(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 669 244**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/68 (2008.01)
C12N 15/11 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2013 PCT/KR2013/001492**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13133561**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2013 E 13757737 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2823061**

(54) Título: **Detección de variación de nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico diana mediante escisión CTO y ensayo de extensión**

(30) Prioridad:

05.03.2012 US 201261606713 P
20.03.2012 US 201261613195 P
06.07.2012 US 201261668628 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.05.2018

(73) Titular/es:

SEEGENE, INC. (100.0%)
8Fl, 9Fl Taewon Bldg. 65-5, Bangi-dong Songpa-gu
Seoul 138-050, KR

(72) Inventor/es:

CHUN, JONG YOON y
LEE, YOUNG JO

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

DESCRIPCIÓN

Detección de variación de nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico diana mediante escisión CTO y ensayo de extensión

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la detección de una variación de nucleótidos en una secuencia de ácidos nucleicos diana mediante un ensayo PTOCE (escisión y extensión de oligonucleótidos de sondaje y marcaje, por sus siglas en inglés).

Descripción de la técnica relacionada

La hibridación del ADN es un proceso fundamental en la biología molecular, en el que influyen la fuerza iónica, la composición de bases, la longitud del fragmento a que ha sido reducido el ácido nucleico, el grado de desapareamiento de las bases y la presencia de agentes desnaturalizantes. Las técnicas de hibridación del ADN constituyen herramientas sumamente útiles para la determinación de secuencias de ácidos nucleicos específicas y son sin duda valiosas en diagnóstico clínico, investigación genética y análisis de laboratorio forense.

Sin embargo, los métodos y procesos convencionales que dependen primordialmente de la hibridación están sujetos a un alto riesgo de resultados positivos falsos debido a la hibridación inespecífica entre las sondas y las secuencias que no son la diana. Por tanto, existen problemas que se han de resolver para mejorar su fiabilidad.

Aparte de los procesos de hibridación con sondas, se han planteado diversas estrategias con reacciones enzimáticas adicionales, por ejemplo, el método con sonda TaqMan™.

En el método con sonda TaqMan™, la sonda marcada e hibridada con una secuencia de ácidos nucleicos diana es escindida por la actividad nucleasa 5’ de una ADN polimerasa dependiente de cebador situada en dirección 5’ (o corriente arriba), lo que genera una señal que indica la presencia de una secuencia diana (Patentes de EE.UU. N.º 5.210.015, 5.538.848 y 6.326.145). El método de la sonda TaqMan™ sugiere dos estrategias para la generación de la señal: la escisión dependiente de la polimerización y la escisión independiente de la polimerización. En la escisión dependiente de la polimerización, la extensión del cebador situado en dirección 5’ tiene que producirse antes de que la polimerasa de ácidos nucleicos alcance el extremo 5’ de la sonda marcada. A medida que la reacción de extensión prosigue, la polimerasa escinde progresivamente el extremo 5’de la sonda marcada. En la escisión independiente de la polimerización, el cebador situado en dirección 5’ y la sonda marcada se hibridan con una secuencia de ácidos nucleicos diana muy próxima, de modo que la unión de la polimerasa de ácidos nucleicos al extremo 3’del citado cebador la pone en contacto con el extremo 5’de la sonda marcada para liberar el marcador. Además, el método de la sonda TaqMan™ desvela que la sonda marcada que en su extremo 5’ tiene una región de cola 5’ no hibridable con la secuencia diana también es escindida y forma un fragmento que comprende la citada región de cola 5’.

Se han publicado algunos métodos en los que una sonda que tiene una región de cola en 5’ no complementaria con la secuencia diana es escindida por una nucleasa 5’ para liberar un fragmento que comprende la región de cola en 5’.

Por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.691.142 desvela una estructura de escisión que ha de ser digerida por la actividad nucleasa 5’ de la ADN polimerasa. La estructura de escisión se ejemplifica en que un oligonucleótido que comprende un segmento 5’ que no es complementario y un segmento 3’ que es complementario con un molde se hibrida con el molde y un oligonucleótido situado en dirección 5’ se hibrida con el molde que está muy cerca. La estructura de escisión es escindida por una ADN polimerasa que tiene actividad nucleasa 5’ o por una ADN polimerasa modificada con actividad sintética reducida para liberar el segmento 5’ que no es complementario con el molde. Después, el segmento 5’ liberado se hibrida con un oligonucleótido que tiene una horquilla formando una estructura de escisión, induciendo de este modo reacciones de escisión progresivas que permiten detectar una secuencia diana.

La patente de EE.UU. N.º 7.381.532 desvela un proceso en que la estructura de escisión que tiene el oligonucleótido situado en dirección 5’ con el extremo 3’ bloqueado es escindida por una ADN polimerasa que tiene actividad nucleasa 5’ o por una nucleasa FEN que libera una región «solapa» 5’ no complementaria; esta región solapa 5’ liberada se detecta por análisis de tamaño o con un marcador interactivo doble. La patente de EE.UU. N.º 6.893.819 desvela que las solapas liberadas detectables se producen con un método de amplificación secuencial mediado por solapa y dependiente de la síntesis de ácidos nucleicos. En este método, una solapa desprendida de una primera estructura de escisión escinde, de un modo dependiente de la síntesis de ácidos nucleicos, una segunda estructura de escisión que a su vez libera una solapa, detectándose las solapas liberadas. La patente de EE.UU. N.º 7.309.573 desvela un método que incluye la formación de una solapa liberada producida mediante una síntesis de ácido

nucleico; la exptensión de la solapa liberada; la escisión de un oligonucleótido derante la extesión de la solapa y la detección de una señal generada mediante la escisión del oligonucleótido.

Mediante la hibridación de sondas marcadas con fluorescencia en una fase líquida es posible detectar simultáneamente una pluralidad de secuencias nucleotídicas diana usando incluso un solo tipo de marcador fluorescente mediante el análisis de la curva de fusión. Sin embargo, las técnicas convencionales para la detección de las secuencias diana mediante la escisión por nucleasa 5' de sondas con doble marcaje interactivo requieren diversos tipos de marcadores fluorescentes para diferentes secuencias diana si se pretenden detectar simultáneamente múltiples dianas, lo que limita el número de secuencias diana detectables a causa de la limitación en el tipo de marcadores fluorescentes.

La publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2008-0241838 desvela un método de detección de dianas usando la escisión de una sonda que tiene un segmento en 5' no complementario con la secuencia de ácidos nucleicos diana y la hibridación con una sonda de captura. En el segmento 5' no complementario se coloca un marcador. La sonda marcada hibridada con la secuencia diana se escinde y libera un fragmento y a continuación ese fragmento se hibrida con la sonda de captura que permite detectar la presencia de la secuencia diana. En este método, es necesario que la sonda sin escindir/intacta no se hibride con la sonda de captura. Para ello, es preciso inmovilizar en un sustrato sólido la sonda de captura más corta. Sin embargo, esa limitación reduce la eficiencia de la hibridación en el sustrato sólido y dificulta la optimización de las condiciones de reacción.

Lyamichev et al. 1999 (*Nature Biotechnology*, vol. 17, páginas 292-296) utilizan una nucleasa *AfuFEN1* y tanto la sonda señal como la sonda invasiva deben tener un sitio discriminativo de variación de nucleótidos para la detección de una variación de nucleótidos en el ácido nucleico diana. Además, la escisión de la sonda señal por la nucleasa *AfuFEN1* se produce a condición de que existan nucleótidos solapantes entre la sonda señal y la sonda invasiva y la región de nucleótidos solapados tiene una complementariedad con el sitio de variación de nucleótidos del ácido nucleico diana. Puesto que la escisión de la sonda señal se determina medainte la estructura precisa formada por el solapamiento de la sonda señal y la sonda invasiva, la sonda invasiva no debe extenderse para la escisión precisa de la sonda señal. En consecuencia, el método de Lyamichev et al, 1999 no puede usar simultáneamente la reacción de amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana tal como PCR para detectar la mutación.

Por tanto, siguen existiendo necesidades en la técnica de desarrollar nuevos enfoques para la detección de una secuencia diana, preferentemente múltiples secuencias diana, en una fase líquida y en una fase sólida, no solo mediante hibridación sino también mediante reacciones enzimáticas, tales como la reacción nucleolítica 5' de una manera más conveniente, fiable y reproducible. Además, también se necesita en la técnica un método novedoso de detección de la diana no limitado por el número de tipos de marcadores (en particular, marcadores fluorescentes).

Mientras tanto, las variaciones de nucleótidos son importantes en los campos de investigación y clínico. Entre ellas, los polimorfismos de nucleótido único (SNP, por sus siglas en inglés) se encuentran más habitualmente en un genoma humano y sirven como marcadores para loci relacionados con enfermedad y farmacogenética (Landegren et al, 1998; Roses, 2000). Los SNP se encuentran en una proporción de aproximadamente 1 por 1000 pb en un genoma humano y su número total se estima en aproximadamente tres millones. Para la detección de variaciones de nucleótidos, tales como SNP, deleción, inserción y translocación, se han notificado diversas tecnologías de discriminación alélica.

La sonda TaqMan específica de alelo se diseña de manera que se hibride solamente con secuencias diana perfectamente apareadas en la etapa de extensión de PCR. La sonda TaqMan tiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora capaz de amortiguar la señal fluorescente de la molécula indicadora. La sonda TaqMan hibridada con secuencias diana es digerida por la actividad nucleasa 5' de la ADN polimerasa Taq y la molécula indicadora y la molécula amortiguadora se separan para generar una señal diana. Para la discriminación alélica, se usan sondas de 13-20 monómeros conjugadas con un conector de surco menor (MGB, por sus siglas en inglés) (Livak, et al, *Genet. Anal.* 14: 143-149 (1999)). Puesto que el método de discriminación alélica usando la sonda TaqMan emplea no solo la reacción de hibridación, sino también las reacciones enzimáticas de la actividad nucleasa 5', su especificidad se potencia. Sin embargo, el método tiene graves problemas tales como dificultades en el diseño de la sonda específica de alelo y condiciones de reacción optimizadas que tienen que discriminar la diferencia mediante un desapareamiento. Además, el conjugado con MGB es uno de los localizadores de problemas en la sonda TaqMan específica de alelo.

Por tanto, siguen existiendo necesidades en la técnica de desarrollar nuevos enfoques para la detección de una variación de nucleótidos de una manera más conveniente, fiable y reproducible, que sea capaz de estar libre de los defectos de las tecnologías convencionales.

En toda la presente solicitud, se referencian diversas patentes y publicaciones y se proporcionan citas entre paréntesis. La divulgación de estas patentes y publicaciones en sus entidades describe el estado de la técnica a la que se refiere la presente invención.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han realizado investigaciones exhaustivas para desarrollar estrategias novedosas para detectar secuencias diana con más precisión y facilidad, entre otros aspectos, de manera múltiple. Como resultado, se han establecido protocolos novedosos para la detección de secuencias diana, en que la detección de la diana se logra mediante la hibridación de sondas, la escisión enzimática de dichas sondas y la extensión y detección de un ácido nucleico bicatenario extendido. Los presentes protocolos están bien adaptados tanto a las reacciones en fase líquida como en fase sólida y garantizan la detección de varias secuencias diana con mayor precisión y facilidad.

Además, los presentes inventores han realizado intensas investigaciones para desarrollar enfoques novedosos para detectar variaciones de nucleótidos con más precisión y comodidad mejoradas, entre otras cosas, de una manera múltiple. Como resultado, se han establecido protocolos novedosos para la detección de variaciones de nucleótidos, en los que la detección de la variación de nucleótidos se consigue mediante la hibridación de sondas, la escisión de sondas enzimáticas, la extensión y la detección de una cadena extendida. En particular, de forma intrigante, el sitio de escisión de la sonda se ha vuelto ajustable dependiendo de la presencia y la ausencia de variaciones de nucleótidos de interés y los fragmentos liberados por escisión en diferentes sitios se distinguen por sus capacidades de extensión en un molde artificial. Los presentes protocolos están bien adaptados a reacciones en fase líquida, así como a reacciones en fase sólida y asegurar la detección de múltiples variaciones de nucleótidos, con más precisión y comodidad mejoradas.

Por tanto, la divulgación proporciona un método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana a partir de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos por un ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO).

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un método para detectar una variación de nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico diana mediante un ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO).

La presente divulgación proporciona un kit para detectar una secuencia de ácido nucleico diana a partir de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO).

Es otro objetivo de la presente invención el uso de un kit para detectar una variación de nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico diana mediante un ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO) de acuerdo con el método de la presente invención.

Otros objetivos y ventajas de la presente invención se harán evidentes en la descripción detallada a continuación conjuntamente con las reivindicaciones y los dibujos adjuntos.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra las estructuras esquemáticas del PTO (Oligonucleótido de sondaje y marcaje, por sus siglas en inglés) y del CTO (Oligonucleótido de captura y molde, por sus siglas en inglés) usados en el ensayo de escisión y extensión de PTO (ensayo PTOCE). Es preferible que los extremos 3'del PTO y del CTO estén bloqueados para impedir su extensión.

La Fig. 2 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE con el análisis de fusión incluido. El CTO contiene una molécula indicadora (*reporter*, en inglés) y una molécula amortiguadora (*quencher*, en inglés) en su segmento molde.

La Fig. 3 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE con el análisis de fusión incluido. El CTO contiene una molécula indicadora en su segmento molde. La molécula indicadora es necesaria para mostrar distintas intensidades de la señal según su presencia en forma monocatenaria o bicatenaria.

La Fig. 4 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE con el análisis de fusión incluido. El CTO contiene un residuo iso-dC y una molécula indicadora en su segmento molde. Durante la reacción de extensión se incorpora un complejo de molécula amortiguadora-iso-dGTP al ácido nucleico bicatenario extendido.

La Fig. 5 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE con el análisis de fusión incluido. El PTO contiene una molécula indicadora en su segmento de marcaje en 5' y el CTO un residuo iso-dC en su segmento molde. Durante la reacción de extensión se incorpora un complejo de molécula amortiguadora-iso-dGTP al ácido nucleico bicatenario extendido.

La Fig. 6 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE con el análisis de fusión incluido. El PTO contiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora en su segmento de marcaje en 5'.

La Fig. 7 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE con el análisis de fusión incluido. El PTO contiene una molécula indicadora en su segmento de marcaje en 5'. La molécula indicadora es necesaria para mostrar distintas intensidades de la señal según su presencia en forma monocatenaria o bicatenaria.

La Fig. 8 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE con el análisis de fusión incluido. El PTO contiene una molécula amortiguadora en su segmento de marcaje en 5' y el CTO una molécula indicadora en su segmento de captura.

La Fig. 9 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE incluyendo la detección a una temperatura prefijada. El CTO contiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora en su segmento molde. El CTO está inmovilizado en un sustrato sólido por su extremo 3'.

La Fig. 10 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE incluyendo la detección a una temperatura prefijada. Durante la reacción de extensión se incorpora un dATP marcado con un grupo indicador al ácido nucleico bicatenario extendido. El CTO está inmovilizado en un sustrato sólido a través de su extremo 3'.

La Fig. 11 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE incluyendo la detección a una temperatura prefijada. El CTO posee un residuo iso-dC en su segmento molde y durante la reacción de extensión se incorpora un complejo de indicador-iso-dGTP al ácido nucleico bicatenario extendido. El CTO está inmovilizado en un sustrato sólido por su extremo 3'.

La Fig. 12 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE incluyendo la detección a una temperatura prefijada. El PTO contiene una molécula indicadora en su segmento de marcaje en 5'. El CTO está inmovilizado en un sustrato sólido por su extremo 5'.

La Fig. 13 representa esquemáticamente el ensayo PTOCE incluyendo la detección a una temperatura prefijada con un colorante intercalante. El CTO está inmovilizado en un sustrato sólido por su extremo 5'.

La Fig. 14 muestra los resultados de la detección de un gen de *Neisseria gonorrhoeae* mediante el ensayo PTOCE incluido el análisis de fusión. El CTO contiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora en su segmento molde.

La Fig. 15 muestra los resultados de la detección de un gen de *Neisseria gonorrhoeae* mediante el ensayo PTOCE incluido el análisis de fusión. El PTO contiene una molécula amortiguadora en su extremo 5' y el CTO una molécula indicadora en su extremo 3'.

La Fig. 16 muestra que los valores de la T_m de los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos se ajustan con las secuencias del CTO.

La Fig. 17 muestra los resultados de la detección de un gen de *Neisseria gonorrhoeae* mediante el ensayo PTOCE con amplificación por PCR. El CTO contiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora en su segmento molde. La Fig. 17A muestra los resultados del ensayo PTOCE complementado con la detección con PCR en tiempo real y la Fig. 17B muestra los resultados del ensayo PTOCE complementado con el análisis de la fusión tras la PCR.

La Fig. 18 muestra los resultados de la detección de un gen de *Neisseria gonorrhoeae* mediante el ensayo PTOCE con amplificación por PCR. El CTO contiene un residuo iso-dC y una molécula indicadora en su extremo 5'. Durante la reacción de extensión se incorpora un complejo de molécula amortiguadora-iso-dGTP al ácido nucleico bicatenario extendido. La Fig. 18A muestra los resultados del ensayo PTOCE complementado con la detección con PCR en tiempo real y la Fig. 18B muestra los resultados del ensayo PTOCE complementado con el análisis de la fusión tras la PCR.

La Fig. 19 muestra los resultados de la detección de un gen de *Neisseria gonorrhoeae* mediante el ensayo PTOCE con amplificación por PCR. El PTO contiene una molécula amortiguadora en su extremo 5' y el CTO una molécula indicadora en su extremo 3'. La Fig. 19A muestra los resultados del ensayo PTOCE complementado con la detección con PCR en tiempo real y la Fig. 19B muestra los resultados del ensayo PTOCE complementado con el análisis de la fusión tras la PCR.

La Fig. 20 muestra los resultados de la detección simultanea del gen de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) y del gen de *Staphylococcus aureus* (SA) mediante el ensayo PTOCE complementado con análisis de la fusión tras la PCR. El CTO contiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora en su segmento molde.

La Fig. 21 muestra los resultados de la detección de un gen de *Neisseria gonorrhoeae* mediante el ensayo PTOCE complementado con el análisis de la fusión en una micromatriz. El CTO está inmovilizado por su extremo 5'. El PTO contiene una molécula indicadora en su segmento de marcaje en 5'.

La Fig. 22 muestra los resultados de la detección de un gen de *Neisseria gonorrhoeae* mediante el ensayo PTOCE complementado con la detección en tiempo real a una temperatura prefijada en una micromatriz. El CTO está inmovilizado por su extremo 5'. El PTO contiene una molécula indicadora en su segmento de marcaje en 5'.

La Fig. 23 muestra los resultados de la detección de un gen de *Neisseria gonorrhoeae* mediante el ensayo PTOCE complementado con la detección en tiempo real a una temperatura prefijada en una micromatriz. El CTO queda inmovilizado por su extremo 3'y contiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora en su segmento molde.

La Fig. 24 muestra los resultados de la detección de una o varias dianas mediante el ensayo PTOCE complementado con la detección de punto final a una temperatura prefijada en una micromatriz. El CTO está inmovilizado por su extremo 5'. El PTO contiene una molécula indicadora en su segmento de marcaje en 5'. El gen de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) y el gen de *Staphylococcus aureus* (SA) actuaron como secuencias de ácidos nucleicos diana.

La Fig. 25 representa esquemáticamente un ensayo PTOCE para la detección de variaciones de nucleótidos. Esta aplicación se denomina ensayo VD-PTOCE (Detección de Variación por escisión y extensión de PTO). El sitio de discriminación de variación de nucleótidos está localizado en el extremo 5' de la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3'. La determinación de la presencia de la variación de nucleótidos se realiza mediante la detección de la presencia de la cadena extendida. Los sitios de escisión son diferentes dependiendo de la presencia y ausencia de la variación de nucleótidos de interés.

La Fig. 26 representa esquemáticamente un ejemplo del ensayo VD-PTOCE. El sitio de discriminación de variación de nucleótidos se localiza a 1 nucleótido de distancia del extremo 5' de la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3'.

La Fig. 27 representa esquemáticamente un ejemplo del ensayo VD-PTOCE. El nucleótido de desapareamiento artificial como resto de emparejamiento de no base se introduce en la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3'. El resto de emparejamiento de no base ensancha la distancia entre el primer sitio de escisión

inicial y el segundo sitio de escisión inicial.

La Fig. 28 representa esquemáticamente un ejemplo del ensayo VD-PTOCE. El sitio de discriminación de variación de nucleótidos se localiza en el extremo 5’ de la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3’. El CTO tiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora en su segmento molde para generar señales.

La Fig. 29 representa esquemáticamente un ejemplo del ensayo VD-PTOCE que comprende un análisis de fusión. El sitio de discriminación de variación de nucleótidos se localiza a 1 nucleótido de distancia del extremo 5’ de la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3’. El CTO tiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora en su segmento molde para generar señales.

La Fig. 30 representa esquemáticamente un ejemplo del ensayo VD-PTOCE que comprende un análisis de fusión. El nucleótido de desapareamiento artificial como resto de emparejamiento de no base se introduce en la parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’. El CTO tiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora en su segmento molde para generar señales.

La Fig. 31 representa esquemáticamente un ejemplo del ensayo VD-PTOCE que comprende la detección a una temperatura prefijada en una micromatriz. La señal de un marcador fluorescente individual se detecta a una temperatura prefijada.

La Fig. 32 representa esquemáticamente un ejemplo del ensayo VD-PTOCE que comprende la detección a una temperatura prefijada en una micromatriz. Un ddUTP marcado con indicador se incorpora en la cadena extendida durante la reacción de extensión. La señal del indicador se detecta a una temperatura prefijada.

La Fig. 33 muestra los resultados de la detección de la mutación V600E del gen BRAF mediante el ensayo VD-PTOCE. Se examinaron cuatro tipos diferentes de PTO-NV con variación de ubicación del sitio de discriminación de variación de un único nucleótido en la parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’.

La Fig. 34 muestra los resultados de la detección de la mutación V600E del gen BRAF mediante el ensayo de VD-PTOCE con PTONV que tiene un nucleótido de desapareamiento artificial como un resto de emparejamiento de no base. El sitio de discriminación de variación de un único nucleótido está situado en el cuarto nucleótido desde el extremo 5’ del segmento localizador en 3’. Se examinaron un PTO-NV que no tiene ningún desapareamiento artificial y tres tipos de PTO-NV que tienen un nucleótido de desapareamiento artificial como un resto de emparejamiento de no base.

La Fig. 35 muestra los resultados de la detección del gen de *Neisseria gonorrhoeae* mediante ensayo PTOCE usando actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en dirección 5’.

La Fig. 35A muestra los resultados del ensayo PTOCE que comprende la detección en tiempo real a una temperatura prefijada sin necesidad de usar un oligonucleótido en dirección 5’ y la Fig. 35B muestra los resultados del ensayo PTOCE que comprenden el análisis de fusión sin necesidad de usar un oligonucleótido en dirección 5’.

Descripción detallada de la presente invención

La presente divulgación generalmente se refiere a un método novedoso para detectar una secuencia de ácido nucleico mediante un ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO). En particular, la presente invención se refiere a un método novedoso para detectar una variación de nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico diana mediante un ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO) y a al uso de un kit para detectar una variación de nucleótidos mediante un ensayo PTOCE de acuerdo con este método.

La presente invención para la detección de una variación de nucleótidos se basa en la escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO en el CTO como el ensayo PTOCE; por tanto, su descripción detallada se describirá después de las descripciones del ensayo PTOCE. Para una mejor comprensión, el ensayo PTOCE se describirá como se indica a continuación:

I. Proceso de detección de la diana mediante PTOCE que comprende análisis de la fusión

En un aspecto de la presente divulgación se proporciona un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos diana en un ADN o en una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO), que comprende:

(a) hibridación de la secuencia de ácidos nucleicos diana con un oligonucleótido en dirección 5’ y un PTO (Oligonucleótido de sondaje y marcaje); en la que el oligonucleótido en dirección 5’ comprende una secuencia de nucleótidos complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana; el PTO comprende: (i) un segmento localizador en 3’ que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana con la cual hibrida y (ii) un segmento de marcaje en 5’ que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana; en el que el segmento localizador en 3’ se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana y el segmento de marcaje en 5’ no se hibrida con dicha secuencia diana; el oligonucleótido en dirección 5’ está situado en dirección 5’ del PTO;

(b) puesta en contacto del producto resultante de la etapa (a) con una enzima que tiene actividad nucleasa 5’ en condiciones para la escisión del PTO; en la que el oligonucleótido en dirección 5’ o su cadena extendida induce la escisión del PTO por la enzima que tiene actividad nucleasa 5’ de modo que la escisión libera un fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5’o una parte del segmento de marcaje en 5’ del PTO;

(c) hibridación del fragmento liberado del PTO con el CTO (oligonucleótido de captura y molde); en el que el CTO

comprende en la dirección de 3' a 5': (i) un segmento de captura que comprende una secuencia nucleotídica complementaria al segmento de marcaje en 5' o a una parte del segmento de marcaje en 5' del PTO; y (ii) un segmento molde que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con el segmento de marcaje en 5' y el segmento localizador en 3' del PTO; en el que el fragmento liberado del PTO se hibrida con el segmento de captura del CTO;

(d) reacción de extensión con el resultado de la etapa (c) y una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde; en la que el fragmento hibridado con el segmento de captura del CTO se extiende y forma un ácido nucleico bicatenario extendido; en el que este ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de T_m que puede ajustarse con: (i) la secuencia y/o la longitud del fragmento; (ii) la secuencia y/o la longitud del CTO; o (iii) la secuencia y/o la longitud del fragmento y la secuencia y/o la longitud del CTO;

(e) fusión del ácido nucleico bicatenario extendido a lo largo de un intervalo de temperaturas para proporcionar una señal diana indicadora de la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido; en la que la señal diana la proporciona: (i) al menos un marcador unido al fragmento y/o al CTO; (ii) un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión; (iii) un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión y un marcador unido al fragmento y/o al CTO; o (IV) un marcador intercalante; y

(f) detección del ácido nucleico bicatenario extendido mediante la medición de la señal diana; la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido indica la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

Los presentes inventores han realizado investigaciones exhaustivas para desarrollar nuevas estrategias para detectar secuencias diana con más precisión y facilidad, entre otros, de forma múltiple. Como resultado, se han creado protocolos novedosos para la detección de secuencias diana, en los que la detección de la diana se logra mediante la hibridación de sondas, la escisión enzimática de sondas y la extensión y detección de un ácido nucleico bicatenario extendido. Los presentes protocolos están bien adaptados tanto a las reacciones en fase líquida como en fase sólida y garantizan la detección de varias secuencias diana con mayor precisión y facilidad.

La presente divulgación emplea eventos sucesivos seguidos por la hibridación de una sonda; escisión del PTO (Oligonucleótido de sondaje y marcaje) y extensión; formación de un ácido nucleico bicatenario extendido dependiente de la diana; y detección del ácido nucleico bicatenario extendido. Por tanto, se denomina un ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO).

En la presente divulgación, el ácido nucleico bicatenario extendido se caracteriza por tener uno o varios marcadores que proporcionan una señal que indica la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido mediante el análisis de la fusión o la detección a una temperatura prefijada. Además, el ácido nucleico bicatenario extendido se caracteriza por tener un valor de T_m ajustable, que desempeña un papel crucial en la detección de múltiples dianas o en la discriminación de señales que no son la diana.

Puesto que el ácido nucleico bicatenario extendido solo se produce si está presente el ácido nucleico diana, la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido indica la presencia del ácido nucleico diana.

El ensayo PTOCE que comprende análisis de la fusión se describe con mayor detalle a continuación:

Etapa (a): <u>Hibridación de un oligonucleótido en dirección 5' y un PTO con una secuencia de ácidos nucleicos diana</u>

De acuerdo con la presente divulgación, primero se hibrida una secuencia de ácidos nucleicos diana con un oligonucleótido en dirección 5' y un PTO (oligonucleótido de sondaje y marcaje).

Las expresiones usadas en el presente documento «ácido nucleico diana», «secuencia de ácidos nucleicos diana» o «secuencia diana» se refieren a una secuencia de ácidos nucleicos cuya detección reviste interés, que se reasocia o se hibrida con una sonda o con un cebador en condiciones de hibridación, reasociación o amplificación.

El término usado en el presente documento «sonda» se refiere a una molécula de ácido nucleico monocatenaria que comprende un segmento o segmentos que son sustancialmente complementarios con una secuencia de ácidos nucleicos diana.

El término «cebador» como se utiliza en el presente documento se refiere a un oligonucleótido que es capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis cuando se pone en condiciones que inducen la síntesis del producto de extensión del cebador es complementario con una cadena de ácido nucleico (molde), es decir, en presencia de nucleótidos y de un agente de polimerización, tal como una ADN polimerasa y a una temperatura y un pH adecuados.

Preferentemente, la sonda y el cebador son moléculas monocatenarias de desoxirribonucleótidos. Las sondas o cebadores usados en la presente invención pueden comprender dNMP naturales (es decir, dAMP, dGMP, dCMP y dTMP), nucleótidos modificados o nucleótidos no naturales. Las sondas o los cebadores también pueden contener ribonucleótidos.

El cebador debe ser lo bastante largo para propiciar la síntesis de los productos de extensión en presencia del agente de polimerización. La longitud exacta de los cebadores depende de muchos factores, tales como la temperatura, la aplicación y la fuente del cebador. El término «reasociación» o «iniciación» como se emplea en el presente documento se refiere a la colocación en aposición de un oligodesoxinucleótido o de un ácido nucleico respecto de un ácido nucleico molde, colocación en aposición que permite a la polimerasa polimerizar nucleótidos en una molécula de ácido nucleico que es complementaria al ácido nucleico molde o a un segmento del mismo.

El término «hibridación» utilizado en el presente documento se refiere a la formación de un ácido nucleico bicatenario a partir de ácidos nucleicos monocatenarios que son complementarios. La hibridación puede tener lugar entre dos cadenas de ácido nucleico perfectamente apareadas o bien sustancialmente apareadas con algunos desapareamientos. La complementariedad para la hibridación puede depender de las condiciones de hibridación, en especial de la temperatura.

La hibridación de una secuencia de ácidos nucleicos diana con el oligonucleótido en dirección 5' y con el PTO puede realizarse en condiciones de hibridación adecuadas que se determinan habitualmente con procedimientos de optimización. Condiciones tales como la temperatura, la concentración de los componentes, los tiempos de hibridación y de lavado, los componentes de la solución tampón y su pH y fuerza iónica pueden variar dependiendo de diversos factores, tales como la longitud y el contenido de GC del oligonucleótido (tanto del oligonucleótido en dirección 5' como del PTO) y de la secuencia nucleotídica diana. Por ejemplo, cuando se utiliza un oligonucleótido relativamente corto es preferible adoptar condiciones poco rigurosas. Las condiciones pormenorizadas de hibridación se pueden encontrar en Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); y en M. L.M. Anderson, *Nucleic acid Hybridization*, Springer-Verlag Nueva York Inc. N.Y. (1999).

No existe distinción pretendida entre los términos «reasociación» e «hibridación» y ambos se usan indistintamente.

El oligonucleótido en dirección 5' y el PTO poseen secuencias nucleotídicas que hibridan por su complementariedad con la secuencia de ácidos nucleicos diana. El término «complementariedad» se usa en el presente documento para indicar que los cebadores o las sondas son lo bastante complementarios para hibridar selectivamente con una secuencia de ácidos nucleicos diana en las condiciones de reasociación o de restrictividad indicadas, abarcando las expresiones «sustancialmente complementario» y «perfectamente complementario», preferentemente perfectamente complementario.

El segmento de marcaje en 5' del PTO tiene una secuencia nucleotídica no complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana. El segmento molde del CTO (Oligonucleótido de captura y molde) tiene una secuencia nucleotídica no complementaria con el segmento de marcaje en 5' y el segmento localizador en 3' del PTO. El término «no complementario» se usa en el presente documento para indicar que los cebadores o las sondas no son lo bastante complementarios para hibridar selectivamente con una secuencia de ácidos nucleicos diana en las condiciones de reasociación o de rigurosidad indicadas, abarcando las expresiones «sustancialmente no complementario» y «perfectamente no complementario», preferentemente perfectamente no complementario.

Por ejemplo, la expresión "no complementario" junto con el segmento de marcaje en 5' del PTO significa que el segmento de marcaje en 5' es lo bastante no complementario para no hibridar selectivamente con una secuencia de ácido nucleico diana en las condiciones de reasociación o rigurosidad indicadas, abarcando las expresiones «sustancialmente no complementario» y «perfectamente no complementario», preferentemente perfectamente no complementario.

El término usado en el presente documento «PTO (Oligonucleótido de sondaje y marcaje)» significa un oligonucleótido que comprende: (i) un segmento localizador en 3' que sirve como sonda; y (ii) un segmento de marcaje en 5' con una secuencia nucleotídica no complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana, que se desprende por nucleólisis del PTO tras la hibridación con la secuencia de ácidos nucleicos diana. El segmento de marcaje en 5' y el segmento localizador en 3' del PTO deben estar colocados en orden 5' a 3'. El PTO se ilustra esquemáticamente en la Fig. 1.

Preferentemente, la hibridación de la etapa (a) se realiza en condiciones restrictivas, de modo que el segmento localizador en 3' se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana y el segmento de marcaje en 5' no se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana.

El PTO no requiere ninguna longitud específica. Por ejemplo, el PTO puede tener una longitud de 15-150 nucleótidos,15-100 nucleótidos, 15-80 nucleótidos, 15-60 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 20-150 nucleótidos, 20-100 nucleótidos,20-80 nucleótidos, 20-60 nucleótidos, 20-50 nucleótidos, 30-150 nucleótidos, 30-100 nucleótidos, 30-80 nucleótidos, 30-60 nucleótidos, 30-50 nucleótidos, 35-100 nucleótidos, 35-80 nucleótidos, 35-60 nucleótidos o 35-50 nucleótidos. El segmento localizador en 3' del PTO puede ser de cualquier longitud siempre que se hibride específicamente con las secuencias de ácidos nucleicos diana. Por ejemplo, el segmento localizador en 3' del PTO puede tener 10-100 nucleótidos, 10-80 nucleótidos, 10-50 nucleótidos, 10-40 nucleótidos, 10-30 nucleótidos, 15-100 nucleótidos, 15-80 nucleótidos, 15-50 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 15-30 nucleótidos, 20-100 nucleótidos, 20-80

nucleótidos, 20-50 nucleótidos, 20-40 nucleótidos o 20-30 nucleótidos de longitud. El segmento de marcaje en 5' puede ser de cualquier longitud siempre que se hibride específicamente con el segmento molde del CTO y después se extienda. Por ejemplo, el segmento de marcaje en 5'del PTO puede tener una longitud de 5-50 nucleótidos, 5-40 nucleótidos, 5-30 nucleótidos, 5-20 nucleótidos, 10-50 nucleótidos, 10-40 nucleótidos, 10-30 nucleótidos, 10-20 nucleótidos, 15-50 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 15-30 nucleótidos o 15-20 nucleótidos.

El extremo 3'del PTO puede tener un 3'-OH terminal. Preferentemente, el extremo 3' del PTO está «bloqueado» para impedir su extensión.

El bloqueo se puede conseguir de acuerdo con métodos convencionales. Por ejemplo, el bloqueo se puede realizar añadiendo al grupo 3'-hidroxilo del último nucleótido un compuesto o resto químico como biotina, marcadores, un grupo fosfato, grupo alquilo, enlazante no nucleotídico, fosforotioato o alcanodiol. Como alternativa, el bloqueo se puede realizar eliminando el grupo 3'-hidroxilo del último nucleótido o usando un nucleótido que carece de ese grupo, como un didesoxinucleótido.

Como alternativa, el PTO puede estar diseñado para tener una estructura de horquilla.

La no hibridación entre el segmento de marcaje en 5' del PTO y la secuencia de ácidos nucleicos diana se refiere a la no formación de una cadena doble estable entre ellos en ciertas condiciones de hibridación. De acuerdo con una realización preferida, el segmento de marcaje en 5' del PTO que no está implicado en la hibridación con la secuencia de ácidos nucleicos diana forma una cadena sencilla.

El oligonucleótido en dirección 5' está situado en dirección 5' del PTO.

Además, el oligonucleótido en dirección 5' o su cadena extendida hibridada con la secuencia de ácidos nucleicos diana induce la escisión del PTO mediante una enzima que tiene actividad nucleasa 5'.

La inducción de la escisión del PTO por el oligonucleótido en dirección 5' se puede realizar de dos modos: (i) inducción de la escisión independiente de la extensión del oligonucleótido en dirección 5'; y (ii) inducción de la escisión dependiente de la extensión del oligonucleótido en dirección 5'.

Si el oligonucleótido en dirección 5' se coloca lo bastante cerca del PTO para inducir la escisión del PTO por la enzima con actividad nucleasa 5', la enzima unida al oligonucleótido en dirección 5' digerirá el PTO sin reacción de extensión. En cambio, si el oligonucleótido en dirección 5' se coloca lejos del PTO, la enzima con actividad polimerasa (por ejemplo, polimerasa dependiente de molde) catalizará la extensión del oligonucleótido en dirección 5' (por ejemplo, cebador situado en dirección 5') y la enzima con actividad nucleasa 5' unida al producto extendido digerirá el PTO.

Por tanto, el oligonucleótido en dirección 5' puede estar situado respecto al PTO de dos modos. El oligonucleótido en dirección 5' puede estar localizado lo bastante cerca del PTO para inducir la escisión del PTO de forma independiente de la extensión. O, como alternativa, el oligonucleótido en dirección 5' puede estar situado lo bastante lejos del PTO para inducir la escisión del PTO de un modo que dependerá de la extensión.

El término usado en el presente documento «adyacente» en alusión a posiciones o ubicaciones significa que el oligonucleótido en dirección 5' está localizado junto al segmento localizador en 3' del PTO con el que forma una muesca. Además, el término significa que el oligonucleótido en dirección 5' está localizado a 1-30 nucleótidos, 1-20 nucleótidos o 1-15 nucleótidos de distancia del segmento localizador en 3' del PTO.

El término usado en el presente documento «distante» en referencia a posiciones o ubicaciones incluye cualquier posición o localización suficiente para asegurar las reacciones de extensión.

De acuerdo con una realización preferida, el oligonucleótido en dirección 5' está situado lo bastante lejos del PTO para inducir la escisión del PTO de un modo que depende de la extensión.

De acuerdo con una realización preferida, el oligonucleótido en dirección 5' es un cebador o una sonda situados en dirección 5'. El cebador situado en dirección 5' es adecuado para la inducción de la escisión independiente de la extensión o la escisión dependiente de la extensión y la sonda situada en dirección 5' es adecuada para la inducción de la escisión independiente de la extensión.

Como alternativa, el oligonucleótido en dirección 5' puede tener una secuencia parcialmente solapada con la parte 5' del segmento localizador en 3' del PTO. Preferentemente, la secuencia solapada tiene una longitud de 1 a 10 nucleótidos, preferentemente de 1 a 5 nucleótidos o, aún más preferentemente, de 1 a 3 nucleótidos. Si el oligonucleótido en dirección 5' tiene una secuencia parcialmente solapada con la parte 5' del segmento localizador en 3' del PTO, el segmento localizador en 3' es digerido parcialmente junto con el segmento de marcaje en 5' en la reacción de escisión de la etapa (b). Además, la secuencia solapada permite escindir un punto deseado del segmento localizador en 3'.

De acuerdo con una realización preferida, el cebador situado en dirección 5' induce a través de su cadena extendida la escisión del PTO por la enzima que tiene actividad nucleasa 5'.

Las tecnologías convencionales para las reacciones de escisión con oligonucleótidos situados en dirección 5' se pueden aplicar a la presente divulgación, siempre que el oligonucleótido en dirección 5' induzca la escisión del PTO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana para liberar un fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' o una parte de ese segmento del PTO. Por ejemplo, a la presente invención se pueden aplicar las patentes de EE.UU. N.º 5.210.015, 5.487.972, 5.691.142, 5.994.069 y 7.381.532 y la publicación de solicitud publicada de EE.UU. N.º 2008-0241838.

De acuerdo con una realización preferida, el método se realiza en presencia de un cebador situado en dirección 3' (o corriente abajo). El cebador situado en dirección 3' genera adicionalmente una secuencia de ácidos nucleicos diana que ha de hibridarse con el PTO, lo que potencia la sensibilidad de la detección de la diana.

De acuerdo con una realización preferida, cuando se usan el cebador situado en dirección 5' y el cebador situado en dirección 3', además, se emplea una polimerasa de ácidos nucleicos dependiente de molde para la extensión de los cebadores.

