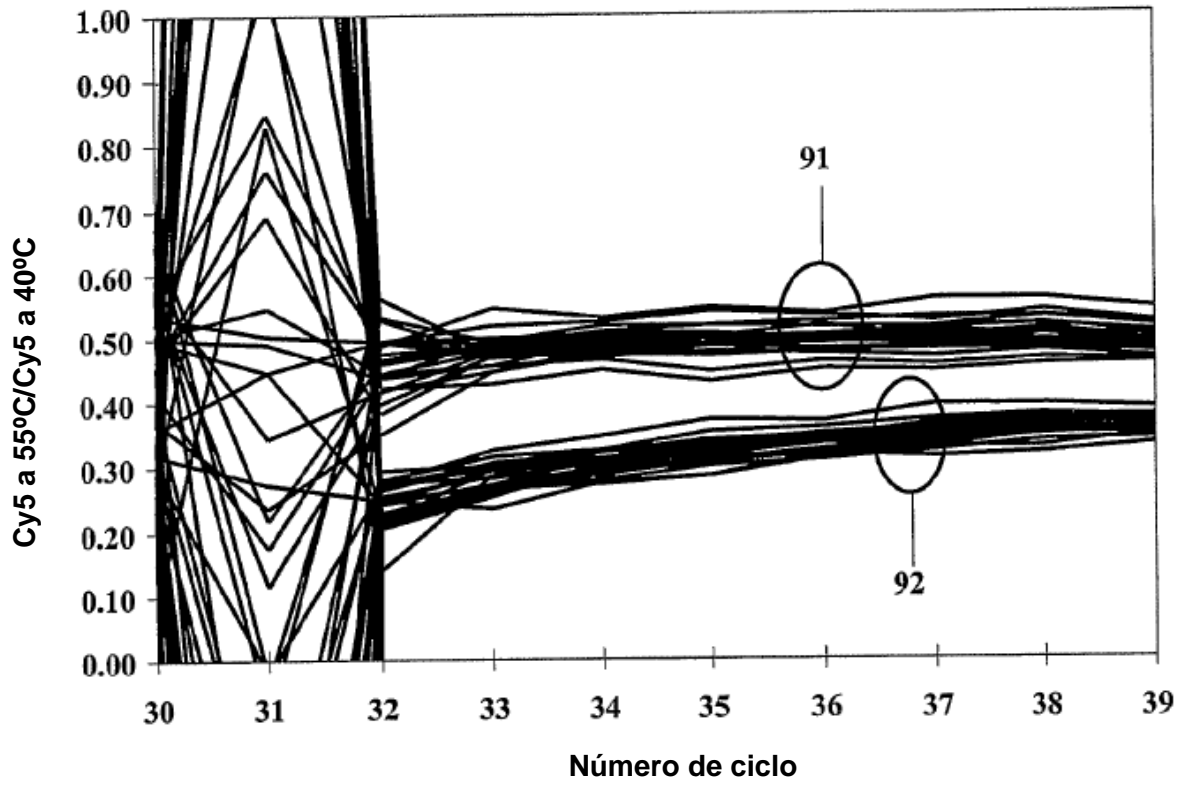


FIGURA 8

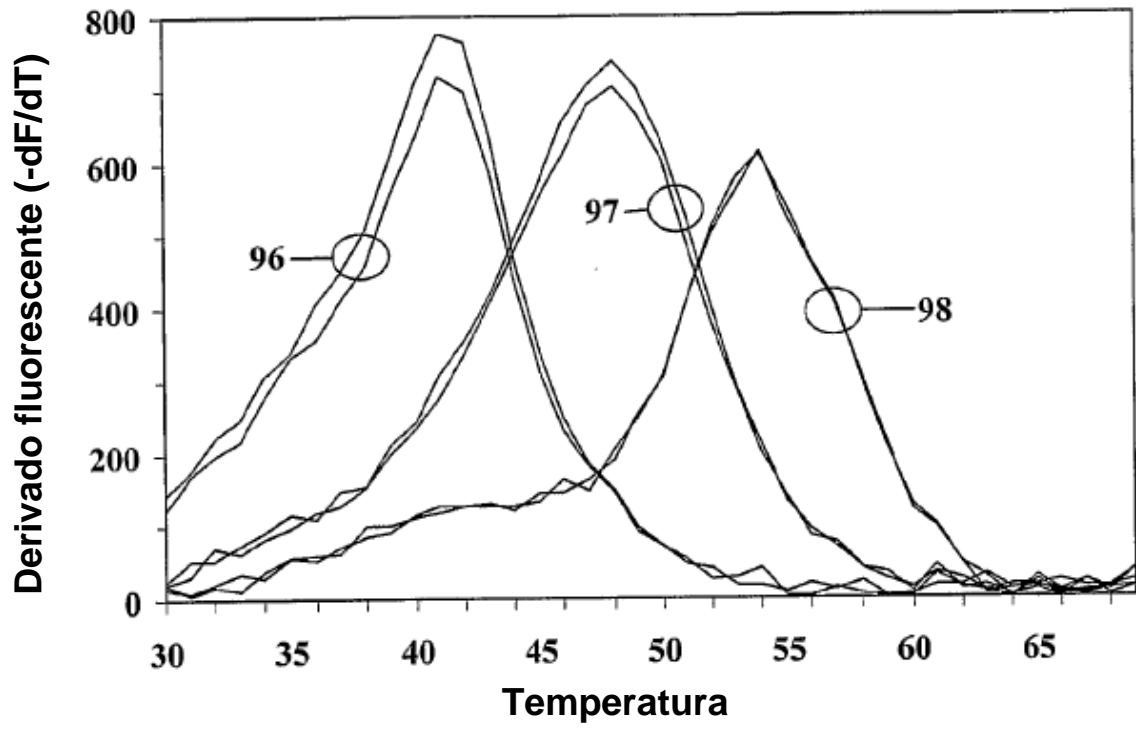


FIGURA 9