De acuerdo con una realización preferida, el oligonucleótido en dirección 5' (cebador situado en dirección 5' o sonda situada en dirección 5'), el cebador situado en dirección 3' y/o el segmento de marcaje en 5' en del PTO tienen una estructura de oligonucleótido de cebado doble (DPO) desarrollada por el presente inventor. Los oligonucleótidos dotados de la estructura DPO presentan una especificidad hacia la diana sustancialmente mejor que los cebadores y las sondas convencionales (véase el documento WO 2006/095981; Chun et al., *Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene, Nucleic Acid Research*, 35:6e40 (2007)).

De acuerdo con una realización preferida, el segmento localizador en 3' del PTO tiene una estructura de oligonucleótido de especificidad doble modificado (mDSO) desarrollado por el presente inventor. La estructura del oligonucleótido de especificidad doble modificado (mDSO) presenta una especificidad hacia la diana sustancialmente mejor que las sondas convencionales (véase el documento WO 2011/028041).

Etapa (b): <u>Liberación de un fragmento del PTO</u>

Después, el producto de la etapa (a) se pone en contacto con una enzima que tiene actividad nucleasa 5' en las condiciones para la escisión del PTO. El PTO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana es digerido por la enzima con actividad nucleasa 5', de forma que se desprende un fragmento que comprende el fragmento de marcaje en 5' o una parte del segmento de marcaje en 5' del PTO.

La expresión usado en el presente documento «condiciones para la escisión del PTO» designa las condiciones suficientes para digerir el PTO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana por la enzima con actividad nucleasa 5', tales como temperatura, pH, fuerza iónica, tampón, longitud y secuencia de los oligonucleótidos y enzimas. Por ejemplo, cuando la ADN polimerasa *Taq* se usa como enzima con actividad nucleasa 5', las condiciones para la escisión del PTO incluyen tampón Tris-HCl, KCl, $MgCl_2$ y temperatura.

Cuando el PTO se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana, su segmento localizador en 3' participa en la hibridación y el segmento de marcaje en 5' forma una cadena sencilla sin hibridar con la secuencia de ácidos nucleicos diana (véase la Fig. 2). Por tanto, el oligonucleótido comprende estructuras tanto monocatenarias como bicatenarias que pueden ser digeridas con una enzima que tiene actividad nucleasa 5' a través de diversas técnicas conocidas por el experto en la materia.

Los sitios de escisión del PTO varían dependiendo del tipo de oligonucleótidos situados en dirección 5' (sonda situada en dirección 5' o cebador situado en dirección 5'), de los puntos de hibridación de los oligonucleótidos situados en dirección 5' y de las condiciones de la escisión (véanse las patentes de EE.UU. N.º 5.210.015, 5.487.972, 5.691.142, 5.994.069 y 7.381.532 y la publicación de solicitud de EE.UU. publicada N.º 2008-0241838).

Se pueden emplear multitud de técnicas convencionales para la reacción de escisión del PTO, que resulta en el desprendimiento de un fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' o una parte del segmento de marcaje en 5'.

En resumen, en la etapa (b) puede haber tres puntos de escisión. En primer lugar, el punto de escisión es un punto de unión entre el segmento de hibridación del PTO (segmento localizador en 3') y un segmento no hibridado (segmento de marcaje en 5'). El segundo punto de escisión está alejado varios nucleótidos en dirección 3' del extremo 3' del segmento de marcaje en 5' del PTO. El segundo punto de escisión está situado en la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' del PTO. El tercer punto de escisión está alejado varios nucleótidos en dirección 5' del extremo 3' del segmento de marcaje en 5' del PTO.

De acuerdo con una realización preferida, el punto inicial para la escisión del PTO por la polimerasa dependiente de molde con actividad nucleasa 5’ tras la extensión del cebador situado en dirección 5’ es un punto de partida para la cadena doble formada por el PTO con la secuencia de ácidos nucleicos diana o un sitio situado a 1 a 3 nucleótidos de distancia del punto de partida.

A este respecto, el término usado en el presente documento «fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5’ o una parte de dicho segmento del PTO» en conjunción con la escisión del PTO mediante la enzima con actividad nucleasa 5’ se usa para abarcar: (i) el segmento de marcaje en 5’; (ii) el segmento de marcaje en 5’ y la parte del extremo 5’ del segmento 3’; y (iii) alejado del segmento de marcaje en 5’. En la presente solicitud, la expresión «fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5’ o una parte de dicho segmento del PTO» también puede aparecer descrito como «fragmento del PTO».

De acuerdo con una realización, el PTO tiene un segmento bloqueador que contiene un bloqueador resistente a la escisión por la enzima que tiene actividad nucleasa 5' y el segmento bloqueador se usa para controlar un sitio de escisión inicial y/o divisiones sucesivas.

De acuerdo con una realización, el PTO tiene un segmento bloqueador que contiene como bloqueador al menos un nucleótido resistente a la escisión por la enzima que tiene actividad nucleasa 5'.

Por ejemplo, para inducir la escisión en el sitio de unión entre un segmento de hibridación del PTO (segmento localizador en 3') y un segmento no de hibridación (segmento de marcaje en 5'), la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' del PTO puede bloquearse con bloqueadores.

El número de bloqueadores contenidos en el segmento bloqueador puede no estar limitado, preferentemente, 1-10, más preferentemente 2-10, todavía más preferentemente 3-8, más preferentemente 3-6 bloqueantes. Los bloqueadores de los presentes en la PTO pueden ser de una manera continua o intermitente, preferentemente de una manera continua. Los nucleótidos como bloqueadores con una cadena principal resistente a la actividad exonucleasa 5' a 3' incluyen uno cualquiera conocido para un experto en la materia. Por ejemplo, incluye diversos enlaces fosforotioato, enlaces fosfonato, enlaces fosforamidato y modificaciones 2'-hidratos de carbono. De acuerdo con una realización más preferida, los nucleótidos que tienen una cadena principal resistente a la exonucleasa 5' a 3' incluyen el enlace fosforotioato, el enlace fosfotriéster de alquilo, el enlace de fosfotriéster de arilo, el enlace fosfonato de alquilo, el enlace fosfonato de arilo, el enlace fosfonato de hidrógeno, el enlace fosforoamidato de alquilo, el enlace fosforoamidato de arilo, el enlace fosforoselenato, la modificación 2'-O-aminopropilo, la modificación 2'-O-alquilo, la modificación 2'-O-alilo, la modificación 2'-O-butilo, el oligodesoxinucleótido α-anomérico y la modificación 1-(4'-tio-β-D-ribofuranosilo).

De acuerdo con una realización, un nucleótido como bloqueador incluye LNA (ácido nucleico bloqueado).

El término «parte» usado en conjunción con el PTO o el CTO en calidad de parte del segmento de marcaje en 5’ del PTO, de la parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’ del PTO y la parte del extremo 5’ del segmento de captura del CTO se refiere a una secuencia nucleotídica compuesta de 1 a 40, 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10 o 1 a 5 nucleótidos, preferentemente 1, 2, 3 o 4 nucleótidos.

De acuerdo con una realización preferida, la enzima que tiene actividad nucleasa 5’ es una ADN polimerasa que tiene actividad nucleasa 5’ o una nucleasa FEN, más preferentemente una ADN polimerasa termostable que tiene actividad nucleasa 5’ o una nucleasa FEN.

Una ADN polimerasa adecuada que tiene actividad nucleasa 5’ en la presente divulgación es la ADN polimerasa termoestable obtenida a partir de diversas especies bacterianas incluyendo *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus literalis*, *Thermus antranikianii, Thermus caldophilus, Thermus chliarophilus, Thermus flavus, Thermus igniterrae, Thermus lacteus, Thermus oshimai, Thermus ruber, Thermus rubens, Thermus scotoductus, Thermus silvanus, Thermus species Z05, Thermus species sps 17, Thermus thermophilus, Thermotoga maritima, Thermotoga neapolitana, Thermosipho africanus, Thermococcus litoralis, Thermococcus barossi, Thermococcus gorgonarius, Thermotoga maritima, Thermotoga neapolitana, Thermosipho africanus, Pyrococcus woesei, Pyrococcus horikoshii, Pyrococcus abyssi, Pyrodictium occultum, Aquifex pyrophilus* y *Aquifex aeolieus*. Mucho más preferentemente, la ADN polimerasa termoestable es la polimerasa Taq.

Como alternativa, la presente invención puede emplear ADN polimerasas con actividad nucleasa 5’ modificadas para tener menos actividad polimerasa.

La nucleasa FEN (endonucleasa de solapa o *flap*) usada es una nucleasa específica de solapa en 5’.

La nucleasa FEN adecuada para la presente divulgación comprende nucleasas FEN obtenidas a partir de diversas especies bacterianas, incluyendo *Sulfolobus solfataricus, Pyrobaculum aerophilum, Thermococcus litoralis, Archaeaglobus veneficus, Archaeaglobus profundus, Acidianus brierlyi, Acidianus ambivalens, Desulfurococcus*

amylolyticus, Desulfurococcus mobilis, Pyrodictium brockii, Thermococcus gorgonarius, Thermococcus zilligii, Methanopyrus kandleri, Methanococcus igneus, Pyrococcus horikoshii, Aeropyrum pernix y *Archaeaglobus veneficus*.

En los casos en que en la etapa (a) se utilice el cebador situado en dirección 5', es preferible que las condiciones para la escisión del PTO comprendan la reacción de extensión del cebador situado en dirección 5'.

De acuerdo con una realización preferida, el cebador situado en dirección 5' se usa en la etapa (a), una polimerasa dependiente de molde se usa para la extensión del cebador situado en dirección 5' y la polimerasa dependiente de molde es idéntica a la enzima con actividad nucleasa 5'.

Opcionalmente, el cebador situado en dirección 5' se usa en la etapa (a), una polimerasa dependiente de molde para la extensión del cebador situado en dirección 5' y la polimerasa dependiente de molde es distinta de la enzima con actividad nucleasa 5'.

Etapa (c): <u>Hibridación del fragmento liberado del PTO con el CTO</u>

El fragmento liberado del PTO se hibrida con el CTO (Oligonucleótido de captura y molde).

El CTO comprende en dirección de 3' a 5' (i) un segmento de captura que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con el segmento de marcaje en 5' o una parte de este segmento del PTO y (ii) un segmento molde que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con el segmento de marcaje en 5' y el segmento localizador en 3' del PTO.

El CTO actúa como molde para la extensión del fragmento liberado del PTO. El fragmento que actúa como cebador se hibrida con el CTO y se extiende hasta formar un ácido nucleico bicatenario extendido.

El segmento molde puede comprender cualquier secuencia mientras ésta no sea complementaria con el segmento de marcaje en 5' y el segmento localizador en 3' del PTO. Además, el segmento molde puede comprender cualquier secuencia mientras ésta pueda actuar como molde para la extensión del fragmento liberado del PTO.

Como se ha descrito antes, cuando el fragmento que tiene el segmento de marcaje en 5' del PTO se desprende, es preferible que el segmento de captura del CTO esté diseñado para comprender una secuencia nucleotídica complementaria con el segmento de marcaje en 5'. Cuando el fragmento que tiene el segmento de marcaje en 5' y la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' se libera, es preferible que el segmento de captura del CTO esté diseñado para comprender una secuencia nucleotídica complementaria con el segmento de marcaje en 5' y la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3'. Cuando el fragmento que tiene una parte del segmento de marcaje en 5'del PTO se libera, es preferible que el segmento de captura del CTO esté diseñado para comprender una secuencia nucleotídica complementaria con la parte del segmento de marcaje en 5'.

Además, es posible diseñar el segmento de captura del CTO para que incorpore de antemano puntos de escisión del PTO. Por ejemplo, en los casos en que el segmento de captura del CTO está diseñado para comprender una secuencia nucleotídica complementaria con el segmento de marcaje en 5', el fragmento que tiene una parte del segmento de marcaje en 5' o el fragmento que tiene el segmento de marcaje en 5' se pueden hibridar con el segmento de captura y después extenderse. Si se desprende el fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' y la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3', se puede hibridar con el segmento de captura del CTO diseñado para comprender una secuencia nucleotídica complementaria con el segmento de marcaje en 5' y después extenderse, aunque la parte del extremo 3' del fragmento contenga nucleótidos desapareados. Esto es debido a que los cebadores pueden extenderse dependiendo de las condiciones de reacción, aunque su extremo 3' contenga algunos nucleótidos desapareados (por ejemplo, de 1 a 3 nucleótidos desapareados).

Cuando el fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' y una parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' se desprende, la parte del extremo 5' del segmento de captura del CTO puede estar diseñada para tener una secuencia nucleotídica complementaria con la parte del extremo 5' escindida del segmento localizador en 3', lo que resuelve los problemas asociados a los nucleótidos desapareados (véase la Fig.1).

Preferentemente, la secuencia nucleotídica de la parte del extremo 5' del segmento de captura del CTO complementaria con la parte del extremo 5' escindida del segmento localizador en 3' puede seleccionarse en función de los puntos de escisión decididos de antemano en el segmento localizador en 3' del PTO. Es preferible que la secuencia nucleotídica de la parte del extremo 5' del segmento de captura del CTO complementaria con la parte del extremo 5' escindida del segmento localizador en 3' tenga entre 1 a 10 nucleótidos, preferentemente de 1 a 5 nucleótidos y más preferentemente de 1 a 3 nucleótidos.

El extremo 3' del CTO puede comprender nucleótidos adicionales que no intervengan en la hibridación con el fragmento. Además, el segmento de captura del CTO puede comprender una secuencia nucleotídica que solo sea complementaria con una parte del fragmento (por ejemplo, una parte del fragmento que contenga el segmento del

extremo 3') siempre que se hibride de forma estable con el fragmento.

La expresión usada «segmento de captura que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con el segmento de marcaje en 5' o con una parte del segmento de marcaje en 5'» se describe en el presente documento para abarcar diversos diseños y composiciones del segmento de captura del CTO como se ha analizado anteriormente.

El CTO puede estar diseñado para tener una estructura de horquilla.

La longitud del CTO puede variar ampliamente. Por ejemplo, el CTO puede tener una longitud de 7-1000 nucleótidos, 7-500 nucleótidos, 7-300 nucleótidos, 7-100 nucleótidos, 7-80 nucleótidos, 7-60 nucleótidos, 7-40 nucleótidos, 15-1000 nucleótidos, 15-500 nucleótidos, 15-300 nucleótidos, 15-100 nucleótidos, 15-80 nucleótidos, 15-60 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 20-1000 nucleótidos, 20-500 nucleótidos, 20-300 nucleótidos, 20-100 nucleótidos, 20-80 nucleótidos, 20-60 nucleótidos, 20-40 nucleótidos, 30-1000 nucleótidos, 30-500 nucleótidos, 30-300 nucleótidos, 30-100 nucleótidos, 30-80 nucleótidos, 30-60 nucleótidos o 30-40 nucleótidos. El segmento de captura del CTO puede tener cualquier longitud siempre que se hibride específicamente con el fragmento liberado del PTO. Por ejemplo, el segmento de captura del CTO puede tener una longitud de 5-100 nucleótidos, 5-60 nucleótidos, 5-40 nucleótidos, 5-30 nucleótidos, 5-20 nucleótidos, 10-100 nucleótidos, 10-60 nucleótidos, 10-40 nucleótidos, 10-30 nucleótidos, 10-20 nucleótidos, 15-100 nucleótidos, 15-60 nucleótidos, 15-40 nucleótidos, 15-30 nucleótidos o 15-20 nucleótidos. El segmento molde del CTO puede tener cualquier longitud siempre que pueda actuar como molde en la extensión del fragmento liberado del PTO. Por ejemplo, el segmento molde del CTO puede tener una longitud de 2-900 nucleótidos, 2-400 nucleótidos, 2-300 nucleótidos, 2-100 nucleótidos, 2-80 nucleótidos, 2-60 nucleótidos, 2-40 nucleótidos, 2-20 nucleótidos, 5-900 nucleótidos, 5-400 nucleótidos, 5-300 nucleótidos, 5-100 nucleótidos, 5-80 nucleótidos, 5-60 nucleótidos, 5-40 nucleótidos, 5-30 nucleótidos, 10-900 nucleótidos, 10-400 nucleótidos, 10-300 nucleótidos, 15-900 nucleótidos, 15-100 nucleótidos, 15-80 nucleótidos, 15-60 nucleótidos, 15-40 nucleótidos o 15-20 nucleótidos.

El extremo 3' del CTO puede tener un 3'-OH terminal. Preferentemente, el extremo 3' del CTO está bloqueado para impedir su extensión. El bloqueo de la extensión del CTO se puede conseguir con métodos convencionales. Por ejemplo, el bloqueo se puede realizar añadiendo al grupo 3'-hidroxilo del último nucleótido del CTO un compuesto o resto químico tal como biotina, marcadores, un grupo fosfato, un grupo alquilo, un enlazante no nucleotídico, fosforotioato o alcanodiol. Como alternativa, el bloqueo puede realizarse retirando el grupo 3'-hidroxilo del último nucleótido o usando un nucleótido carente de grupo hidroxilo tal como un didesoxinucleótido.

El fragmento liberado del PTO se hibrida con el CTO, proporcionando una forma adecuada en extensión del fragmento. Aunque el PTO sin digerir también se hibrida con el segmento de captura del CTO a través de su segmento de marcaje en 5', su segmento localizador en 3' no queda hibridado con el CTO lo que impide la formación de un ácido nucleico bicatenario extendido.

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

Etapa (d): <u>Extensión del fragmento</u>

La reacción de extensión se realiza usando el producto de la etapa (c) y una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde. El fragmento hibridado con el segmento de captura del CTO se extiende hasta formar un ácido nucleico bicatenario extendido. En cambio, el PTO no escindido que se hibrida con el segmento de captura del CTO no se extiende, de modo que no se forma ese ácido nucleico bicatenario extendido.

La expresión usada en el presente documento «ácido nucleico bicatenario extendido» designa un ácido nucleico bicatenario formado por una reacción de extensión en la que el fragmento hibridado con el segmento de captura del CTO se extiende usando el segmento molde del CTO como molde y la polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde.

El ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de T_m distinto del valor del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO.

Preferentemente, el ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de T_m superior al del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO.

El valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido puede ajustarse con: (i) la secuencia y/o la longitud del fragmento; (ii) la secuencia y/o la longitud del CTO; o (iii) la secuencia y/o la longitud del fragmento y la secuencia y/o la longitud del CTO.

Una característica sobresaliente de la presente invención es que el valor de T_m ajustable del ácido nucleico bicatenario extendido se utiliza para dar una señal diana indicadora de la presencia de dicho ácido nucleico bicatenario extendido mediante la fusión del mismo en la etapa (e).

El término «T_m» como se usa en el presente documento se refiere a la temperatura de fusión a la que la mitad de la población de moléculas bicatenarias de ácido nucleico se disocia en moléculas monocatenarias. El valor de T_m está determinado por la longitud y por el contenido de G/C en los nucleótidos hibridados. El valor de T_m se puede calcular con métodos convencionales como la regla de Wallace (R.B. Wallace, et al., *Nucleic Acids Research*, 6:3543-3547(1979)) y el llamado «método del vecino más cercano» (SantaLucia J. Jr., et al., *Biochemistry*, 35:3555-3562(1996)); Sugimoto N., et al., *Nucleic Acids Res.,* 24:4501-4505(1996)).

De acuerdo con una realización preferida, el valor deT_m se refiere a los valores deT_m reales que se dan en las condiciones de reacción puestas en práctica.

La polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde usada en la etapa (d) puede incluir cualquier polimerasa de ácido nucleico, por ejemplo, el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, una ADN polimerasa termostable y la ADN polimerasa del bacteriófago T7. Preferentemente, la polimerasa es una ADN polimerasa termostable que se puede obtener de varias especies de bacterias, entre ellas: *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis, Thermis flavus, Thermococcus literalis, Thermus antranikianii, Thermus caldophilus, Thermus chliarophilus, Thermus flavus, Thermus igniterrae, Thermus lacteus, Thermus oshimai, Thermus ruber, Thermus rubens, Thermus scotoductus, Thermus silvanus, Thermus species Z05, Thermus species sps 17, Thermus thermophilus, Thermotoga maritima, Thermotoga neapolitana, Thermosipho africanus, Thermococcus litoralis, Thermococcus barossi, Thermococcus gorgonarius, Thermotoga maritima, Thermotoga neapolitana, Thermosipho africanus, Pyrococcus furiosus (Pfu), Pyrococcus woesei, Pyrococcus horlkoshii, Pyrococcus abyssi, Pyrodictium occultum, Aquifex pyrophilus* y *Aquifex aeolieus*. Pero lo más preferible es que la polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde sea la polimerasa *Taq*.

De acuerdo con una realización preferida, la enzima con actividad nucleasa 5' usada en la etapa (b) es idéntica a la polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde usada en la etapa (d). Más preferentemente, la enzima con actividad nucleasa 5' usada en la etapa (b), la polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde usada para la extensión del cebador situado en dirección 5' y la polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde usada en la etapa (d) son idénticas entre sí.

El ácido nucleico bicatenario extendido tiene un marcador originado a partir de (i) al menos un marcador unido al fragmento de PTO y/o al CTO; (ii) un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión; (iii) un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión y un marcador unido al fragmento de PTO y/o al CTO; o (IV) un marcador intercalante.

La presencia del ácido nucleico bicatenario extendido puede indicar la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana porque el ácido nucleico bicatenario extendido se forma cuando dicha secuencia diana está presente. Para detectar la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido de modo directo, en la etapa (d) se forma un ácido nucleico bicatenario extendido que tiene un marcador que proporciona una señal detectable. El marcador usado en el ácido nucleico bicatenario extendido proporciona un cambio de la señal dependiendo de si el ácido nucleico bicatenario extendido está en una cadena doble o sencilla, dando finalmente la señal diana indicadora de la presencia de dicho ácido nucleico bicatenario extendido mediante la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

Etapa (e): <u>Fusión del ácido nucleico bicatenario extendido</u>

Después de la reacción de extensión, el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona a lo largo de un intervalo de temperaturas para proporcionar una señal diana indicadora de su presencia.

La señal diana la proporciona (i) al menos un marcador unido al fragmento y/o al CTO; (ii) un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión; (iii) un marcador incorporado en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión y un marcador unido al fragmento y/o al CTO; o (IV) un marcador intercalante.

La expresión «señal diana» usada en el presente documento significa cualquier señal capaz de indicar la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido. Por ejemplo, la señal diana incluye una señal procedente de los marcadores (generación o extinción de la señal), un cambio de señal de los marcadores (aumento o disminución de la señal), una curva de fusión, un perfil de fusión y una temperatura de fusión (o valor de T_m).

De acuerdo con una realización preferida, la señal diana es un cambio de señal procedente del marcador situado en el ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa de fusión. El cambio de señal se puede obtener midiendo señales como mínimo a dos temperaturas distintas. Como alternativa, la señal diana es una curva de fusión, un perfil de fusión o una temperatura de fusión (o valor de T_m) obtenida mediante la medición de señales obtenidas a partir del marcador situado en el ácido nucleico bicatenario extendido a lo largo de un intervalo de temperaturas. Preferentemente, el intervalo de temperaturas corresponde al de un análisis de la curva de fusión o a temperaturas cercanas al valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido.

El ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de T_m superior al del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO. Por tanto, el ácido nucleico bicatenario extendido y el híbrido muestran patrones de fusión distintos. Dichos perfiles dispares permiten distinguir la señal diana de las señales que no lo son. El distinto perfil de fusión o la distinta temperatura de fusión generan la señal diana junto con un sistema de marcaje adecuado.

Los sistemas de marcaje adecuados para la presente invención son diversos en cuanto a tipo, localización y modo de generación de la señal.

Los sistemas de marcaje útiles para la presente invención se describen pormenorizadamente a continuación:

(i) Marcador unido al fragmento y/o al CTO

De acuerdo con una realización preferida, la señal diana la proporciona como mínimo un marcador unido al fragmento y/o al CTO. Como el ácido nucleico bicatenario extendido se forma entre el fragmento del PTO y el CTO, contiene el marcador del fragmento del PTO o el del CTO, que proporciona la señal diana en la etapa de fusión.

El marcaje incluye un marcador interactivo doble y un marcador sencillo.

(i-1) Marcador interactivo doble

El sistema de marcaje interactivo es un sistema generador de señal en el que se transmite energía no radioactiva entre una molécula donadora y una molécula aceptora. Como ejemplo representativo del sistema de marcaje interactivo, el sistema de marcaje FRET (transferencia de energía de resonancia fluorescente) incluye una molécula indicadora fluorescente (molécula donadora) y una molécula amortiguadora (molécula aceptora). En FRET, la donadora de energía es fluorescente, pero la aceptora de esa energía puede ser fluorescente o no. En otro tipo de sistemas interactivos de marcaje, el donante de energía no es fluorescente, por ejemplo, un cromóforo y el aceptor de energía es fluorescente. En otros tipos de sistemas interactivos de marcaje, el donador de energía es luminiscente, por ejemplo, bioluminiscente, quimioluminiscente, electroquimioluminiscente y el aceptor es fluorescente. En la presente divulgación la molécula donadora puede describirse como molécula indicadora y la molécula aceptora como molécula amortiguadora, respectivamente.

Preferentemente, la señal indicadora de la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido (es decir, la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana) es generada por sistemas interactivos de marcaje, más preferentemente por el sistema de marcaje FRET (es decir, un sistema interactivo de marcaje doble).

Primera realización (marcaje interactivo doble intracatenario)

En una primera realización del sistema interactivo de marcaje doble, el fragmento o el CTO poseen un marcaje interactivo doble que comprende una molécula indicadora y una molécula amortiguadora; la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble para proporcionar lugar a la señal diana en la etapa (e). La primera realización del sistema interactivo de marcaje doble se ilustra en las Figs. 2, 6 y 9. La primera realización se denomina marcaje interactivo doble intracatenario.

Primera realización plasmada en la Fig. 2 (marcaje interactivo doble intracatenario)

La realización ejemplificada se describe con referencia a la Fig. 2. El segmento molde del CTO contiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora. El PTO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana es digerido y libera el fragmento y éste a su vez se hibrida con el segmento de captura del CTO y se extiende hasta formar el ácido nucleico bicatenario extendido.

Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se forma en la etapa (d), la molécula indicadora y la molécula amortiguadora del CTO están conformacionalmente separadas y eso impide que la molécula amortiguadora atenúe la señal emitida por la molécula indicadora; cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona en la etapa (e), la molécula indicadora y la molécula amortiguadora están conformacionalmente adyacentes de modo que la segunda atenúa la señal de la primera y de esa forma se emite la señal diana que indica la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

La expresión usada en el presente documento «la molécula indicadora y la molécula amortiguadora están conformacionalmente adyacentes» significa que ambas moléculas quedan tridimensionalmente adyacentes una respecto a la otra por una estructura conformacional del fragmento o del CTO, como un arrollamiento al azar o una horquilla.

La expresión usada en el presente documento «la molécula indicadora y la molécula amortiguadora están conformacionalmente separadas» significa que ambas moléculas quedan tridimensionalmente separadas por el cambio de la estructura conformacional del fragmento o del CTO a raíz de la formación de la cadena doble.

Preferentemente, la señal diana emitida en la etapa (e) incluye una curva de fusión, un perfil de fusión o un valor de T_m que se obtiene midiendo el cambio de la señal fluorescente generado en la etapa (d).

De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora pueden estar localizadas en cualquier punto del CTO, siempre que la señal de la molécula indicadora pueda ser amortiguada y desamortiguada en función de la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

De acuerdo con una realización preferida, tanto la molécula indicadora como la molécula amortiguadora están unidas al segmento molde o al segmento de captura del CTO.

De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora están situadas en el extremo 5' y en el extremo 3' del CTO.

De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora o la molécula amortiguadora del CTO está localizada en su extremo 5' o a entre 1 y 5 nucleótidos de distancia del extremo 5' mientras que la otra está situada de modo que amortigua y desamortigua la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del CTO.

De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora o la molécula amortiguadora del CTO está localizada en su extremo 3'o a entre 1 y 5 nucleótidos de distancia del extremo 3' mientras que la otra está situada de modo que amortigua y desamortigua la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del CTO.

De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora están separadas como máximo por 80 nucleótidos, preferentemente como máximo por 60 nucleótidos, más preferentemente como máximo por 30 nucleótidos y mucho más preferentemente como máximo por 25 nucleótidos. De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora están separadas como mínimo por 4 nucleótidos, preferentemente como mínimo por 6 nucleótidos, más preferentemente como mínimo por 10 nucleótidos y mucho más preferentemente como mínimo por 15 nucleótidos..

En la presente divulgación, se puede formar un híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO.

Cuando el segmento molde del CTO esté marcado con un marcador interactivo doble como el de la Fig. 2, no habrá un cambio de la señal del marcador en el híbrido formado por el PTO sin escindir y el CTO. Por tanto, el híbrido no proporciona una señal que no sea la diana.

Cuando el segmento de captura del CTO esté marcado con un marcador interactivo doble, el híbrido formado por el PTO sin escindir y el CTO ofrece una señal que no es la diana en la etapa de fusión. En tal caso, la diferencia entre los valores T_m del ácido nucleico bicatenario extendido y del híbrido permite diferenciar la señal diana del ácido nucleico bicatenario extendido de la señal no diana del híbrido.

<u>Primera realización plasmada en la Fig. 6 (marcaje interactivo doble intracatenario)</u>

La realización ejemplificada se describe con referencia a la Fig. 6. El segmento de marcaje en 5' del PTO contiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora. El PTO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana es digerido para liberar el fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' con la molécula indicadora y la molécula amortiguadora. El fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO.

Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se forma en la etapa (d), la molécula indicadora y la molécula amortiguadora del fragmento quedan separadas conformacionalmente y eso impide que la molécula amortiguadora atenúe la señal emitida por la molécula indicadora; cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona en la etapa (e), la molécula indicadora y la molécula amortiguadora están conformacionalmente adyacentes de modo que la segunda atenúa la señal de la primera y de esa forma se emite la señal diana que indica la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora pueden estar localizadas en cualquier punto del fragmento, siempre que la señal de la molécula indicadora sea amortiguada y desamortiguada en función de la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora o la molécula amortiguadora del CTO está localizada en su extremo 5' o a entre 1 y 5 nucleótidos de distancia del extremo 5' mientras que la otra está situada de modo que amortigua y desamortigua la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del fragmento.

De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora están separadas entre sí como máximo por 50 nucleótidos, preferentemente como máximo por 40 nucleótidos, más preferentemente como

máximo por 30 nucleótidos y mucho más preferentemente como máximo por 20 nucleótidos. De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora están separadas como mínimo por 4 nucleótidos, preferentemente como mínimo por 6 nucleótidos, más preferentemente como mínimo por 10 nucleótidos y mucho más preferentemente como mínimo por 15 nucleótidos.

Como se representa en la Fig. 6, el híbrido formado entre el PTO sin escindir y el CTO proporciona una señal que no es la diana en la etapa de fusión. En este caso, la diferencia entre el valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido y el del híbrido permite diferenciar la señal diana del ácido nucleico bicatenario extendido de la señal no diana del híbrido.

Segunda realización (marcaje interactivo doble intracatenario)

En la segunda realización del sistema interactivo de marcaje doble, el fragmento tiene un marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora y una molécula amortiguadora y el CTO posee otro marcador interactivo doble; en la que la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble para proporcionar lugar a la señal diana en la etapa (e).

La realización ejemplificada se describe con referencia a la Fig. 8.

Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se forma en la etapa (d), la señal emitida por la molécula indicadora unida al CTO es amortiguada por la molécula amortiguadora unida al PTO. Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona en la etapa (d), la molécula indicadora y la molécula amortiguadora quedan separadas, lo que impide que la molécula amortiguadora atenúe la señal emitida por la molécula indicadora, de modo que la señal diana es emitida indicando la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

Preferentemente, la señal diana proporcionada en la etapa (e) incluye una curva de fusión, un perfil de fusión o un valor de T_m que se obtiene midiendo el cambio de la señal fluorescente emitida por el marcador interactivo doble.

La molécula indicadora y la molécula amortiguadora pueden estar localizadas en cualquier punto del fragmento del PTO y del CTO, siempre que la señal de la molécula indicadora sea atenuada por la molécula amortiguadora en el ácido nucleico bicatenario extendido.

De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora o la molécula amortiguadora situadas en el fragmento del PTO está localizada en el extremo 5' del segmento de marcaje en 5'.

De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora o la molécula amortiguadora situada en el CTO está localizada en el extremo 3'.

Como se representa en la Fig. 8, el híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO proporciona una señal que no es la diana en la etapa de fusión. En tal caso, la diferencia entre el valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido y el del híbrido permite diferenciar la señal diana emitida por el ácido nucleico bicatenario extendido de la señal no diana del híbrido.

La molécula indicadora y la molécula amortiguadora útiles en la presente divulgación pueden incluir cualquier molécula conocida en la técnica. Algunos ejemplos son Cy2™(506), YO-PRO™-1 (509), YOYO™-1 (509), calceína (517), FITC (518), FluorX™ (519), Alexa™ (520), rodamina 110 (520), Oregon Green™ 500 (522), Oregon Green™ 488 (524), Ri-boGreen™ (525), Rhodamine Green™ (527), rodamina 123 (529), Magnesium Green™(531), Calcium Green™ (533), TO-PRO™-1 (533), TOTO1 (533), JOE (548), BODIPY530/550 (550), Dil (565), BODIPY TMR (568), BODIPY558/568(568), BODIPY564/570 (570), Cy3™ (570), Alexa™ 546 (570), TRITC (572), Magnesium Orange™ (575), ficoeritrina R&B (575), rodamina faloidina (575), Calcium Orange™(576), pironina Y (580), rodamina B (580), TAMRA (582), Rhodamine Red™ (590), Cy3.5™ (596), ROX (608), Calcium Crimson™ (615), Alexa™ 594 (615), rojo de Texas (615), rojo Nilo (628), YO-PRO™-3 (631), YOYO™-3 (631), R-ficocianina (642), C-ficocianina (648), TO-PRO™-3 (660), TOTO3 (660), DiDDilC(5) (665), Cy5™ (670), tiadicarbocianina (671), Cy5.5 (694), HEX (556), TET (536), BiosearchBlue (447), CAL Fluor Gold 540 (544), CAL Fluor Orange 560 (559), CAL Fluor Red 590 (591), CAL Fluor Red 610(610), CAL Fluor Red 635 (637), FAM (520), fluoresceína (520), fluoresceína-C3 (520), Pulsar 650 (566), Quasar 570 (667), Quasar 670 (705) y Quasar 705 (610). El número entre paréntesis indica la longitud de onda máxima de emisión en nanómetros. Preferentemente, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora incluyen JOE, FAM, TAMRA, ROX y un marcador a base de fluoresceína.

Los pares más adecuados de molécula indicadora-molécula amortiguadora se desvelan en diversas publicaciones como se indica a continuación: Pesce et al., editores, *Fluorescence Spectroscopy* (Marcel Dekker, Nueva York, 1971); White et al., *Fluorescence Analysis: A Practical Approach* (Marcel Dekker, Nueva York, 1970); Berlman, *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*, 2a Edición (Academic Press, Nueva York, 1971); Griffiths, *Color AND Constitution of Organic Molecules* (Academic Press, Nueva York,1976); Bishop, editor, *Indicators* (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (Molecular Probes, Eugene, 1992); Pringsheim, *Fluorescence and Phosphorescence* (Interscience Publishers,

Nueva York, 1949); Haugland, R. P., *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 6a Edición (Molecular Probes, Eugene, Oreg., 1996), Patentes de EE.UU. N.º 3.996.345 y 4.351.760.

Es destacable que en la presente invención se pueda utilizar una molécula amortiguadora negra no fluorescente capaz de atenuar la fluorescencia de un amplio intervalo de longitudes de onda o una longitud de onda concreta. Ejemplos de ellas son BHQ y DABCYL.

En el marcador FRET adoptado en el CTO, la molécula indicadora abarca una donadora de FRET y la amortiguadora abarca a la otra pareja (aceptora) de FRET. Por ejemplo, un colorante de fluoresceína se usa como indicador y un colorante de rodamina como amortiguador.

Los marcadores pueden unirse al CTO o PTO mediante métodos convencionales. Preferentemente, se une al CTO o PTO a través de un espaciador que contiene átomos de carbono (por ejemplo, espaciador de 3 carbonos, espaciador de 6 carbonos o espaciador de 12 carbonos).

(i-2) Marcador sencillo

La presente divulgación también se ejecuta muy bien con sistemas de marcaje sencillos que proporcionan señales indicadoras de la presencia de secuencias de ácidos nucleicos diana.

De acuerdo con una realización preferida, el fragmento o el CTO tienen un solo marcador y la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e) induce el cambio de señal del marcador sencillo para proporcionar lugar a la señal diana en la etapa (e).

Primera realización en la Fig. 3 (sistema de marcaje sencillo)

La realización ejemplificada se describe con referencia a la Fig. 3. El segmento molde del CTO tiene un marcador fluorescente sencillo. El PTO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana es digerido, con lo que se libera el fragmento. El fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO y se extiende hasta formar el ácido nucleico bicatenario extendido. Con la formación del ácido nucleico bicatenario extendido, la intensidad de la fluorescencia emitida por el marcador fluorescente sencillo aumenta. Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona en la etapa (e), la intensidad de la fluorescencia emitida por el marcador fluorescente sencillo disminuye, de modo que la señal diana indica la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

De acuerdo con una realización preferida, el marcador sencillo puede estar localizado en cualquier punto del CTO, siempre que el nivel de la señal emitida por el marcador sencillo cambie en función de la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

De acuerdo con una realización preferida, el marcador sencillo está unido al segmento molde o al segmento de captura del CTO.

Cuando el segmento molde del CTO esté marcado con un marcador sencillo como el de la Fig. 3, no se inducirá un cambio de la señal del marcador situado en el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO. Por tanto, el híbrido no proporciona una señal que no sea la diana.

Si el segmento de captura del CTO está marcado con un marcador sencillo, el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO proporciona una señal que no es la diana en la etapa de fusión. En este caso, la diferencia entre el valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido y el del híbrido permite diferenciar la señal diana emitida por el ácido nucleico bicatenario extendido de la señal no diana emitida por el híbrido.

Segunda realización en la Fig. 7 (sistema de marcaje sencillo)

La realización ejemplificada se describe con referencia a la Fig. 7. El segmento de marcaje en 5' del PTO tiene un marcador fluorescente sencillo. El PTO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana es digerido, con lo que se libera el fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' con el marcador fluorescente sencillo. Con la hibridación, la intensidad de la señal emitida por el marcador fluorescente sencillo situado en el segmento de marcaje en 5' aumenta. Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona en la etapa (e), la intensidad de la señal emitida por el marcador fluorescente sencillo disminuye, de modo que la señal diana indica la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

De acuerdo con una realización preferida, el marcador sencillo puede estar localizado en cualquier punto del fragmento del PTO, siempre que el nivel de la señal emitida por el marcador sencillo cambie en función de la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

Como se representa en la Fig. 7, el híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO proporciona una señal que no es la diana en la etapa de fusión. En tal caso, la diferencia entre el valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido y

el del híbrido permite diferenciar la señal diana emitida por el ácido nucleico bicatenario extendido de la señal no diana emitida por el híbrido.

El marcador sencillo usado aquí tiene que ser capaz de emitir una señal distinta dependiendo de si hay presente una cadena doble o una cadena sencilla. El marcador sencillo puede ser un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador quimioluminiscente, un marcador electroquímico o un marcador metálico. Preferentemente, el marcador sencillo incluye un marcador fluorescente.

Los tipos y los puntos de unión preferibles para los marcadores fluorescentes sencillos usados en la presente invención se desvelan en las patentes de EE.UU. N.º 7.537.886 y 7.348.141, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad. Preferentemente, el marcador fluorescente sencillo incluye JOE, FAM, TAMRA, ROX y un marcador a base de fluoresceína. Es preferible que el residuo nucleotídico marcado esté situado como residuo interno en el seno del oligonucleótido, en lugar de en el extremo 5' o en el extremo 3'.

El marcador fluorescente sencillo útil para la presente invención puede describirse en referencia a descripciones de moléculas indicadora y amortiguadora como se ha indicado antes.

En particular, en el caso de que la presente divulgación en fase sólida se realice con un marcador sencillo, se puede utilizar un marcador fluorescente general y no se precisa un marcador fluorescente específico capaz de proporcionar una señal fluorescente con diferentes intensidades dependiendo de su presencia en una cadena doble o en una cadena sencilla. Se mide la señal diana proporcionada en el sustrato sólido. La realización del sistema de marcaje sencillo con el CTO inmovilizado se ilustra en la Fig. 12.

Cuando se emplea el CTO inmovilizado sobre el sustrato sólido se pueden usar marcadores químicos (por ejemplo, biotina) o enzimáticos (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa, β-galactosidasa y β-glucosidasa).

En el sistema de marcaje «marcador unido al fragmento y/o al CTO», los marcadores pueden estar situados en cualquier punto siempre que el híbrido formado entre el PTO sin escindir y el CTO no emita ninguna señal que no sea la diana en la etapa (e). Como alternativa, los marcadores pueden estar colocados en cualquier punto siempre que el híbrido formado entre el PTO sin escindir y el CTO emita una señal que no sea la diana en la etapa (e); en ese caso el valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido es superior al del híbrido formado entre el PTO sin escindir y el CTO.

En particular, en el caso de que los marcadores estén colocados de modo que el híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO no ofrezca una señal que no es la diana, el intervalo que incluya el valor de T_m del híbrido puede ser utilizado para seleccionar el valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido para detectar la secuencia de ácido nucleico diana.

(ii) Marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido

La presente divulgación puede emplear un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión para proporcionar la señal diana que indique la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido.

Aunque el fragmento del PTO o el CTO carezcan de marcador, la incorporación de un marcador al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión sirve para marcarlo. Las Figs. 10 y 11 ilustran una realización en la que un nucleótido marcado con un marcador sencillo se incorpora al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión (véanse los apartados C y D de las Figs. 10 y 11). Esta realización también es aplicable a otras realizaciones en las que se recurre al análisis de la fusión.

De acuerdo con una realización preferida, la señal diana la proporciona un marcador sencillo incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión; en la que el marcador sencillo incorporado está unido a un nucleótido que se incorpora durante la reacción de extensión; en la que la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e) provoca un cambio de la señal emitida por el marcador sencillo para proporcionar lugar a la señal diana en la etapa (e).

La realización ejemplificada se describe con referencia a la Fig. 10. El PTO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana es digerido para liberar el fragmento. El fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO inmovilizado en un sustrato sólido y se extiende en presencia de nucleótidos marcados con un marcador fluorescente sencillo hasta formar el ácido nucleico bicatenario extendido. La señal fluorescente emitida por el ácido nucleico bicatenario extendido puede ser detectada directamente en el sustrato sólido que acoge el CTO inmovilizado. Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona, una cadena que tiene un marcador fluorescente se libera y la señal fluorescente deja de detectarse directamente (no mostrado en la Fig. 10). Por tanto, la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido puede proporcionar directamente un cambio de la señal. A este respecto, se emite la señal diana que indica la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

La señal diana proporcionada en la etapa (e) incluye una curva de fusión, un perfil de fusión o un valor de T_m que se obtiene midiendo el cambio de la intensidad de la fluorescencia directamente en el soporte que acoge el CTO inmovilizado.

De acuerdo con una realización preferida, un nucleótido incorporado durante la reacción de extensión es un ddNTP.

De acuerdo con una realización preferida, un nucleótido incorporado durante la reacción de extensión tiene una primera base no natural y el CTO tiene un nucleótido que tiene de una segunda base no natural con una afinidad de unión específica hacia la primera base no natural, como ilustra la Fig. 11. El nucleótido que tiene la segunda base no natural está localizado preferentemente en cualquier punto del segmento molde del CTO.

La expresión «base no natural» como se usa en el presente documento se refiere a derivados de bases naturales tales como adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U), que son capaces de formar pares de bases unidos por puentes de hidrógeno. La expresión «base no natural» como se emplea en el presente documento incluye bases que tienen patrones de apareamiento distintos de los de las bases naturales como compuestos originales, como describen, entre otras, las patentes de EE.UU. N.º 5.432.272, 5.965.364, 6.001.983 y 6.037.120. El apareamiento entre bases no naturales también implica dos o tres puentes de hidrógeno, como en las bases naturales. El apareamiento entre bases no naturales también se forma de manera específica.

Los ejemplos específicos de bases no naturales son, entre otros, las siguientes bases en combinaciones de pares: iso-C/iso-G,iso-dC/iso-dG, K/X, H/J y M/N (véase la patente de EE.UU. N.º 7.422.850).

La realización ejemplificada se describe con referencia a la Fig. 11. El fragmento se hibrida con el CTO que incorpora un nucleótido que tiene una segunda base no natural (por ejemplo, iso-dC) que tiene una afinidad de unión específica hacia una primera base no natural (por ejemplo, iso-dG). La extensión se realiza en presencia de un nucleótido que tiene la primera base no natural marcada con un marcador fluorescente sencillo, dando lugar al ácido nucleico bicatenario extendido. En la reacción de extensión, el nucleótido que tiene la primera base no natural se incorpora en la posición opuesta a la del nucleótido que tiene la segunda base no natural.

La señal fluorescente del ácido nucleico bicatenario extendido puede ser detectada directamente en el sustrato sólido que acoge el CTO inmovilizado. Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona, una cadena que tiene un marcador fluorescente se libera y la señal fluorescente deja de detectarse en el sitio (no mostrado en la Fig. 11). Por tanto, la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido puede proporcionar directamente un cambio de la señal. A este respecto, se emite la señal diana que indica la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

Cuando se emplea el marcador incorporado en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, el marcador no se incorporará al híbrido formado entre el PTO sin escindir y el CTO porque dicho híbrido no se extiende. Por tanto, el híbrido no proporciona una señal que no sea la diana.

Los tipos y las características de los marcadores sencillos usados pueden estar descritos con referencia a las descripciones del sistema de marcaje basado en «un marcador unido al fragmento y/o al CTO» como se ha indicado antes en el presente documento.

(iii) Marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido y marcador unido al fragmento o al CTO

La presente divulgación puede emplear un sistema de marcaje basado en la cooperación de un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión con otro marcador unido al fragmento y/o al CTO, como ilustran las figuras 4 y 5.

De acuerdo con una realización preferida, la señal diana es proporcionada por un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión y por un marcador unido al fragmento y/o al CTO y el marcador incorporado está unido a un nucleótido incorporado durante la reacción de extensión; ambos marcadores forman una marcador interactivo doble con una molécula indicadora y una molécula amortiguadora; la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e) induce el cambio de señal emitida por el marcador interactivo doble para proporcionar lugar a la señal diana en la etapa (e).

Más preferentemente, el nucleótido incorporado durante la reacción de extensión tiene una primera base no natural y el CTO tiene un nucleótido que tiene una segunda base no natural con una afinidad de unión específica hacia la primera base no natural.

La realización ejemplificada se describe con referencia a la Fig. 4. El fragmento que se hibrida con el CTO comprende una molécula indicadora o amortiguadora y un nucleótido que tiene una segunda base no natural (por ejemplo, iso-dC) que tiene una afinidad de unión específica hacia una primera base no natural (por ejemplo, iso-dG). La extensión se realiza en presencia de un nucleótido dotado con la primera base no natural marcada con una molécula amortiguadora o indicadora y da lugar a un ácido nucleico bicatenario extendido en el que la señal emitida

por la molécula indicadora es atenuada por la molécula amortiguadora. En la reacción de extensión, el nucleótido que tiene la primera base no natural se incorpora en la posición opuesta a la del nucleótido que tiene la segunda base no natural.

Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona en la etapa (e), la molécula indicadora y la molécula amortiguadora quedan separadas, lo que impide que la molécula amortiguadora atenúe la señal emitida por la molécula indicadora, de ese modo la señal diana es emitida e indica la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

Preferentemente, la señal diana emitida en la etapa (e) incluye una curva de fusión, un perfil de fusión o un valor de T_m que se obtiene midiendo el cambio de la señal emitida por el marcador interactivo doble.

El punto que ocupa el marcador en el CTO y el punto de incorporación del marcador incorporado dependen de la contribución de los dos marcadores al sistema de marcaje interactivo doble a la hora de provocar el cambio de señal en la etapa de fusión.

Aún más preferentemente, el segmento molde del CTO tiene una molécula indicadora o amortiguadora y un nucleótido que tiene una segunda base no natural. La reacción de extensión de la etapa (d) se realiza en presencia de un nucleótido que tiene una molécula indicadora o amortiguadora y de una primera base no natural con una afinidad de unión específica hacia la segunda base no natural del CTO. Las dos bases no naturales del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (d) forman un par de bases que amortigua la señal de la molécula indicadora por efecto de la molécula amortiguadora y provocan así el cambio de la señal, que proporciona la señal diana. Como alternativa, el fragmento posee una molécula indicadora o amortiguadora y el segmento molde del CTO tiene un nucleótido que tiene una segunda base no natural. La reacción de extensión de la etapa (d) se realiza en presencia de un nucleótido que tiene una molécula indicadora o amortiguadora y de una primera base no natural con una afinidad de unión específica hacia la segunda base no natural del CTO. Las dos bases no naturales del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (d) forman un par de bases que inducen un cambio en la señal de la molécula indicadora por amortiguación, proporcionando así la señal diana.

Otra realización ejemplificada se describe con referencia a la Fig. 5. En esta realización, el fragmento que tiene una molécula indicadora o amortiguadora se hibrida con el CTO que comprende un nucleótido que tiene una segunda base no natural (por ejemplo, iso-dC) que tiene una afinidad de unión específica hacia una primera base no natural (por ejemplo, iso-dG). La extensión se realiza en presencia de un nucleótido que tiene la primera base no natural marcada con una molécula amortiguadora o indicadora y da lugar a un ácido nucleico bicatenario extendido en el que la señal emitida por la molécula indicadora es atenuada por la molécula amortiguadora. En la reacción de extensión, el nucleótido que tiene la primera base no natural se incorpora en la posición opuesta a la del nucleótido que tiene la segunda base no natural.

Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se forma en la etapa (d), la molécula indicadora y la molécula amortiguadora quedan separadas conformacionalmente y eso impide que la molécula amortiguadora atenúe la señal emitida por la molécula indicadora; cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona en la etapa (e), la molécula indicadora y la molécula amortiguadora están conformacionalmente adyacentes de modo que la segunda atenúa la señal de la primera y de esa forma se emite la señal diana que indica la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

Preferentemente, la señal diana proporcionada en la etapa (e) incluye una curva de fusión, un perfil de fusión o un valor de T_m que se obtiene midiendo el cambio de la señal emitida por el marcador interactivo doble.

El sitio que ocupa el marcador en el CTO y el lugar de incorporación del marcador incorporado dependen de la contribución de los dos marcadores al sistema de marcaje interactivo doble a la hora de provocar el cambio de señal en la etapa de fusión.

Cuando se emplea el marcador incorporado en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, el marcador no se incorporará al híbrido formado entre el PTO sin escindir y el CTO porque dicho híbrido no se extiende. Por tanto, el híbrido no proporciona una señal que no sea la diana en la etapa de fusión.

(IV) Marcador intercalante

La presente divulgación puede emplear un marcador intercalante para proporcionar la señal diana indicadora de la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido. El marcador intercalante es más útil en una reacción en fase sólida con CTO inmovilizados porque las moléculas de ácido nucleico bicatenarias presentes en las muestras pueden generar señales.

Algunos ejemplos de colorantes intercalantes que son útiles para la presente invención incluyen SYBR™ Green I, PO-PRO™-1, BO-PRO™-1,SYTO™43, SYTO™44, SYTO™45, SYTOX™ Blue, POPO™-1, POPO™-3, BOBO™-1, BOBO™-3, LO-PRO™-1, JO-PRO™-1, YO-PRO™1, TO-PRO™1, SYTO™11, SYTO™13, SYTO™15, SYTO™16,

SYTO™20, SYTO™23, TOTO™-3,YOYO™3, GelStar™ y naranja de tiazol. Los colorantes intercalantes se intercalan específicamente en las moléculas de ácido nucleico bicatenarias para generar las señales.

La Fig. 13 ilustra una realización en la que los colorantes intercalantes se intercalan entre pares de bases del ácido nucleico bicatenario extendido (etapas C y D de la Fig. 13). Esta realización también es aplicable a otras realizaciones en las que se recurre al análisis de la fusión.

La realización ejemplificada se describe con referencia a la Fig. 13. El fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO inmovilizado en un sustrato sólido. La extensión se realiza en presencia de un colorante intercalante (por ejemplo, SYBR™ Green) y produce el ácido nucleico bicatenario extendido con colorantes intercalados. La señal fluorescente emitida por el ácido nucleico bicatenario extendido directamente en el sustrato sólido que tiene del CTO inmovilizado puede ser detectada mediante colorantes intercalantes fluorescentes. Cuando el ácido nucleico bicatenario extendido se fusiona, los colorantes intercalantes fluorescentes se liberan y la señal fluorescente deja de detectarse directamente (no mostrado en la Fig. 13). A este respecto, se emite la señal diana que indica la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (e).

El híbrido formado entre el PTO sin escindir y el CTO proporciona una señal que no es la diana en la etapa de fusión. En este caso, la diferencia entre el valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido y el del híbrido permite diferenciar la señal diana emitida por el ácido nucleico bicatenario extendido de la señal no diana emitida por el híbrido (no mostrado en la Fig. 13).

Preferentemente, la señal diana proporcionada en la etapa (e) incluye una curva de fusión, un perfil de fusión o un valor de T_m que se obtiene midiendo el cambio de la señal fluorescente generada en la etapa (d).

Etapa (f): <u>Detección de la señal diana</u>

Por último, el ácido nucleico bicatenario extendido se detecta con la medición de la señal diana en la etapa (e); la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

La detección se puede realizar de diversas maneras dependiendo del tipo de señal diana.

De acuerdo con una realización preferida, la detección de la señal diana se realiza mediante un análisis de la fusión.

La expresión utilizada en el presente documento «análisis de la fusión» significa un método en que la señal diana indicadora de la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido se obtiene mediante la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido, e incluye un método para medir señales a dos temperaturas distintas, análisis de la curva de fusión, análisis del patrón de fusión o análisis del pico de fusión. Preferentemente, el análisis de la fusión es un análisis de la curva de fusión.

De acuerdo con una realización preferida, la detección de la presencia de la cadena extendida en la etapa (e) se realiza mediante un análisis de fusión en el que el ácido nucleico bicatenario extendido se funde en un intervalo de temperaturas para proporcionar una señal diana indicativa de la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido.

Como alternativa, la detección de la presencia de la cadena extendida en la etapa (e) se realiza mediante un análisis de hibridación. Preferentemente, la detección de la presencia de la cadena extendida en la etapa (e) se realiza por un análisis de hibridación en el que se funde el ácido nucleico bicatenario extendido y el resultante se hibrida en un intervalo de temperaturas para proporcionar una señal diana indicativa de la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido.

De acuerdo con una realización preferida, la fusión de la etapa (e) va seguida de la hibridación para proporcionar la señal diana indicativa de la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido. En ese caso, la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido se detecta por análisis de la curva de hibridación.

La curva de fusión o curva de hibridación se puede obtener con técnicas convencionales, por ejemplo, como las descritas en las patentes de EE.UU. N.º 6.174.670 y 5.789.167, Drobyshev et al., *Gene* 188: 45 (1997); Kochinsky y Mirzabekov *Human Mutation* 19: 343 (2002); Livehits et al. *J. Biomol. Structure Dynam*. 11: 783 (1994); y Howell et al. *Nature Biotechnology* 17: 87 (1999). Por ejemplo, la curva de fusión o curva de hibridación puede consistir en una gráfica o una presentación de la variación de la señal de emisión con el parámetro de restrictividad de la hibridación (rigurosidad). La señal emitida puede representarse directamente en una gráfica que la compare con el parámetro de hibridación. Normalmente, una curva de fusión o curva de hibridación consta de la señal de emisión, por ejemplo fluorescencia, que indica el grado de estructura del ácido nucleico bicatenario (es decir, la magnitud de la hibridación), representada en el eje de ordenadas (Y) y el parámetro de hibridación en el eje de abscisas (X).

Una gráfica de la primera derivada de la fluorescencia frente a la temperatura, es decir, un gráfico de la tasa de cambio en la fluorescencia frente a la temperatura (dF/dT frente a T) o (-dF/dT frente a T) proporciona un pico de fusión.

El PTO y el CTO pueden comprender dNMP naturales. Como alternativa, el PTO y el CTO pueden comprender nucleótidos modificados o nucleótidos no naturales como APN (ácidos peptidonucleicos, véase la publicación PCT N.º WO 92/20702) o LNA (ácidos nucleicos cerrados, véanse las publicaciones PCT N.º WO 98/22489, WO 98/39352 y WO 99/14226). El PTO y el CTO pueden comprender bases universales como desoxiinosina, inosina, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol y 5-nitroindol. El término «base universal» se refiere a toda base capaz de formar pares de bases con todas las bases naturales del ADN/ARN sin apenas discriminación entre ellas.

Como se ha descrito antes, el PTO puede ser escindido en un punto situado en dirección 3' alejado del extremo 3' del segmento de marcaje en 5' del PTO. El punto de escisión puede estar localizado en la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' del PTO. Si el fragmento del PTO comprende la parte del extremo 5' del segmento de marcaje en 3' del PTO, un lugar del CTO hibridado con la parte del extremo 5' del segmento de marcaje en 3' puede contener una base universal, una secuencia degenerada o una combinación de ambas. Por ejemplo, si el PTO se escinde en un punto situado a un nucleótido en dirección 3' del extremo 3' del segmento de marcaje en 5' del PTO, es ventajoso que la parte del extremo 5' del segmento de captura del CTO comprenda una base universal para la hibridación con el nucleótido. Si el PTO se escinde en un punto situado a dos nucleótidos en dirección 3' del extremo 3' del segmento de marcaje en 5' del PTO, es ventajoso que el extremo 5' del segmento de captura del CTO comprenda una secuencia degenerada y que su nucleótido adyacente en dirección 3' contenga una base universal. Por tanto, si la escisión del PTO ocurre en varios puntos de la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3', es útil que el CTO contenga bases universales y secuencias degeneradas. Además, si se usan PTO dotados del mismo segmento de marcaje en 5' para detectar varias secuencias de ácidos nucleicos diana en condiciones de inducción de la escisión dependiente de la extensión del cebador situado en dirección 5', se pueden generar fragmentos del PTO con distintas partes del extremo5' del segmento localizador en 3'. En tales casos, resulta conveniente el uso de bases universales y de secuencias degeneradas en el CTO. Las estrategias basadas en el uso de bases universales y de secuencias degeneradas en el CTO aseguran el uso de un solo tipo o de un número mínimo de tipos del CTO en el cribado de varias secuencias de ácidos nucleicos diana.

De acuerdo con una realización preferida, el método comprende además repetir todos o algunos de las etapas (a)-(e) con desnaturalización entre ciclos de repetición.

De acuerdo con una realización preferida, el método comprende además repetir las etapas (a)-(b), (a)-(d) o (a)-(f) con desnaturalización entre ciclos de repetición, más preferentemente usando un cebador en dirección 3'. Esta repetición permite amplificar la secuencia de ácido nucleico diana y/o la señal diana.

La desnaturalización puede realizarse por las tecnologías convencionales, incluyendo, pero sin limitación, calefacción, álcali, formamida, urea y tratamiento con glicoxal, métodos enzimáticos (por ejemplo, acción helicasa), y proteínas de unión. Por ejemplo, la fusión puede conseguirse por calentamiento a temperatura que varía de 80 ºC a 105 ºC. Se proporcionan métodos generales para realizar este tratamiento por Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (2001).

De acuerdo con una realización preferida, la presente divulgación puede realizarse mediante una serie de análisis de fusión para detectar cualitativa o cuantitativamente la secuencia de ácido nucleico diana.

Más preferentemente, la presente divulgación comprende (i) repetir las etapas (a)-(d) con desnaturalización entre ciclos de repetición para formar el ácido nucleico bicatenario extendido, (ii) realizar un análisis de fusión y (iii) repetir las etapas (i) y (ii) al menos dos veces. En dicho enfoque, el análisis de fusión se realiza repetidamente al menos dos veces en un intervalo determinado.

De acuerdo con una realización preferida, el número de repetición de las etapas (a)-(d) se puede controlar opcionalmente. En la realización de una serie de análisis de fusión, el número de repetición de las etapas (a)-(d) para una ejecución de un análisis de fusión puede ser el mismo o diferente del de la repetición de las etapas (a)-(d) para otra ejecución de un análisis de fusión.

Se entendería por un experto en la materia que la repetición de las etapas (a)-(d) es un ejemplo ilustrativo para la formación del ácido nucleico bicatenario extendido. Por ejemplo, la presente invención puede realizarse mediante la repetición de las etapas (a)-(b) y realizar las etapas (c) y (d) para formar el ácido nucleico bicatenario extendido seguido de la realización de un análisis de fusión.

De acuerdo con una realización preferida, las etapas (a)-(f) se realizan en un recipiente de reacción o en recipientes de reacción separados. Por ejemplo, las etapas (a)-(b), (c)-(d) o (e)-(f) pueden realizarse en recipientes de reacción separados.

De acuerdo con una realización preferida, las etapas (a)-(b) y (c)-(f) pueden ser simultáneas o por separado, incluso en un recipiente de reacción dependiendo de las condiciones de reacción (en particular, la temperatura).

De acuerdo con una realización preferida, al menos dos análisis de fusión en la presente invención permiten detectar cuantitativamente la secuencia de ácido nucleico diana.

El área y la altura de un pico de fusión obtenido por un análisis de fusión dependen de la cantidad del ácido nucleico bicatenario extendido, proporcionando información sobre la cantidad inicial de la secuencia de ácido nucleico diana.

De acuerdo con una realización preferida, la presente divulgación comprende (i) aumentar el número del ácido nucleico bicatenario extendido mediante la repetición de las etapas (a)-(d) con desnaturalización entre ciclos de repetición, (ii) realizar un análisis de fusión y (iii) repetir las etapas (i) y (ii) al menos dos veces. La cantidad de la secuencia de ácido nucleico diana se puede medir mediante la determinación de un número de ciclo del análisis de fusión al que se alcanza un valor umbral predeterminado sobre las áreas y/o las alturas de los picos de fusión obtenidos.

Como alternativa, la cuantificación de la secuencia de ácido nucleico diana puede realizarse mediante representación gráfica de la información de análisis de fusión (por ejemplo, el área o la altura de los picos) frente al número de ciclo de la repetición para determinar el aumento en la cantidad del ácido nucleico bicatenario extendido.

La presente divulgación no requiere que las secuencias de ácidos nucleicos diana que se han de detectar y/o amplificar tengan una secuencia o longitud concretas, ni en el caso del ADN (ADNg y ADNc) ni en el del ARN.

En los casos en que se emplee ARNm como material de partida, será necesario una etapa de transcripción inversa antes de la etapa de reasociación, cuyos detalles se pueden encontrar en Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); y en Noonan, K. F. et al., *Nucleic Acids Res*. 16: 10366 (1988). Para la transcripción inversa se puede usar un hexámero aleatorio o un cebador oligonucleotídico de dT hibridable con ARNm.

Las secuencias de ácidos nucleicos diana que pueden ser detectadas y/o amplificadas incluyen cualquier secuencia natural presente en procariotas, eucariotas (protozoos y parásitos, hongos, levaduras, plantas superiores e inferiores y animales superiores, entre ellos mamíferos y seres humanos, entre otros ejemplos) o virus (herpesvirus, VIH, virus de la gripe, virus de Epstein-Barr, virus de la hepatitis, poliovirus, etc.) o ácido nucleico viroide.

La secuencia de ácido nucleico diana que se ha de detectar incluye una amplia diversidad de secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, secuencias en un genoma, secuencias artificialmente aisladas o fragmentadas y secuencias sintetizadas (por ejemplo, secuencias de ADNc y secuencias de código de barras). Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico diana incluye secuencias marcadoras de ácido nucleico para Inmuno-PCR (IPCR). La IPCR emplea conjugados entre secuencias marcadoras de ácido nucleico y anticuerpos junto con PCR, que se aplica ampliamente para la detección de diversos tipos de dianas, incluyendo proteínas (véase Sano et al., *Science* 258 págs.: 120-122 (1992), la patente de EE.UU. N.º 5.665.539, Niemeyer et al., *Trends in Biotechnology* 23 págs.: 208-216 (2005), la publicación de patente de EE.UU. N.º 2005/0239108 y Ye et al., *Journal of Environmental Science* 22 págs.: 796-800 (2010)).

La presente invención también es útil para la detección de variaciones nucleotídicas. Preferentemente, la secuencia de ácidos nucleicos diana comprende una variación de nucleótidos. El término «variación de nucleótidos» como se usa en el presente documento se refiere a cualquier sustitución, deleción o inserción de uno o varios nucleótidos en una secuencia de ADN en un lugar concreto entre segmentos de ADN contiguos que, por lo demás, son similares en cuanto a secuencia. Tales segmentos contiguos de ADN incluyen un gen o cualquier otro segmento de un cromosoma. Estas variaciones nucleotídicas pueden ser variaciones mutantes o variaciones alélicas polimórficas. Por ejemplo, la variación de nucleótidos detectada en la presente invención incluye SNP (polimorfismos mononucleotídicos), mutaciones, deleciones, inserciones, sustituciones y translocaciones. La variación de nucleótidos mostrada a título de ejemplo incluye numerosas variaciones del genoma humano (por ejemplo, variaciones en el gen MTHFR, metileno-tetrahidrofolato-reductasa), variaciones implicadas en la resistencia a los fármacos de los microbios patógenos y variaciones relacionadas con la oncogénesis. La expresión variación de nucleótidos utilizada en el presente documento incluye cualquier variación en una ubicación particular en una secuencia de ácido nucleico. En otras palabras, la expresión variación de nucleótidos incluye un tipo silvestre y es cualquier tipo mutante en una ubicación particular en una secuencia de ácido nucleico.

En la presente invención para la detección de una variación de nucleótidos en una secuencia de ácidos nucleicos diana, cuando los cebadores o las sondas usados tienen una secuencia que es complementaria con la variación de nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos diana, la secuencia de ácidos nucleicos diana que contiene dicha variación se describe como molde apareado. Cuando los cebadores o sondas usados tienen una secuencia que no es complementaria con la variación de nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos diana, la secuencia de ácidos nucleicos diana que contiene dicha variación se describe como molde desapareado.

Para la detección de variaciones nucleotídicas, el extremo 3' del cebador situado en dirección 5' se puede diseñar para quedar situado en oposición al punto de la variación de nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos diana. De acuerdo con una realización preferida, el extremo 3' del cebador situado en dirección 5' tiene una secuencia complementaria con la variación de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos diana. El extremo 3' del cebador situado en dirección 5' que tiene de la secuencia complementaria con la variación de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos diana se hibrida con el molde apareado y se extiende hasta provocar la escisión del PTO. El

fragmento del PTO resultante se hibrida con el CTO y proporciona la señal diana. En cambio, si el extremo 3' del cebador situado en dirección 5' no concuerda con la variación de nucleótidos en un molde desapareado, éste no se extenderá en las condiciones en que la hibridación del extremo 3' de los cebadores es esencial para la extensión, aunque el cebador situado en dirección 5' esté hibridado con el molde desapareado, lo que tiene como consecuencia que no se genere la señal diana.

Como alternativa, es posible usar la escisión del PTO dependiente de la hibridación del PTO que tiene una secuencia que es complementaria de la variación de nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos diana. Por ejemplo, en condiciones controladas, un PTO que tiene una secuencia complementaria con la de la variación de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos diana se hibrida con el molde apareado y después es escindida. El fragmento del PTO resultante se hibrida con el CTO y proporciona la señal diana. En cambio, en las condiciones controladas, el PTO no se hibrida con el molde desapareado cuya secuencia no es complementaria con la posición de la variación de nucleótidos y no se escinde. Preferentemente, en este caso, la secuencia complementaria con la variación de nucleótidos del PTO está situada en mitad del segmento localizador en 3' del PTO.

De acuerdo con una realización, el uso de un nucleótido de desapareamiento artificial potencia el potencial de discriminación del PTO a variaciones de nucleótidos.

Como alternativa, es preferible que la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' del PTO esté situada con respecto a la variación de nucleótidos en una secuencia de ácidos nucleicos diana para la detección de la variación de nucleótidos y que la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' del PTO tenga una secuencia complementaria con la variación de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

Para mejorar la eficiencia de la detección de variaciones de nucleótidos, la presente invención se puede realizar con el método de sujeción por PCR. El método de sujeción por PCR representativa usando PNA se desvela en Henrik et al., *Nucleic Acid Research* 21: 5332-5336 (1993) y Luo et al., *Nucleic Acid Research* Vol. 34, N.º 2 e12 (2006). Por ejemplo, la técnica de sujeción por PCR usando PNA permite amplificar una secuencia de ácido nucleico que tiene una variación de nucleótidos de tipo mutante pero no permite amplificar una secuencia de ácido nucleico que tiene una variación de nucleótidos de tipo silvestre, que va seguida del ensayo PTOCE, lo que permite una detección más eficaz de variaciones de nucleótidos. En particular, puesto que la técnica de sujeción por PCR permite amplificar solamente una secuencia de ácido nucleico que tiene una variación de nucleótidos de tipo específico, su combinación con el presente método permitiría la detección de la variante minoritaria de una manera más eficiente.

Cuando una sonda que tiene en su segmento terminal 5' un segmento de discriminación de variación de nucleótidos, se hibrida con un molde desapareado, su segmento terminal 5' puede formar una cadena simple bajo ciertas condiciones. La sonda puede corresponder a un PTO. La señal puede generarse mediante el ensayo PTO de la presente invención. Este enfoque puede ser útil en la detección de una secuencia de ácido nucleico diana que tiene una variación de nucleótidos no complementaria al sitio de discriminación de variación de nucleótidos de las sondas.

De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana utilizada en la presente divulgación es una secuencia de ácido nucleico preamplificada. La utilización de la secuencia de ácido nucleico preamplificada permite aumentar significativamente la sensibilidad y especificidad de la detección de dianas de la presente divulgación.

De acuerdo con una realización preferida, el método se realiza en presencia de un cebador en dirección 3'.

Las ventajas de la presente divulgación pueden resaltarse en la detección simultánea (múltiple) de al menos dos secuencias de ácido nucleico diana.

De acuerdo con una realización preferida, el método se realiza para detectar al menos dos tipos (más preferentemente, al menos tres tipos, aún más preferentemente al menos cinco tipos) de secuencias de ácidos nucleicos diana.

De acuerdo con una realización preferida, el método tiene por finalidad detectar como mínimo dos tipos (más preferentemente, como mínimo tres tipos y aún más preferentemente como mínimo cinco tipos) de secuencias de ácidos nucleicos diana. De acuerdo con una realización preferida, el método tiene por finalidad detectar como mínimo dos tipos (más preferentemente, como mínimo tres tipos y aún más preferentemente como mínimo cinco tipos) de secuencias de ácidos nucleicos diana; en el mismo el oligonucleótido en dirección 5' comprende como mínimo dos tipos (más preferentemente como mínimo tres tipos y aún más preferentemente como mínimo cinco tipos) de oligonucleótidos, el PTO comprende como mínimo dos tipos (más preferentemente como mínimo tres tipos y aún más preferentemente como mínimo cinco tipos) de los PTO y el CTO comprende como mínimo un tipo (preferentemente como mínimo dos tipos, más preferentemente como mínimo tres tipos y aún más preferentemente como mínimo cinco tipos) del CTO; cuando como mínimo concurren dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana, el método proporciona como mínimo dos tipos de señales diana que corresponden como mínimo a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana.

Los segmentos de marcaje en 5’ de al menos dos PTO pueden tener secuencias idénticas entre sí. Por ejemplo, si la presente invención se realiza para cribar secuencias de ácidos nucleicos diana, los segmentos de marcaje en 5’ de los PTO pueden tener secuencias idénticas.

Además, se puede usar un solo tipo de CTO para detectar una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos diana. Por ejemplo, si se emplean PTO con segmentos de marcaje en 5’ de idéntica secuencia para el cribado de secuencias de ácidos nucleicos diana, se puede usar un solo tipo de CTO.

De acuerdo con una realización preferida, los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos corresponden como mínimo a dos tipos de las secuencias de ácidos nucleicos diana que tienen distintos valores de T_m.

De acuerdo con una realización preferida, los como mínimo dos tipos de señales diana correspondientes al menos a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana proceden de distintos tipos de marcadores.

De acuerdo con una realización preferida, los como mínimo dos tipos de señales diana correspondientes al menos a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana proceden del mismo tipo de marcadores.

De acuerdo con una realización preferida, los como mínimo dos tipos de señales diana correspondientes al menos a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana proceden del mismo tipo de marcadores; los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos correspondientes al menos a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana tienen valores de T_m distintos.

El término «distintos tipos de marcadores» como se utiliza en el presente documento se refiere a marcadores cuyas señales detectables tienen características diferentes. Por ejemplo, los marcadores indicadores fluorescentes FAM y TAMRA se consideran tipos distintos de marcadores porque sus longitudes de onda de excitación y de emisión difieren.

Si la presente divulgación se realiza para detectar simultáneamente al menos dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana mediante el análisis de la curva de fusión y los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos correspondientes como mínimo a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana tienen valores de T_m distintos, es posible detectar como mínimo dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana, aunque se utilice un solo tipo de marcador (por ejemplo, FAM).

Detección de la diana usando CTO inmovilizado en una fase sólida

La ventaja sobresaliente de la presente divulgación es que es eficaz para la detección de secuencias de ácidos nucleicos diana incluso sobre una fase sólida como una micromatriz.

De acuerdo con una realización preferida, la presente divulgación se realiza sobre una fase sólida y el CTO permanece inmovilizado en un sustrato sólido por su extremo 5’ o por su extremo 3’. En la fase sólida se mide la señal diana proporcionada sobre el sustrato sólido.

Si se emplea un CTO inmovilizado, el análisis de la fusión con sistemas de marcaje como los antes descritos es aplicable a la reacción en fase sólida de la presente invención.

De acuerdo con una realización preferida, la señal diana la proporciona un solo marcador unido al fragmento o por medio de un solo marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión. En particular, en el caso de que la presente invención en fase sólida se realice con un marcador sencillo, se puede utilizar un marcador fluorescente general y no se precisa un marcador fluorescente específico capaz de proporcionar una señal fluorescente con intensidades diferentes dependiendo de su presencia en una cadena doble o en una cadena sencilla.

Cuando se emplea el CTO inmovilizado en un sustrato sólido se pueden usar marcadores químicos (por ejemplo, biotina) o enzimáticos (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa, β-galactosidasa y β-glucosidasa).

Para la reacción en fase sólida, el CTO se inmoviliza directa o indirectamente (preferentemente de forma indirecta) por su extremo 5’ o por su extremo 3’ (preferentemente este último) sobre la superficie del sustrato sólido. Además, el CTO puede quedar inmovilizado en la superficie del sustrato sólido de forma covalente o no covalente. Si los CTO inmovilizados quedan inmovilizados indirectamente en la superficie del sustrato sólido, se usan conectores adecuados. Los conectores útiles en la presente invención pueden incluir cualquier conector utilizado para la inmovilización de sondas en la superficie de sustratos sólidos. Por ejemplo, los compuestos alquilo o arilo con un grupo funcional amino, o los compuestos alquilo o arilo con un grupo funcional tiol sirven como conectores para la inmovilización del CTO. También las colas de poli-T o de poli-A pueden servir como conectores.

De acuerdo con una realización preferida, el sustrato sólido usado en la presente invención es una micromatriz. La micromatriz destinada a proporcionar el entorno de reacción para la presente invención puede incluir cualquiera de

las conocidas por las personas versadas en la técnica. Todos los procesos de la presente invención, es decir, la hibridación con las secuencias de ácidos nucleicos diana, la escisión, la extensión, la fusión y la detección de la fluorescencia, se realizan en la micromatriz. Los CTO inmovilizados en la micromatriz actúan como elementos de la matriz hibridables. Los sustratos sólidos aptos para fabricar micromatrices incluyen, entre otros, metales (por ejemplo, oro, aleación de oro y cobre, aluminio), óxido metálico, vidrio, cerámica, cuarzo, silicio, semiconductor, obleas de Si/SiO_2, germanio, arseniuro de galio, carbono, nanotubos de carbono, polímeros (por ejemplo, poliestireno, polietileno, polipropileno y poliacrilamida), sefarosa, agarosa y coloides. Una pluralidad de CTO inmovilizados en la presente invención puede quedar inmovilizada en una región accesible o en dos o más regiones accesibles de un sustrato sólido que puede comprender de 2 a 1.000.000 de regiones accesibles. Los CTO inmovilizados pueden ser fabricados para producir una matriz o matrices para una aplicación dada con técnicas de fabricación convencionales como fotolitografía, chorro de tinta, *microspotting* mecánico o derivadas de las mismas.

La presente divulgación realizada en fase sólida puede detectar simultáneamente una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos diana, aunque se utilice un solo tipo de marcador, porque los marcadores incorporados a los CTO inmovilizados están físicamente separados. A este respecto, el número de secuencias de ácidos nucleicos diana que pueden ser detectadas por la presente invención en la fase sólida no son limitadas.

En la presente divulgación, un fragmento del PTO se produce por escisión de la PTO hibridado con el ácido nucleico diana y se hibrida con y se extiende en el CTO, dando como resultado la formación de una cadena extendida.

También es posible proporcionar fragmentos adicionales extensibles en el CTO para potenciar el número de las cadenas extendidas por una reacción adicional de escisión nucleasa 5' usando un PTO adicional que comprende (i) un segmento localizador en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la cadena extendida y (ii) un segmento de marcaje en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la cadena extendida pero complementaria al segmento de captura del CTO. Es preferible utilizar un oligonucleótido en dirección 5’ adicional que comprenda una secuencia de nucleótidos hibridadora complementaria a la cadena extendida y que esté situado en dirección 5’ del PTO adicional para la reacción de escisión de nucleasa 5'.

La realización preferible anterior tiene la característica de que la formación de los fragmentos adicionales depende de la formación de una cadena extendida.

Como alternativa, los fragmentos adicionales se pueden proporcionar mediante el uso de un PTO adicional que comprende (i) un segmento localizador en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria al segmento molde de CTO y (ii) un segmento de marcaje en 5’ que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria al segmento molde de CTO pero complementaria al segmento de captura del CTO.

De acuerdo con una realización preferida, se forman ácidos nucleicos bicatenarios extendidos adicionales mediante la producción adicional de las cadenas extendidas, contribuyendo a la amplificación de la señal diana sobre el sustrato sólido.

II. Realización preferida con amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos diana

Preferentemente, la presente divulgación se realiza simultáneamente con la amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos diana usando una pareja de cebadores compuesta por un cebador situado en dirección 5’ y otro cebador situado en dirección 3’ capaces de sintetizar la secuencia de ácidos nucleicos diana.

En otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos diana en un ADN o en una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO), que comprende:

(a) hibridación de las secuencias de ácidos nucleicos diana con una pareja de cebadores que comprende un cebador situado en dirección 5’ y otro cebador situado en dirección 3’ y un PTO (Oligonucleótido de sondaje y marcaje); en la que tanto el cebador situado en dirección 5’ como el cebador situado en dirección 3’ comprenden una secuencia nucleotídica complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana y se hibridan con ella; el PTO comprende (i) un segmento localizador en 3’ que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana con la cual se hibrida; y (ii) un segmento de marcaje en 5’ que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana; dicho segmento localizador en 3’ se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana y el segmento de marcaje en 5’ no se hibrida con dicha secuencia diana; el PTO está localizado entre el cebador situado en dirección 5’ y el cebador situado en dirección 3’; dicho PTO está bloqueado en su extremo 3’ para impedir su extensión:
(b) puesta en contacto del producto resultante de la etapa (a) con una polimerasa de ácidos nucleicos dependiente de molde que tiene actividad nucleasa 5’ en las condiciones adecuadas para la extensión de los cebadores y para la escisión del PTO; cuando el PTO se hibrida con las secuencias de ácidos nucleicos diana, el cebador situado en dirección 5’ se extiende y la cadena extendida induce la escisión del PTO por la polimerasa de ácidos nucleicos dependiente de molde que tiene actividad nucleasa 5’ de modo que la escisión libera un

fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' o una parte de dicho segmento del PTO;
(c) hibridación del fragmento liberado del PTO con el CTO (Oligonucleótido de captura y molde); el CTO comprende en dirección de 3' a 5': (i) un segmento de captura que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con el segmento de marcaje en 5' o una parte de este segmento del PTO; y (ii) un segmento molde que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con el segmento de marcaje en 5' y el segmento localizador en 3'; en que el fragmento liberado del PTO se hibrida con los segmentos de captura del CTO;
(d) realización de una reacción de extensión con el resultado de la etapa (c) y la polimerasa de ácidos nucleicos dependiente de molde; en la cual el fragmento hibridado con el segmento de captura del CTO se extiende y forma un ácido nucleico bicatenario extendido; este ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de T_m que puede ajustarse con (i) la secuencia y/o la longitud del fragmento, (ii) la secuencia y/o la longitud del CTO, o (iii) la secuencia y/o la longitud del fragmento y la secuencia y/o la longitud del CTO;
(e) fusión del ácido nucleico bicatenario extendido a lo largo de un intervalo de temperaturas para proporcionar una señal diana indicadora de la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido; en la cual la señal diana es provista por (i) al menos un marcador unido al fragmento y/o al CTO, (ii) un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, (iii) un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión y un marcador unido al fragmento y/o al CTO, o (IV) un marcador intercalante; y
(f) detección del ácido nucleico bicatenario extendido mediante la medición de la señal diana; en la cual la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

Como la realización preferible de la presente invención sigue las etapas del presente método antes descritas, las descripciones comunes de ambas se han omitido para evitar la redundancia innecesaria que complicaría la presente solicitud.