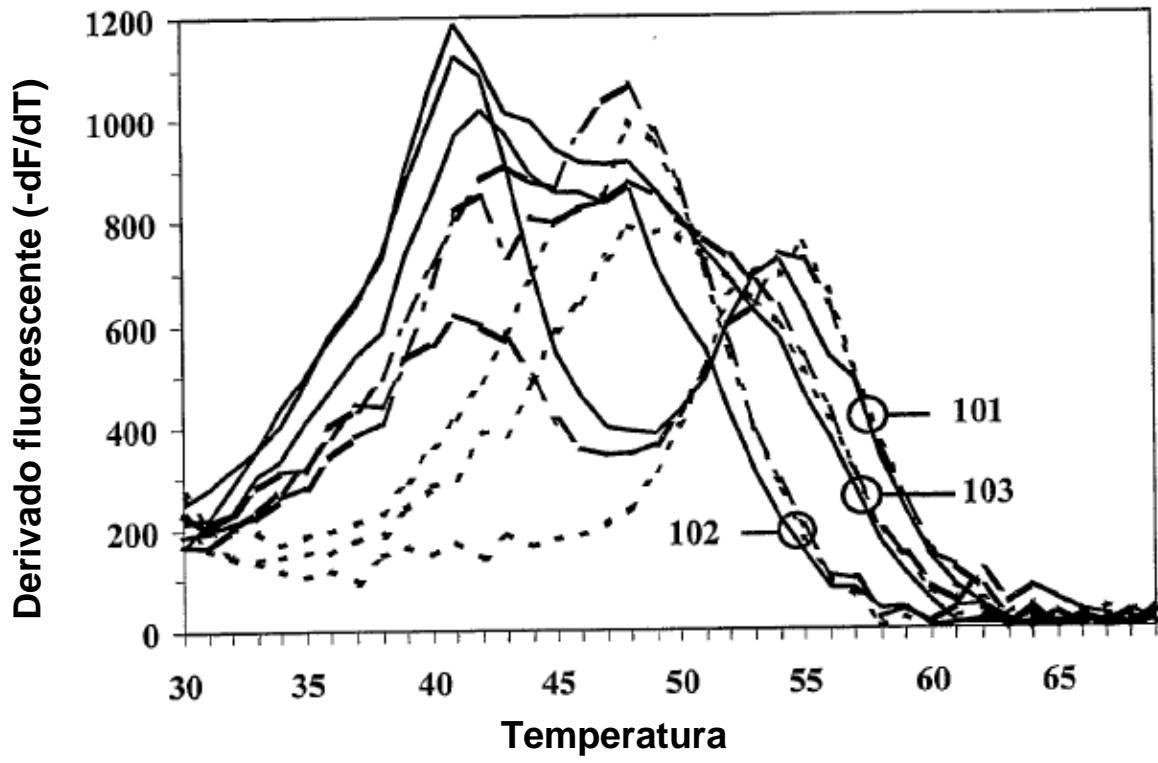


FIGURA 10

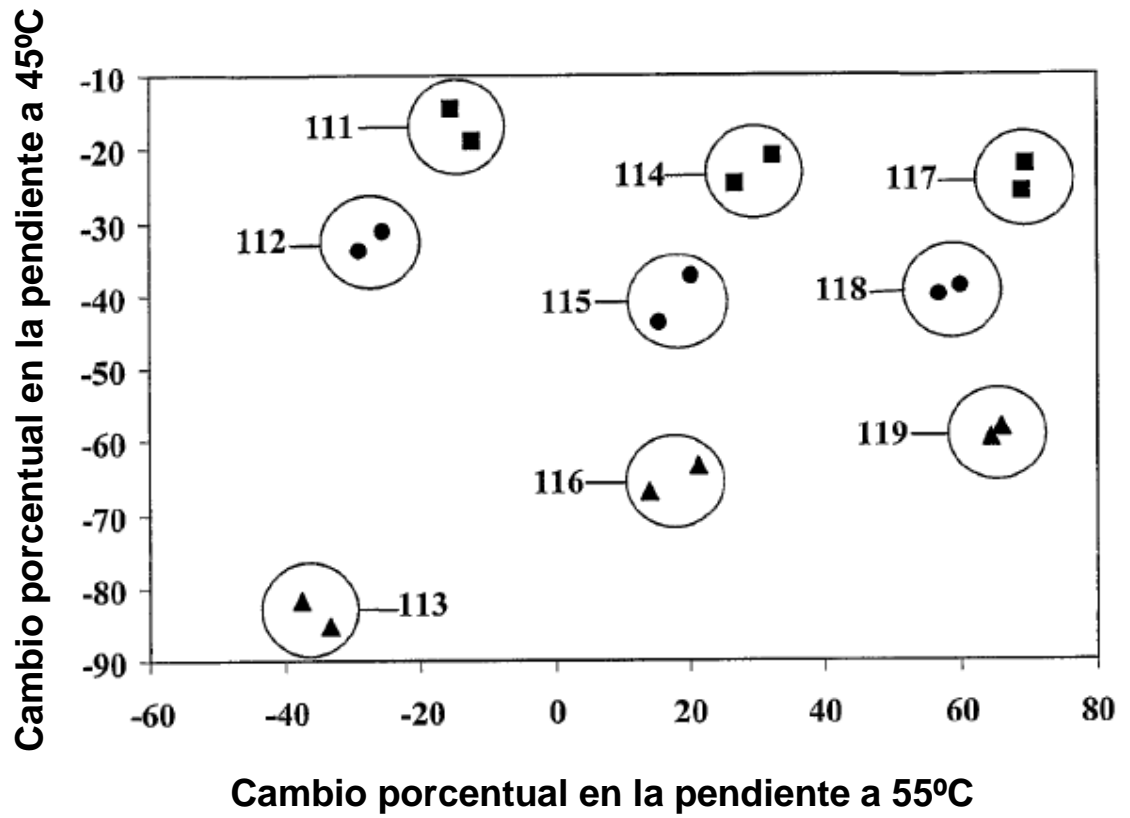


FIGURA 11

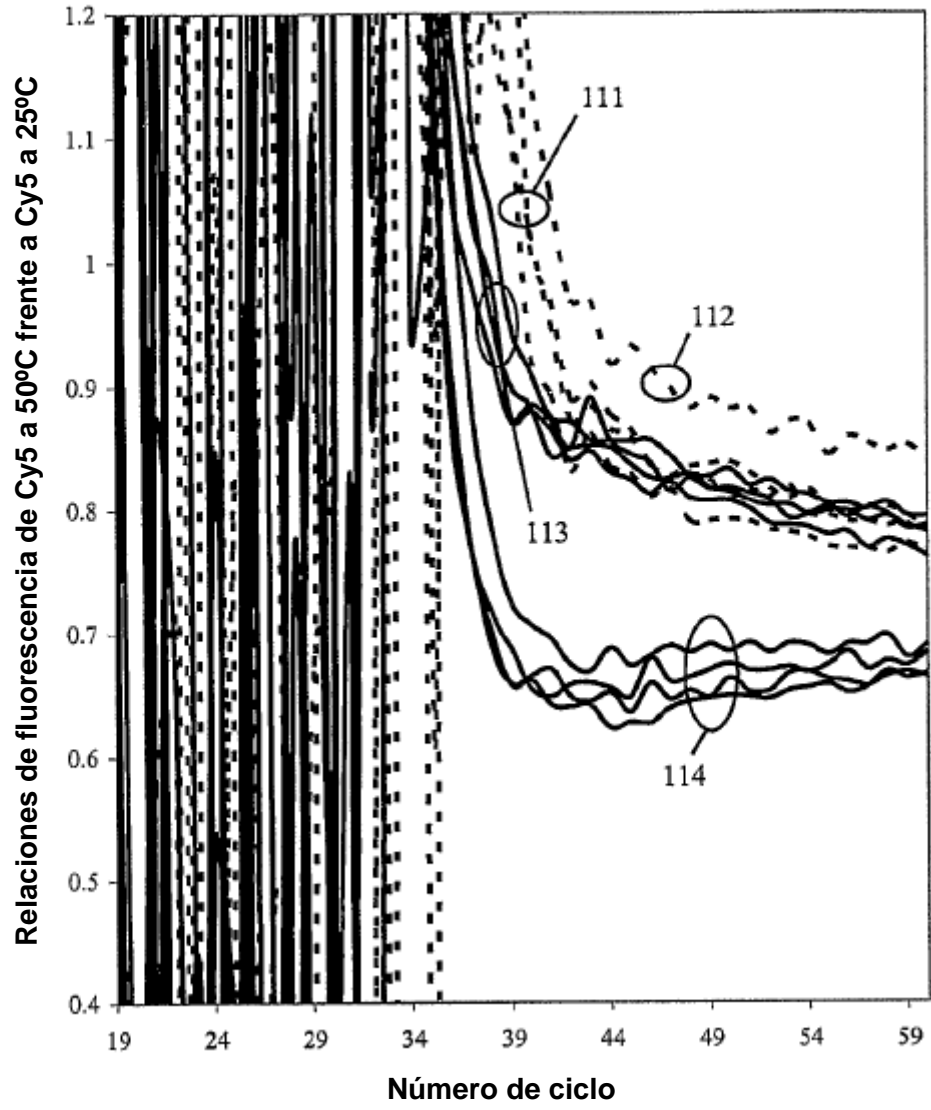