De acuerdo con una realización preferida, el método además comprende la repetición de las etapas (a)-(b), (a)-(d) o (a)-(f) con desnaturalización entre los ciclos repetidos. La repetición de la reacción se acompaña de la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Preferentemente, la amplificación se realiza de acuerdo con la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que se desvela en las patentes de EE.UU. N.º 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159.

De acuerdo con una realización preferida, el método se realiza para detectar como mínimo dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana.

De acuerdo con una realización preferida, los como mínimo dos tipos de señales diana correspondientes al menos a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana proceden del mismo tipo de marcadores; los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos correspondientes al menos a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana tienen valores de T_m distintos.

III. Proceso de detección de la diana mediante PTOCE que comprende la detección a una temperatura prefijada

La presente divulgación se refiere específicamente a una modificada para utilizar una señal diana generada en asociación con la formación del ácido nucleico bicatenario extendido.

En otro aspecto más de la presente divulgación, se proporciona un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos diana en un ADN o en una mezcla de ácidos nucleicos mediante un ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO), que comprende:

(a) hibridación de la secuencia de ácidos nucleicos diana con un oligonucleótido en dirección 5' y un PTO (Oligonucleótido de sondaje y marcaje); en la que dicho oligonucleótido en dirección 5' comprende una secuencia de nucleótidos complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana con la cual se hibrida; el PTO comprende (i) un segmento localizador en 3' que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana con la cual se hibrida; y (ii) un segmento de marcaje en 5' que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con la secuencia de ácidos nucleicos diana; dicho segmento localizador en 3' se hibrida con la secuencia de ácidos nucleicos diana y el segmento de marcaje en 5' no se hibrida con dicha secuencia diana; el oligonucleótido en dirección 5' está situado en dirección 5' del PTO;
(b) puesta en contacto del producto resultante de la etapa (a) con una enzima que tiene actividad nucleasa 5' en condiciones para la escisión del PTO; en la cual el oligonucleótido en dirección 5' o su cadena extendida induce la escisión del PTO por la enzima con actividad nucleasa 5' de modo que la escisión libera un fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' o una parte de este segmento del PTO;
(c) hibridación del fragmento liberado del PTO con un CTO (Oligonucleótido de captura y molde); en el que el CTO comprende en dirección de 3' a 5' (i) un segmento de captura que comprende una secuencia nucleotídica complementaria con el segmento de marcaje en 5' o una parte de este segmento del PTO y (ii) un segmento molde que comprende una secuencia nucleotídica no complementaria con el segmento de marcaje en 5' y el segmento localizador en 3'; de forma que el fragmento liberado del PTO se hibrida con el segmento de captura

del CTO;
(d) reacción de extensión con el resultado de la etapa (c) y una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde; en la cual el fragmento hibridado con el segmento de captura del CTO se extiende hasta formar un ácido nucleico bicatenario extendido; el valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido puede ajustarse con (i) la secuencia y/o la longitud del fragmento, (ii) la secuencia y/o la longitud del CTO, o (iii) la secuencia y/o la longitud del fragmento y la secuencia y/o la longitud del CTO; de forma que el ácido nucleico bicatenario extendido proporciona una señal diana mediante (i) al menos un marcador unido al fragmento y/o al CTO;(ii) un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacciónde extensión; (iii) al menos un marcador unido al fragmento y/o al CTO y un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reciente extensión; o (IV) un marcador intercalante; y
(e) detección del ácido nucleico bicatenario extendido mediante la medición de la señal diana a una temperatura prefijada en la que el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene su forma bicatenaria; la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

Como la realización preferida de la presente divulgación sigue las etapas del presente método antes descritas, excepto la de la etapa de fusión, las descripciones comunes de ambas se han omitido para evitar la redundancia innecesaria que complicaría la presente solicitud.

La presente divulgación usando el análisis de la fusión descrito antes requiere la detección de señales emitidas por marcadores como mínimo a dos temperaturas distintas porque la señal diana la da la medición del cambio de la señal proporcionada por la fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

Es improbable que en este aspecto de la presente divulgación el ácido nucleico bicatenario extendido produzca por sí mismo una señal capaz de discriminar la formación de la no formación del mismo y la señal se detecta a una temperatura prefijada en la que el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene su forma bicatenaria, que permite determinar la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

La presente divulgación consiste en medir la señal diana junto con la formación del ácido nucleico bicatenario extendido, para la detección de la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

En la presente divulgación, el ácido nucleico bicatenario extendido tiene un marcador de modo que el ácido nucleico bicatenario extendido proporciona una señal diana.

Preferentemente, la señal diana incluye una señal (generación o extinción de la señal) emitida por el marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido a una temperatura prefijada.

El marcaje en la presente invención puede ejecutarse del mismo modo que el aplicado para el método con análisis de la fusión antes descrito. Las Figs. 2-13 pueden ilustrar este aspecto de la presente divulgación con una pequeña modificación relativa a la detección a una temperatura prefijada.

El principio de funcionamiento de la señal diana emitida por el ácido nucleico bicatenario extendido es el siguiente:

(i) la extensión del fragmento induce un cambio de la señal emitida por el marcador que proporciona la señal diana; o
(ii) la hibridación del fragmento y el CTO induce un cambio de la señal emitida por el marcador que proporciona la señal diana y el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana.

La realización ejemplificada del principio de funcionamiento (i) puede describirse con referencia a la Fig. 9. Si se utilizan CTO inmovilizados, la presente divulgación detecta una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos diana de un modo mucho más eficaz. El segmento molde del CTO inmovilizado contiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora. La molécula indicadora y la molécula amortiguadora están conformacionalmente adyacentes y ello permite que la segunda amortigüe la señal de la primera. Cuando el fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO, la molécula amortiguadora atenúa la señal emitida por la molécula indicadora. Con la formación del ácido nucleico bicatenario extendido, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora quedan por conformación separadas lo que impide que ésta última amortigüe la señal de la primera. La señal diana se produce en la etapa de extensión (C y D de la Fig. 9).

En la Fig. 9, el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO no forma un ácido nucleico bicatenario extendido. Por tanto, la molécula amortiguadora sigue atenuando la señal emitida por la molécula indicadora. El híbrido no proporciona una señal que no sea la diana.

La realización ejemplificada sobre el principio de funcionamiento (ii) puede describirse con referencia a la Fig. 6. La figura ilustra el presente aspecto, así como el método que utiliza el análisis de la fusión. El segmento de marcaje en 5' del PTO contiene una molécula indicadora y una molécula amortiguadora. La molécula indicadora y la molécula amortiguadora están conformacionalmente adyacentes y ello permite que la segunda amortigüe la señal de la primera. El PTO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana es digerido y se desprende el fragmento que

comprende el segmento de marcaje en 5' con la molécula indicadora y la molécula amortiguadora y este fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO. Mediante la hibridación, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora quedan por conformación separadas lo que impide que ésta última amortigüe la señal de la primera. La señal diana se produce en la etapa de la hibridación del fragmento y el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana (C y D en la Fig. 6).

En la Fig. 6, el híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO proporciona una señal que no es la diana (C y D en la Fig. 6) y para eliminar la señal no diana es necesario que el híbrido se disocie. Por tanto, la temperatura para medir la señal diana está determinada por la disociación del híbrido. De acuerdo con una realización preferida, la temperatura además se determina teniendo en cuenta el valor de T_m del híbrido.

De acuerdo con una realización preferida, el ácido nucleico bicatenario extendido puede ser detectado a temperaturas en las que el híbrido queda parcialmente disociado.

La temperatura prefijada es superior a la del valor de T_m del híbrido menos 10 ºC, preferentemente superior a la del valor de T_m del híbrido menos 5 ºC, más preferentemente superior a la del valor de T_m del híbrido y más preferentemente aún superior a la del valor de T_m del híbrido más 5 ºC.

De acuerdo con una realización preferida, la señal diana proporcionada por el ácido nucleico bicatenario extendido se da durante la extensión de la etapa (d); en ella el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO no proporciona una señal que no sea la diana, como se representa en las figuras 2-4 y 9-11.

De acuerdo con una realización, la señal diana proporcionada por el ácido nucleico bicatenario extendido se proporciona por la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) y la formación del ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diaria en la etapa (d); en la que un híbrido entre un PTO escindido y el CTO proporciona una señal no diana; en la que la temperatura prefijada es suficiente para disociar el híbrido para retirar la señal no diana.

De acuerdo con una realización preferida, la señal diana proporcionada por el ácido nucleico bicatenario extendido es dada por la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) y la formación del ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana en la etapa (d); en la misma el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO no proporciona una señal que no sea la diana; la temperatura prefijada es superior a la del valor de T_m del híbrido, como se representa en las figuras 5-8 y 12-13.

Cuando el híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO proporciona una señal que no es la diana (Panel D en la Fig. 6), eliminar esa señal no diana exige disociar el híbrido. Por tanto, la temperatura para medir la señal diana está determinada por la disociación del híbrido.

Los sistemas de marcaje útiles en la presente divulgación se describirán como se indica a continuación:

(i) Marcador unido al fragmento y/o al CTO

(I-1) Marcador interactivo doble

En una realización de un sistema de marcaje interactivo doble, el CTO incorpora un marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora y una molécula amortiguadora; la extensión del fragmento en la etapa (d) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble que proporciona la señal diana. La primera realización del sistema de marcaje interactivo doble se ilustra en la Fig. 2. La señal diana es dada por la generación de la señal sincronizada con la extensión.

De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora pueden estar situadas en el segmento molde del CTO.

De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora o la molécula amortiguadora del CTO está localizada en su extremo 5' o a entre 1 y 5 nucleótidos de distancia del extremo 5', mientras que la otra está situada de modo que amortigua y desamortigua la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del CTO.

En una realización de un sistema de marcaje interactivo doble, el CTO incorpora un marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora y una molécula amortiguadora; la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble que proporciona la señal diana y el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana.

De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora y la molécula amortiguadora pueden estar situadas en el segmento de captura del CTO.
De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora o la molécula amortiguadora del CTO está

localizada en su extremo 3' o a entre 1 y 5 nucleótidos de distancia del extremo 3' mientras que la otra está situada de modo que amortigua y desamortigua la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del CTO.

En esta realización, el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO proporciona una señal que no es la diana; la temperatura para medir la señal diana se determina teniendo en cuenta el valor de T_m del híbrido.

En una realización de un sistema de marcaje interactivo doble, el fragmento incorpora un marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora y una molécula amortiguadora; la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble que proporciona la señal diana y el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana. La primera realización del sistema de marcaje interactivo doble se ilustra en la Fig. 6.

De acuerdo con la realización preferida, una de la molécula indicadora y la molécula amortiguadora del fragmento está localizada en su extremo 5' o a entre 1 y 5 nucleótidos de distancia del extremo 5', mientras que la otra está situada de modo que amortigua y desamortigua la señal de la molécula indicadora dependiendo de la conformación del fragmento.

En esta realización, el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO proporciona una señal que no es la diana; la temperatura para medir la señal diana se determina teniendo en cuenta el valor de T_m del híbrido.

En una realización del sistema de marcaje interactivo doble, el fragmento incorpora una parte del marcador interactivo doble que comprende una molécula indicadora y una molécula amortiguadora y el CTO tiene la otra parte del marcador interactivo doble; la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble que proporciona la señal diana y el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana. La realización del sistema de marcaje interactivo doble se ilustra en la Fig. 8.

La molécula indicadora y la molécula amortiguadora pueden estar situadas en cualquier punto del fragmento del PTO y del CTO, siempre que la señal de la molécula indicadora sea atenuada por la molécula amortiguadora.

De acuerdo con la realización, la molécula indicadora o la molécula amortiguadora situadas en el fragmento PTO está localizada, preferentemente, en su extremo 5'.

De acuerdo con la realización, la molécula indicadora o la molécula amortiguadora situada en el CTO está localizada, preferentemente, en su extremo 5'.

En esta realización, el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO proporciona una señal que no es la diana; la temperatura para medir la señal diana se determina teniendo en cuenta el valor de T_m del híbrido.

(I-2) Marcador sencillo

En una realización de un sistema de marcador sencillo, el CTO tiene un marcador sencillo y la extensión del fragmento en la etapa (d) induce un cambio de la señal emitida por el marcador sencillo para proporcionar la señal diana. La realización del sistema de marcaje sencillo se ilustra en la Fig. 3. La señal diana es dada por la generación de la señal sincronizada con la extensión.

De acuerdo con la realización, el segmento molde del CTO está marcado con el marcador sencillo.

En una realización de un sistema de marcaje sencillo, el CTO incorpora un marcador sencillo y la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble que proporciona la señal diana y el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana.

De acuerdo con la realización, el segmento de captura del CTO está marcado con el marcador sencillo.

En esta realización, el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO proporciona una señal que no es la diana; la temperatura para medir la señal diana se determina teniendo en cuenta el valor de T_m del híbrido.

En una realización de un sistema de marcaje sencillo, el fragmento incorpora un marcador sencillo y la hibridación del fragmento y el CTO en la etapa (c) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble para proporcionar la señal diana y el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene la señal diana. La realización del sistema de marcaje sencillo se ilustra en la Fig. 12.

En esta realización, el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO proporciona una señal que no es la diana; la temperatura para medir la señal diana se determina teniendo en cuenta el valor de T_m del híbrido.

El marcador sencillo usado aquí tiene que ser capaz de proporcionar una señal distinta dependiendo de si hay

presente una cadena doble o una cadena sencilla. El marcador sencillo puede ser un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador quimioluminiscente, un marcador electroquímico o un marcador metálico. Preferentemente, el marcador sencillo consiste en un marcador fluorescente. Los tipos y los puntos de unión preferibles para los marcadores fluorescentes sencillos usados en la presente invención se desvelan en las patentes de EE.UU. N.º 7.537.886 y 7.348.141, las enseñanzas de las cuales se incorporan en su integridad a la presente memoria como referencia. Preferentemente, el marcador fluorescente sencillo incluye JOE, FAM, TAMRA, ROX y un marcador a base de fluoresceína. Es preferible que el residuo nucleotídico marcado esté situado como residuo interno en el seno del oligonucleótido, en lugar de en los extremos 5'o 3'.

El marcador fluorescente sencillo que es útil para la presente invención puede ser descrito en referencia a las descripciones de las moléculas indicadora y amortiguadora como se ha indicado antes.

En particular, en el caso de que la presente invención en fase sólida se realice con un marcador sencillo, se puede utilizar un marcador fluorescente general y no se precisa un marcador fluorescente específico capaz de proporcionar una señal fluorescente con diferentes intensidades dependiendo de su presencia en una cadena doble o en una cadena sencilla.

Si se emplea el CTO inmovilizado en un sustrato sólido se pueden usar marcadores químicos (por ejemplo, biotina) o enzimáticos (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa, β-galactosidasa y β-glucosidasa).

En una realización preferida, los marcadores unidos al fragmento y/o al CTO están situados en cualquier punto siempre que el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO no emita ninguna señal que no sea la diana en la etapa (d), como aparece representado en las Figs. 2-3 y 9.

Como alternativa, los marcadores pueden estar situados en cualquier punto siempre que el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO emita una señal que no sea la diana en la etapa (d); en ese caso el valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido es superior a la del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO, como aparece representado en las Figs. 6-8 y 12.

(ii) Marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido

En particular, si la presente invención se realiza en una fase sólida con un CTO inmovilizado, este sistema de marcaje resulta más útil para proporcionar la señal diana como se ilustra en las Figs. 10 y 11.

De acuerdo con una realización preferida, la señal diana es proporcionada por un marcador sencillo incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión; el marcador sencillo incorporado está unido a un nucleótido que se incorpora durante la reacción de extensión; la extensión del fragmento en la etapa (d) provoca un cambio de la señal emitida por el marcador sencillo para proporcionar lugar a la señal diana en la etapa (d).

De acuerdo con una realización preferida, el nucleótido incorporado durante la reacción de extensión es ddNTP.

De acuerdo con una realización preferida, el nucleótido incorporado durante la reacción de extensión tiene una primera base no natural y el CTO tiene un nucleótido que tiene de una segunda base no natural con una afinidad de unión específica hacia la primera base no natural, como ilustra la Fig. 11. El nucleótido que tiene la segunda base no natural está localizado preferentemente en cualquier punto del segmento molde del CTO.

Si se emplea el marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, el marcador no se incorporará al híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO porque dicho híbrido no se extiende. Por tanto, el híbrido no proporciona una señal que no sea la diana.

(iii) Marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido y marcador unido al fragmento o al CTO

La presente divulgación puede emplear un sistema de marcaje basado en la cooperación de un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión con otro marcador unido al fragmento y/o al CTO, como ilustran las figuras 4 y 5.

De acuerdo con una realización preferida, la señal diana está provista por un marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión y un marcador unido al fragmento y/o al CTO; el marcador incorporado está unido a un nucleótido que se incorpora durante la reacción de extensión; los dos marcadores constituyen un sistema de marcaje interactivo doble formado por una molécula indicadora y una molécula amortiguadora; la extensión del fragmento en la etapa (d) induce un cambio de la señal del marcador interactivo doble que proporciona la señal diana.

Más preferentemente, el nucleótido incorporado durante la reacción de extensión tiene una primera base no natural y el CTO tiene un nucleótido que tiene una segunda base no natural con una afinidad de unión específica hacia la primera base no natural.

Preferentemente, la señal diana dada en la etapa (e) es una señal emitida por el marcador interactivo doble en la etapa (d).

Si se emplea el marcador incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, el marcador no se incorporará al híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO porque dicho híbrido no se extiende. Por tanto, el híbrido no proporciona una señal que no sea la diana.

(IV) Marcador intercalante

La presente divulgación puede emplear un marcador intercalante para proporcionar la señal diana indicadora de la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido. El marcador intercalante es más útil en una reacción en fase sólida con CTO inmovilizados porque las moléculas de ácido nucleico bicatenarias presentes en las muestras pueden generar señales.

La realización ejemplificada se describe con referencia a la Fig. 13. El PTO hibridado con la secuencia de ácidos nucleicos diana es digerido para liberar el fragmento. El fragmento se hibrida con el CTO. La extensión se realiza en presencia de un colorante intercalante (por ejemplo, SYBR™ Green) y forma el ácido nucleico bicatenario extendido con colorantes intercalados.

En la Fig. 13, el híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO proporciona una señal que no es la diana (C y D en la Fig. 13) y para eliminar la señal no diana es necesario que el híbrido se disocie. Por tanto, la temperatura para medir la señal diana se determina teniendo en cuenta el valor de T_m del híbrido.

Preferentemente, la señal diana dada en la etapa (e) es una señal emitida por el colorante intercalado.

De acuerdo con una realización preferida, el PTO y/o el CTO están bloqueados en su extremo 3' para impedir su extensión.

De acuerdo con una realización preferida, el oligonucleótido en dirección 5' es un cebador o una sonda situados en dirección 5'.

De acuerdo con una realización preferida, el oligonucleótido en dirección 5' puede estar situado junto al PTO en la medida en que el oligonucleótido en dirección 5' induzca la escisión del PTO por la enzima que tiene actividad nucleasa 5'.

De acuerdo con una realización preferida, el cebador situado en dirección 5' induce a través de su cadena extendida la escisión del PTO por la enzima que tiene actividad nucleasa 5'.

De acuerdo con una realización preferida, el método además comprende la repetición de las etapas (a)-(b), (a)-(d) o (a)-(e) con desnaturalización entre los ciclos repetidos.

De acuerdo con una realización preferida, las etapas (a)-(b) y (c)-(e) se realizan en un recipiente de reacción o en recipientes de reacción separados.

De acuerdo con una realización preferida, el método se realiza para detectar como mínimo dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana; en la que el oligonucleótido en dirección 5' comprende al menos dos tipos de oligonucleótidos, el PTO comprende al menos dos tipos de PTO y el CTO comprende al menos un tipo de CTO: cuando como mínimo están presentes dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana, el método proporciona al menos dos tipos de señales diana correspondientes como mínimo a dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana.

De acuerdo con una realización preferida, el oligonucleótido en dirección 5' es un cebador situado en dirección 5' y la etapa (b) usa una polimerasa de ácidos nucleicos dependiente de molde para la extensión del cebador situado en dirección 5'.

De acuerdo con una realización preferida, el CTO permanece inmovilizado por su extremo 5' o 3' en un sustrato sólido y se mide la señal diana proporcionada sobre el sustrato sólido.

De acuerdo con una realización preferida, la señal diana es provista por un marcador sencillo unido al fragmento o por un marcador sencillo incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión.

De acuerdo con una realización preferida, el método se realiza en presencia de un cebador situado en dirección 3'.

La detección de la etapa (e) se puede realizar en tiempo real, en punto final, o con un intervalo de tiempo prefijado. En los casos en que la presente invención además comprende la repetición de las etapas (a)-(b), (a)-(d) o (a)-(e), es preferible que la detección de la señal se realice en cada ciclo de la repetición a una temperatura prefijada (en tiempo real), al final de la repetición a una temperatura prefijada (punto final) o a cada uno de los intervalos de tiempo prefijados durante la repetición a una temperatura prefijada. Es preferible que la detección se realice en cada ciclo de la repetición en tiempo real a fin de mejorar la exactitud y la cuantificación de la detección.

IV. Proceso de detección de diana mediante ensayo PTOCE basado en la actividad nucleasa 5' independiente de oligonucléotido en dirección 5'.

En un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona un método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana a partir de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos mediante el ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO), que comprende:

(a) hibridación de la secuencia de ácido nucleico diana con un PTO (oligonucleótido de sondaje y marcaje); en la que el PTO comprende (i) un segmento localizador en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) un segmento de marcaje en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; en el que el segmento localizador en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y el segmento de marcaje en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana;
(b) puesta en contacto del producto resultante de la etapa (a) con una enzima que tiene una actividad nucleasa 5' en condiciones para la escisión del PTO; en la que el PTO se escinde por la enzima que tiene la actividad nucleasa 5' de modo que la escisión libera un fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' o una parte del segmento de marcaje en 5' del PTO;
(c) hibridación del fragmento liberado del PTO con un CTO (Oligonucleótido de Captura y Molde); en la que el CTO comprende en una dirección de 3' a 5' (i) un segmento de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria al segmento de marcaje en 5' o una parte del segmento de marcaje en 5' del PTO y (ii) un segmento molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria al segmento de marcaje en 5' y la segmento localizador en 3' del PTO; en el que el fragmento liberado del PTO se hibrida con el segmento de captura del CTO;
(d) realización de una reacción de extensión usando el producto resultante de la etapa (c) y una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde; en la que el fragmento hibridado con el segmento de captura del CTO se extiende y se forma un ácido nucleico bicatenario extendido; en el que el ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor T_m ajustable por (i) una secuencia y/o longitud del fragmento, (ii) una secuencia y/o longitud del CTO o (iii) la secuencia y/o longitud del fragmento y la secuencia y/o longitud del CTO;
(e) fusión del ácido nucleico bicatenario extendido sobre un intervalo de temperaturas para proporcionar una señal diana indicativa de la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido; en el que la señal diana es proporcionada por (i) al menos un marcador ligado al fragmento y/o el CTO, (ii) un marcador incorporado en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, (iii) un marcador incorporado en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión y un marcador ligado al fragmento y/o el CTO, o (iv) un marcador intercalante; y
(f) detección del ácido nucleico bicatenario extendido mediante la medición de la señal diana; por lo que la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido indica la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

En un aspecto adicional más de la presente divulgación, se proporciona un método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana a partir de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos por un ensayo PTOCE (escisión y extensión de PTO), que comprende:

(a) hibridación de la secuencia de ácido nucleico diana con un PTO (Oligonucleótido de Sondaje y Marcaje); en la que el PTO comprende (i) un segmento localizador en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) un segmento de marcaje en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; en el que el segmento localizador en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y el segmento de marcaje en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana;
(b) puesta en contacto del producto resultante de la etapa (a) con una enzima que tiene una actividad nucleasa 5' en condiciones para la escisión del PTO; en la que el PTO se escinde por la enzima que tiene la actividad nucleasa 5' de modo que la escisión libera un fragmento que comprende el segmento de marcaje en 5' o una parte del segmento de marcaje en 5' del PTO;
(c) hibridación del fragmento liberado del PTO con un CTO (Oligonucleótido de Captura y Molde); en la que el CTO comprende en una dirección de 3' a 5' (i) un segmento de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria al segmento de marcaje en 5' o una parte del segmento de marcaje en 5' del PTO y (ii) un segmento molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria al segmento de marcaje en 5' y el segmento localizador en 3' del PTO; en el que el fragmento liberado del PTO se hibrida con el segmento de captura del CTO;
(d) realización de una reacción de extensión usando el producto resultante de la etapa (c) y una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde; en la que el fragmento hibridado con el segmento de captura del CTO se

extiende para formar un ácido nucleico bicatenario extendido; en el que el ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de T_m ajustable por (i) una secuencia y/o longitud del fragmento, (ii) una secuencia y/o longitud del CTO o (iii) la secuencia y/o longitud del fragmento y la secuencia y/o longitud del CTO; en la que el ácido nucleico bicatenario extendido proporciona una señal diana por (i) al menos un marcador ligado al fragmento y/o CTO, (ii) un marcador incorporado en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, (iii) al menos un marcador unido al fragmento y/o CTO y un marcador incorporado en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión o (iv) marcador intercalante; y

(e) detección del ácido nucleico bicatenario extendido mediante la medición de la señal diana a una temperatura predeterminada en la que el ácido nucleico bicatenario extendido mantiene su forma de cadena doble, por lo que la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido indica la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

Puesto que el presente método basado en la actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en dirección 5' es el mismo que aquellos del ensayo de PTOCE usando oligonucleótidos en dirección 5', excepto porque no se usan oligonucleótidos en dirección 5', las descripciones comunes entre ellos se omiten con el fin de evitar la redundancia indebida que conduce a la complejidad de presente memoria descriptiva.

Curiosamente, el presente método basado en la actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en dirección 5' prácticamente proporciona señales diana mediante el ensayo de PTOCE incluso sin el uso de oligonucleótidos en dirección 5' (véanse las Fig. 35A y 35B).

Para el presente método, pueden usarse enzimas convencionales que tienen actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en dirección 5'. Entre las polimerasas dependientes de molde que tienen actividad nucleasa 5', existen varias enzimas que tienen actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en dirección 5', por ejemplo, ADN polimerasa *Taq*.

Teniendo en cuenta la amplificación de secuencias de ácido nucleico diana y la eficacia de escisión del PTO, el ensayo PTOCE de la presente invención se realiza preferentemente usando oligonucleótidos en dirección 5'.

V. Proceso de detección de variación de nucleótidos mediante un ensayo PTOCE

En la presente invención, se proporciona un método para detectar una variación de nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico diana mediante un ensayo PTOCE (Escisión y Extensión de Oligonucleótido de Sondaje y Marcaje), que comprende:

(a) hibridación de la secuencia de ácido nucleico diana con un cebador en dirección 5' y un PTO-NV (Oligonucleótido de Sondaje y Marcaje para Variación de Nucleótidos); en la que el cebador en dirección 5' comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; el PTO-NV comprende (i) un segmento localizador en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana, (ii) un segmento de marcaje en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (iii) un sitio de discriminación de variación de nucleótidos, que comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótidos en el ácido nucleico diana, posicionado en una parte del extremo 5' del segmento localizador en 3'; en el que el segmento localizador en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y el segmento de marcaje en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana; el cebador en dirección 5' se encuentra en dirección 5' del PTO-NV; la cadena extendida del cebador en dirección 5' induce la escisión del PTO-NV por una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa 5';

(b) puesta en contacto el producto resultante de la etapa (a) con la polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa 5' en condiciones para la escisión del PTO-NV; en la que cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana que tiene la variación de nucleótidos complementaria al sitio de discriminación de variación de nucleótidos y la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' forma una cadena doble con la secuencia de ácido nucleico diana para inducir la escisión de un primer sitio de escisión inicial, un primer fragmento se libera; en la que cuando el PTO-NV se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana que tiene una variación de nucleótidos no complementaria al sitio de discriminación de variación de nucleótidos y la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' no forma una cadena doble con la secuencia de ácido nucleico diana para inducir la escisión de un segundo sitio de escisión inicial situado en dirección 3' del primer sitio de escisión inicial, un segundo fragmento se libera; en la que el segundo fragmento comprende un segmento del extremo 3' adicional permitiendo que el segundo fragmento se diferencie del primera fragmento;

(c) hibridación del fragmento liberado del PTO-NV con un CTO (Oligonucleótido de Captura y Molde); en la que el CTO comprende en una dirección de 3' a 5' (i) un segmento de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria al segmento de marcaje en 5' o una parte del segmento de marcaje en 5' del PTO-NV y (ii) un segmento molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria al segmento de marcaje en 5' y el segmento localizador en 3' del PTO-NV; en el que el primer fragmento o el segundo fragmento liberado del PTO-NV se hibrida con el segmento de captura del CTO;

(d) realización de una reacción de extensión usando el producto resultante de la etapa (c) y una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde; en la que cuando el primer fragmento se hibrida con el segmento de

captura del CTO, que se extiende para formar una cadena extendida que comprende una secuencia extendida complementaria al segmento molde del CTO; en la que cuando el segundo fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO, no se extiende; y
(e) detección de la presencia de la cadena extendida, por lo que la presencia de la cadena extendida indica la presencia de la variación de nucleótidos complementaria al sitio de la discriminación de nucleótidos del PTO-NV.

Los presentes inventores han realizado intensas investigaciones para desarrollar nuevos enfoques para detectar variaciones de nucleótidos, con más precisión y conveniencia mejoradas, entre otras cosas, de una manera múltiple. Como resultado, se han establecido nuevos protocolos para la detección de variaciones de nucleótidos, en los que la detección de variación de nucleótidos se logra mediante la hibridación de sondas, la escisión de sondas enzimáticas, la extensión y la detección de una cadena extendida. En particular, de forma intrigante, el sitio de escisión de la sonda se ha vuelto ajustable dependiendo de la presencia y la ausencia de variaciones de nucleótidos de interés y los fragmentos liberados por escisión en diferentes sitios se distinguen por sus capacidades de extensión en un molde artificial. Los presentes protocolos están bien adaptados a reacciones en fase líquida, así como a reacciones en fase sólida y asegurar la detección de múltiples variaciones de nucleótidos, con más precisión y comodidad mejoradas.

La presente invención emplea eventos sucesivos seguidos de hibridación de sondas; escisión de PTO-NV (oligonucleótido de sondaje y marcaje para variación de nucleótidos) y extensión; formación de una cadena extendida dependiente de variación de nucleótidos; y detección de la cadena extendida. Por tanto, se denomina ensayo VD-PTOCE (Detección de Variación por escisión y extensión de PTO).

De acuerdo con una realización preferida, la variación de nucleótidos detectada por la presente invención es una variación por sustitución, una variación por deleción o una variación por inserción, más preferentemente una variación de un único nucleótido, tal como SNP.

En la presente solicitud, una secuencia de ácido nucleico diana que tiene una variación de nucleótidos complementaria al sitio de discriminación de variación de nucleótidos del PTO-NV también se describe como "molde apareado". Una secuencia de ácido nucleico diana que tiene una variación de nucleótidos no complementaria al sitio de discriminación de variación de nucleótidos del PTO también se describe como "molde desapareado".

De acuerdo con una realización preferida, la expresión "no complementario" junto con una variación de nucleótidos no complementaria al sitio de discriminación de variación de nucleótidos se usa en el presente documento para abarcar la no complementariedad debida a la inserción o deleción.

El ensayo VD-PTOCE de la presente invención usa el PTO-NV que tiene el sitio de discriminación de variación de nucleótidos posicionado en la parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’ para la selectividad del PTO para una variación de nucleótidos específica. Cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana (es decir, molde apareado) que tiene la variación de nucleótidos complementaria al sitio de discriminación de variación de nucleótidos, la parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’ forma una cadena doble con el molde apareado; sin embargo, cuando el PTO-NV se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana (es decir, molde desapareado) que tiene una variación de nucleótidos no complementaria al sitio de discriminación de variación de nucleótidos, la parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’ no formar una cadena doble con el molde desapareado.

Es notable que dichos patrones de hibridación distintos en la variación de nucleótidos de interés son responsables de las diferencias en los sitios de escisión iniciales del PTO-NV, produciendo de este modo dos tipos de fragmentos de PTO-NV para proporcionar la diferenciación de señal dependiendo de la presencia de la variación de nucleótidos de interés.

Un primer fragmento se genera mediante la escisión de híbrido entre el PTO y molde apareado. Un segundo fragmento se genera mediante la escisión de híbrido entre el PTO y molde desapareado. El segundo fragmento comprende más nucleótidos en su segmento del extremo 3’ que el primer fragmento.

La producción de cualquiera de entre el primer fragmento o el segundo fragmento se puede detectar claramente por una reacción de extensión en el CTO.

En general, la hibridación entre una parte del extremo 3’ de los cebadores y un molde es muy importante para la extensión de cebadores en una condición rigurosa. En la presente invención, el primer fragmento y el segundo fragmento se hibridan cada uno con el mismo sitio del CTO. Como se ha descrito anteriormente, el segundo fragmento comprende el segmento del extremo 3’ adicional en comparación con el primer fragmento. Mediante el ajuste de las condiciones de hibridación y una secuencia del CTO opuesto al segmento del extremo 3’ adicional del segundo fragmento, solo se permite que se extienda el primer fragmento.

De acuerdo con una realización preferida, el CTO tiene una secuencia seleccionada de manera que el CTO no se hibride con el segmento del extremo 3’ adicional del segundo fragmento para evitar que el segundo fragmento se

extienda cuando el segundo fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO.

De acuerdo con una realización preferida, la secuencia del CTO opuesta al segmento del extremo 3' adicional del segundo fragmento no es complementaria al segmento del extremo 3' adicional.

La producción de la cadena extendida por extensión del primer fragmento puede detectarse mediante diversos métodos.

De acuerdo con las tecnologías convencionales que usan actividades nucleasa 5' para la detección de variaciones de nucleótidos, la hibridación de sondas utilizada se determina o se ve afectada por toda una secuencia de una sonda. En dichas tecnologías convencionales, el diseño y la construcción de la sonda y la optimización de las condiciones de reacción son muy problemáticas ya que la hibridación de sondas depende de la presencia de variaciones de nucleótidos se ve determinada principalmente por la diferencia en un nucleótido.

De acuerdo con el ensayo VD-PTOCE, un sitio de discriminación de variación de nucleótidos se posiciona en una parte del extremo 5' de un segmento que implica hibridación de sondas, lo que permite la optimización de las condiciones de hibridación para que sean convenientes. Además, el ensayo VD-PTOCE detecta diferencialmente una variación de nucleótidos por un segmento local de sondas en lugar de toda una secuencia de sondas, de manera que la diferencia de incluso un nucleótido tal como SNP se puede detectar con precisión.

Un experto en la materia sabe que una secuencia de sonda adyacente a una secuencia opuesta a un SNP afecta extremadamente a la hibridación de la sonda. Las sondas convencionales tienen una secuencia opuesta a un SNP generalmente en su porción media. A este respecto, las sondas convencionales pueden no seleccionar una secuencia circundante alrededor de un SNP implicado en la hibridación. Las tecnologías convencionales tienen graves limitaciones debido a secuencias circundantes a los SNP.

Por el contrario, en la presente invención, el sitio de discriminación de variación de nucleótidos opuesto a un SNP está posicionado en una parte del extremo 5' de un segmento que implica hibridación de sondas, de manera que una secuencia de sondas a una secuencia adyacente a 5' de SNP se convierte en ajustable. Debido a que las influencias de una secuencia circundante alrededor de un SNP en la hibridación se controlan con precisión en la presente invención, se puede analizar verdaderamente los SNP nada o poco detectables mediante las tecnologías convencionales debido a las influencias de una secuencia circundante alrededor de un SNP.

El ensayo VD-PTOCE de la presente invención se describirá con más detalle como se indica a continuación:

> Puesto que el ensayo VD-PTOCE de la presente invención se basa en la escisión del PTO y la extensión de fragmento PTO en CTO como el ensayo PTOCE descrito anteriormente, las descripciones comunes entre ellos se emiten con el fin de evitar la redundancia excesiva que conduce a la complejidad de presente memoria descriptiva.

Etapa (a): <u>Hibridación de un oligonucleótido en dirección 5' y un PTO-NV con una secuencia de ácido nucleico diana</u>

De acuerdo con la presente invención, una secuencia de ácido nucleico diana se hibrida primero con un oligonucleótido en dirección 5' y un PTO-NV (oligonucleótido de sondaje y marcaje para variación de nucleótidos).

El término usado en el presente documento, "PTO-NV (oligonucleótido de sondaje y marcaje para variación de nucleótidos)" significa un oligonucleótido que comprende (i) un segmento localizador en 3' que sirve como una sonda, (ii) un segmento de marcaje en 5' marcado con una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (iii) un sitio de discriminación de variación de nucleótidos, que comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótidos en el ácido nucleico diana, posicionado en una parte del extremo 5' del segmento localizador en 3'. El segmento de marcaje en 5' se libera nucleolíticamente del PTO después de la hibridación con la secuencia de ácido nucleico diana. El segmento de marcaje en 5' y el segmento localizador en 3' en el PTO tienen que posicionarse en una dirección 5' a 3'. El PTO-NV se ilustra esquemáticamente en la Fig. 25. El PTO-NV puede apreciarse como una forma de aplicación del PTO para la detección de variaciones de nucleótidos, que se construye mediante la introducción del sitio de discriminación de variación de nucleótidos en la parte del extremo 5' del segmento localizado en 3'.

El PTO-NV comprende el sitio de discriminación de variación de nucleótidos que comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótidos colocada en una parte del extremo 5' del segmento localizador en 3'.

Cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana que tiene la variación de nucleótidos complementaria al sitio de discriminación variación, la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' forma una cadena doble con la secuencia de ácido nucleico diana. Cuando el PTO-NV se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana que tiene una variación de nucleótidos no complementaria al sitio de discriminación de variación, la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' no forma una cadena doble con la secuencia de ácido nucleico

diana. Dichos patrones de hibridación distintos sobre la variación de nucleótidos de interés son responsables de las diferencias en los sitios de escisión del PTO-NV, produciendo de este modo dos tipos de fragmentos de PTO-NV para proporcionar la diferenciación de la señal dependiendo de la presencia de la variación de nucleótidos de interés. La parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’ del PTO-NV también describirse como un segmento del extremo 5' de formación de cadena simple del segmento localizado en 3' del PTO-NV cuando se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana que tiene una variación de nucleótidos no complementaria al sitio de discriminación de variación.

El sitio de discriminación de variación de nucleótidos posicionado en una parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’ del PTO-NV comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótidos. Por ejemplo, cuando la variación de nucleótidos que se ha de detectar es un SNP, el sitio de discriminación de variación de nucleótidos comprende un nucleótido complementario del SNP.

De acuerdo con una realización preferida, el sitio de discriminación de variación de nucleótidos se encuentra dentro de 10 nucleótidos, más preferentemente 8 nucleótidos, aún más preferentemente 6 nucleótidos, mucho más preferentemente 4 nucleótidos, 3 nucleótidos, 2 nucleótidos o 1 nucleótido de distancia del extremo 5’ del segmento localizador en 3’ del PTO-NV. Preferentemente, el sitio de discriminación de variación de nucleótidos se encuentra en el extremo 5’ del segmento localizador en 3’ del PTO-NV.

La localización del sitio de discriminación de variación de nucleótidos se puede determinar considerando las secuencias que se han de detectar, el tipo de nucleasas y las condiciones de reacción.

El término "sitio" con referencia a cualquiera de los sitios discriminación de variación de nucleótidos de sondas o sitio de variación de nucleótidos en secuencias diana se usa en el presente documento para abarcar no solo un único nucleótido, sino también una pluralidad de nucleótidos.

Preferentemente, la hibridación en la etapa (a) se realiza en condiciones rigurosas en las que el segmento localizador en 3’ se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y el segmento de marcaje en 5’ no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana.

De acuerdo con una realización preferida, el PTO-NV y/o CTO está bloqueado en su extremo 3’ para evitar su extensión.

El oligonucleótido en dirección 5’ es un cebador en dirección 5’.

De acuerdo con una realización preferida, el oligonucleótido en dirección 5’ se encuentra adyacente al PTO-NV en la medida en que el oligonucleótido en dirección 5’ induce la escisión del PTO-NV por la enzima que tiene la actividad nucleasa 5’.

De acuerdo con una realización preferida, el cebador en dirección 5’ induce a través de su cadena extendida la escisión del PTO-NV por la enzima que tiene la actividad nucleasa 5’.

Etapa (b): <u>Liberación de un fragmento del PTO-NV</u>

Después, el producto resultante de la etapa (a) se pone en contacto con una enzima que tiene una actividad nucleasa 5’ en condiciones para la escisión del PTO-NV. Esta enzima que tiene una actividad nucleasa 5’ es una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa 5'.

Cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana (es decir, molde apareado) que tiene la variación de nucleótidos complementaria al sitio de discriminación de variación y la parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’ forma una cadena doble con la secuencia de ácido nucleico diana para inducir la escisión de un primer sitio de escisión inicial, se libera un primer fragmento (véase la Fig. 25).

Cuando el PTO-NV se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana (es decir, molde desapareado) que tiene una variación de nucleótidos no complementaria al sitio de discriminación de variación y la parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’ no forma una cadena doble con la secuencia de ácido nucleico diana para inducir la escisión de un segundo sitio de escisión inicial situado en dirección 3’ del primer sitio de escisión inicial, se libera un segundo fragmento; en el que el segundo fragmento comprende un segmento del extremo 3’ adicional permitiendo que el segundo fragmento sea diferente del primer fragmento (véase la Fig. 25).

Cuando la secuencia de ácido nucleico diana no está presente en una muestra, no se produce la escisión del PTO-NV.

Como tal, las diferencias en los sitios de escisión y los tipos de fragmentos de PTO-NV generados dieron como resultado diferentes patrones de extensión en función de la presencia y ausencia de la variación de nucleótidos de interés en la secuencia de ácido nucleico diana, lo que contribuye a la detección diferencial de la variación de

nucleótidos en la secuencia de ácido nucleico diana.

Un sitio de escisión inicial del PTO-NV se ve afectado por el tipo de nucleasa 5', el tipo de oligonucleótidos en dirección 5' (cebador en dirección 5'), los sitios de hibridación de oligonucleótidos en dirección 5' y las condiciones de escisión.

Un sitio de escisión inicial por polimerasa dependiente de molde que tiene actividad nucleasa 5' con la extensión de cebadores en dirección 5' generalmente se posiciona en una dirección 5' a 3' en un nucleótido inicial de una cadena doble (es decir, sitio de bifurcación) en estructuras que incluyen una cadena simple y una cadena doble o a 1-2 nucleótidos de distancia del nucleótido inicial. Mediante la reacción de escisión, se producen fragmentos que comprenden el segmento de marcaje en 5' y una parte del segmento localizador en 3'. Cuando la presente invención se realiza por inducción de escisión independiente de extensión de oligonucleótido en dirección 5', el sitio de escisión del PTO-NV se puede ajustar por la localización de los oligonucleótidos en dirección 5' (por ejemplo, sonda en dirección 5').

La expresión usada en el presente documento "un primer sitio de escisión inicial", en relación con el PTO-NV significa un sitio de escisión del PTO-NV que se escinde en primer lugar cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana que tiene la variación de nucleótidos complementaria al sitio de la discriminación de variación. La expresión usada en el presente documento "un segundo sitio de escisión inicial", en relación con el PTO-NV significa un sitio de escisión del PTO-NV que se escinde en primer lugar cuando el PTO-NV se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana que tiene una variación de nucleótidos no complementaria al sitio de la discriminación de variación.

La expresión usada en el presente documento "un primer fragmento" se refiere a un fragmento producido tras la escisión en el primer sitio de escisión inicial. La expresión se utiliza indistintamente con "un primer segmento" y "un primer fragmento de PTO-NV". La expresión en el presente documento "un segundo fragmento" se refiere a un fragmento producido tras la escisión en el segundo sitio de escisión inicial. La expresión se utiliza indistintamente con "un segundo segmento" y "un segundo fragmento de PTO-NV".

Preferentemente, el primer fragmento y el segundo fragmento comprenden cada uno el segmento de marcaje en 5' o una parte del segmento de marcaje en 5'.

La escisión puede producirse sucesivamente después de la escisión del primer sitio de escisión inicial (o el segundo sitio de escisión inicial) dependiendo de los métodos de escisión utilizados. Por ejemplo, cuando se usa una reacción de escisión de nucleasa 5', junto con la extensión de cebadores en dirección 5', el sitio de escisión inicial y su secuencia sucesiva se escinden. Cuando se utiliza una sonda de en dirección 5' y la reacción de escisión se produce en un sitio distante de un sitio de localización de la sonda, la reacción de escisión puede producirse solo en el sitio y la escisión en sitios sucesivos puede no ocurrir.

De acuerdo con una realización preferida, un sitio de escisión inicial dependiente de la extensión de los cebadores en dirección 5' puede estar situado en una dirección 5' a 3' en un nucleótido inicial de una cadena doble (es decir, sitio de bifurcación).

Como se muestra en la Fig. 25 que representa un ejemplo de la presente invención, el sitio de discriminación de variación de nucleótidos está posicionado en el extremo 5' de la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3'. En un caso de este tipo, el primer sitio de escisión inicial está posicionado inmediatamente adyacente, en una dirección 5' a 3', a la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3'. En otras palabras, el primer sitio de escisión inicial se posiciona inmediatamente adyacente, en una dirección 3', al sitio de discriminación de variación de nucleótidos. El segundo sitio de escisión inicial generalmente está posicionado a 1 nucleótido de distancia, en una dirección 3', desde el sitio de discriminación de variación de nucleótidos.

Como se muestra en la Fig. 26 que representa otro ejemplo de la presente invención, el sitio de discriminación de variación de nucleótidos está posicionado a 1 nucleótido de distancia del extremo 5' de la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3'. En un caso de este tipo, el primer sitio de escisión inicial está posicionado inmediatamente adyacente, en una dirección 5', al sitio de la discriminación de variación de nucleótidos. El segundo sitio de escisión inicial generalmente está posicionado a 1 nucleótido de distancia, en una dirección 3', desde el sitio de discriminación de variación de nucleótidos.

La parte del extremo 5' que comprende el sitio de discriminación de variación de nucleótidos puede estar compuesta por una secuencia hibridable con la secuencia de ácido nucleico diana. Como alternativa, la parte del extremo 5' puede comprender parcialmente una secuencia no hibridable (véase la Fig. 27). La introducción de una secuencia no hibridable en la parte del extremo 5' es muy ventajosa con respecto a la formación de cadena simple de la parte del extremo 5' cuando el PTO-NV se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana que tiene una variación de nucleótidos no complementaria al sitio de la discriminación de variación de nucleótidos.

De acuerdo con una realización preferida, la parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’ del PTO-NV comprende un resto de emparejamiento de no base situado a 1-10 nucleótidos (más preferentemente a 1-5 nucleótidos) de distancia del sitio de discriminación de variación de nucleótidos.

El resto de emparejamiento de no base impide que la parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3' forme una cadena doble con la secuencia de nucleótidos diana cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana que tiene la variación de nucleótidos no complementaria al sitio de discriminación de variación.

De acuerdo con una realización preferida, el resto de emparejamiento de no base no inhibe la formación de una cadena doble entre la parte del extremo 5’ y la secuencia de ácido nucleico diana cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana que tiene la variación de nucleótidos complementaria al sitio de discriminación de variación de nucleótidos.

De acuerdo con una realización, el resto de emparejamiento de no base potencia la diferenciación entre el primer sitio de escisión inicial y el segundo sitio de escisión inicial. Por ejemplo, cuando los sitios de escisión no se diferencian en un molde apareado y molde desapareado por diferencia en el sitio de discriminación de variación debida a diferencias en los patrones de hibridación de la parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’ del PTO-NV, el uso del resto de emparejamiento de no base hace que los patrones de hibridación se diferencien. Además, incluso cuando la parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’ del PTO-NV muestra diferentes patrones de hibridación en un molde apareado y molde desapareado por diferencia en el sitio de discriminación de variación, el uso del resto de emparejamiento de no base permite proporcionar un segmento del extremo 3’ mucho más largo del segundo fragmento que el del primer fragmento, evitando de ese modo completamente la extensión del segundo fragmento en el CTO.

El uso del resto de emparejamiento de no base mejora el ensayo VD-PTOCE.

De acuerdo con una realización preferida, el uso del resto de emparejamiento de no base (por ejemplo, nucleótido desapareado artificial) potencia el potencial de discriminación del PTO-NV a variaciones de nucleótidos.

De acuerdo con una realización, el reconocimiento diferencial mediante la enzima que tiene la actividad nucleasa 5' entre el primer sitio de escisión inicial y el segundo sitio de escisión inicial se mejora mediante la diferenciación impuesta por el resto de emparejamiento de no base. La diferenciación puede potenciarse por la distancia entre el primer sitio de escisión inicial y el segundo sitio de escisión inicial provocada por el resto de emparejamiento de no base. De acuerdo con una realización preferida, el resto de emparejamiento de no base ensancha la distancia entre el primer sitio de escisión inicial y el segundo sitio de escisión inicial.

De acuerdo con una realización preferida, la introducción de una secuencia de resto de emparejamiento de no base permite que el segundo sitio de escisión inicial se ajuste.

Preferentemente, el resto de emparejamiento de no base está situado en dirección 3’ del sitio discriminación de variación de nucleótidos.

Por ejemplo, cuando un nucleótido desapareado como un resto de emparejamiento de no base se introduce en una posición a 2 nucleótidos de distancia, en una dirección 3', desde el sitio de discriminación de variación de nucleótidos, el segundo sitio de escisión inicial se ajusta a una posición a 2 nucleótidos de distancia del sitio de discriminación de variación de nucleótidos (véase la Fig. 27). En caso de no utilizar el nucleótido desapareado, el segundo sitio de escisión inicial está posicionado a 1 nucleótido de distancia del sitio de discriminación de variación de nucleótidos. Es decir, el resto de emparejamiento de no base puede ensanchar la distancia entre el primer sitio de escisión inicial y el segundo sitio de escisión inicial.

El resto de emparejamiento de no base incluye cualesquiera restos que no formen un par de bases entre secuencias de ácidos nucleicos diana. Preferentemente, el resto de emparejamiento de no base es (i) un nucleótido que comprende una base desapareada artificial, una base de emparejamiento de no base modificada para que no sea susceptible de emparejamiento de bases o una base universal, (ii) un nucleótido de emparejamiento de no base modificado para que no sea susceptible de emparejamiento de bases, o (iii) un compuesto químico de emparejamiento de no base.

Por ejemplo, el resto de emparejamiento de no base incluye grupo alquileno, ribofuranosil naftaleno, desoxi ribofuranosil naftaleno, metafosfato, enlace fosforotioato, enlace fosfotriéster de alquilo, enlace fosfotriéster de arilo, enlace fosfonato de alquilo, enlace fosfonato de arilo, enlace fosfonato de hidrógeno, enlace fosforoamidato de alquilo y enlace fosforoamidato de arilo. También se usan espaciadores de carbono convencionales como restos de emparejamiento de no bases. Son útiles bases universales como restos de emparejamiento no de base en el ajuste de los sitios de escisión del PTO-NV.

Como pares de bases que contienen bases universales como desoxiinosina, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol y 5-nitroindol tienen una fuerza de unión más baja que la que existe entre bases naturales, pueden

emplearse bases universales como restos de apareamiento de no base en ciertas condiciones de hibridación.

El resto de emparejamiento de no base introducido en la parte del extremo 5’ tiene preferentemente 1-5, más preferentemente 12 restos. Una pluralidad de restos de apareamiento de no base en la parte del extremo 5’ puede estar presente en forma consecutiva o intermitente. Preferentemente, el resto de emparejamiento de no base tiene 2-5 restos consecutivos.

Preferentemente, el resto de emparejamiento de no base es un compuesto químico de emparejamiento de no base.

De acuerdo con una realización preferida, el sitio de discriminación de variación de nucleótidos y el resto de emparejamiento de no base del PTO-NV están a 10 nucleótidos (más preferentemente 8 nucleótidos, 7 nucleótidos, 6 nucleótidos, 5 nucleótidos, 4 nucleótidos, 3 nucleótidos, 2 nucleótidos o 1 nucleótidos, aún más preferentemente 1 nucleótido) de distancia del extremo 5’ del segmento localizador en 3’.

Como alternativa, la reacción de escisión puede ejecutarse solamente en el primer sitio de escisión inicial no en el segundo sitio de escisión inicial. Por ejemplo, cuando se utiliza una sonda de en dirección 5’ y la reacción de escisión se produce en un sitio distante de un sitio de localización de la sonda, la reacción de escisión puede producirse solo en el primer sitio de escisión inicial cuando el PTONV se hibrida con el molde apareado. Cuando el PTO-NV se hibrida con el molde desapareado, el lugar de la bifurcación (el segundo sitio inicial de escisión) no puede escindirse debido a una larga distancia de la sonda en dirección 5’.

De acuerdo con una realización preferida, en el PTO-NV se hibrida con el molde desapareado, el segundo sitio de escisión inicial comprende un sitio inicial de una cadena doble (es decir, sitio de bifurcación) en estructuras, incluyendo una cadena simple y una cadena doble.

De acuerdo con una realización, el PTO-NV tiene un segmento bloqueador que contiene como un bloqueador al menos un nucleótido resistente a la escisión por la enzima que tiene actividad nucleasa 5' y el segmento bloqueador está posicionado para controlar el sitio de escisión inicial o evitar la escisión en un sitio o sitios.

Etapa (c): <u>Hibridación del fragmento liberado del PTO con CTO</u>

El fragmento liberado del PTO se hibrida con un CTO (Oligonucleótido de Captura y Molde).

El primer fragmento y el segundo fragmento tienen habitualmente una secuencia hibridable con el segmento de captura del CTO y por tanto uno de ellos se hibrida con el CTO.

El segundo fragmento producido cuando se hibrida con el molde desapareado comprende una parte del extremo 3’ adicional que es diferente del primer fragmento producido cuando se hibrida con el molde apareado.

De acuerdo con una realización preferida, el CTO presenta una secuencia seleccionada de manera que el CTO no se hibrida con el segmento del extremo 3’ adicional del segundo fragmento para evitar que el segundo fragmento se extienda cuando el segundo fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO. Por ejemplo, la secuencia del CTO puede seleccionarse de manera que el CTO tenga uno o más nucleótidos desapareados en oposición al segmento del extremo 3’ adicional del segundo fragmento. Como alternativa, se pueden usar bases universales en lugar del nucleótido desapareado dependiendo de las condiciones de reacción.

El primer sitio de escisión inicial (o el segundo sitio de escisión inicial) puede no estar fijo sino ser múltiple en una condición. Por ejemplo, los sitios de escisión iniciales pueden estar posicionados en una dirección 5' a 3' en un nucleótido inicial de una cadena doble (es decir, sitio de bifurcación) en estructuras que incluyen una cadena simple y una cadena doble y a 1-2 nucleótidos de distancia del nucleótido inicial. En un caso de este tipo, preferentemente, la secuencia del CTO se selecciona de manera que el fragmento más corto liberado por la primera escisión inicial se extienda selectivamente en la presente invención para generar la cadena extendida indicativa de la presencia de la variación de nucleótidos.

Etapa (d): <u>Extensión del fragmento</u>

Cuando el primer fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO, se extiende para formar una cadena extendida que comprende una secuencia extendida complementaria al segmento molde del CTO. Cuando el segundo fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO, no se extiende.

En general, la extensión de cebadores puede controlarse mediante la hibridación entre una parte del extremo 3’ de los cebadores y un molde. Mediante el ajuste de las secuencias de cebadores y las condiciones de reacción (por ejemplo, temperatura de hibridación), es permisible la extensión de cebadores que tiene en su parte del extremo 3’ 1-3 nucleótidos desapareados. Como alternativa, la extensión de cebadores puede ser permisible solo cuando tienen una secuencia perfectamente complementaria a secuencias diana.

De acuerdo con una realización preferida, la secuencia del CTO se selecciona de manera que el primer fragmento o el segundo fragmento se extiendan selectivamente.

De acuerdo con una realización preferida, la extensión del fragmento se realiza en condiciones de manera que la extensión no se produzca incluso cuando esté presente un único desapareamiento en la parte del extremo 3' del fragmento.

Etapa (e): <u>Detección de la cadena extendida</u>

La cadena extendida se detecta después de la reacción de extensión. La presencia de la cadena extendida indica la presencia de la variación de nucleótidos complementaria al sitio de discriminación de nucleótidos del PTO-NV.

De acuerdo con una realización preferida, la detección en la etapa (e) se realiza de acuerdo con el ensayo PTOCE que comprende el análisis de fusión o el PTOCE que comprende la detección a una temperatura prefijada usando señales del ácido nucleico bicatenario extendido entre la cadena extendida y el CTO descrito anteriormente.

De acuerdo con una realización preferida, la cadena extendida del primer fragmento y el CTO forman un ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (d); en el que el ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de T_m ajustable por (i) una secuencia y/o longitud del primer fragmento, (ii) una secuencia y/o longitud del CTO o (iii) la secuencia y/o longitud del primer fragmento y la secuencia y/o longitud del CTO; en el que el ácido nucleico bicatenario extendido proporciona una señal diana por (i) al menos un marcador unido al primer fragmento y/o CTO, (ii) un marcador incorporado en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, (iii) al menos un marcador unido al primer fragmento y/o CTO y un marcador incorporado en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión o (iv) marcador intercalante; y en el que la presencia de la cadena extendida se detecta mediante la medición de la señal diana del ácido nucleico bicatenario extendido de acuerdo con un análisis de fusión o un análisis de hibridación para el ácido nucleico bicatenario extendido.

De acuerdo con una realización preferida, la cadena extendida del primer fragmento y el CTO forman un ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (d); en el que el ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de T_m ajustable por (i) una secuencia y/o longitud del primer fragmento, (ii) una secuencia y/o longitud del CTO o (iii) la secuencia y/o longitud del primer fragmento y la secuencia y/o longitud del CTO; en el que el ácido nucleico bicatenario extendido proporciona una señal diana por (i) al menos un marcador unido al primer fragmento y/o CTO, (ii) un marcador incorporado en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, (iii) al menos un marcador unido al primer fragmento y/o CTO y un marcador incorporado en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión o (iv) marcado intercalante; y en el que la presencia de la cadena extendida se detecta mediante la medición de la señal diana del ácido nucleico bicatenario extendido a una temperatura prefijada suficiente para mantener una cadena doble del ácido nucleico bicatenario extendido.

De acuerdo con una realización preferida, la cadena extendida del primer fragmento puede detectarse mediante la medición de las señales generadas a partir de la escisión de sondas marcadas hibridadas con el CTO en la extensión del primer fragmento.

De acuerdo con una realización preferida, la cadena extendida del primer fragmento puede detectarse basándose ya sea en el tamaño o la secuencia de la cadena extendida. Por ejemplo, la cadena extendida puede detectarse mediante el uso de una electroforesis o un análisis de masas (por ejemplo, impacto de electrones (IE), ionización química (IQ), Desorción de Campo (DC), Desorción de 252Cf-Plasma (DP), Desorción por ionización química (DIQ), espectrometría de masas de iones secundarios (EMIS), bombardeo con átomos rápidos (BAR), ionización por electronebulización (IEN), ionización por desorción por láser asistida por matriz (MALDI) y espectrometría de masas en tándem).

De acuerdo con una realización preferida, el presente método comprende además la repetición de todas o algunas de las etapas (a)-(e) con desnaturalización entre ciclos de repetición.

De acuerdo con una realización preferida, el procedimiento se realiza para detectar al menos dos tipos de variaciones de nucleótidos; en el que el oligonucleótido en dirección 5' comprende al menos dos tipos de oligonucleótidos y el PTO-NV comprende al menos dos tipos de los PTO-NV.

El oligonucleótido en dirección 5' es un cebador en dirección 5' y la etapa (b) utiliza una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde para la extensión del cebador en dirección 5' como la enzima que tiene la actividad nucleasa 5'.

La enzima que tiene la actividad nucleasa 5' es una ADN polimerasa termoestable que tiene una actividad nucleasa 5'.

De acuerdo con una realización preferida, el método se realiza en presencia de un cebador en dirección 3'.

El presente procedimiento puede realizarse con el método de sujeción por PCR usando PNA en el que el PNA y PTO-NV utilizados pueden diseñarse para que se hibriden con la misma cadena en una cadena doble de ADN o diferentes cadenas entre sí.

Entre las polimerasas dependientes de molde que tienen actividad nucleasa 5', existen varias enzimas que tienen actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en dirección 5', por ejemplo, ADN polimerasa *Taq*.

Teniendo en cuenta la amplificación de secuencias de ácido nucleico diana, las condiciones de reacción y la actividad nucleasa 5', la presente invención se realiza preferentemente usando oligonucleótidos en dirección 5' que son cebadores en dirección 5'.

El método para detectar una variación de nucleótidos mediante un ensayo PTOCE basado en la actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en dirección 5' comprende:

(a) hibridación de la secuencia de ácido nucleico diana con un PTO-NV (oligonucleótido de sondaje y marcaje para variación de nucleótidos); en la que el PTO-NV comprende (i) un segmento localizador en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana, (ii) un segmento de marcaje en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (iii) un sitio de discriminación de variación de nucleótidos, que comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótidos en el ácido nucleico diana, posicionado en una parte del extremo 5' del segmento localizador en 3'; en el que el segmento localizador en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y el segmento de marcaje en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana;
(b) puesta en contacto del producto resultante de la etapa (a) con una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa 5' en las condiciones para la escisión del PTO-NV; en la que cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana que tiene la variación de nucleótidos complementaria al sitio de discriminación de variación de nucleótidos y la parte de extremo 5' del segmento localizador en 3' forma una cadena doble con la secuencia de ácido nucleico diana para inducir la escisión de un primer sitio de escisión inicial, se libera un primer fragmento; en la que cuando el PTO-NV se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana que tiene una variación de nucleótidos no complementaria al sitio de discriminación de variación de nucleótidos y la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' no forma una cadena doble con la secuencia de ácido nucleico diana para inducir la escisión de un segundo sitio de escisión inicial situado en dirección 3' del primer sitio de escisión inicial, se libera un segundo fragmento; en la que el segundo fragmento comprende un segmento del extremo 3' adicional que permite que el segundo fragmento se diferencie del primer fragmento;
(c) hibridación del fragmento liberado del PTO-NV con un CTO (oligonucleótido de captura y molde); en la que el CTO comprende en una dirección de 3' a 5' (i) un segmento de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria al segmento de marcaje en 5' o una parte del segmento de marcaje en 5' del PTO-NV y (ii) un segmento de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria al segmento de marcaje en 5' y el segmento localizador en 3' del PTO-NV; en el que el primer fragmento o el segundo fragmento liberado del PTO-NV se hibrida con el segmento de captura del CTO;
(d) realización de una reacción de extensión usando el producto resultante de la etapa (c) y una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde; en la que cuando el primer fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO, que se extiende para formar una cadena extendida que comprende una secuencia extendida complementaria al segmento de molde del CTO; en la que cuando el segundo fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO, no se extiende; y
(e) detección de la presencia de la cadena extendida, por lo que la presencia de la cadena extendida indica la presencia de la variación de nucleótidos complementaria al sitio de discriminación de nucleótidos del PTO-NV.

Puesto que el presente método basado en la actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en dirección 5' es el mismo que el del ensayo PTOCE usando oligonucleótidos en dirección 5' excepto porque no se usan oligonucleótidos en dirección 5', las descripciones comunes entre ellos se omiten con el fin de evitar la redundancia indebida que conduce a la complejidad de la presente memoria descriptiva.

En otro aspecto de la presente invención, se utiliza un kit para detectar una variación de nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico diana mediante un ensayo PTOCE (Escisión y Extensión de Oligonucleótido de Sondaje y Marcaje) de acuerdo con la presente invención, que comprende:

(a) un PTO-NV (oligonucleótido de sondaje y marcaje para variación de nucleótidos); en el que el PTO-NV comprende (i) un segmento localizador en 3' que comprende una secuencia de hibridación de nucleótidos complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana, (ii) un segmento de marcaje en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (iii) un sitio de discriminación de variación de nucleótidos que comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótidos en el ácido nucleico diana, posicionado en una parte del extremo 5' del segmento localizador en 3'; en el que el segmento localizador en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y el segmento de marcaje en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana;
(b) un cebador en dirección 5'; en el que el cebador en dirección 5' comprende una secuencia de nucleótidos de

hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; en el que el cebador en dirección 5’ se encuentra en dirección 5’ del PTO-NV; la cadena extendida del cebador en dirección 5’ induce la escisión del PTO-NV por una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa 5'; y
(c) un CTO (oligonucleótido de captura y molde); en el que el CTO comprende en una dirección 5' a 3’ (i) un segmento de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria al segmento de marcaje en 5’ o una parte del segmento de marcaje en 5’ del PTO-NV y (ii) un segmento molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria al segmento de marcaje en 5’ y el segmento localizador en 3’ del PTO-NV;

en el que cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana que tiene la variación de nucleótidos complementaria al sitio de discriminación de variación y la parte de extremo 5’ del segmento localizador en 3’ forma una cadena doble con la secuencia de ácido nucleico diana para inducir la escisión de un primer sitio de escisión inicial, se libera un primer fragmento;
en el que cuando el PTO-NV se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana que tiene una variación de nucleótidos no complementaria al sitio de discriminación de variación y la parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’ no forma una cadena doble con la secuencia de ácido nucleico diana para inducir la escisión de un segundo sitio de escisión inicial situado en dirección 3’ del primer sitio de escisión inicial, se libera un segundo fragmento; en el que el segundo fragmento comprende un segmento del extremo 3’ adicional que permite que el segundo fragmento se diferencie del primer fragmento; en el que el primer fragmento o el segundo fragmento liberado del PTO-NV se hibrida con el segmento de captura del CTO.

En un aspecto adicional de la presente invención, se usa un kit para detectar una variación de nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico diana mediante un ensayo PTOCE (escisión y extensión de oligonucleótido de sondaje y marcaje) basado en la actividad nucleasa 5' independiente de oligonucleótido en dirección 5’ de acuerdo con el método de la invención, que comprende:

(a) un PTO-NV (oligonucleótido de sondaje y marcaje para variación de nucleótidos); en el que el PTO-NV comprende (i) un segmento localizador en 3’ que comprende una secuencia de hibridación de nucleótidos complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana, (ii) un segmento de marcaje en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (iii) un sitio de discriminación de variación de nucleótidos que comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótidos en el ácido nucleico diana, posicionado en una parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’; en el que el segmento localizador en 3’ se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y el segmento 5' de marcado no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana;
(b) un CTO (oligonucleótido de captura y molde); en el que el CTO comprende en una dirección 5' a 3’ (i) un segmento de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria al segmento de marcaje en 5’ o una parte del segmento de marcaje en 5’ del PTO-NV y (ii) un segmento molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria al segmento de marcaje en 5’ y el segmento localizador en 3’ del PTO-NV;

en el que cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana que tiene la variación de nucleótidos complementaria al sitio de discriminación de variación y la parte de extremo 5’ del segmento localizador en 3’ forma una cadena doble con la secuencia de ácido nucleico diana para inducir la escisión de un primer sitio de escisión inicial, se libera un primer fragmento;
en el que cuando el PTO-NV se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana que tiene una variación de nucleótidos no complementaria al sitio de discriminación de variación y la parte de extremo 5’ del segmento localizador en 3’ no forma una doble cadena con la secuencia de ácido nucleico diana para inducir la escisión de un segundo sitio de escisión inicial situado en dirección 3’ del primer sitio de escisión inicial, se libera un segundo fragmento; en el que el segundo fragmento comprende un segmento del extremo 3’ adicional que permite que el segundo fragmento se diferencie del primer fragmento; en el que el primer fragmento o el segundo fragmento liberado del PTO-NV se hibrida con el segmento de captura del CTO.

Puesto que el kit de la presente invención se construye para realizar el método de detección de la presente invención descrito anteriormente, las descripciones comunes entre ellos se omiten con el fin de evitar la redundancia excesiva que conduce a la complejidad de la presente memoria descriptiva.

Las características y ventajas de la divulgación de la invención se pueden resumir como se indica a continuación:

(a) La presente divulgación proporciona un ácido nucleico bicatenario extendido dependiente de la diana en el que PTO (Oligonucleótido de Sondaje y Marcaje) hibridado con una secuencia de ácido nucleico diana se escinde para liberar un fragmento y el fragmento se hibrida con CTO (Oligonucleótido de Captura y Molde) para formar un ácido nucleico bicatenario extendido. El ácido nucleico bicatenario extendido proporciona una señal (generación o extinción de la señal) o un cambio de señal (aumento o disminución de la señal) que indica la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana.
(b) La presencia del ácido nucleico bicatenario extendido se determina por diversos métodos o procesos tales como el análisis de curva de fusión y la detección a una temperatura prefijada (por ejemplo, una forma en tiempo

real y una forma de punto final).

(c) La presente divulgación permite detectar simultáneamente al menos dos tipos de secuencias de ácidos nucleicos diana mediante fusión de análisis de la curva incluso usando un solo tipo de un marcador (por ejemplo, FAM). Por el contrario, el método múltiple en tiempo real convencional realizado en una fase líquida sufre seriamente la limitación asociada al número de marcadores de fluorescencia detectables. La presente invención permite superar satisfactoriamente dichas deficiencias y ampliar la aplicación de detección en tiempo real múltiple.

(d) La presente divulgación se puede realizar usando una multitud de sistemas de marcaje. Por ejemplo, los marcadores unidos a cualquier sitio de PTO y/o CTO se pueden utilizar para proporcionar la señal diana que indica el ácido nucleico bicatenario extendido. Además, los marcadores incorporados en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión se pueden utilizar en la presente invención. Además de esto, se puede usar una combinación de dichos marcadores. Los sistemas de marcaje versátiles aplicables a la presente invención nos permiten elegir un sistema de marcaje adecuado dependiendo de las condiciones u objetivos experimentales.

(e) La presente divulgación proporciona un ácido nucleico bicatenario extendido dependiente de la diana que tiene un valor de T_m prefijado ajustable por (i) una secuencia y/o longitud del fragmento, (ii) una secuencia y/o longitud del CTO o (iii) la secuencia y/o longitud del fragmento y la secuencia y/o longitud del CTO.

(f) El análisis de la curva de fusión convencional usando un producto amplificado depende de la secuencia del producto amplificado de manera que es difícil obtener un valor de T_m deseado del producto amplificado. Por el contrario, la presente invención depende de la secuencia de un ácido nucleico bicatenario extendido, no de la secuencia de un producto amplificado, lo que permite seleccionar un valor de T_m deseado de ácido nucleico bicatenario extendido. Por tanto, la presente divulgación es fácilmente adoptable para la detección de múltiples secuencias diana.

(g) Es muy probable que el análisis de la curva de fusión convencional usando una hibridación directa entre sondas marcadas y secuencias de ácido nucleico diana genere señales de falsos positivos debido a la hibridación no específica de sondas. Por el contrario, la presente divulgación emplea no solo hibridación de PTO sino también escisión y extensión enzimáticas, lo que supera completamente los problemas de falsas señales positivas.

(h) El valor de T_m del análisis de la curva de fusión convencional se ve afectado por una variación de la secuencia en las secuencias de ácidos nucleicos diana. Sin embargo, un ácido nucleico bicatenario extendido de la presente invención proporciona un valor constante de T_m independientemente de una variación de la secuencia en las secuencias de ácidos nucleicos diana, permitiendo garantizar una excelente precisión en el análisis de la curva de fusión.

(i) Es notable que la secuencia del segmento de marcaje en 5' del PTO y la secuencia de CTO se puedan seleccionar sin tener en cuenta las secuencias de ácidos nucleicos diana. Esto hace que sea posible de prediseñar un grupo de secuencias para el segmento de marcaje en 5' de PTO y CTO. Aunque el segmento localizador en 3' del PTO tiene que estar preparado teniendo en cuenta las secuencias de ácidos nucleicos diana, el CTO se pueden preparar en una forma ya preparada sin ninguna consideración o conocimiento de las secuencias de ácidos nucleicos diana. Dichas características proporcionan ventajas considerables en la detección de múltiples dianas, entre otras cosas, en un ensayo de micromatriz usando CTO inmovilizados sobre un sustrato sólido.

(j) De acuerdo con la presente invención para la detección de una variación de nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico diana, es decir, el ensayo VD-PTOCE, la sonda (PTO-NV) muestra patrones de hibridación claramente diferentes en función de la presencia de la variación de nucleótidos de interés.

(k) Dichos patrones de hibridación distintos en la variación de nucleótidos de interés son responsables de las diferencias en los sitios de escisión iniciales del PTO-NV, produciendo de este modo dos tipos de fragmentos de PTO-NV para proporcionar la diferenciación de la señal dependiendo de la presencia de la variación de nucleótidos de interés.

La presente invención se describirá ahora con más detalle mediante ejemplos. Sería obvio para los expertos en la materia que estos ejemplos tienen por objeto ser ilustrativos más concretamente.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Evaluación del ensayo de escisión y extensión de oligonucleótido de sondaje y marcaje (PTOCE)

Un nuevo ensayo, el ensayo de escisión y extensión de oligonucleótido de sondaje y marcaje (PTOCE, por sus siglas en inglés), se evaluó para ver si un ácido nucleico bicatenario extendido podía proporcionar una señal diana para la detección de una secuencia de ácidos nucleicos diana.

Para dicha evaluación se realizó un ensayo PTOCE que detecta la presencia de un ácido nucleico bicatenario extendido mediante el análisis de la fusión (ensayo PTOCE con análisis de la fusión). Se usó la ADN polimerasa Taq que tiene actividad nucleasa 5' para la extensión del cebador situado en dirección 5', la escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO.

El ácido nucleico bicatenario extendido formado durante el ensayo se diseñó para tener un marcador interactivo doble. El marcador interactivo doble incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido fue proporcionado por: (i) CTO marcado con una molécula indicadora y una molécula amortiguadora (CTO con marcaje doble); o (ii) PTO que tiene una molécula amortiguadora y CTO que tiene una molécula indicadora (un PTO marcado con molécula amortiguadora y un CTO marcado con molécula indicadora). El PTO y el CTO están bloqueados con un espaciador de carbonos en sus extremos 3'. El oligonucleótido sintético para un gen de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) se usó como molde diana.

1-1. Ensayo PTOCE con un CTO con marcaje doble

El PTO no tiene marcador. El CTO tiene una molécula amortiguadora (BHQ-1) y una molécula indicadora fluorescente (FAM) en su segmento molde. Las secuencias del molde sintético, del cebador situado en dirección 5', del PTO y del CTO usadas en este ejemplo son:

NG-T 5'-
AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTTGTTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATACC
GATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
NG-PTO-1 5'-ACGACGGCTTGGCTGCCCCTCATTGGCGTGTTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 3)
NG-CTO-1 5'-[BHQ-1]CCTCCTCCTCCTCCTCCTCC[T(FAM)]CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3]-3'(SEQ ID NO: 4)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5' del PTO)

La reacción se realizó con un volumen final de 20 µl que contenían 2 pmol de molde sintético (SEQ ID NO: 1) del gen de NG, 10 pmol de cebador situado en dirección 5' (SEQ ID NO: 2), 5 pmol de PTO (SEQ ID NO: 3), 2 pmol de CTO (SEQ ID NO: 4) y 10 µl de Mezcla maestra 2X que contenía $MgCl_2$ 2,5 mM, dNTP 200 µM y 1,6 unidades de ADN polimerasa H-*Taq* (Solgent, Corea); el tubo con la mezcla de reacción se introdujo en un termociclador de tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 ºC y se sometió a 30 ciclos de 30 s a 95 ºC y 60 s a 60 ºC. Después de la reacción, se obtuvo la curva de fusión mediante el enfriamiento de la mezcla de reacción a 35 ºC, mantenimiento a 35 ºC durante 30 s y calentamiento lento de 35 ºC a 90 ºC. La fluorescencia se midió continuamente durante el alza de la temperatura para controlar la disociación de las moléculas bicatenarias de ADN. El pico de fusión se dedujo de los datos de la curva de fusión.

Como muestra la Figura 14, en presencia del molde se detectó un pico a 76,5 ºC correspondiente al valor de T_m esperado del ácido nucleico bicatenario extendido. No se detectó ningún pico sin la presencia del molde. Como el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO no ofrece ninguna señal en este método de marcaje, no hubo ningún pico que correspondiera a dicho híbrido. En los casos en que no había PTO o CTO, no se observó ningún pico.

1-2. Ensayo PTOCE usando un PTO marcado con molécula amortiguadora y un CTO marcado con molécula indicadora

El PTO está marcado con una molécula amortiguadora (BHQ-1) en su extremo 5'. El CTO está marcado con una molécula indicadora fluorescente (FAM) en su extremo 3'.

Las secuencias del molde sintético, del cebador situado en dirección 5', del PTO y del CTO usadas en este ejemplo son:

NG-T 5'-
AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTTGTTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATACC
GATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
NG-PTO-2 5'- [BHQ-1]ACGACGGCTTGGCTTTACTGCCCCTCATTGGCGTGTTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 5)
NG-CTO-2 5'-CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[FAM]-3' (SEQ ID NO: 6)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5' del PTO)

La reacción se realizó con un volumen final de 20 µl que contenía 2 pmol de molde sintético (SEQ ID NO: 1) del gen de NG, 10 pmol de cebador situado en dirección 5' (SEQ ID NO: 2), 5 pmol de PTO (SEQ ID NO: 5), 2 pmol de CTO (SEQ ID NO: 6) y 10 µl de Mezcla maestra 2X que contenía $MgCl_2$ 2,5 mM, dNTP 200 µM y 1,6 unidades de ADN polimerasa H-*Taq* (Solgent, Corea); el tubo con la mezcla de reacción se introdujo en un termociclador de tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 ºC y se sometió a 30 ciclos de 30

s a 95 ºC, 60 s a 60 ºC y 30 s a 72 ºC. Después de la reacción, se obtuvo la curva de fusión mediante el enfriamiento de la mezcla de reacción a 35 ºC, mantenimiento a 35 ºC durante 30 s y calentamiento lento de 35 ºC a 90 ºC. La fluorescencia se midió continuamente durante el alza de la temperatura para controlar la disociación de las moléculas bicatenarias de ADN. El pico de fusión se dedujo de los datos de la curva de fusión.

Como muestra la Figura 15, en presencia del molde se detectó un pico a 77,0 ºC correspondiente al valor de T_m esperado del ácido nucleico bicatenario extendido. Como el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO ofrece una señal no diana en este método de marcaje, hubo un pico a 64,0 ºC~64,5 ºC correspondiente al valor de T_m esperado del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO. En los casos en que no había PTO o CTO, no se observó ningún pico.

Estos resultados indican que se produce un ácido nucleico bicatenario extendido y que éste proporciona la señal diana indicando la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

EJEMPLO 2: Ajustabilidad del valor de T_m de un ácido nucleico bicatenario extendido

Se examinó en mayor detalle si el valor de T_m de un ácido nucleico bicatenario extendido es ajustable con la secuencia de CTO en el ensayo PTOCE.

Para el examen, se emplearon tres tipos de CTO cuyos segmentos molde tenían secuencias distintas. El PTO no tiene marcador. Los tres tipos de CTO incorporan una molécula amortiguadora (BHQ-1) y una molécula indicadora fluorescente (FAM) en los segmentos molde. El PTO y el CTO están bloqueados con un espaciador de carbonos en sus extremos 3'.

Los tres tipos de CTO fueron sometidos al ensayo PTOCE con análisis de la fusión.

Las secuencias del molde sintético, del cebador situado en dirección 5', del PTO y del CTO usadas en este ejemplo son:

NG-T 5'-
AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTTGTTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATACC
GATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
NG-PTO-3 5'-<u>ACGACGGCTTG</u>GCCCCTCATTGGCGTGTTTCG[espaciador C3] -3' (SEQ ID NO: 7)
NG-CTO-1 5'-[BHQ-1]CCTCCTCCTCCTCCTCCTCC[T(FAM)]CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3] -3 (SEQ ID NO: 4)
NG-CTO-3 5'-[BHQ-1]TTTTTTTTTTCCTCCTCCAG[T(FAM)]AAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO:8)
NG-CTO-4 5'-[BHQ-1] TTTTTTTTTTTTTTTTTTAG[T(FAM)]AAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3] -3' (SEQ ID NO: 9)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5' del PTO)

La reacción se realizó con un volumen final de 20 µl que contenía 2 pmol de molde sintético (SEQ ID NO: 1) del gen de NG, 10 pmol de cebador situado en dirección 5' (SEQ ID NO: 2), 5 pmol de PTO (SEQ ID NO: 7), 2 pmol de CTO (SEQ ID NO: 4, 8 o 9) y 10 µl de Mezcla maestra 2X que contenía $MgCl_2$ 2,5 mM, dNTP 200 µM y 1,6 unidades de ADN polimerasa H-Taq (Solgent, Corea); el tubo con la mezcla de reacción se introdujo en un termociclador de tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 ºC y se sometió a 30 ciclos de 30 s a 95 ºC y 60 s a 60 ºC. Después de la reacción, se obtuvo la curva de fusión mediante el enfriamiento de la mezcla de reacción a 35 ºC, mantenimiento a 35 ºC durante 30 s y calentamiento lento de 35 ºC a 90 ºC. La fluorescencia se midió continuamente durante el alza de la temperatura para controlar la disociación de las moléculas bicatenarias de ADN. El pico de fusión se dedujo de los datos de la curva de fusión.