FIGURA 12

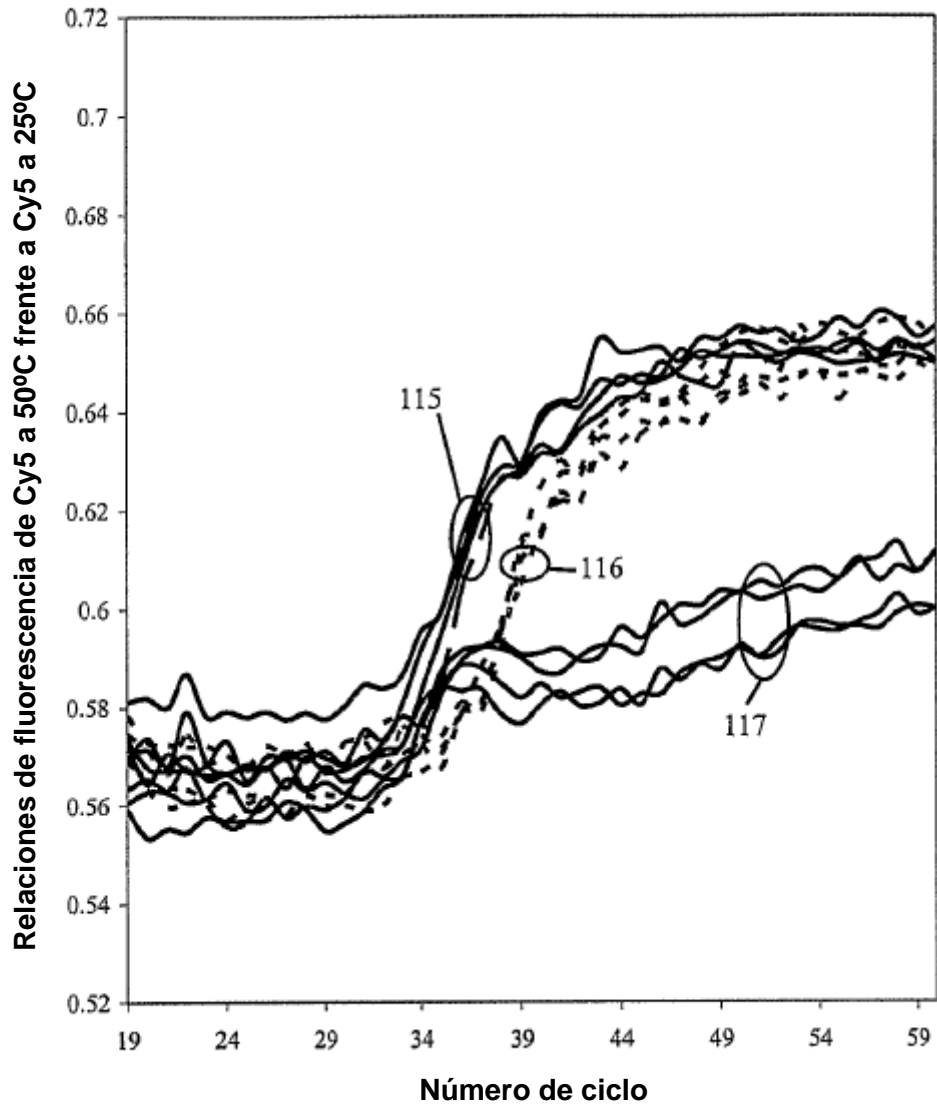


FIGURA 13

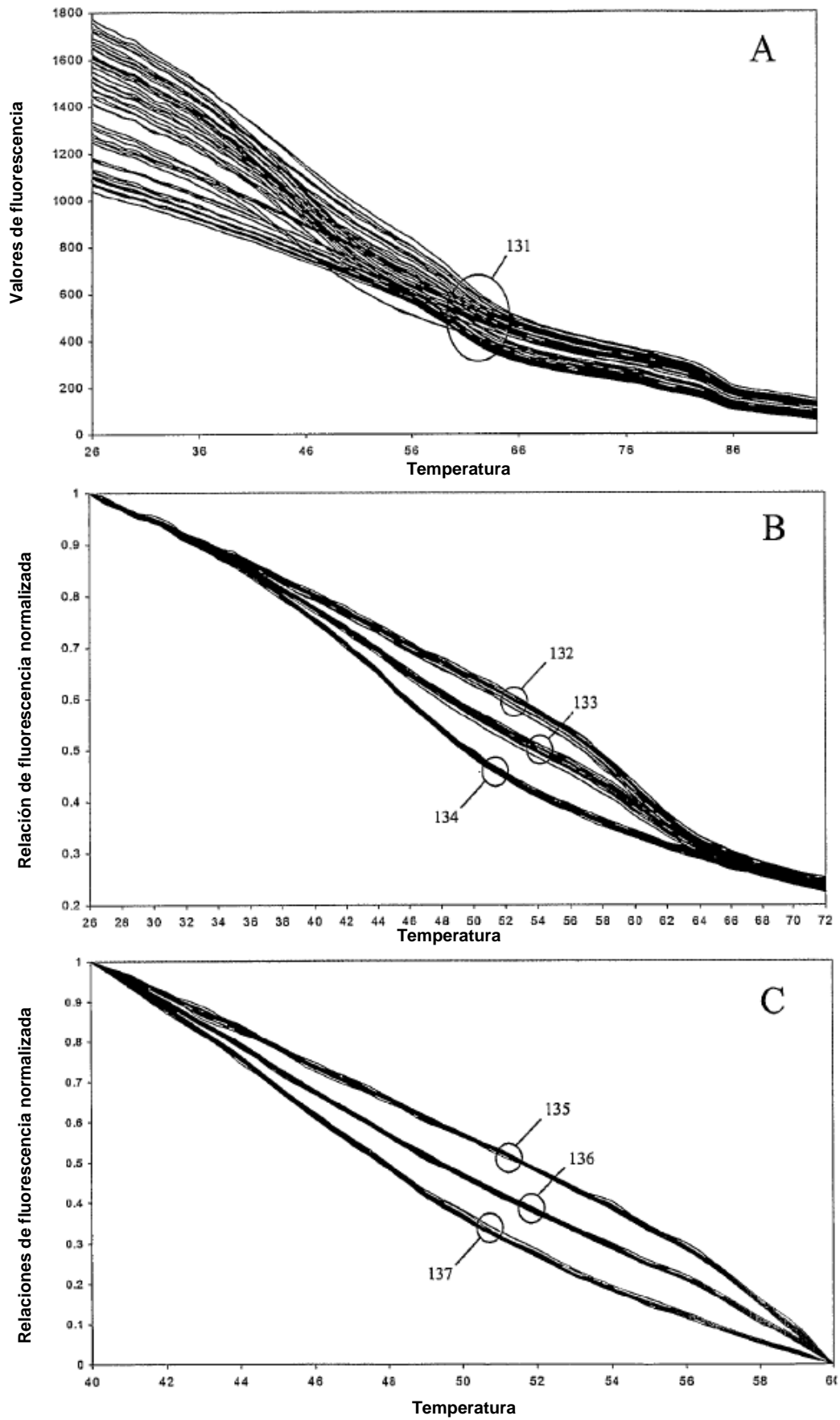