Como muestra la Figura 16, se detectó un pico a 76,0 ºC, 69,0 ºC o 64,5 ºC en presencia del molde. Cada pico corresponde a la T_m esperada del ácido nucleico bicatenario extendido generado a partir del CTO examinado. No se detectó ningún pico sin la presencia del molde.

Estos resultados indican que el valor de T_m del ácido nucleico bicatenario extendido es ajustable mediante la secuencia del CTO.

EJEMPLO 3: Detección de una secuencia de ácidos nucleicos diana usando el ensayo PTOCE que comprende la detección en tiempo real o el análisis de la fusión

Se examinó en mayor detalle si el ensayo PTOCE podía detectar una secuencia de ácidos nucleicos diana con (i) la PCR en tiempo real o (ii) el análisis de la fusión tras la PCR: (i) La escisión del PTO y la extensión del fragmento del

PTO estuvieron acompañadas por la amplificación de un ácido nucleico diana con el proceso de PCR y la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido se detectó a una temperatura prefijada en cada ciclo (ensayo PTOCE con detección en tiempo real a temperatura prefijada) o; (ii) la escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO estuvieron acompañadas por la amplificación de un ácido nucleico diana con el proceso de PCR y la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido se detectó mediante un análisis de la fusión tras la PCR (ensayo PTOCE con análisis de la fusión).

El cebador situado en dirección 5' interviene tanto en la escisión del PTO por una enzima con actividad nucleasa 5' como en la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana con el cebador situado en dirección 3' mediante el proceso de PCR. La ADN polimerasa Taq que tiene actividad nucleasa 5' se usó para la extensión del cebador situado en dirección 5' y del cebador situado en dirección 3', la escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO.

El ácido nucleico bicatenario extendido se diseñó para tener un marcador interactivo doble. El marcador interactivo doble incorporado al ácido nucleico bicatenario extendido se proporcionó en forma de: (i) CTO marcado con una molécula indicadora y una molécula amortiguadora, (ii) un complejo de molécula amortiguadora-iso-dGTP incorporado durante la reacción de extensión y CTO que tiene una molécula amortiguadora y un residuo iso-dC, o (iii) PTO que tiene una molécula amortiguadora y un CTO que tiene una molécula indicadora. El PTO y el CTO están bloqueados con un espaciador de carbonos en sus extremos 3'.

El ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) se usó como ácido nucleico diana.

3-1. Ensayo PTOCE usando un CTO con marcaje doble

El PTO no tiene marcador y el CTO está marcado con una molécula amortiguadora (BHQ-1) y una molécula indicadora fluorescente (FAM) en su segmento molde.

Las secuencias del cebador situado en dirección 5', del cebador situado en dirección 3', del PTO y del CTO usadas en este ejemplo son:

NG-F 5' TACGCCTGCTACTTTCACGCT 3' (SEQ ID NO: 10)
NG-R 5-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
NG-PTO-3 5'-ACGACGGCTTGGCCCCTCATTGGCGTGTTTCG[espaciador C3] -3' (SEQ ID NO: 7)
NG-CTO-1 5'-[BHQ-1]CCTCCTCCTCCTCCTCCTCC[T(FAM)]CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGTC[espaciador C3] -3'(SEQ ID NO: 4)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5' del PTO)

3-1-1. Ensayo PTOCE con detección en tiempo real a una temperatura prefijada

La reacción se realizó con un volumen final de 20 µl que contenía 100 pg de ADN genómico de NG, 10 pmol de cebador situado en dirección 3' (SEQ ID NO: 10), 10 pmol de cebador situado en dirección 5' (SEQ ID NO: 2), 5 pmol de PTO (SEQ ID NO: 7), 2 pmol de CTO (SEQ ID NO: 4) y 10 µl de Mezcla maestra 2X que contenía $MgCl_2$ 2,5 mM, dNTP 200 µM y 1,6 unidades de ADN polimerasa H-*Taq* (Solgent, Corea); el tubo con la mezcla de reacción se introdujo en un termociclador de tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 ºC y se sometió a 60 ciclos de 30 s a 95 ºC, 60 s a 60 ºC y 30 s a 72 ºC. La detección de la señal se realizó a 60 ºC en cada ciclo. La temperatura de detección se determinó en función de que el ácido nucleico bicatenario extendido mantuviera la forma bicatenaria.

Como muestra la Figura 17A, la señal diana (Ct 31,36) se detectó en presencia del molde. No se detectó ninguna señal sin la presencia del molde.

3-1-2. Ensayo PTOCE con análisis de la fusión

Después de la reacción del Ejemplo 3-1-1, se obtuvo la curva de fusión mediante el enfriamiento de la mezcla de reacción a 35 ºC, mantenimiento a 35 ºC durante 30 s y calentamiento lento de 35 ºC a 90 ºC. La fluorescencia se midió continuamente durante el alza de la temperatura para controlar la disociación de las moléculas bicatenarias de ADN. El pico de fusión se dedujo de los datos de la curva de fusión.

Como muestra la Figura 17B, en presencia del molde se detectó un pico a 76,0 ºC correspondiente al valor de T_m esperado del ácido nucleico bicatenario extendido. No se detectó ningún pico sin la presencia del molde. Como el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO no ofrece ninguna señal en este método de marcaje, no hubo ningún pico que correspondiera a dicho híbrido.

3-2. Ensayo PTOCE usando una molécula amortiguadora-iso-dGTP y un CTO marcado con molécula indicadora que tiene un residuo iso-dC

El PTO no tiene marcador. El CTO contiene una molécula indicadora (FAM) y un residuo iso-dC en su extremo 5'. Durante la reacción de extensión del fragmento del PTO, un iso-dGTP marcado con una molécula amortiguadora (dabcyl) se incorpora en la posición complementaria al residuo iso-dC.

Las secuencias del cebador situado en dirección 5', del cebador situado en dirección 3', del PTO y del CTO usadas en este ejemplo son:

NG-F 5' TACGCCTGCTACTTTCACGCT-3' (SEQ ID NO: 10)
NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
NG-PTO-1 5'-ACGACGGCTTGGCTGCCCCTCATTGGCGTGTTTCG[espaciador C3] -3' (SEQ ID NO: 3)
NG-CTO-5 5'-[FAM][Iso-dC]CTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3] -3' (SEQ ID NO: 11)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5' del PTO)

3-2-1. Ensayo PTOCE que comprende detección en tiempo real a una temperatura prefijada

La reacción se realizó con un volumen final de 20 µl que contenía 100 pg de ADN genómico de NG, 10 pmol de cebador situado en dirección 3' (SEQ ID NO: 10), 10 pmol de cebador situado en dirección 5' (SEQ ID NO: 2), 5 pmol de PTO (SEQ ID NO: 3), 2 pmol de CTO (SEQ ID NO: 11) y 10 µl de Mezcla maestra 2X Plexor® (N.º de catálogo A4100, Promega, EE.UU.); el tubo con la mezcla de reacción se introdujo en un termociclador de tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 ºC y se sometió a 60 ciclos de 30 s a 95 ºC, 60 s a 60 ºC y 30 s a 72 ºC y 5 ciclos de 30 s a 72 ºC y 30 s a 55 ºC. La detección de la señal se realizó a 60 ºC en cada ciclo. La temperatura de detección se determinó en función de que el ácido nucleico bicatenario extendido mantuviera la forma bicatenaria.

La ADN polimerasa que tiene actividad nucleasa 5' de la Mezcla maestra Plexor® se usó para la extensión del cebador situado en dirección 5' y la del cebador situado en dirección 3', la escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO.

Como muestra la Figura 18A, la señal diana (Ct 33,03) se detectó en presencia del molde. No se detectó ninguna señal sin la presencia del molde.

3-2-2. Ensayo PTOCE que comprende análisis de la fusión

Después de la reacción del Ejemplo 3-2-1, se obtuvo la curva de fusión mediante el enfriamiento de la mezcla de reacción a 35 ºC, mantenimiento a 35 ºC durante 30 s y calentamiento lento de 35 ºC a 90 ºC. La fluorescencia se midió continuamente durante el alza de la temperatura para controlar la disociación de las moléculas bicatenarias de ADN. El pico de fusión se dedujo de los datos de la curva de fusión.

Como muestra la Figura 18B, en presencia del molde se detectó un pico a 70,0 ºC correspondiente al valor de T_m esperado del ácido nucleico bicatenario extendido. No se detectó ningún pico sin la presencia del molde. Como el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO no ofrece ninguna señal en este método de marcaje, no hubo ningún pico que correspondiera a dicho híbrido.

3-3. Ensayo PTOCE usando un PTO marcado con molécula amortiguadora y un CTO marcado con molécula indicadora

El PTO está marcado con una molécula amortiguadora (BHQ-1) en su extremo 5'. El CTO está marcado con una molécula indicadora fluorescente (FAM) en su extremo 3'.

Las secuencias del cebador situado en dirección 5', del cebador situado en dirección 3', del PTO y del CTO usadas en este ejemplo son:

NG-F 5'-TACGCCTGCTACTTTCACGCT 3' (SEQ ID NO: 10)
NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
NG-PTO-4 5'-[BHQ-1]ACGACGGCTTGCCCCTCATTGGCGTGTTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 12)
NG-CTO-2 5'-CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[FAM]-3' (SEQ ID NO: 6)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5' del PTO)

3-3-1. Ensayo PTOCE que comprende detección en tiempo real a una temperatura prefijada

La reacción se realizó con un volumen final de 20 µl que contenía 100 pg de ADN genómico de NG, 10 pmol de cebador situado en dirección 3' (SEQ ID NO: 10), 10 pmol de cebador situado en dirección 5' (SEQ ID NO: 2), 5 pmol de PTO (SEQ ID NO: 12), 2 pmol de CTO (SEQ ID NO: 6) y 10 µl de Mezcla maestra 2X que contenía $MgCl_2$ 2,5 mM, dNTP 200 µM y 1,6 unidades de ADN polimerasa H-*Taq* (Solgent, Corea); el tubo con la mezcla de reacción se introdujo en un termociclador de tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 ºC y se sometió a 60 ciclos de 30 s a 95 ºC, 60 s a 60 ºC y 30 s a 72 ºC. La detección de la señal se realizó a 60 ºC en cada ciclo. La temperatura de detección se determinó en función de que el ácido nucleico bicatenario extendido mantuviera la forma bicatenaria y la temperatura fuera superior al valor de T_m del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO.

Como muestra la Figura 19A, la señal diana (Ct 29,79) se detectó en presencia del molde. No se detectó ninguna señal sin la presencia del molde.

3-3-2. Ensayo PTOCE que comprende análisis de la fusión

Después de la reacción del Ejemplo 3-3-1, se obtuvo la curva de fusión mediante el enfriamiento de la mezcla de reacción a 35 ºC, mantenimiento a 35 ºC durante 30 s y calentamiento lento de 35 ºC a 90 ºC. La fluorescencia se midió continuamente durante el alza de la temperatura para controlar la disociación de las moléculas bicatenarias de ADN. El pico de fusión se dedujo de los datos de la curva de fusión.

Como muestra la Figura 19B, en presencia del molde se detectó un pico a 76,5 ºC correspondiente al valor de T_m esperado del ácido nucleico bicatenario extendido. Como el híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO ofrece una señal no diana en este método de marcaje, el pico correspondiente al valor de T_m del híbrido de PTO sin escindir con CTO se detectó a 48,0 ºC sin presencia del molde.

Estos resultados indican que el ensayo PTOCE con detección en tiempo real o análisis de la fusión puede detectar una secuencia de ácidos nucleicos diana.

EJEMPLO 4: Detección de múltiples secuencias de ácidos nucleicos diana mediante el ensayo PTOCE que comprende el análisis de la fusión

También se examinó si el ensayo PTOCE que comprende análisis de la fusión podía detectar múltiples secuencias de ácidos nucleicos diana con el mismo tipo de molécula indicadora.

A la escisión de los PTO y la extensión de los fragmentos del PTO le acompañó la amplificación de las secuencias de ácidos nucleicos diana con el proceso de PCR y la presencia de ácidos nucleicos bicatenarios extendidos se detectó mediante análisis de la fusión tras la PCR (ensayo PTOCE con análisis de la fusión).

Los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos formados durante el ensayo fueron diseñados para tener un marcador interactivo doble. El marcador interactivo doble del ácido nucleico bicatenario extendido se proporcionó en forma de CTO marcado con una molécula indicadora y una molécula amortiguadora en su segmento molde. Los CTO tenían el mismo tipo de molécula indicadora fluorescente (FAM), pero tenían secuencias distintas para generar los diferentes valores de T_m de los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos. El PTO y el CTO están bloqueados con un espaciador de carbonos en sus extremos 3'.

Los ADN genómicos de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) y de *Staphylococcus aureus* (SA) se usaron como ácidos nucleicos diana.

Las secuencias del cebador situado en dirección 5', del cebador situado en dirección 3', de los PTO y de los CTO usados en este ejemplo son:

NG-F 5'-TACGCCTGCTACTTTCACGCT-3' (SEQ ID NO: 10)
NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
NG-PTO-3 5'-ACGACGGCTTGGCCCCTCATTGGCGTGTTTCG[espaciador C3] -3' (SEQ ID NO: 7)
NG-CTO-1 5'-[BHQ-1]CCTCCTCCTCCTCCTCCTCC[T(FAM)]CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3] -3'(SEQ ID NO: 4)
SA-F 5'-TGTTAGAATTTGAACAAGGATTTAATC-3' (SEQ ID NO: 13)
SA-R 5'-GATAAGTTTAAAGCTTGACCGTCTG-3' (SEQ ID NO: 14)
SA-PTO-1 5'-AATCCGACCACGCATTCCGTGGTCAATCATTCGGTTTACG[espaciador C3] -3' (SEQ ID NO: 15)
SA-CTO-1 5'-[BHQ-1]TTTTTTTTTTTTTTTTTGCA[T(FAM)]AGCGTGGTCGGATT[espaciador C3] -3' (SEQ ID NO: 16)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5' del PTO)

La reacción se realizó con un volumen final de 20 µl que contenía 100 pg de ADN genómico de NG, 100 pg de ADN genómico de SA, 10 pmol de cada cebador situado en dirección 3' (SEQ ID NO: 10 y 13), 10 pmol de cada cebador situado en dirección 5' (SEQ ID NO: 2 y 4), 5 pmol de cada PTO (SEQ ID NO: 7 y 15), 2 pmol de cada CTO (SEQ ID NO: 4 y 6) y 10 µl de Mezcla maestra 2X que contenía $MgCl_2$ 2,5 mM, dNTP 200 µM y 1,6 unidades de ADN polimerasa H-*Taq* (Solgent, Corea); el tubo con la mezcla de reacción se introdujo en un termociclador de tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 ºC y se sometió a 60 ciclos de 30 s a 95 ºC, 60 s a 60 ºC y 30 s a 72 ºC. Después de la reacción, se obtuvo la curva de fusión mediante el enfriamiento de la mezcla de reacción a 35 ºC, mantenimiento a 35 ºC durante 30 s y calentamiento lento de 35 ºC a 90 ºC. La fluorescencia se midió continuamente durante el alza de la temperatura para controlar la disociación de las moléculas bicatenarias de ADN. El pico de fusión se dedujo de los datos de la curva de fusión.

Como se muestra en la Figura 20, se detectaron múltiples señales diana (T_m de NG: 75,5 ºC y T_m de SA: 63,5 ºC) en presencia de los moldes. No se detectó ninguna señal sin la presencia de los moldes.

Estos resultados indican que el ensayo PTOCE que comprende el análisis de la fusión permite detectar múltiples ácidos nucleicos diana usando el mismo tipo de molécula indicadora (por ejemplo, FAM) siempre que los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos correspondientes a los ácidos nucleicos diana tengan valores de T_m distintos.

EJEMPLO 5: Evaluación del ensayo PTOCE que comprende análisis de la fusión en una micromatriz

Se examinó con más profundidad el ensayo PTOCE con análisis de la fusión en una micromatriz. La escisión del PTO se realizó en un recipiente distinto y una parte alícuota del resultado se incorporó a una micromatriz que contenía CTO inmovilizado. Tras la reacción de extensión se detectó la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido mediante el análisis de la fusión.

La ADN polimerasa Taq que tiene actividad nucleasa 5' se usó para la extensión del cebador situado en dirección 5', la escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO. El ácido nucleico bicatenario extendido formado durante el ensayo se diseñó para que tuviera un marcador sencillo. El marcador sencillo del ácido nucleico bicatenario extendido consistió en el marcaje del PTO en su extremo 5' con Quasar570 como molécula indicadora fluorescente. El PTO y el CTO están bloqueados con un espaciador de carbonos en sus extremos 3'. El CTO tiene poli$(T)_5$ como brazo de enlace y se inmovilizó sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio a través de un grupo amino (AminoC7) en su extremo 5'. Una sonda marcadora que tiene una molécula indicadora fluorescente (Quasar570) en su extremo 5' se inmovilizó sobre la superficie del portaobjetos de vidrio a través de un grupo amino de su extremo 3'.

Las secuencias del molde sintético, del cebador situado en dirección 5', del PTO, del CTO y del marcador usadas en este ejemplo son:

NG-T 5'-
AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTTGTTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATACC
GATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
NG-PTO-5 5'-[Quasar570]ACGACGGCTTGGCTTTACTGCCCCTCATTGGCGTGTTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 17)
NG-CTO-S1 5'-[AminoC7]TTTTTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3]-3'(SEQ ID NO: 18)
Marcador 5'-[Quasar570]ATATATATAT[AminoC7]-3' (SEQ ID NO: 19)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5' del PTO)

Se usaron portaobjetos NSB9 NHS (NSBPOSTECH, Corea) para la fabricación del CTO y del marcador (SEQ ID NO: 18 y 19). El CTO y el marcador disueltos en tampón de aplicación NSB con una concentración final de 10 µM se imprimieron en los portaobjetos NSB9 NHS con PersonalArrayer™16 Microarray Spotter (CapitalBio, China). El CTO y el marcador se aplicaron uno junto al otro en un formato 2x1 (puntos «sonda» duplicados) y la micromatriz resultante se incubó hasta el día siguiente en una cámara mantenida a ~85 % de humedad. Después, los portaobjetos se lavaron con una solución tampón que contenía 2 x SSPE (cloruro sódico 0,3 M, hidrogenofosfato de sodio 0,02 M y EDTA 2,0 mM), pH 7,4 y SDS 7,0 mM a 37 ºC durante 30 min para eliminar el CTO y el marcador que no se hubieran unido específicamente y se enjuagó con agua destilada. Los portaobjetos con el ADN preparado se secaron en una centrífuga al efecto y se conservaron a oscuras y a 4 ºC hasta su uso.

La reacción de escisión se realizó con un volumen final de 50 µl que contenía 2 pmol de molde sintético (SEQ ID NO: 1) del gen de NG, 10 pmol de cebador situado en dirección 5' (SEQ ID NO: 2), 1 pmol de PTO (SEQ ID NO: 17) y 25 µl de Mezcla maestra 2X que contenía $MgCl_2$ 2,5 mM, dNTP 200 µM y 4 unidades de ADN polimerasa H-Taq (Solgent, Corea); el tubo con la mezcla de reacción se introdujo en un termociclador de tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 ºC y se sometió a 30 ciclos de 30 s a 95 ºC y 60 s

a 63 ºC.

Los 30 µl de la mezcel producto resultante se depositaron en una cámara montada sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio NSB al que se había fijado el CTO (SEQ ID NO: 18). El portaobjetos se colocó en el termobloque del termociclador (GeneProB4I, China). Se prepararon seis portaobjetos iguales para el análisis de la fusión. La reacción de extensión duró 20 min a 55 ºC. Después, los portaobjetos se incubaron 1 min a temperatura ambiente. Por último, cada portaobjetos se lavó con agua destilada durante 1 min a 44 ºC, 52 ºC, 60 ºC, 68 ºC, 76 ºC o 84 ºC. La adquisición de imágenes se efectuó con un escáner láser confocal Axon GenePix4100A (Molecular Device, EE.UU.) con exploración a una resolución de píxel de 5 µm. La intensidad de la fluorescencia se analizó con el software para análisis cuantitativo de micromatrices GenePix pro6.0 (Molecular Device, EE.UU.). La intensidad de la fluorescencia se expresó en forma de mediana de cada mancha tras la preceptiva resta del fondo local. Cada mancha estaba duplicada para la prueba de reproducibilidad. La intensidad de la fluorescencia indica el valor promedio de las manchas duplicadas.

Como se muestra en las Figuras 21A y 21B, se obtuvo la curva de fusión midiendo la intensidad de la fluorescencia de los puntos sonda preparados con distintas temperaturas de lavado. La presencia del ácido nucleico bicatenario extendido se determinó a partir de los datos de la curva de fusión.

EJEMPLO 6: Evaluación del ensayo PTOCE que comprende detección en tiempo real en una micromatriz

Se examinó con mayor detalle el ensayo PTOCE con detección en tiempo real a una temperatura prefijada en una micromatriz.

La escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO se repitieron en una micromatriz que contenía el CTO inmovilizado. La presencia del ácido nucleico bicatenario extendido se detectó a una temperatura prefijada en varios ciclos concretos.

Se usó la ADN polimerasa Taq que tiene actividad nucleasa 5' para la extensión del cebador situado en dirección 5', la escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO.

El ácido nucleico bicatenario extendido formado durante el ensayo se diseñó para tener un marcador sencillo o un marcador interactivo doble. El marcador sencillo del ácido nucleico bicatenario extendido se proporcionó en forma de PTO con una molécula indicadora (PTO marcado con indicador). El marcador interactivo doble del ácido nucleico bicatenario extendido se proporcionó marcando el CTO con una molécula indicadora y una molécula amortiguadora (CTO con marcaje doble). El PTO y el CTO están bloqueados con un espaciador de carbonos en sus extremos 3'.

El CTO tiene un poli(T) como brazo de enlace. El CTO se inmovilizó sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio a través de un grupo amino (AminoC7) en su extremo 5' o en su extremo 3'. Una sonda marcadora que tiene una molécula indicadora fluorescente (Quasar570) en su extremo 5' se inmovilizó sobre la superficie del portaobjetos de vidrio a través de un grupo amino en su extremo 3'. La intensidad de la fluorescencia sobre el portaobjetos de vidrio se midió a una temperatura prefijada. La temperatura de detección se determinó en función de que el ácido nucleico bicatenario extendido mantuviera la forma bicatenaria. El oligonucleótido sintético para *Neisseria gonorrhoeae* (NG) se usó como molde.

6-1. Ensayo PTOCE usando un PTO marcado con molécula indicadora

El PTO incorpora como molécula indicadora fluorescente Quasar570 en su extremo 5'. El CTO se inmovilizó por su extremo 5'. En este método de marcaje, la temperatura de detección se determinó en función de que el ácido nucleico bicatenario extendido mantuviera la forma bicatenaria y la temperatura fuera superior al valor de T_m del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO.

Las secuencias del molde sintético, del cebador situado en dirección 5', del PTO, del CTO y del marcador usadas en este ejemplo son:

NG-T 5'-
AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTTGTTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATACC
GATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
NG-PTO-5 5'-[Quasar570]ACGACGGCTTGGCTTTACTGCCCCTCATTGGCGTGTTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 17)
NG-CTO-S1 5'-[AminoC7]TTTTTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3]-3'(SEQ ID NO: 18)
Marcador 5'-[Quasar570]ATATATATAT[AminoC7]-3' (SEQ ID NO: 19)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5' del PTO)

La preparación del portaobjetos se hizo siguiendo el mismo protocolo del Ejemplo 5.

La reacción del PTOCE se realizó con un volumen final de 30 µl que contenía 2 pmol de molde sintético (SEQ ID NO: 1) del gen de NG, 10 pmol de cebador situado en dirección 5' (SEQ ID NO: 2), 1 pmol de PTO (SEQ ID NO: 17) y 15 µl de Mezcla maestra 2X que contenía $MgCl_2$ 2,5 mM, dNTP 200 µM y 2,4 unidades de ADN polimerasa H-*Taq* (Solgent, Corea); la mezcla entera se depositó en una cámara montada sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio NSB al que se había fijado el CTO (SEQ ID NO: 18). El portaobjetos se colocó en el termobloque del termociclador (GenePro B4I, China). Se prepararon cinco portaobjetos iguales para el análisis del ciclado. La reacción de PTOCE se realizó del modo siguiente: 15 min de desnaturalización a 95 ºC y 0, 5, 10, 20 o 30 ciclos de 30 s a 95 ºC, 60 s a 60 ºC y 60 s a 55 ºC. Después de la reacción con el correspondiente número de ciclos, los portaobjetos se lavaron con agua destilada a 64 ºC durante 1 min. La adquisición de imágenes se efectuó después de cada lavado con un escáner láser confocal Axon GenePix4100A (Molecular Device, EE.UU.) con exploración a una resolución de píxel de 5 µm. La intensidad de la fluorescencia se analizó con el software para análisis cuantitativo de micromatrices GenePix pro6.0 (Molecular Device, EE.UU.). La intensidad de la fluorescencia se expresó en forma de mediana de cada mancha tras la preceptiva resta del fondo local. Cada mancha estaba duplicada para la prueba de reproducibilidad. La intensidad de la fluorescencia indica el valor promedio de las manchas duplicadas.

Como se muestra en las Figuras 22A y 22B, la intensidad de la fluorescencia emitida por la secuencia de ácidos nucleicos diana aumentó con el número de ciclos (Unidades de fluorescencia relativa (RFU) en el ciclo 0: 1304 ± 0,7; RFU a los 5 ciclos: 18,939 ± 1342,1; RFU a los 10 ciclos: 30,619 ± 285,0; RFU a los 20 ciclos: 56,248 ± 2208,3; y RFU a los 30 ciclos: 64,645 ± 1110,2) en presencia del molde. La intensidad de la fluorescencia no cambió en ningún ciclo cuando el molde no estaba presente.

6-2. Ensayo PTOCE con un CTO con marcaje doble

El CTO estaba inmovilizado por su extremo 3' e incorporaba una molécula amortiguadora (BHQ-2) y una molécula indicadora fluorescente (Quasar570) en su segmento molde.

Las secuencias del molde sintético, del cebador situado en dirección 5', del PTO, del CTO y del marcador usadas en este ejemplo son:

NG-T 5'-
AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTTGTTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATACC
GATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
NG-PTO-6 5'-ACGACGGCTTGGCTTTACTGCCCCTCATTGGCGTGTTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 20)
NG-CTO-S2 5'- [BHQ-2]CCTCCTCCTCCTCCTCCTCC[T(Quasar570)]CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGTTTTTTT
TTTT[AminoC7]-3' (SEQ ID NO: 21)
Marcador 5'-[Quasar570]ATATATATAT[AminoC7]-3' (SEQ ID NO: 19)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5' del PTO)

La preparación del portaobjetos se hizo siguiendo el mismo protocolo del Ejemplo 5.

La reacción del PTOCE se realizó con un volumen final de 30 µl que contenía 2 pmol de molde sintético (SEQ ID NO: 1) del gen de NG, 10 pmol de cebador situado en dirección 5' (SEQ ID NO: 2), 1 pmol de PTO (SEQ ID NO: 20) y 15 µl de Mezcla maestra 2X que contenía $MgCl_2$ 2,5 mM, dNTP 200 µM y 2,4 unidades de ADN polimerasa H-*Taq* (Solgent, Corea); la mezcla entera se depositó en una cámara montada sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio NSB al que se había fijado el CTO (SEQ ID NO: 21). El portaobjetos se colocó en el termobloque del termociclador (GenePro B4I, China). Se prepararon cinco portaobjetos iguales para el análisis del ciclado. La reacción de PTOCE se realizó del modo siguiente: 15 min de desnaturalización a 95 ºC y 0, 5, 10, 20 o 30 ciclos de 30 s a 95 ºC, 60 s a 60 ºC y 60 s a 50 ºC. Después de la reacción con el correspondiente número de ciclos, la adquisición de imágenes se efectuó con un escáner confocal láser Axon GenePix4100A (Molecular Device, EE.UU.) con exploración a una resolución de píxel de 5 µm. La intensidad de la fluorescencia se analizó con el software para análisis cuantitativo de micromatrices GenePix pro6.0 (Molecular Device, EE.UU.). La intensidad de la fluorescencia se expresó en forma de mediana de cada mancha tras la preceptiva resta del fondo local. Cada mancha estaba duplicada para la prueba de reproducibilidad. La intensidad de la fluorescencia indica el valor promedio de las manchas duplicadas.

Como se muestra en las Figuras 23A y 23B, la intensidad de la fluorescencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana aumentó con el número de ciclos (RFU en el ciclo 0: 28,078 ± 460,3; RFU a los 5 ciclos: 35,967 ± 555,1; RFU a los 10 ciclos: 44,674 ± 186,0; RFU a los 20 ciclos: 65,423 ± 2,1; y RFU a los 30 ciclos: 65,426 ± 2,8) en presencia del molde. La intensidad de la fluorescencia no cambió en ningún ciclo cuando el molde no estaba presente.

EJEMPLO 7: Detección de múltiples secuencias de ácidos nucleicos diana mediante el ensayo PTOCE que comprende detección de punto final a una temperatura prefijada en una micromatriz

Se examinó con mayor detalle la detección de múltiples dianas mediante el ensayo PTOCE con detección de punto final a una temperatura prefijada en una micromatriz.

La escisión del PTO se realizó en un recipiente distinto al del proceso de PCR y una parte alícuota del resultado se incorporó a la micromatriz que contenía el CTO inmovilizado. Tras la reacción de extensión, la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido se detectó por detección de punto final a una temperatura prefijada.

La ADN polimerasa Taq que tiene actividad nucleasa 5' se usó para la extensión del cebador situado en dirección 5' y del cebador situado en dirección 3', la escisión del PTO y la extensión del fragmento del PTO.

El ácido nucleico bicatenario extendido formado durante el ensayo se diseñó para tener un marcador sencillo. El marcador sencillo del ácido nucleico bicatenario extendido consistió en el marcaje del PTO por su extremo 5' con Quasar570 como molécula indicadora fluorescente. El PTO y el CTO están bloqueados con un espaciador de carbonos en sus extremos 3'.

El CTO tiene poli$(T)_5$ como brazo de enlace y se inmovilizó sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio a través de un grupo amino (AminoC7) en su extremo 5'. Una sonda marcadora que tiene una molécula indicadora fluorescente (Quasar570) en su extremo 5' se inmovilizó sobre la superficie del portaobjetos de vidrio a través de un grupo amino en su extremo 3'.

La intensidad de la fluorescencia en el portaobjetos de vidrio se midió a una temperatura prefijada. La temperatura de detección se determinó en función de que el ácido nucleico bicatenario extendido mantuviera la forma bicatenaria y la temperatura fuera superior al valor de T_m del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO. Se usaron los ADN genómicos de *Staphylococcus aureus* (SA) y de *Neisseria gonorrhoeae* (NG).

Las secuencias del cebador situado en dirección 5', del cebador situado en dirección 3', del PTO, del CTO y del marcador usadas en este ejemplo son:

NG-F 5'- TACGCCTGCTACTTTCACGCT-3' (SEQ ID NO: 10)
NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
NG-PTO-5 5'-[Quasar570]ACGACGGCTTGGCTTTACTGCCCCTCATTGGCGTGTTTCG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 17)
NG-CTO-S1 5'-[AminoC7]TTTTTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[es-paciador C3]-3'(SEQ ID NO: 18)
SA-F 5'-TGTTAGAATTTGAACAAGGATTTAATC-3' (SEQ ID NO: 13)
SA-R2 5'-TTAGCTCCTGCTCCTAAACCA-3' (SEQ ID NO: 22)
SA-PTO-2 5'-[Quasar570]AATCCGACCACGCTATGCTCATTCCGTGGTCAATCATTCGGTTTACG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 23)
SA_CTO-S1 5'-[AminoC7]TTTTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCCCCCAGCATCGCGTGGTCGGATT [espaciadorC3]-3' (SEQ ID NO: 24)
Marcador 5'-[Quasar570]ATATATATAT[AminoC7]-3' (SEQ ID NO: 19)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5' del PTO)

La preparación del portaobjetos se hizo siguiendo el mismo protocolo del Ejemplo 5.

La reacción de escisión se realizó con un volumen final de 50 µl que contenía 100 pg de ADN genómico de SA y/o otros tantos de ADN genómico de NG, 10 pmol de cebador situado en dirección 3' (SEQ ID NO: 10 y/o 13), 10 pmol de cebador situado en dirección 5' (SEQ ID NO: 2 y/o 22), 1 pmol de PTO (SEQ ID NO: 17 y/o 23) y 25 µl de Mezcla maestra 2X que contenía $MgCl_2$ 2,5 mM, dNTP 200 µM y 4 unidades de ADN polimerasa H-Taq (Solgent, Corea); el tubo con la mezcla de reacción se introdujo en un termociclador de tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 ºC y se sometió a 60 ciclos de 30 s a 95 ºC y 60 s a 63 ºC. Los 30 µl de la mezcel producto resultante se depositaron en una cámara montada sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio NSB en el que se habían fijado los CTO (SEQ ID NO: 18 y 24). El portaobjetos se colocó en el termobloque del termociclador (GenePro B4I, China). La reacción de extensión duró 20 min a 55 ºC. Después, los portaobjetos se lavaron con agua destilada a 64 ºC durante 1 min. La adquisición de imágenes se efectuó después de cada lavado con un escáner confocal láser Axon GenePix4100A (Molecular Device, EE.UU.) con exploración a una resolución de píxel de 10 µm. La intensidad de la fluorescencia se analizó con el software para análisis cuantitativo de micromatrices GenePix pro6.0 (Molecular Device, EE.UU.). La intensidad de la fluorescencia se expresó en forma de mediana de cada mancha tras la preceptiva resta del fondo local. Cada mancha estaba duplicada para la prueba de reproducibilidad. La intensidad de la fluorescencia indica el valor promedio de las manchas duplicadas.

Como muestra la Figura 24, la señal diana de SA (RFU: 65,192 ± 198,7) se detectó en presencia del molde de SA. La señal diana de NG (RFU: 65,332 ± 1,4) se detectó en presencia del molde de NG. Tanto la señal diana de SA (RFU: 65,302 ± 0,7) como la de NG (RFU: 65,302 ± 0,7) se detectaron en presencia de ambos moldes.

EJEMPLO 8: Detección de una única variación de nucleótidos de una secuencia de ácido nucleico diana usando el ensayo de Escisión y Extensión de Oligonucleótido de Sondaje y Marcaje (PTOCE, por sus siglas en inglés)

Se examinó si el ensayo PTOCE con ensayo PTO-NV (PTO para Variación de Nucleótidos) puede discriminar una única variación de nucleótidos de una secuencia de ácido nucleico diana.

La escisión de PTO-NV y la extensión del fragmento PTO-NV se acompañaron de la amplificación del ácido nucleico diana por el proceso de PCR y la presencia del ácido nucleico bicatenario extendido se detectó mediante análisis de fusión (análisis de fusión) post-PCR. El cebador en dirección 5' está implicado en la escisión PTO-NV por una enzima que tiene una actividad nucleasa 5' y que participan en la amplificación de la secuencia de ácido diana con cebador en dirección 3' por el proceso de PCR. Se usó ADN polimerasa *Taq* que tiene una actividad nucleasa 5' para la extensión de cebador en dirección 5' y el cebador en dirección 3', la escisión de PTO-NV y la extensión del fragmento PTO-NV.

PTO-NV y CTO se bloquean con un espaciador de carbono en sus extremos 3'. Se utilizaron como moldes ADN genómicos humanos BRAF (V600E) de tipo silvestre (T) y de tipo mutante (A).

PTO-NV no tiene marcador y el sitio de discriminación de variación de un único nucleótido en la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' tiene un nucleótido complementario al molde (A) de tipo mutante. Se examinaron cuatro tipos diferentes de PTO-NV con variación de ubicación del sitio de discriminación de variación de un único nucleótido en la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3'. Los sitios de discriminación de variación de un único nucleótido se encuentran en el primer nucleótido (SEQ ID NO: 27), en el segundo nucleótido (SEQ ID NO: 28), en el tercer nucleótido (SEQ ID NO: 29) y en el cuarto nucleótido (SEQ ID NO: 30) a partir del extremo 5' del segmento localizador en 3' respectivamente.

CTO está marcado con una molécula amortiguadora (BHQ-2) y una molécula indicadora fluorescente (CAL Fluor Red 610) en su segmento molde. Las combinaciones del PTO-NV y CTO son como se indican a continuación: (i) PTO-NV de la SEQ ID NO: 27 y CTO de la SEQ ID NO: 31, (ii) PTO-NV de la SEQ ID NO: 28 y CTO de la SEQ ID NO: 32 (iii) PTO-NV de la SEQ ID NO: 29 y CTO de la SEQ ID NO: 31, (iv) PTO-NV de la SEQ ID NO: 30 y CTO de la SEQ ID NO: 33.

Las secuencias dek cebador en dirección 5', el cebador en dirección 3', PTO-NV y CTO utilizados en este ejemplo son:

BRAF-F 5' CTTCATAATGCTTGCTCTGATAGGIIIIIGAGATCTACT-3' (SEQ ID NO: 25)
BRAF-R 5' ATAGCCTCAATTCTTACCATCCAIIIIITGGATCCAGA-3' (SEQ ID NO: 26)
BRAF-PTO-NV-1 5'-<u>CACAAGGGTGGGT</u>**A**GAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 27)
BRAF-PTO-NV-2 5'-<u>CACAAGGGTGGGTG</u>**A**GAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 28)
BRAF-PTO-NV-3-5'-<u>CACAAGGGTGGGTAG</u>**A**GAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 29)
BRAF-PTO-NV-4-5'-<u>CACAAGGGTGGGTCAG</u>**A**GAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAG[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 30)
BRAF-CTO-1 5'-[BHQ-2]TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT[T(CAL Fluor Red610)]CTCCGAGTTACCCACCCTTGTG [espaciador C3] -3' (SEQ ID NO: 31)
BRAF-CTO-2 5'-[BHQ-2]TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT[T(CAL Fluor Red610)]GCTGAGTACACCCACCCTTGTG [espaciador C3] -3' (SEQ ID NO: 32)
BRAF-CTO-3 5'-[BHQ-2]TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT[T(CAL Fluor Red610)]CGAGTAGAGACCCACCCTTGTG [espaciador C3] -3' (SEQ ID NO: 33)

(I: Desoxiinosina)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5' de PTO-NV)

(Las letras en negrita indica el sitio de discriminación de variación de nucleótidos)

La reacción se realizó en el volumen final de 20 µl que contenía 10 ng de ADN genómico humano BRAF (V600E) de tipo silvestre (T) o mutante (A), 10 pmol de cebador en dirección 5' (SEQ ID NO: 25), 10 pmol de cebador en dirección 3' (SEQ ID NO: 26), 5 pmol de PTO-NV (SEQ ID NO: 27, 28, 29 o 30) y 1 pmol de correspondiente CTO (SEQ ID NO: 31, 32, 31 o 33) y 10 µl de 2X Master Mix que contenía $MgCl_2$ 2,5 mM, 200 µM de dNTP y 1,6 unidades

de ADN polimerasa H-*Taq* (Solgent, Corea); el tubo que contenía la mezcla de reacción se colocó en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 ºC y se sometió a 50 ciclos de 30 s a 95 ºC, 60 s a 55 ºC, 30 s a 72 ºC. Después de la reacción, la curva de fusión se obtuvo por enfriamiento de la mezcla de reacción a 55 ºC, mantenimiento a 55 ºC durante 30 s y calentando lentamente a 55 ºC a 85 ºC. La fluorescencia se midió continuamente durante el aumento de temperatura para controlar la disociación del ADN bicatenario. Pico de fusión se deriva de los datos de la curva de fusión.

Como se muestra en las Figuras 33A y B, se detectaron los picos correspondientes al valor de T_m esperado de los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos para todos los PTO-NV (SEQ ID NO: 27, 28, 29 y 30) en presencia del molde de tipo mutante (A).