FIGURA 14

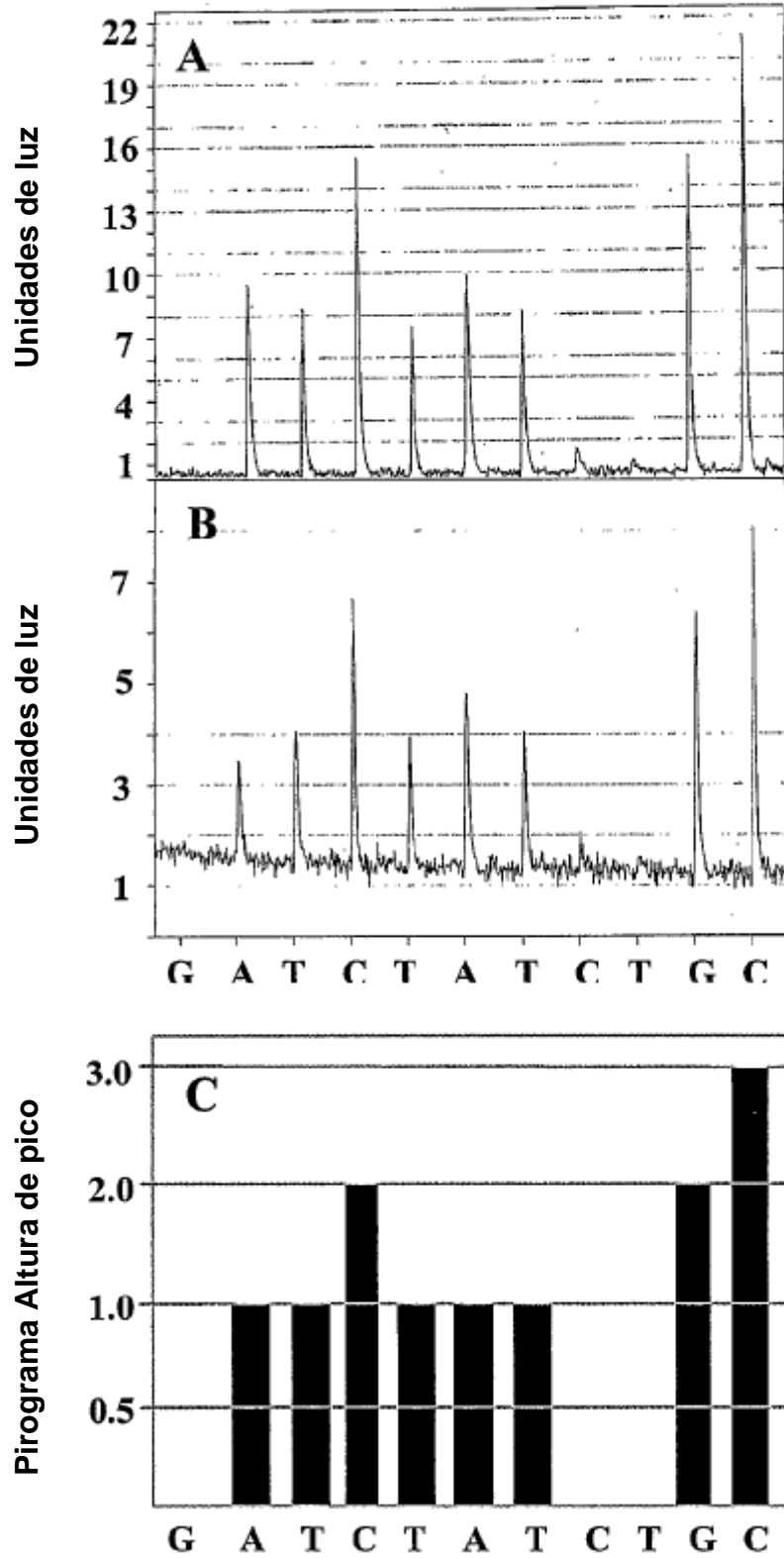


FIGURA 15

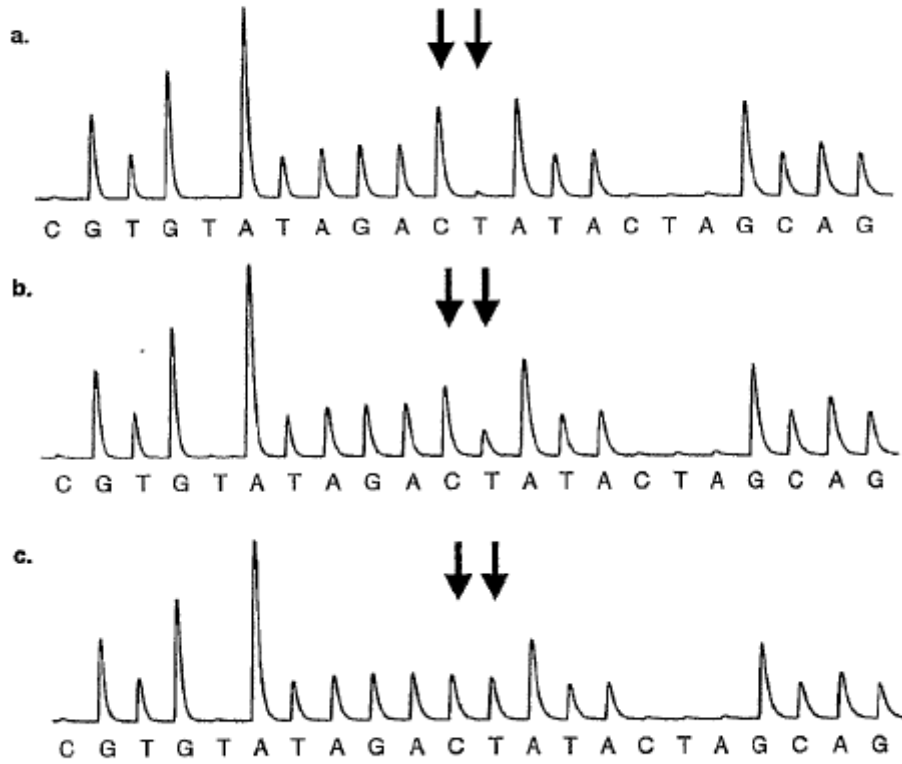


FIGURA 16

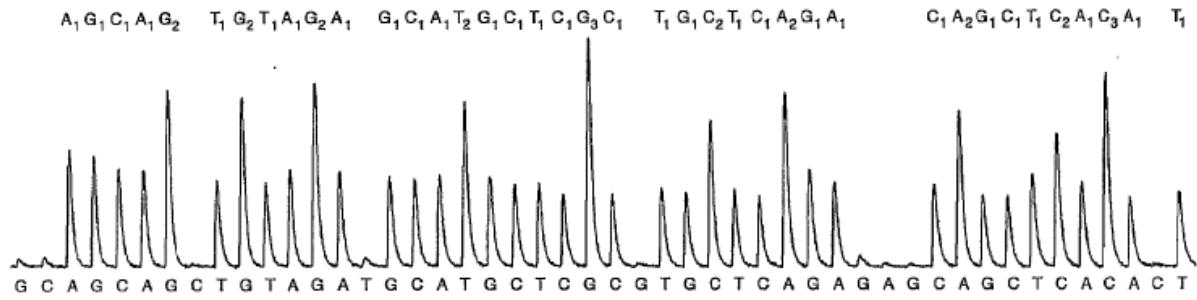
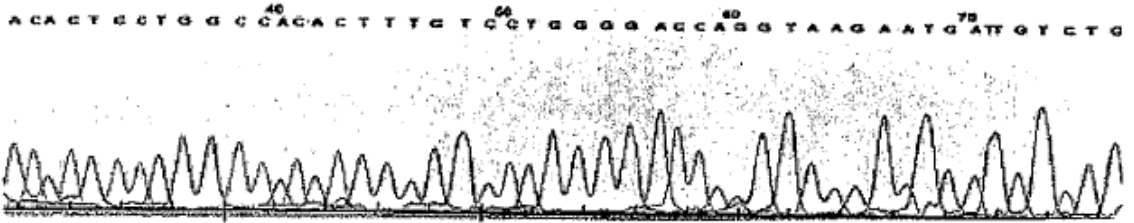
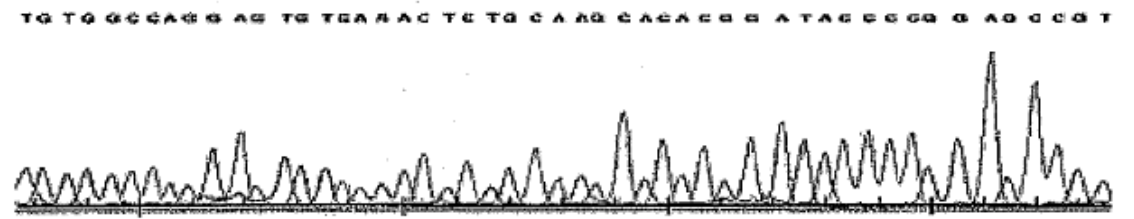