No hay picos para los PTO-NV de la SEQ ID NO: 27, 28 y 29 en presencia del molde (T) de tipo silvestre. A pesar de que el PTO-NV de la SEQ ID NO: 30 proporcionó un pico que tenía una altura baja, pudo discriminarse del pico obtenido en presencia del molde de tipo silvestre (T). No se detectó ningún pico en ausencia de los moldes.

Estos resultados muestran que el ensayo PTOCE usando PTO-NV (es decir, ensayo VD-PTOCE) es capaz de discriminar una variación de un único nucleótido.

EJEMPLO 9: Detección de una sola variación de nucleótidos de una secuencia de ácido nucleico diana mediante ensayo PTOCE usando PTO-NV que tiene un resto de emparejamiento de no base

Se examinó adicionalmente si el uso un resto de emparejamiento de no base en PTO-NV mejora el ensayo VD-PTOCE.

Se usó ADN polimerasa *Taq* que tenía una actividad nucleasa 5' para la extensión del cebador en dirección 5’ y el cebador en dirección 3’, la escisión de PTO-NV y la extensión del fragmento PTO-NV.

El ácido nucleico bicatenario extendido se diseñó para que tuviera un marcador dual interactivo. El marcador dual interactivo en el ácido nucleico bicatenario extendido fue proporcionado por CTO marcado con una molécula indicadora y una molécula amortiguadora. PTO-NV y CTO se bloquean con un espaciador de carbono en sus extremos 3’.

Se utilizaron como moldes ADN genómico humano BRAF (V600E) de tipo silvestre (T) y de tipo mutante (A).

El PTO-NV no tiene marcador y el sitio de discriminación de variación de un único nucleótido en la parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’ tiene un nucleótido complementario al molde de tipo mutante (A). El sitio de discriminación de variación de un único nucleótido está situado en el cuarto nucleótido en la parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’.

Se prepararon tres tipos de PTO-NV que tenían un nucleótido de desapareamiento artificial como un resto de emparejamiento de no base en el segundo nucleótido (SEQ ID NO: 34), en el tercer nucleótido (SEQ ID NO: 35) y en el cuarto nucleótido (SEQ ID NO: 36) en dirección 3' desde el sitio de discriminación de variación de un único nucleótido, respectivamente.

El CTO se marca con una molécula amortiguadora (BHQ-2) y una molécula indicadora fluorescente (CAL Fluor Red 610) en su segmento molde (SEQ ID NO: 33).

Un PTO-NV que no tenía ningún resto de emparejamiento de no base se utilizó para la comparación (SEQ ID NO: 30).

Las secuencias de cebador en dirección 5’, cebador en dirección 3’, PTO-NV y CTO utilizadas en este Ejemplo son:

BRAF-F 5’-CTTCATAATGCTTGCTCTGATAGGIIIIIGAGATCTACT-3’ (SEQ ID NO: 25)
BRAF-R 5’-ATAGCCTCAATTCTTACCATCCAIIIIITGGATCCAGA-3’ (SEQ ID NO: 26)
BRAF-PTO-NV-4 5’-CACAAGGGTGGGTCAG**A**GAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAG[espaciador C3]-3’ (SEQ ID NO: 30)
BRAF-PTO-NV-5 5’-CACAAGGGTGGGTCAG**A**GTAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAG[espaciador C3]-3’ (SEQ ID NO: 34)
BRAF-PTO-NV-6 5’-CACAAGGGTGGGTCAG**A**GATATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAG[espaciador C3]-3’ (SEQ ID NO: 35)
BRAF-PTO-NV-7 5’-CACAAGGGTGGGTCAG**A**GAATTCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAG[espaciador C3]-3’ (SEQ ID NO: 36)
BRAF-CTO-3 5’-[BHQ-2]TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT[T(CAL Fluor Red610)]CGAGTAGAGACCCACCCTTGTG [espaciador C3] -3’ (SEQ ID NO: 33)

(I: Desoxiinosina)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5’ de PTO-NV)

(La letra en negrita indica el sitio de discriminación de variante de nucleótidos)

(La letra en una caja indica el nucleótido de desapareamiento artificial que trabaja como un resto de emparejamiento de no base)

La reacción se realizó en el volumen final de 20 µl que contenía 10 ng de ADN genómico humano BRAF (V600E) de tipo silvestre (T) o mutante (A), 10 pmol de cebador en dirección 5’ (SEQ ID NO: 25), 10 pmol de cebador en dirección 3’ (SEQ ID NO: 26), 5 pmol de PTO-NV (SEQ ID NO: 27, 28, 29 o 30) y 1 pmol de correspondiente CTO (SEQ ID NO: 31, 32, 31 o 33) y 10 µl de 2X Master Mix que contenía $MgCl_2$ 2,5 mM, 200 µM de dNTP y 1,6 unidades de ADN polimerasa H-*Taq* (Solgent, Corea); el tubo que contenía la mezcla de reacción se colocó en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 ºC y se sometió a 50 ciclos de 30 s a 95 ºC, 60 s a 55 ºC, 30 s a 72 ºC. Después de la reacción, la curva de fusión se obtuvo por enfriamiento de la mezcla de reacción a 55 ºC, mantenimiento a 55 ºC durante 30 s y calentando lentamente a 55 ºC a 85 ºC. La fluorescencia se midió continuamente durante el aumento de temperatura para controlar la disociación del ADN bicatenario. Pico de fusión se deriva de los datos de la curva de fusión.

Como se muestra en las Figuras 34A y B, los picos correspondientes al valor de T_m esperado de los ácidos nucleicos bicatenarios extendidos y las alturas de los picos fueron similares para todos los PTO-NV (SEQ ID NO: 30, 34, 35 y 36), independientemente de la presencia y la ubicación del resto de emparejamiento de no base en presencia del molde de tipo mutante (A).

En presencia del molde de tipo silvestre (T), se detectaron picos pero las alturas de pico disminuyeron para los PTO-NV (SEQ ID NO: 34, 35 y 36) que tenían resto de emparejamiento de no base en comparación con la altura de los picos para el PTO-NV (SEQ ID NO: 30) que no tenían ningún resto de emparejamiento de no base. No se detectó ningún pico en ausencia de los moldes.

Estos resultados muestran que el uso de un resto de emparejamiento de no base mejora la capacidad de discriminación de PTO-NV.

EJEMPLO 10: Evaluación del ensayo PTOCE usando escisión independiente de oligonucleotídico en dirección 5’ de PTO

El ensayo PTOCE se evaluó adicionalmente para la detección de una secuencia de ácido nucleico diana sin usar oligonucleótido en dirección 5’ en (i) la detección en tiempo real a una temperatura prefijada o (ii) por análisis de fusión.

Se usó ADN polimerasa *Taq* que tenía actividad nucleasa 5' para la escisión de PTO y la extensión del fragmento de PTO.

El ácido nucleico bicatenario extendido formado durante el ensayo se diseñó para que tuviera un marcador dual interactivo. El PTO no tenía marcador. El CTO tenía una molécula amortiguadora (BHQ-1) y una molécula indicadora fluorescente (FAM) en su segmento molde. PTO y CTO se bloquean con un espaciador de carbono en sus extremos 3’. Se usó el oligonucleótido sintético para el gen de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) como molde diana.

Las secuencias de molde sintético, PTO y CTO utilizadas en este Ejemplo son:

NG-T 5'

AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTTGTTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATA

CCGATCCATTGAAAAA-3’ (SEQ ID NO: 1)

NG-PTO-1 5’-<u>ACGACGGCTTGGC</u>TGCCCCTCATTGGCGTGTTTCG[espaciador C3]-3’ (SEQ ID NO: 3)
NG-CTO-1 5’-[BHQ-1]CCTCCTCCTCCTCCTCCTCC[T(FAM)]CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT[espaciador C3]-3’ (SEQ ID NO: 4)

(Las letras subrayadas indican el segmento de marcaje en 5’ de PTO)

<u>10-1. Detección en tiempo real a una temperatura prefijada</u>

La reacción se realizó en el volumen final de 20 µl que contenía 2 pmol de molde sintético (SEQ ID NO: 1) para el gen NG, 5 pmol de PTO (SEQ ID NO: 3), 2 pmol de CTO (SEQ ID NO: 4) y 10 µl de 2X Master Mix que contenía

$MgCl_2$ 2,5 mM, 200 µM de dNTP y 1,6 unidades de ADN polimerasa H-*Taq* (Solgent, Corea); el tubo que contenía la mezcla de reacción se colocó en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 15 min a 95 ºC y se sometió a 30 ciclos de 30 s a 95 ºC, 60 s a 60 ºC. La detección de la señal generada se realizó a 60 ºC de cada ciclo. Se determinó la temperatura de detección en la medida en que el ácido nucleico bicatenario extendido mantenía una forma bicatenaria.

Como se muestra la figura 35A, la señal fluorescente (Ct 1,15) se detectó en presencia del molde. No se detectó señal en ausencia del molde.

10-2. Análisis de fusión

Después de la reacción del Ejemplo 10-1, se obtuvo una curva de fusión enfriando la mezcla de reacción a 55 ºC, manteniendo a 55 ºC durante 30 s y calentando lentamente a 55 ºC a 90 ºC. La fluorescencia se midió continuamente durante el aumento de temperatura para controlar la disociación de los ADN bicatenarios. El pico de fusión se derivó de los datos de la curva de fusión.

Como se muestra la Figura 35B, un pico a 76,0 ºC que correspondía al valor de T_m esperado del ácido nucleico bicatenario extendido se detectó en presencia del molde. No se detectó ningún pico en ausencia del molde.

<110> SEEGENE, INC.

<120> DETECCIÓN DE VARIACIÓN DE NUCLEÓTIDOS EN UNA SECUENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS DIANA MEDIANTE ENSAYO DE ESCISIÓN Y EXTENSIÓN DE PTO

<130> PP130016

<150> US 61/606.713
<151> 05-03-2012

<150> US 61/613.195
<151> 20-03-2012

<150> US 61/668.628
<151> 06-07-2012

<160> 36

<170> KopatentIn 2.0

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

<220>
<223> NG-T

<400> 1

aaatatgcga aacacgccaa tgaggggcat gatgctttct ttttgttctt gctcggcaga 60

gcgagtgata ccgatccatt gaaaaa 86

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

<220>
<223> NG-R

<400> 2
caatggatcg gtatcactcg c 21

<210> 3

<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> NG-PT0-1

<400> 3
acgacggctt ggctgcccct cattggcgtg tttcg 35

<210> 4
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> NG-CTO-1

<400> 4
cctcctcctc ctcctcctcc tccagtaaag ccaagccgtc gt 42

<210> 5
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> NG-PT0-2

<400> 5
acgacggctt ggctttactg cccctcattg gcgtgtttcg 40

<210> 6
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> NG-CT0-2

<400> 6
cctcctcctc ctcctcctcc tccagtaaag ccaagccgtc gt 42

<210> 7
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> NG-PT0-3

<400> 7
acgacggctt ggcccctcat tggcgtgttt cg 32

<210> 8
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> NG-CTO-3

<400> 8
ttttttttt cctcctccag taaagccaag ccgtcgt 37

<210> 9
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> NG-CTO-4

<400> 9
ttttttttt ttttttttag taaagccaag ccgtcgt 37

<210> 10
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> NG-F

<400> 10
tacgcctgct actttcacgc t 21

<210> 11
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> NG-CT05

<400> 11
ctcctccagt aaagccaagc cgtcgt 26

<210> 12
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> NG-PT04

<400> 12
acgacggctt gcccctcatt ggcgtgtttc g 31

<210> 13
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> SA-F

<400> 13
tgttagaatt tgaacaagga tttaatc 27

<210> 14
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> SA-R

<400> 14
gataagttta aagcttgacc gtctg 25

<210> 15
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> SA-PT01

<400> 15
aatccgacca cgcattccgt ggtcaatcat tcggtttacg 40

<210> 16
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> SA-CT01

<400> 16
ttttttttt ttttttgca tagcgtggtc ggatt 35

<210> 17
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> NG-PTO-5

<400> 17
acgacggctt ggctttactg cccctcattg gcgtgtttcg 40

<210> 18
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> NG-CT0-S1

<400> 18
tttttcctcc tcctcctcct cctcctccag taaagccaag ccgtcgt 47

<210> 19
<211> 10
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador

<400> 19
atatatatat 10

<210> 20
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> NG-PT06

<400> 20
acgacggctt ggctttactg cccctcattg gcgtgtttcg 40

<210> 21
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> NG-CT0S2

<400> 21
cctcctcctc ctcctcctcc tccagtaaag ccaagccgtc gttttttttt tt 52

<210> 22
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> SA-R2

<400> 22
ttagctcctg ctcctaaacc a 21

<210> 23
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> SA-PT02

<400> 23
aatccgacca cgctatgctc attccgtggt caatcattcg gtttacg 47

<210> 24
<211> 53
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> SA_CT0S1

<400> 24
tttttcttct tcttcttctt cttcttcttc ccccagcata gcgtggtcgg att 53

<210> 25
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> BRAF-F

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(29)

<400> 25
cttcataatg cttgctctga taggnnnnng agatctact 39

<210> 26
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> BRAF-R

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(28)
<223> n significa desoxiinosina

<400> 26
atagcctcaa ttcttaccat ccannnnntg gatccaga 38

<210> 27
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> BRAF-PT0-NV-1

<400> 27
cacaagggtg ggtagaaatc tcgatggagt gggtcccatc ag 42

<210> 28
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> BRAF-PT0-NV-2

<400> 28
cacaagggtg ggtgagaaat ctcgatggag tgggtcccat cag 43

<210> 29
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> BRAF-PT0-NV-3

<400> 29
cacaagggtg ggtagagaaa tctcgatgga gtgggtccca tcag 44

<210> 30
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> BRAF-PTO-NV-4

<400> 30
cacaagggtg ggtcagagaa atctcgatgg agtgggtccc atcag 45

<210> 31
<211> 43
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> BRAF-CT0-1

<400> 31
ttttttttt ttttttttt tctccgagtt acccaccctt gtg 43

<210> 32
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> BRAF-CT0-2

<400> 32
ttttttttt ttttttttt tgctgagtac acccaccctt gtg 43

<210> 33
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> BRAF-CT0-3

<400> 33
ttttttttt ttttttttt tcgagtagag acccaccctt gtg 43

<210> 34
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> BRAF-PT0-NV-5

<400> 34
cacaagggtg ggtcagagta atctcgatgg agtgggtccc atcag 45

<210> 35
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> BRAF-PT0-NV-6

<400> 35
cacaagggtg ggtcagagat atctcgatgg agtgggtccc atcag 45

<210> 36
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> BRAF-PT0-NV-7

<400> 36
cacaagggtg ggtcagagaa ttctcgatgg agtgggtccc atcag 45

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una variación de nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico diana mediante un ensayo PTOCE (Escisión y Extensión de Oligonucleótido de Sondaje y Marcaje), que comprende:

(a) hibridación de la secuencia de ácido nucleico diana con un cebador en dirección 5' y un PTO-NV (Oligonucleótido de Sondaje y Marcaje para Variación de Nucleótidos); en la que el cebador en dirección 5' comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; el PTO-NV comprende (i) un segmento localizador en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana, (ii) un segmento de marcaje en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (iii) un sitio de discriminación de variación de nucleótidos, que comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótidos en el ácido nucleico diana, posicionado en una parte del extremo 5' del segmento localizador en 3'; en donde el segmento localizador en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y el segmento de marcaje en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana; el cebador en dirección 5' se sitúa en dirección 5' del PTO-NV; la cadena extendida del cebador en dirección 5' induce la escisión del PTO-NV por una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa 5';
(b) puesta en contacto del producto resultante de la etapa (a) con la polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa 5' en condiciones para la escisión del PTO-NV; en donde cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana que tiene la variación de nucleótidos complementaria al sitio de discriminación de variación de nucleótidos y a la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' forma una cadena doble con la secuencia de ácido nucleico diana para inducir la escisión de un primer sitio de escisión inicial, se libera un primer fragmento; en donde cuando el PTO-NV se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana que tiene una variación de nucleótidos no complementaria al sitio de discriminación de variación de nucleótidos y a la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' no forma una cadena doble con la secuencia de ácido nucleico diana para inducir la escisión de un segundo sitio de escisión inicial situado en dirección 3' del primer sitio de escisión inicial, se libera un segundo fragmento; en donde el segundo fragmento comprende un segmento del extremo 3' adicional permitiendo que el segundo fragmento se diferencie del primer fragmento;
(c) hibridación del fragmento liberado del PTO-NV con un CTO (Oligonucleótido de Captura y Molde); en donde el CTO comprende en una dirección de 3' a 5' (i) un segmento de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria al segmento de marcaje en 5' o a una parte del segmento de marcaje en 5' del PTO-NV y (ii) un segmento molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria al segmento de marcaje en 5' y al segmento localizador en 3' del PTO-NV; en donde el primer fragmento o el segundo fragmento liberados del PTO-NV se hibridan con el segmento de captura del CTO;
(d) realización de una reacción de extensión usando el producto resultante de la etapa (c) y una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde; en donde cuando el primer fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO, se extiende para formar una cadena extendida que comprende una secuencia extendida complementaria al segmento molde del CTO; en donde cuando el segundo fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO, no se extiende; y
(e) detección de la presencia de la cadena extendida, por lo que la presencia de la cadena extendida indica la presencia de la variación de nucleótidos complementaria al sitio de discriminación de nucleótidos del PTO-NV.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el CTO tiene una secuencia seleccionada de manera que el CTO no se hibride con el segmento del extremo 3' adicional del segundo fragmento para evitar que el segundo fragmento se extienda cuando el segundo fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sitio de discriminación de variación de nucleótidos se encuentra a 10 nucleótidos de distancia del extremo 5' del segmento localizador en 3' del PTO-NV.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' del PTO-NV comprende un resto de emparejamiento de no base situado a 1-5 nucleótidos de distancia desde el sitio de discriminación de variación de nucleótidos; en donde el resto de emparejamiento de no base potencia la diferenciación entre el primer sitio de escisión inicial y el segundo sitio de escisión inicial.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el resto de emparejamiento de no base ensancha la distancia entre el primer sitio de escisión inicial y el segundo sitio de escisión inicial.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el resto de emparejamiento de no base es (i) un nucleótido que comprende una base desapareada artificial, una base de emparejamiento de no base modificada que no es susceptible de apareamiento de bases o una base universal, (ii) un nucleótido de emparejamiento de no base modificado para que no sea susceptible de emparejamiento de bases, o (iii) un compuesto químico de emparejamiento de no base.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el resto de emparejamiento de no base tiene 1-5 restos.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el sitio de discriminación de variación de nucleótidos y el resto de emparejamiento de no base del PTO-NV están situados a 10 nucleótidos de distancia del extremo 5' del segmento localizador en 3'.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la variación de nucleótidos es una variación de sustitución, una variación de deleción o una variación de inserción.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cadena extendida del primer fragmento y el CTO forman un ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (d); en donde el ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de T_m ajustable por (i) una secuencia y/o una longitud del primer fragmento, (ii) una secuencia y/o una longitud del CTO o (iii) la secuencia y/o la longitud del primer fragmento y la secuencia y/o la longitud del CTO; en donde el ácido nucleico bicatenario extendido proporciona una señal diana mediante (i) al menos un marcador unido al primer fragmento y/o CTO, (ii) un marcador incorporado en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, (iii) al menos un marcador unido al primer fragmento y/o CTO y un marcador incorporado en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión o (iv) marcador intercalante; y en donde la presencia de la cadena extendida se detecta mediante la medición de la señal diana del ácido nucleico bicatenario extendido de acuerdo con un análisis de fusión o un análisis de hibridación para el ácido nucleico bicatenario extendido.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cadena extendida del primer fragmento y el CTO forman un ácido nucleico bicatenario extendido en la etapa (d); en donde el ácido nucleico bicatenario extendido tiene un valor de T_m ajustable por (i) una secuencia y/o longitud del primer fragmento, (ii) una secuencia y/o longitud del CTO o (iii) la secuencia y/o longitud del primer fragmento y la secuencia y/o longitud del CTO; en donde el ácido nucleico bicatenario extendido proporciona una señal diana mediante (i) al menos un marcador unido al primer fragmento y/o al CTO, (ii) un marcador incorporado en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión, (iii) al menos un marcador unido al primer fragmento y/o al CTO y un marcador incorporado en el ácido nucleico bicatenario extendido durante la reacción de extensión o (iv) marcador intercalante; y en donde la presencia de la cadena extendida se detecta mediante la medición de la señal diana del ácido nucleico bicatenario extendido a una temperatura prefijada suficiente para mantener una cadena doble del ácido nucleico bicatenario extendido.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el PTO-NV y/o el CTO están bloqueados en su extremo 3' para evitar su extensión.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método comprende adicionalmente la repetición de todas o algunas de las etapas (a)-(e) con desnaturalización entre ciclos de repetición.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método se realiza para detectar al menos dos tipos de variaciones de nucleótidos; en el que el cebador en dirección 5' comprende al menos dos tipos de cebadores en dirección 5' y el PTO-NV comprende al menos dos tipos de los PTO-NV.

15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el método se realiza en presencia de un cebador en dirección 3'.

16. Un método para detectar una variación de nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico diana mediante un ensayo PTOCE (Escisión y Extensión de Oligonucleótido de Sondaje y Marcaje), que comprende:

(a) hibridación de la secuencia de ácido nucleico diana con un PTO-NV (Oligonucleótido de Sondaje y Marcaje para Variación de Nucleótidos); en la que el PTO-NV comprende (i) un segmento localizador en 3' que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana, (ii) un segmento de marcaje en 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (iii) un sitio de discriminación de variación de nucleótidos, que comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótidos en el ácido nucleico diana, situado en una parte del extremo 5' del segmento localizador en 3'; en donde el segmento localizador en 3' se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y el segmento de marcaje en 5' no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana;

(b) puesta en contacto del producto resultante de la etapa (a) con una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa 5' en las condiciones para la escisión del PTO-NV; en donde cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana que tiene la variación de nucleótidos complementaria al sitio de discriminación de variación de nucleótidos y la parte de extremo 5' del segmento localizador en 3' forma una cadena doble con la secuencia de ácido nucleico diana para inducir la escisión de un primer sitio de escisión inicial, se libera un primer fragmento; en donde cuando el PTO-NV se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana que tiene una variación de nucleótidos no complementaria al sitio de discriminación de variación de nucleótidos y la parte del extremo 5' del segmento localizador en 3' no forma una cadena doble con la secuencia de ácido nucleico diana para inducir la escisión de un segundo sitio de escisión inicial situado en dirección 3' del primer sitio de escisión inicial, se libera un segundo fragmento; en donde el segundo fragmento comprende un segmento del extremo 3' adicional que permite que el segundo fragmento se diferencie del primer fragmento;

(c) hibridación del fragmento liberado del PTO-NV con un CTO (oligonucleótido de captura y molde); en la que el CTO comprende en una dirección de 3’ a 5’ (i) un segmento de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria al segmento de marcaje en 5’ o a una parte del segmento de marcaje en 5' del PTO-NV y (ii) un segmento de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria al segmento de marcaje en 5’ y al segmento localizador en 3' del PTO-NV; en donde el primer fragmento o el segundo fragmento liberados del PTO-NV se hibridan con el segmento de captura del CTO;
(d) realización de una reacción de extensión usando el producto resultante de la etapa (c) y una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde; en donde cuando el primer fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO, se extiende para formar una cadena extendida que comprende una secuencia extendida complementaria al segmento de molde del CTO; en donde cuando el segundo fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO, no se extiende; y
(e) detección de la presencia de la cadena extendida, por lo que la presencia de la cadena extendida indica la presencia de la variación de nucleótidos complementaria al sitio de discriminación de nucleótidos del PTO-NV.

17. Uso de un kit para detectar una variación de nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico diana mediante un ensayo PTOCE (Escisión y Extensión de Oligonucleótido de Sondaje y Marcaje) de acuerdo con el método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende:

(a) un PTO-NV (Oligonucleótido de Sondaje y Marcaje para Variación de Nucleótidos); en donde el PTO-NV comprende (i) un segmento localizador en 3’ que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana, (ii) un segmento de marcaje en 5’ que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (iii) un sitio de discriminación de variación de nucleótidos que comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótidos en el ácido nucleico diana, situado en una parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’; en donde el segmento localizador en 3’ se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y el segmento de marcaje en 5’ no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana;
b) un cebador en dirección 5’; en donde el cebador en dirección 5’ comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; en donde el cebador en dirección 5’ se sitúa en dirección 5’ del PTO-NV; la cadena extendida del cebador en dirección 5’ induce la escisión del PTO-NV por una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa 5'; y
(c) un CTO (Oligonucleótido de Captura y Molde); en donde el CTO comprende en una dirección de 3’ a 5’ (i) un segmento de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria al segmento de marcaje en 5’ o a una parte del segmento de marcaje en 5’ del PTO-NV y (ii) un segmento de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria al segmento de marcaje en 5’ y al segmento localizador en 3’ del PTO-NV;

en donde cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana que tiene la variación de nucleótidos complementaria al sitio de discriminación de variación y la parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’ forma una cadena doble con la secuencia de ácido nucleico diana para inducir la escisión de un primer sitio de escisión inicial, se libera un primer fragmento;
en donde cuando el PTO-NV se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana que tiene una variación de nucleótidos no complementaria al sitio discriminación de variación y la parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’ no forma una cadena doble con la secuencia de ácido nucleico diana para inducir la escisión de un segundo sitio de escisión inicial situado en dirección 3’ del primer sitio de escisión inicial, se libera un segundo fragmento; en donde el segundo fragmento comprende un segmento del extremo 3’ adicional que permite que el segundo fragmento se diferencie del primer fragmento; en donde el primer fragmento o el segundo fragmento liberados del PTO-NV se hibridan con el segmento de captura del CTO.

18. El uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el kit comprende adicionalmente una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde que tiene la actividad nucleasa 5'; en donde cuando el primer fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO, se extiende para formar una cadena extendida que comprende una secuencia extendida complementaria al segmento molde del CTO; en donde cuando el segundo fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO, no se extiende.

19. El uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el CTO tiene una secuencia seleccionada de manera que el CTO no se hibrida con el segmento del extremo 3’ adicional del segundo fragmento para evitar que el segundo fragmento se extienda cuando el segundo fragmento se hibrida con el segmento de captura del CTO.

20. El uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’ del PTO-NV comprende un resto de emparejamiento de no base situado a 1-5 nucleótidos de distancia del sitio de discriminación de variación de nucleótidos; en donde el resto de emparejamiento de no base potencia la diferenciación entre el primer sitio de escisión inicial y el segundo sitio de escisión inicial.

21. Un uso de un kit para detectar una variación de nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico diana mediante un ensayo PTOCE (Escisión y Extensión de Oligonucleótido de Sondaje y Marcaje) de acuerdo con el método como se define en la reivindicación 16, que comprende:

(a) un PTO-NV (Oligonucleótido de Sondaje y Marcaje para Variación de Nucleótidos); en donde el PTO-NV comprende (i) un segmento localizador en 3’ que comprende una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana, (ii) un segmento de marcaje en 5’ que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (iii) un sitio de discriminación de variación de nucleótidos que comprende una secuencia complementaria a la variación de nucleótidos en el ácido nucleico diana, situada en una parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’; en donde el segmento localizador en 3’ se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y el segmento de marcaje en 5’ no se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana;

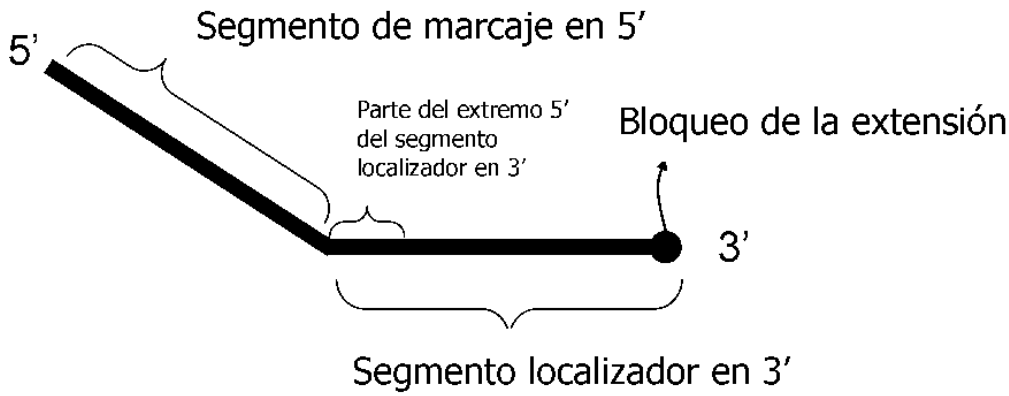
(b) un CTO (Oligonucleótido de Captura y Molde); en donde el CTO comprende en una dirección de 3' a 5' (i) un segmento de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria al segmento de marcaje en 5’ o a una parte del segmento de marcaje en 5’ del PTO-NV y (ii) un segmento de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria al segmento de marcaje en 5’ y al segmento localizador en 3’ del PTO-NV;

en donde cuando el PTO-NV se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana que tiene la variación de nucleótidos complementaria al sitio de discriminación de variación y la parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’ forma una cadena doble con la secuencia de ácido nucleico diana para inducir la escisión de un primer sitio de escisión inicial, se libera un primer fragmento;

en donde cuando el PTO-NV se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana que tiene una variación de nucleótidos no complementaria al sitio de discriminación de variación y la parte del extremo 5’ del segmento localizador en 3’ no forma una cadena doble con la secuencia de ácido nucleico diana para inducir la escisión de un segundo sitio de escisión inicial situado en dirección 3’ del primer sitio de escisión inicial, se libera un segundo fragmento; en donde el segundo fragmento comprende un segmento del extremo 3’ adicional que permite que el segundo fragmento se diferencie del primer fragmento; en donde el primer fragmento o el segundo fragmento liberados del PTO-NV se hibridan con el segmento de captura del CTO.

Fig. 1

A. Oligonucleótido de sondeo y marcaje (PTO)



B. Oligonucleótido de captura y molde (CTO)

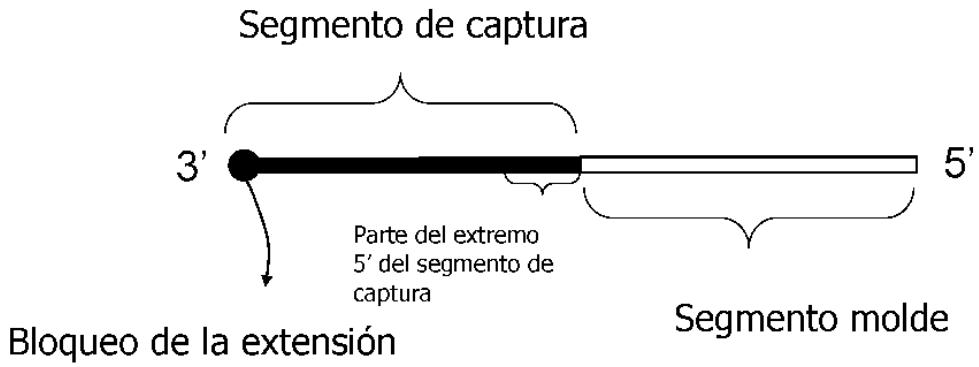


Fig. 2

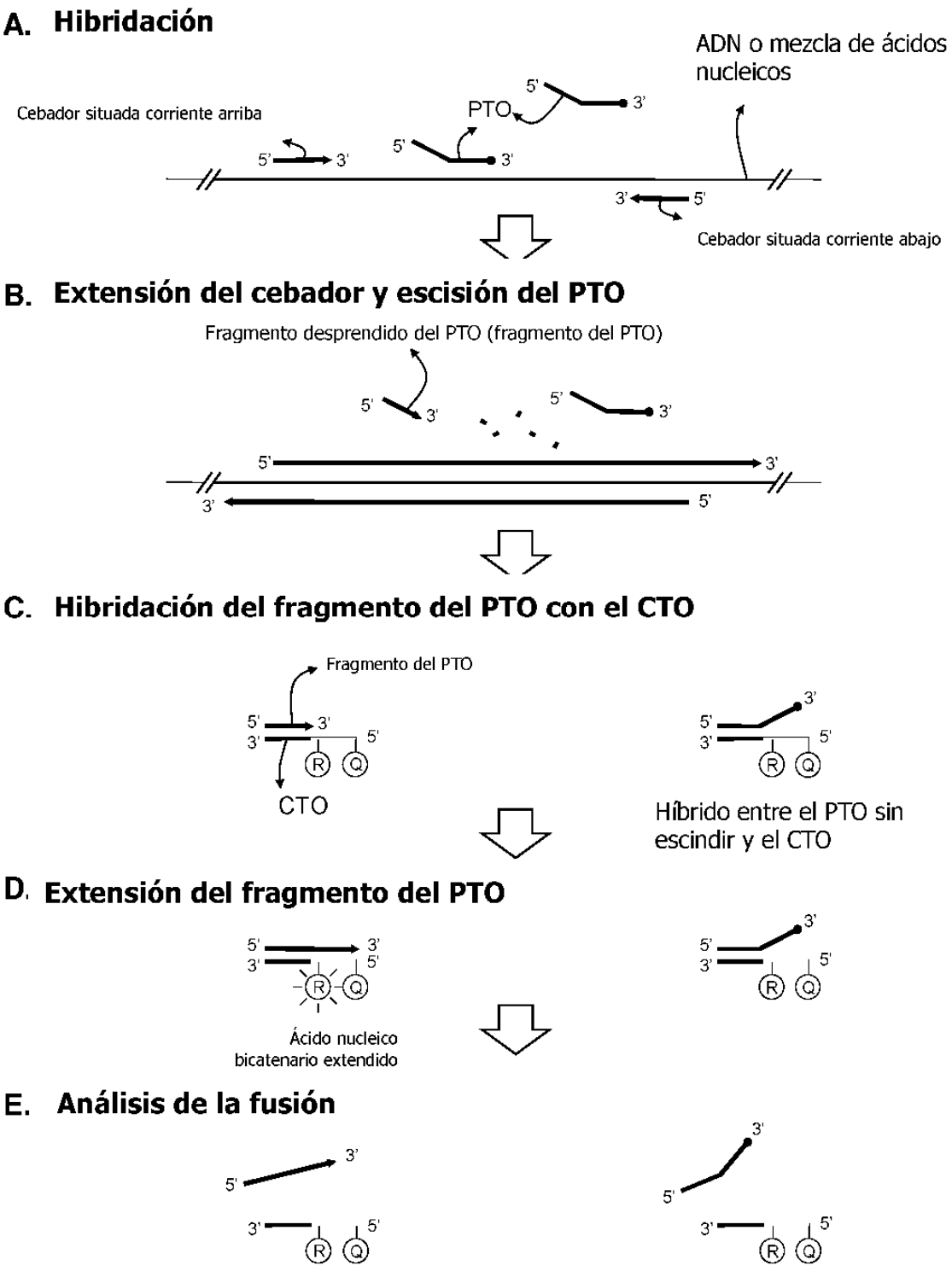

A. Hibridación
ADN o mezcla de ácidos nucleicos
Cebador situada corriente arriba
PTO
5'
3'
Cebador situada corriente abajo
B. Extensión del cebador y escisión del PTO
Fragmento desprendido del PTO (fragmento del PTO)
C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO
Fragmento del PTO
CTO
R
Q
Híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO
D. Extensión del fragmento del PTO
Ácido nucleico bicatenario extendido
E. Análisis de la fusión

Fig. 3

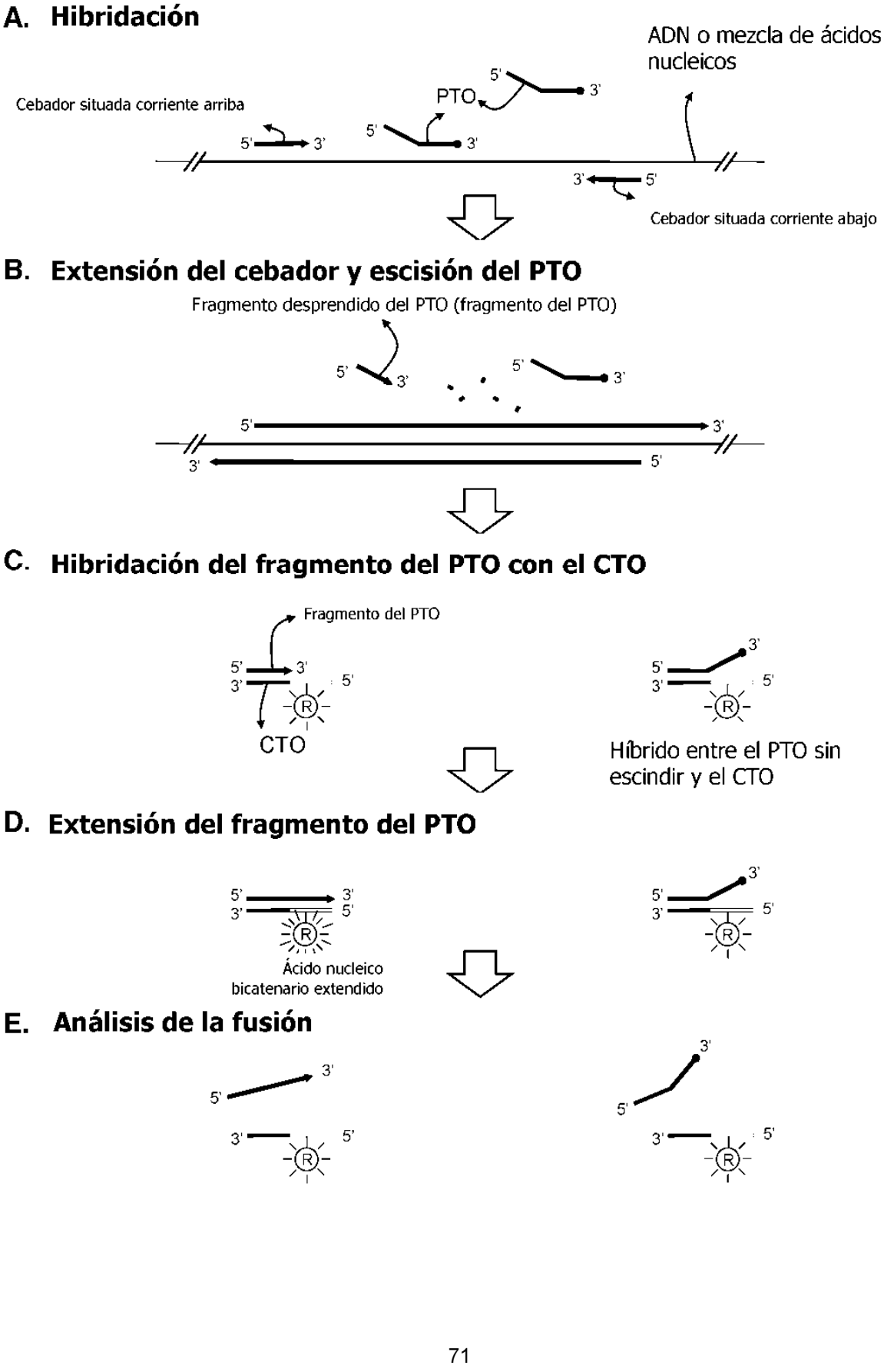

A. Hibridación
ADN o mezcla de ácidos nucleicos
Cebador situada corriente arriba
PTO
5'
3'
Cebador situada corriente abajo
B. Extensión del cebador y escisión del PTO
Fragmento desprendido del PTO (fragmento del PTO)
C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO
Fragmento del PTO
CTO
R
Híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO
D. Extensión del fragmento del PTO
Ácido nucleico bicatenario extendido
E. Análisis de la fusión