FIGURA 17

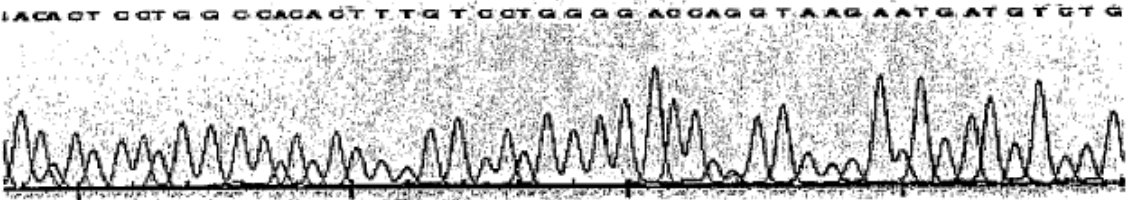
A



B



C



D

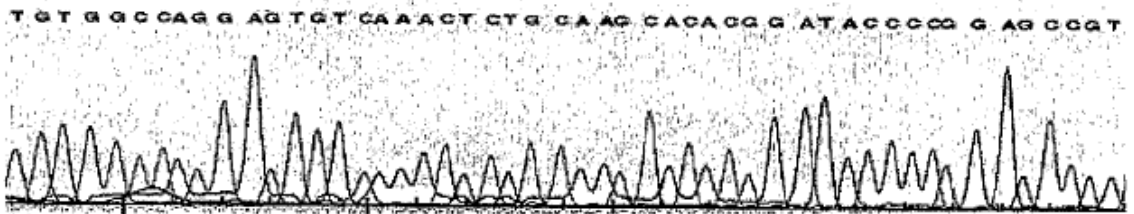


FIGURA 18

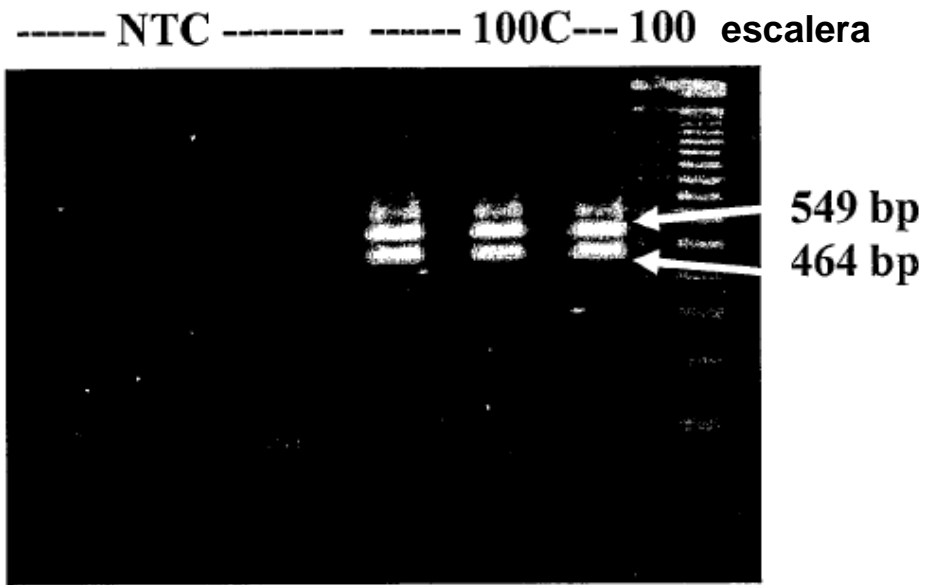
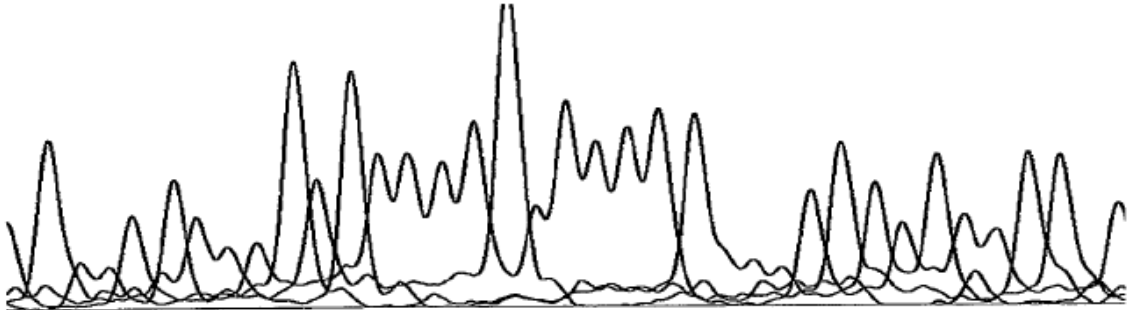


FIGURA 19

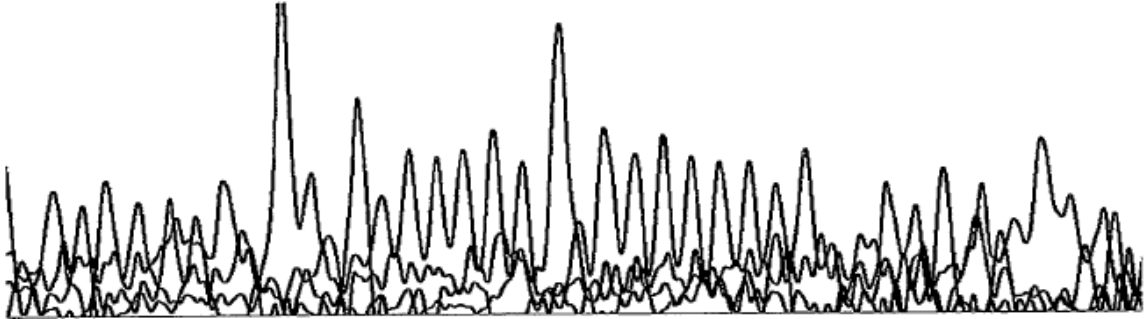
A

C T T G T A A G C A T G G G G A G G G G G T T T T G A T G T G G A T C G



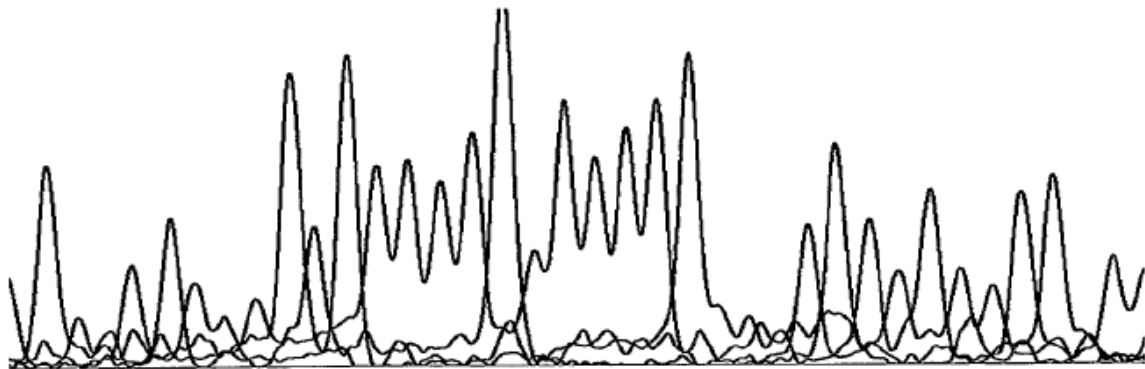
B

T A A N N A G A C A G A G N A G A N C G A G G N A G A G A A G G G G G N G N G N N G A T A T A A G A G A T A A T N N A A T A T A



C

C T T G T A A G C A T G G G G A G G G G G T T T C T G A T G T G G A T T G C



D

A A A T C T C C A C C A A A C C C C C C C N A C C C C C G C T T G C N N A G G C C A

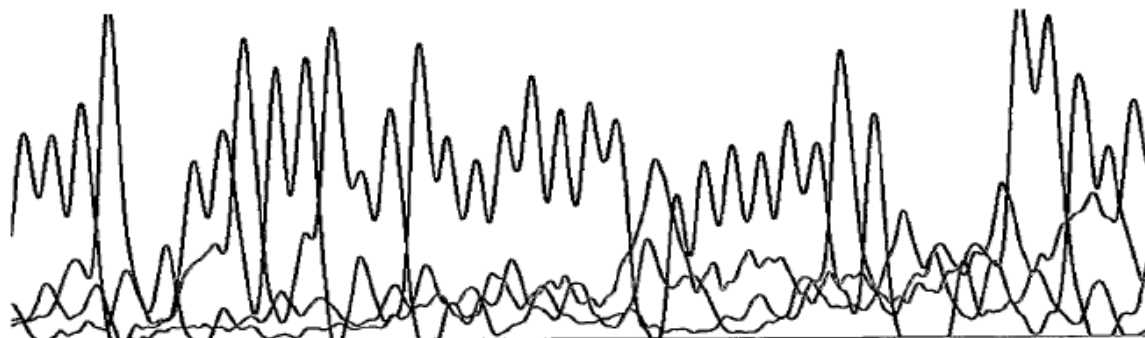


FIGURA 20

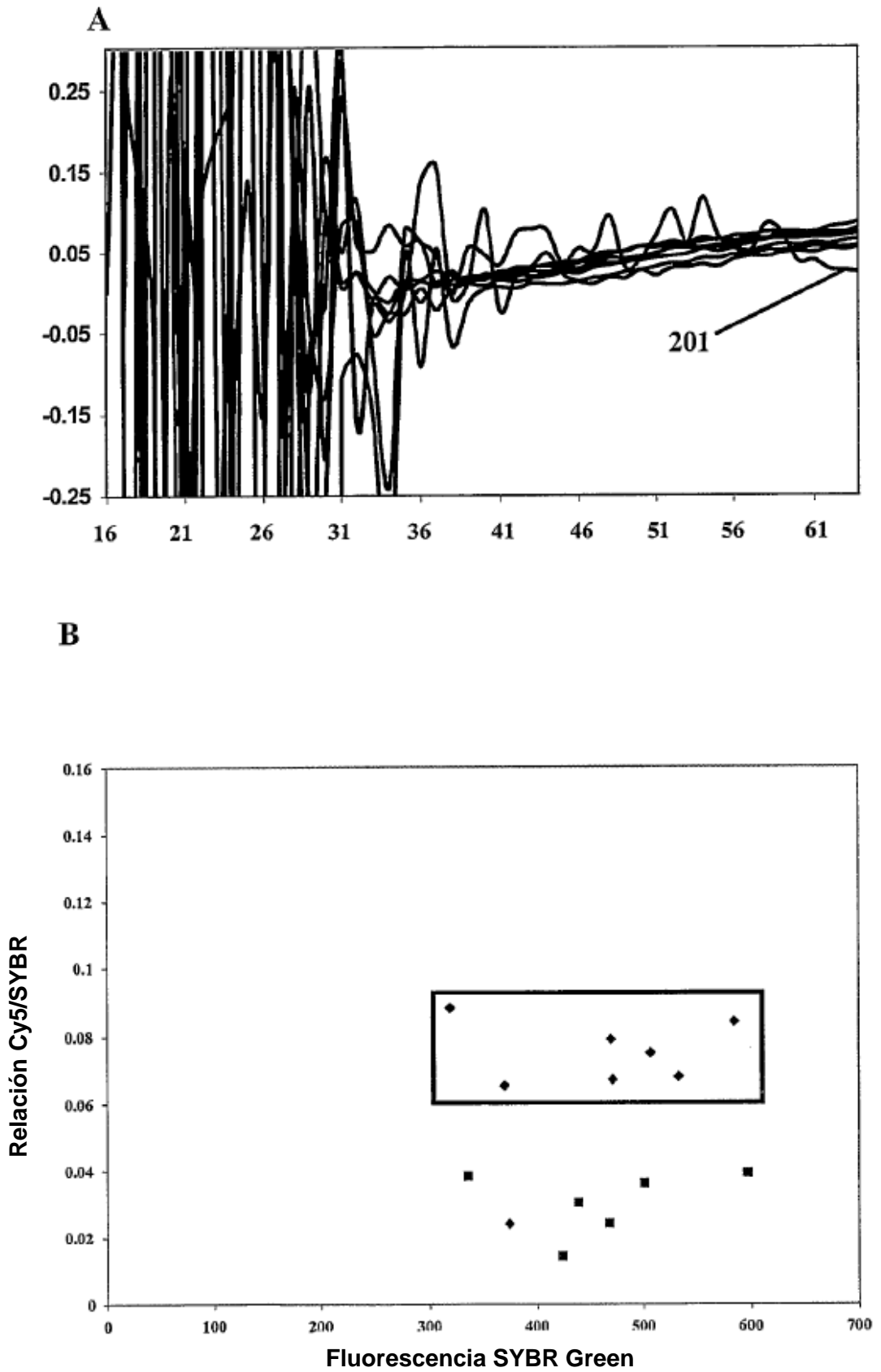


FIGURA 21

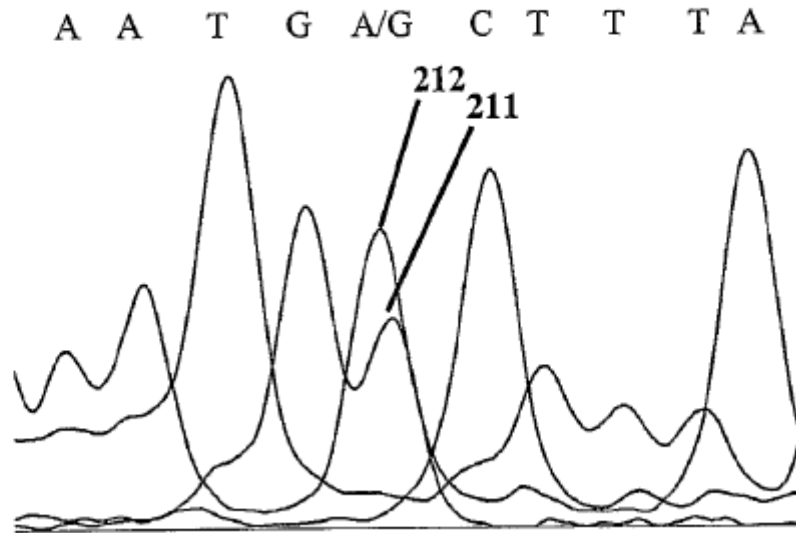


FIGURA 22

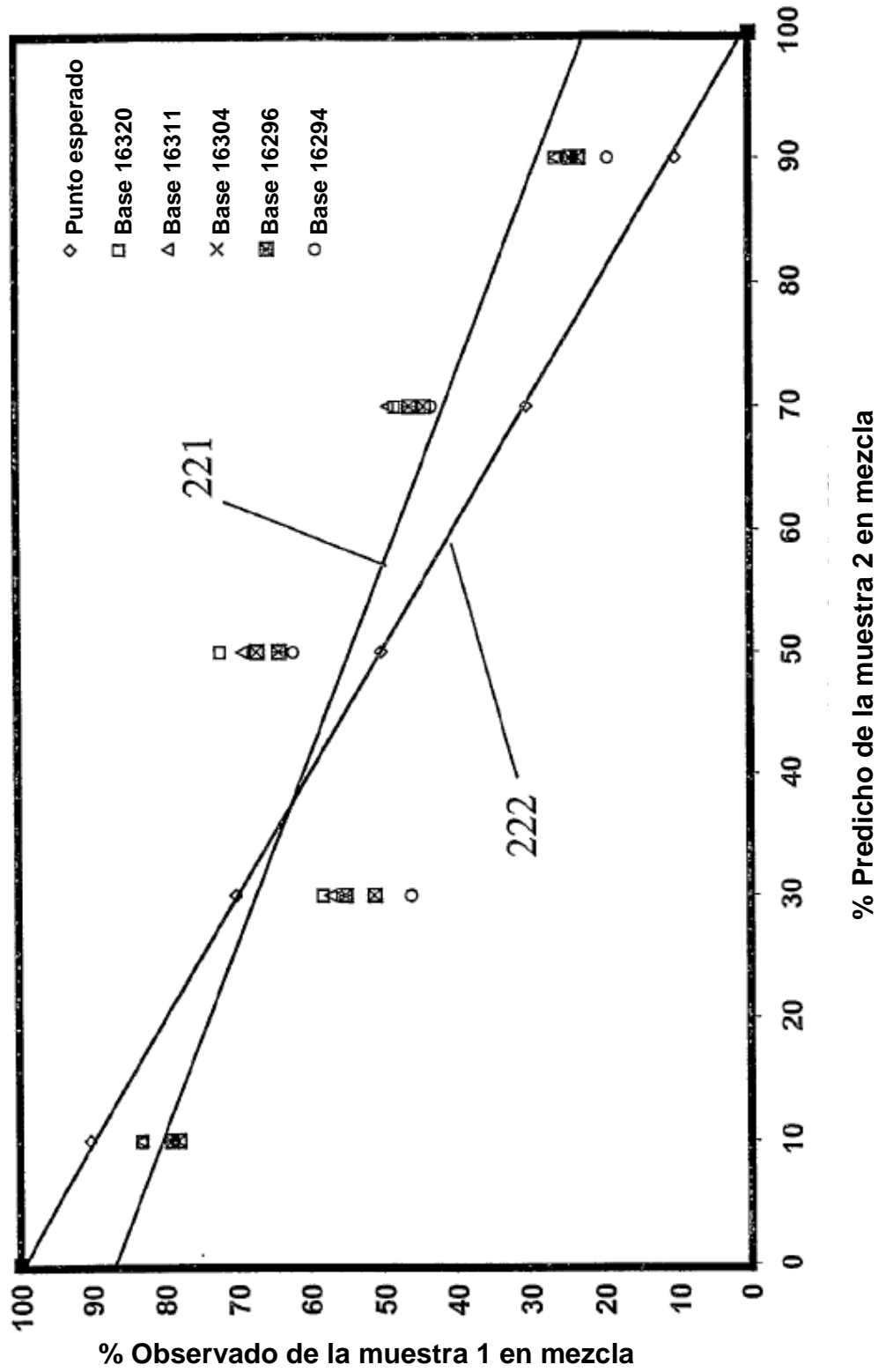


FIGURA 23

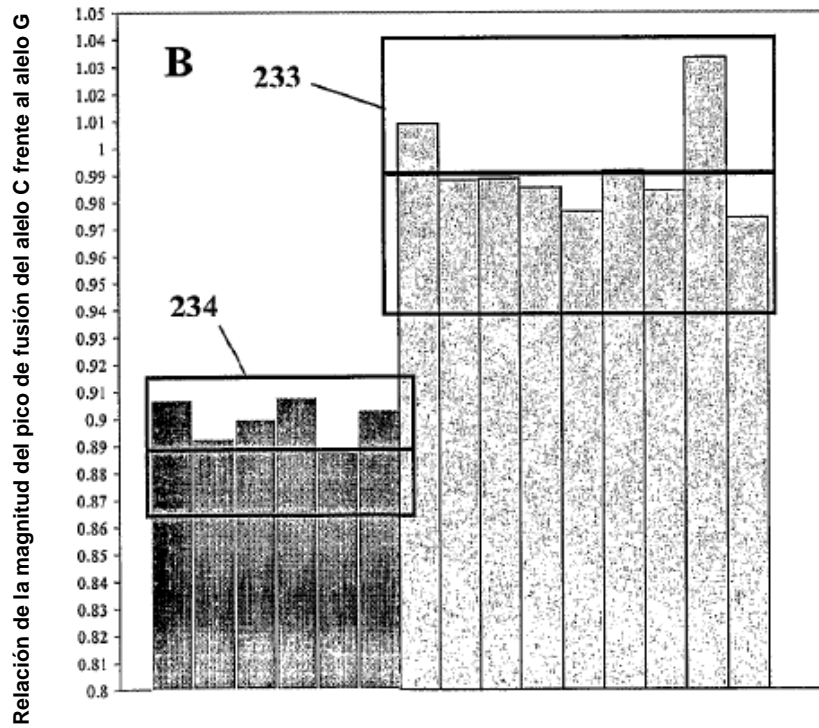
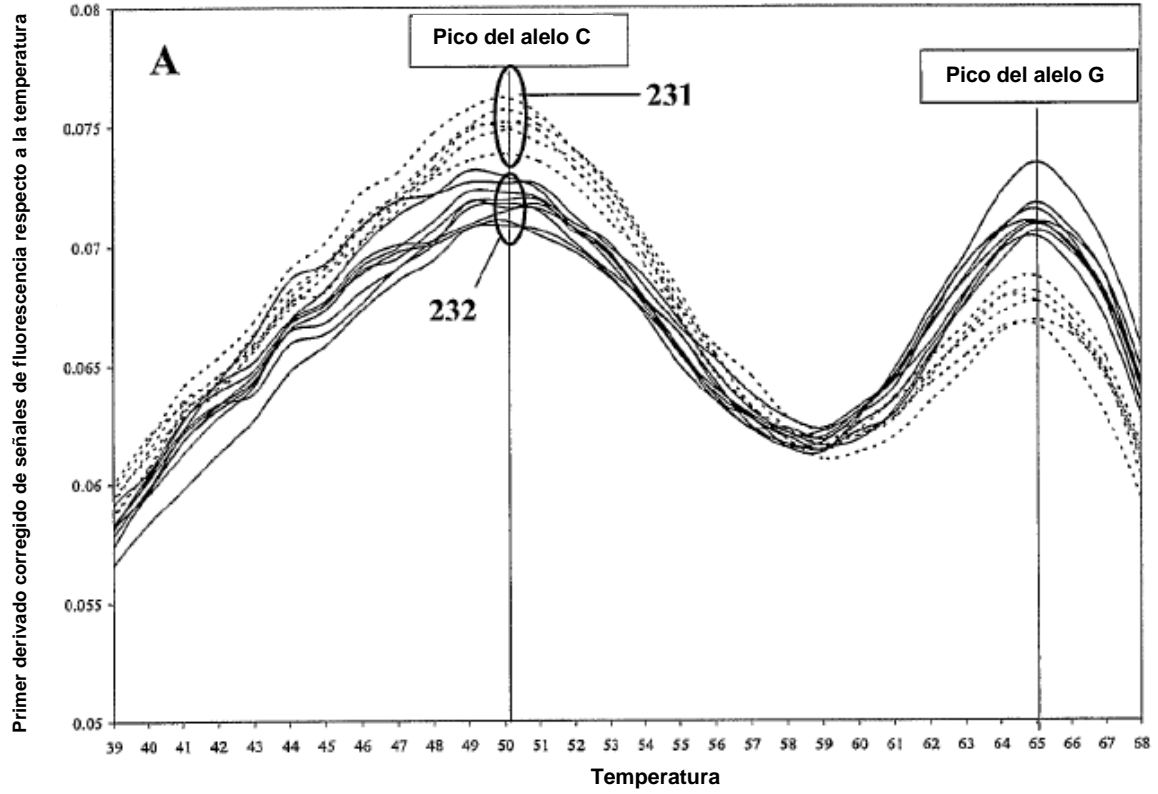


FIGURA 24