Fig. 4

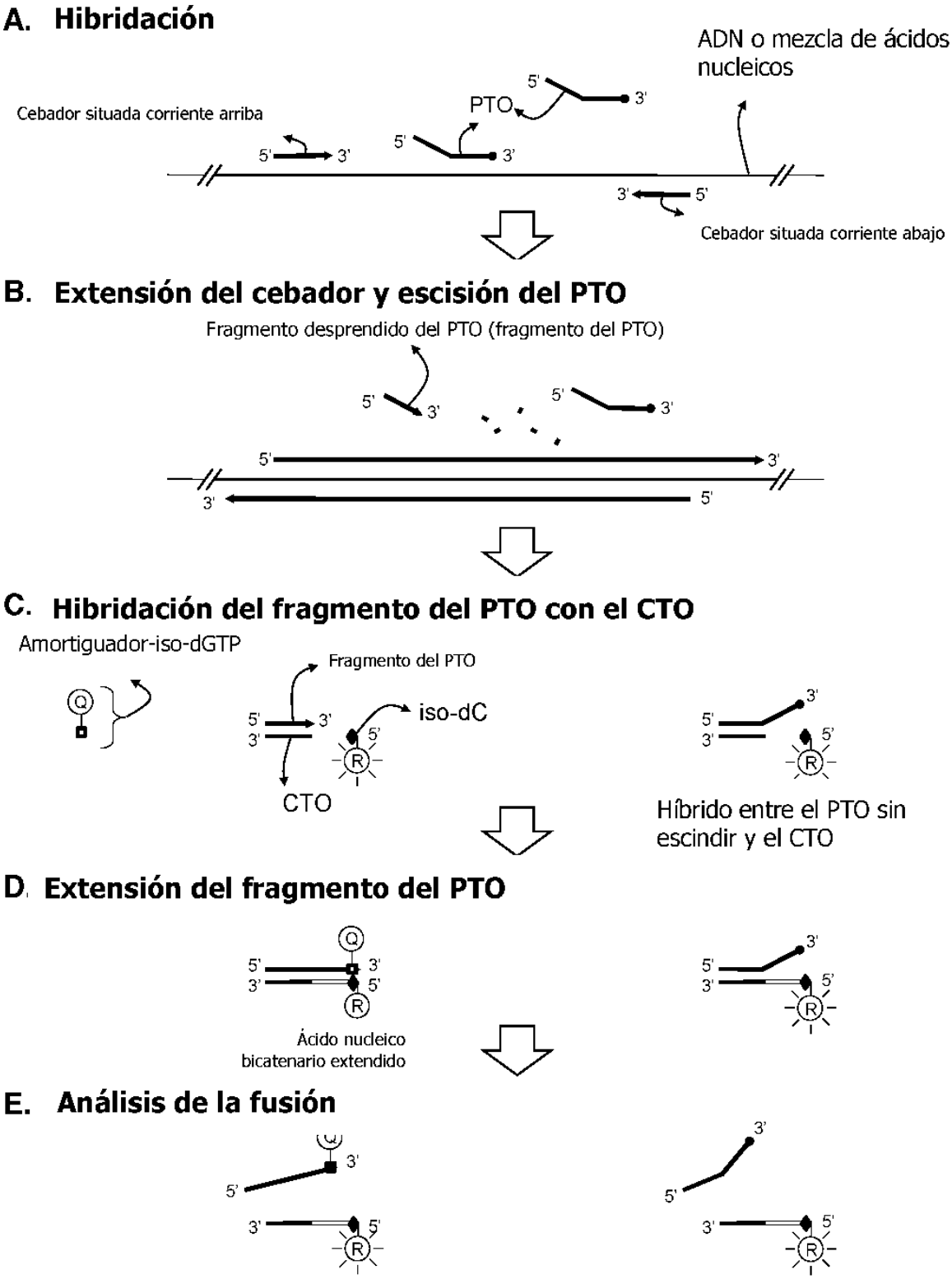

A. Hibridación
ADN o mezcla de ácidos nucleicos
Cebador situada corriente arriba
PTO
5'
3'
Cebador situada corriente abajo
B. Extensión del cebador y escisión del PTO
Fragmento desprendido del PTO (fragmento del PTO)
C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO
Amortiguador-iso-dGTP
Fragmento del PTO
iso-dC
CTO
Híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO
D. Extensión del fragmento del PTO
Ácido nucleico bicatenario extendido
E. Análisis de la fusión

Fig. 5

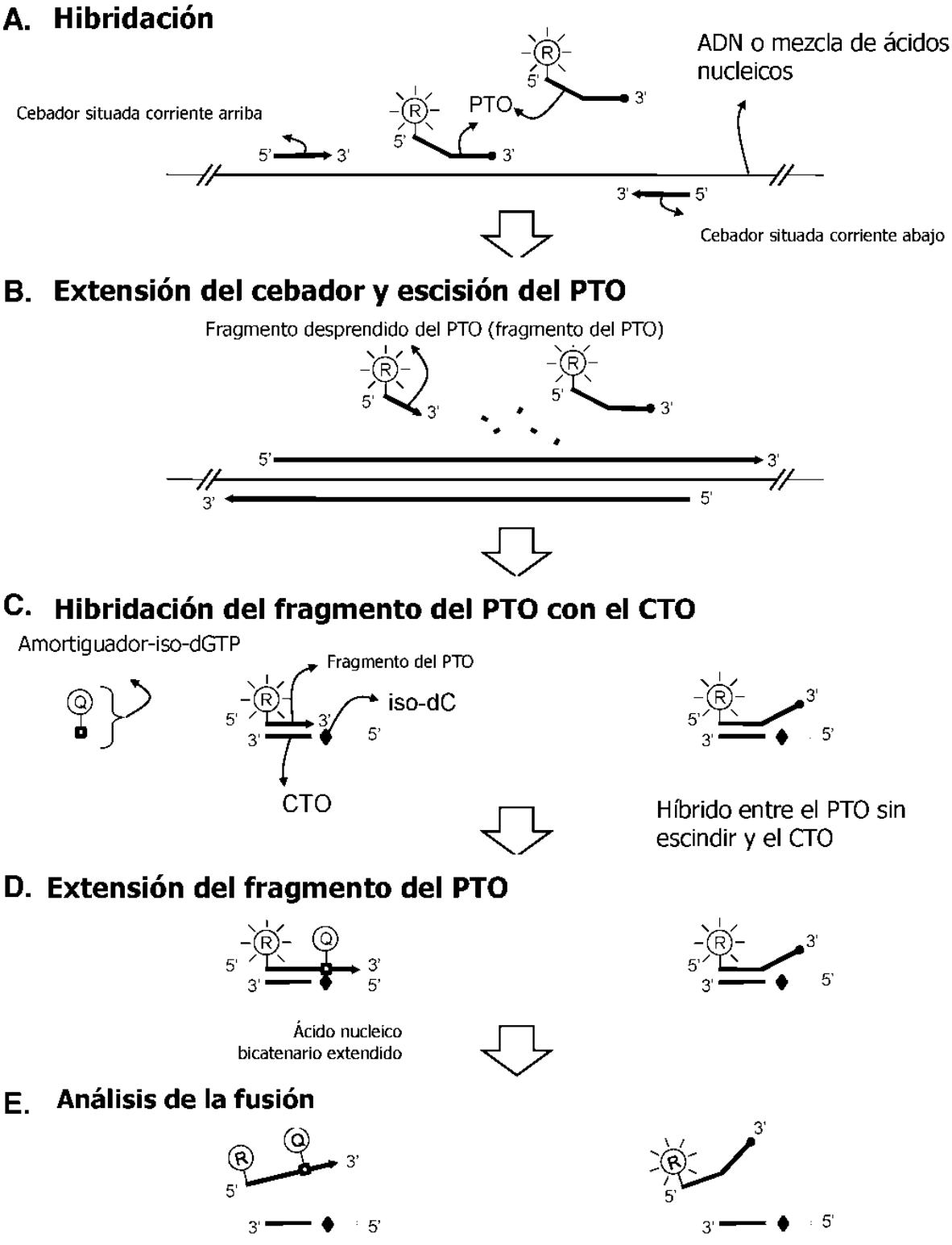

A. Hibridación
ADN o mezcla de ácidos nucleicos
Cebador situada corriente arriba
PTO
Cebador situada corriente abajo
B. Extensión del cebador y escisión del PTO
Fragmento desprendido del PTO (fragmento del PTO)
C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO
Amortiguador-iso-dGTP
Fragmento del PTO
iso-dC
CTO
Híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO
D. Extensión del fragmento del PTO
Ácido nucleico bicatenario extendido
E. Análisis de la fusión

Fig. 6

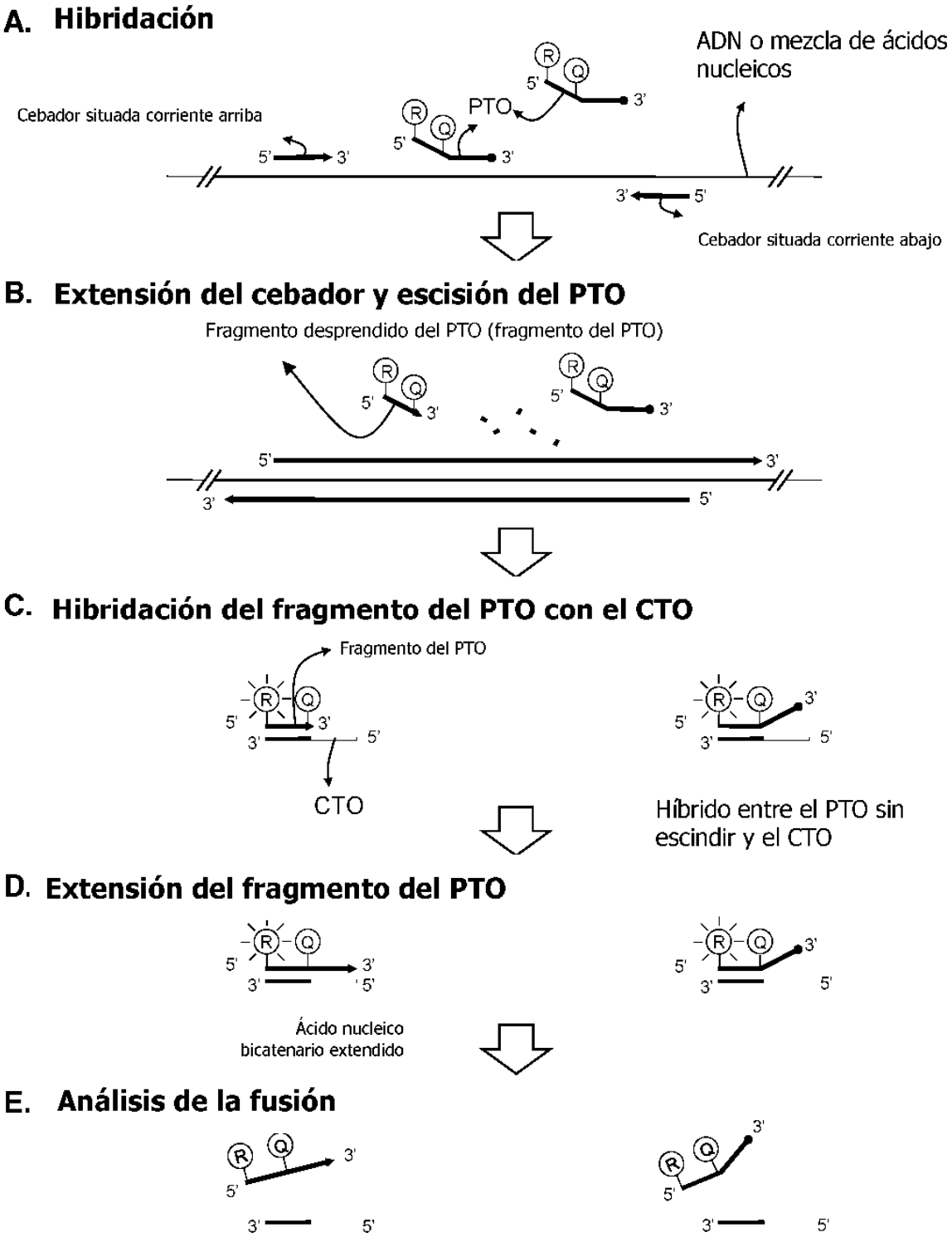

A. Hibridación
ADN o mezcla de ácidos nucleicos
Cebador situada corriente arriba
PTO
Cebador situada corriente abajo
B. Extensión del cebador y escisión del PTO
Fragmento desprendido del PTO (fragmento del PTO)
C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO
Fragmento del PTO
CTO
Híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO
D. Extensión del fragmento del PTO
Ácido nucleico bicatenario extendido
E. Análisis de la fusión

Fig. 7

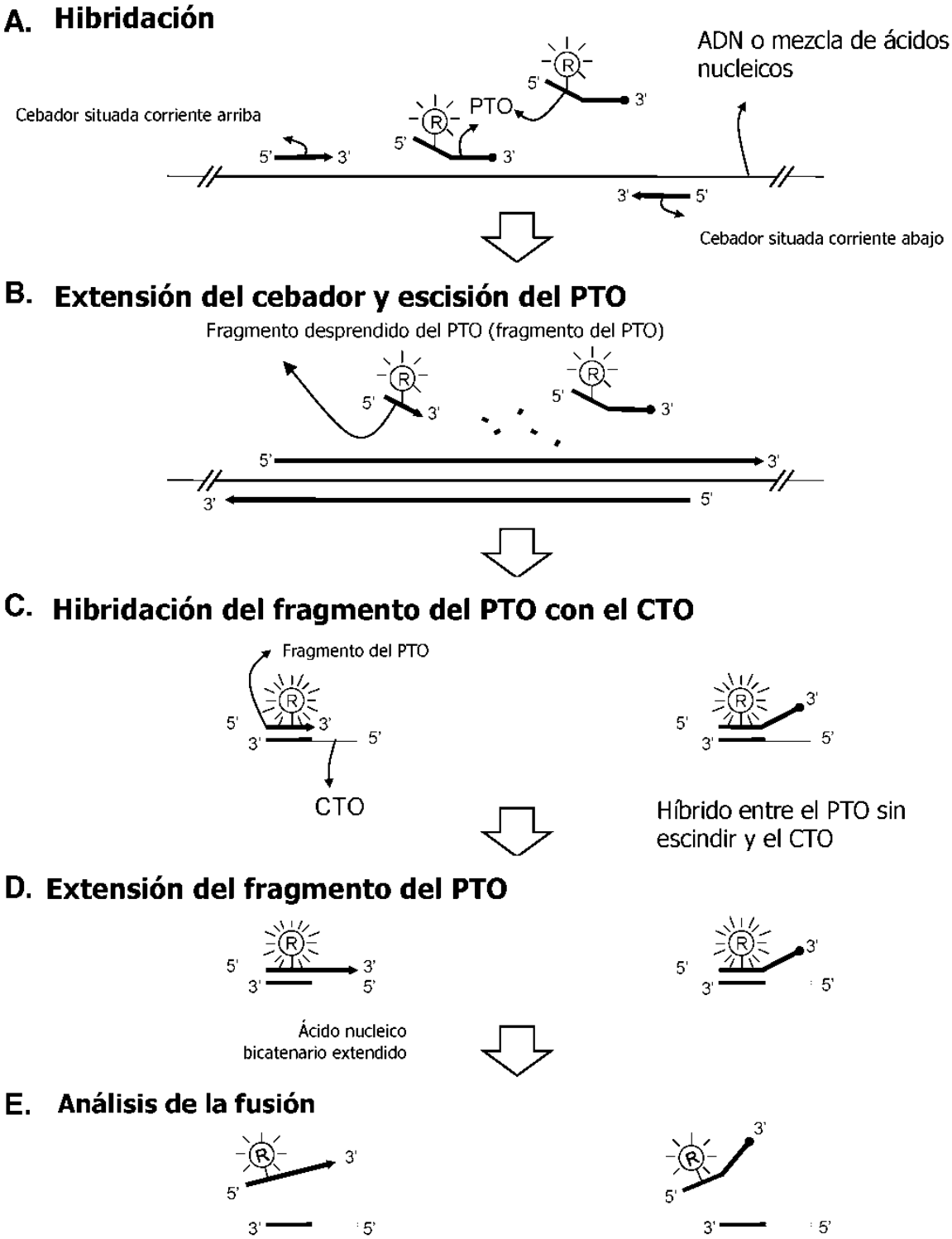

A. Hibridación
ADN o mezcla de ácidos nucleicos
Cebador situada corriente arriba
PTO
Cebador situada corriente abajo
B. Extensión del cebador y escisión del PTO
Fragmento desprendido del PTO (fragmento del PTO)
C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO
Fragmento del PTO
CTO
Híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO
D. Extensión del fragmento del PTO
Ácido nucleico bicatenario extendido
E. Análisis de la fusión

Fig. 8

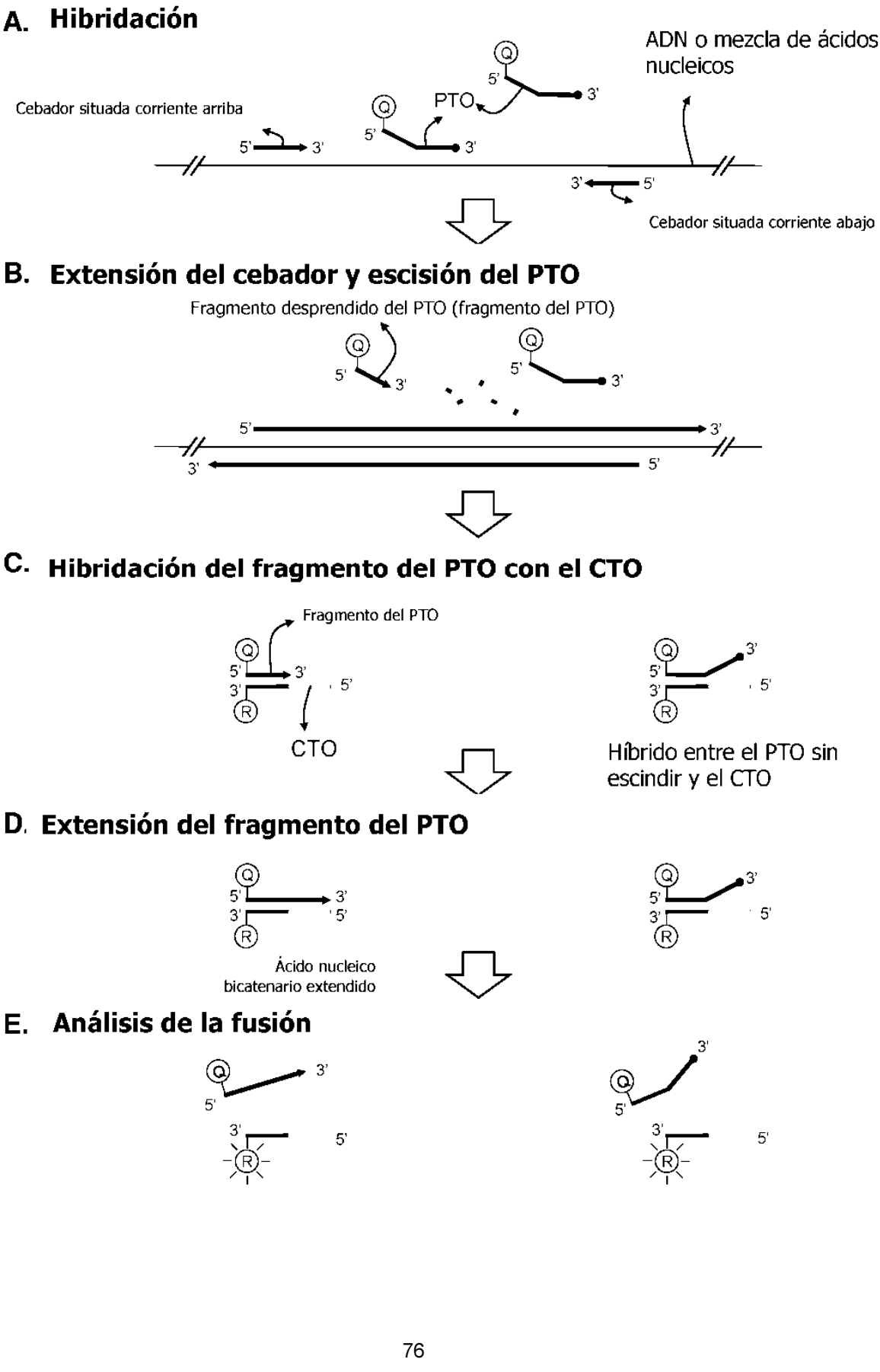

A. Hibridación
ADN o mezcla de ácidos nucleicos
Cebador situada corriente arriba
PTO
Cebador situada corriente abajo
B. Extensión del cebador y escisión del PTO
Fragmento desprendido del PTO (fragmento del PTO)
C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO
Fragmento del PTO
CTO
Híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO
D. Extensión del fragmento del PTO
Ácido nucleico bicatenario extendido
E. Análisis de la fusión

Fig. 9

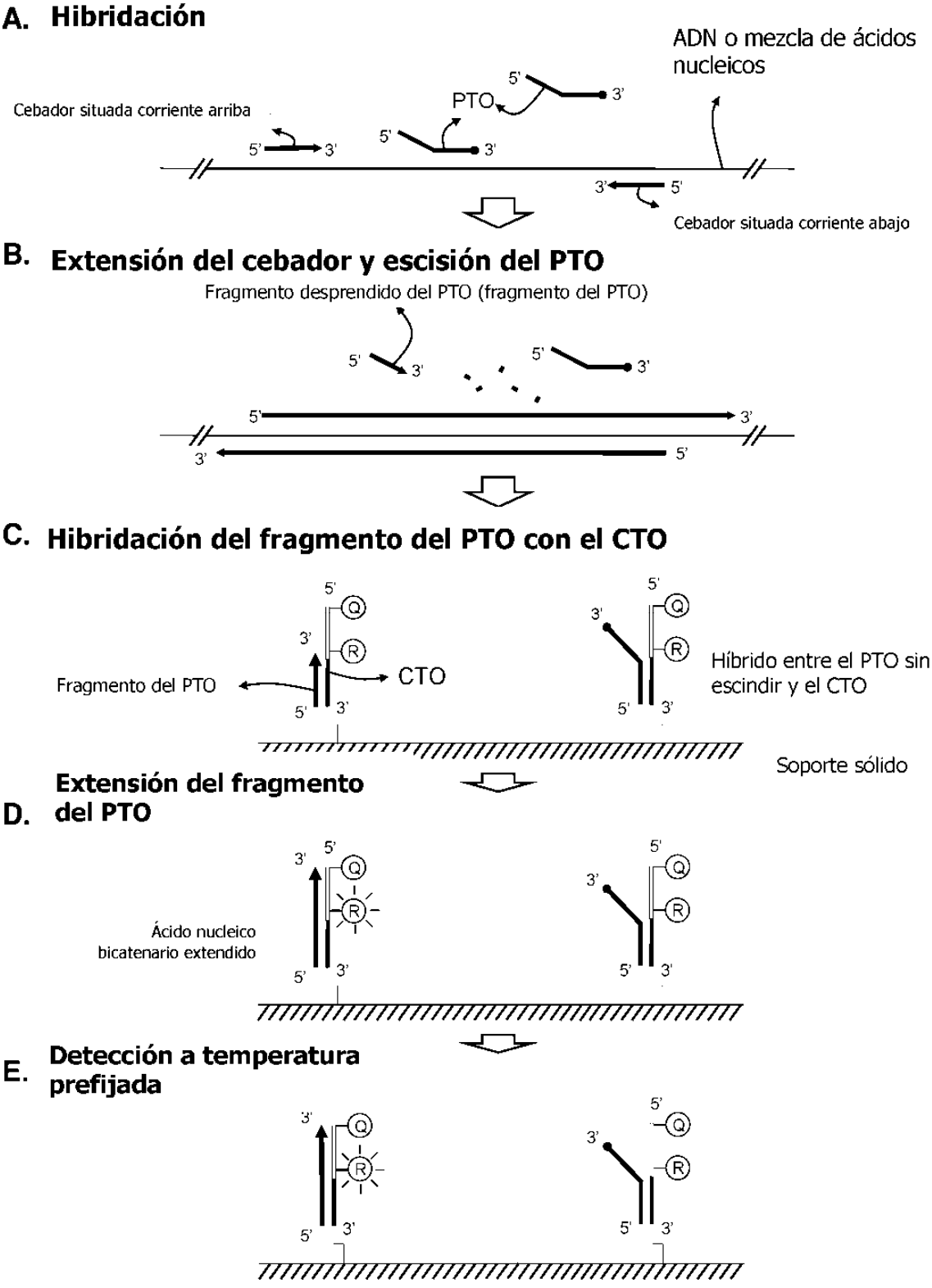

A. Hibridación
ADN o mezcla de ácidos nucleicos
Cebador situada corriente arriba
PTO
5'
3'
Cebador situada corriente abajo
B. Extensión del cebador y escisión del PTO
Fragmento desprendido del PTO (fragmento del PTO)
C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO
Fragmento del PTO
CTO
Híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO
Soporte sólido
D. Extensión del fragmento del PTO
Ácido nucleico bicatenario extendido
E. Detección a temperatura prefijada
Q
R

Fig. 10

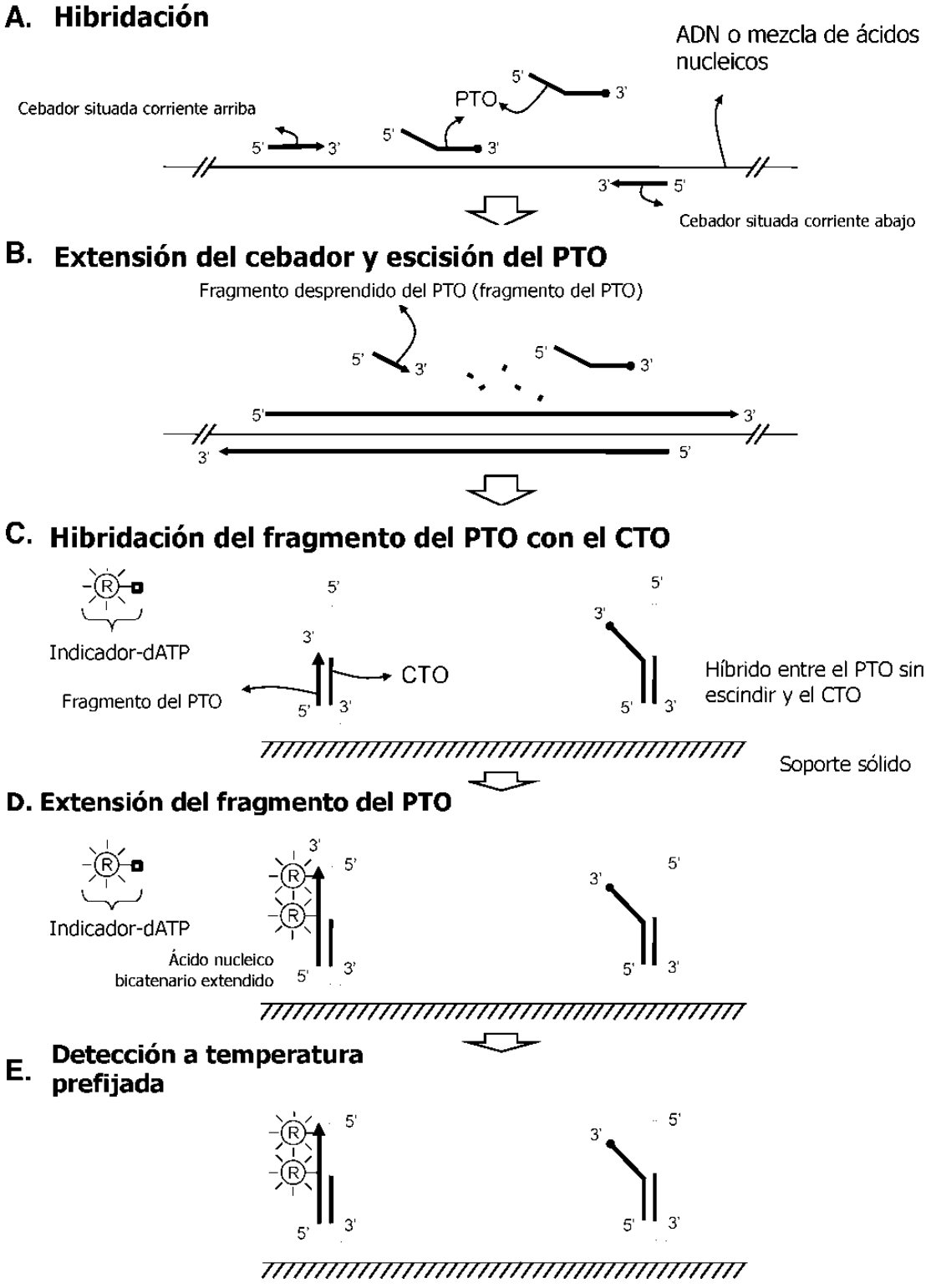

A. Hibridación
ADN o mezcla de ácidos nucleicos
Cebador situada corriente arriba
PTO
5'
3'
Cebador situada corriente abajo
B. Extensión del cebador y escisión del PTO
Fragmento desprendido del PTO (fragmento del PTO)
C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO
Indicador-dATP
Fragmento del PTO
CTO
Híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO
Soporte sólido
D. Extensión del fragmento del PTO
Indicador-dATP
Ácido nucleico bicatenario extendido
E. Detección a temperatura prefijada

Fig. 11

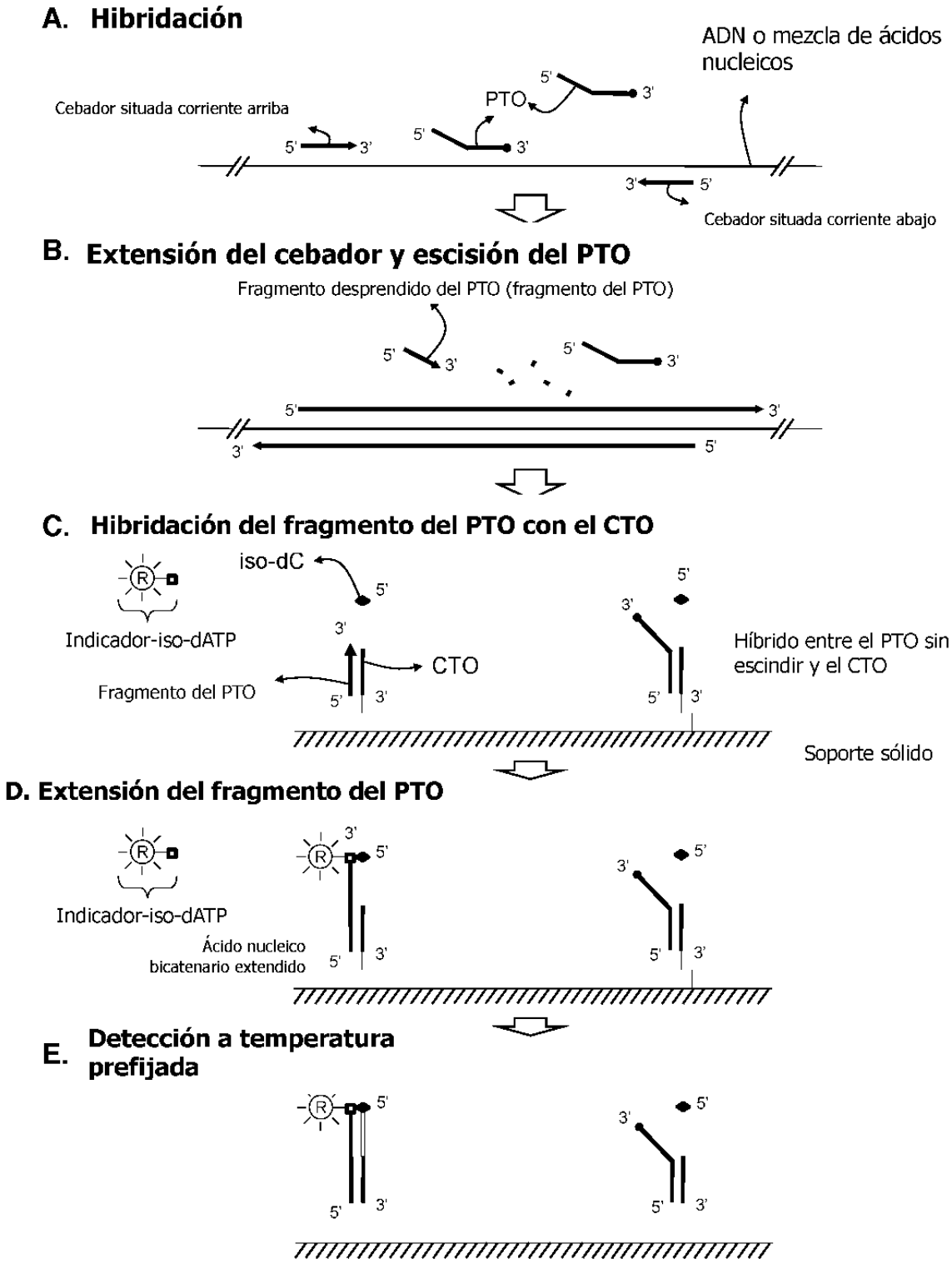

A. Hibridación
ADN o mezcla de ácidos nucleicos
Cebador situada corriente arriba
PTO
5'
3'
Cebador situada corriente abajo
B. Extensión del cebador y escisión del PTO
Fragmento desprendido del PTO (fragmento del PTO)
C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO
iso-dC
Indicador-iso-dATP
Fragmento del PTO
CTO
Híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO
Soporte sólido
D. Extensión del fragmento del PTO
Indicador-iso-dATP
Ácido nucleico bicatenario extendido
E. Detección a temperatura prefijada

Fig. 12

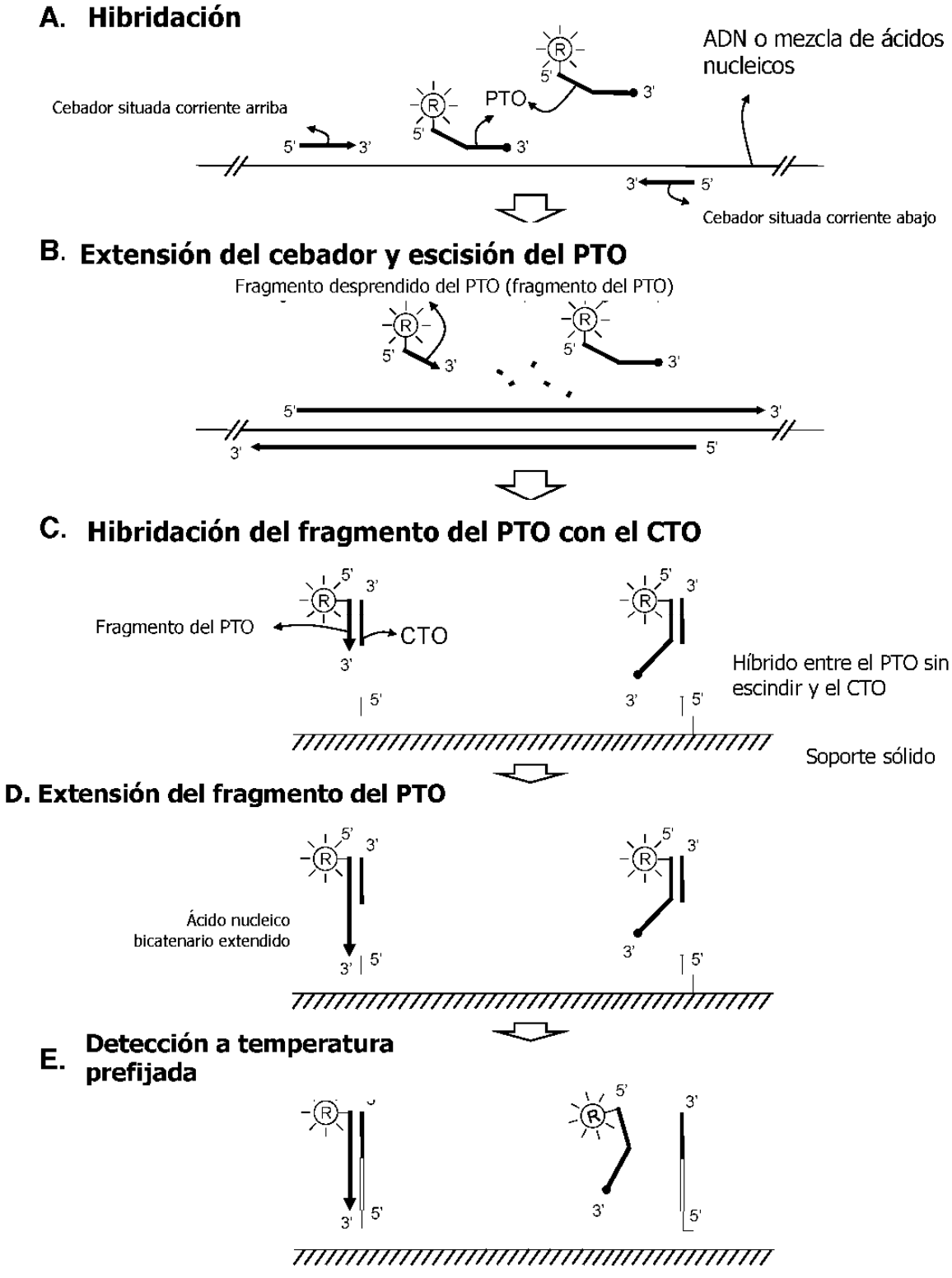

A. Hibridación
ADN o mezcla de ácidos nucleicos
Cebador situada corriente arriba
PTO
Cebador situada corriente abajo
B. Extensión del cebador y escisión del PTO
Fragmento desprendido del PTO (fragmento del PTO)
C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO
Fragmento del PTO
CTO
Híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO
Soporte sólido
D. Extensión del fragmento del PTO
Ácido nucleico bicatenario extendido
E. Detección a temperatura prefijada

Fig. 13

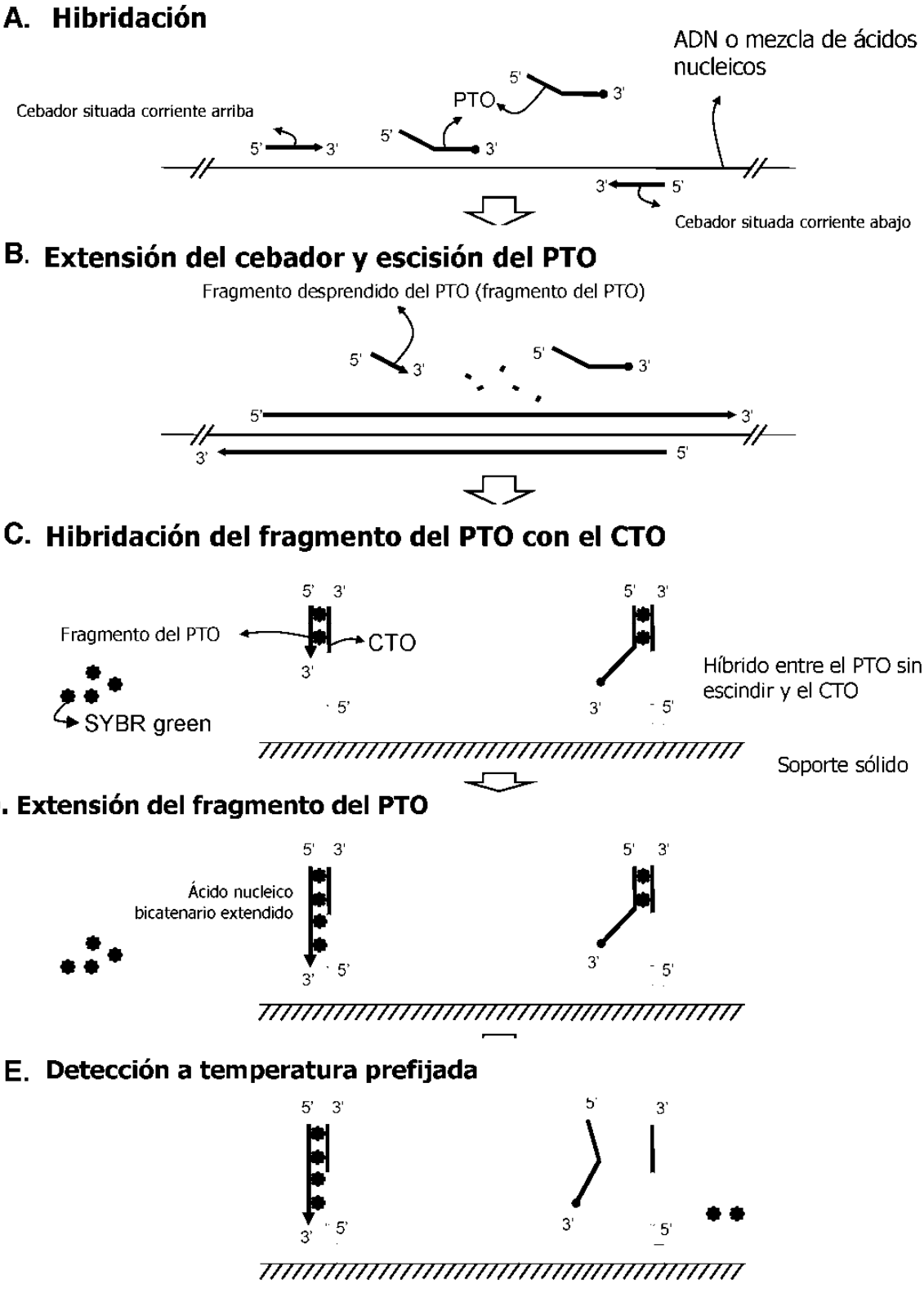
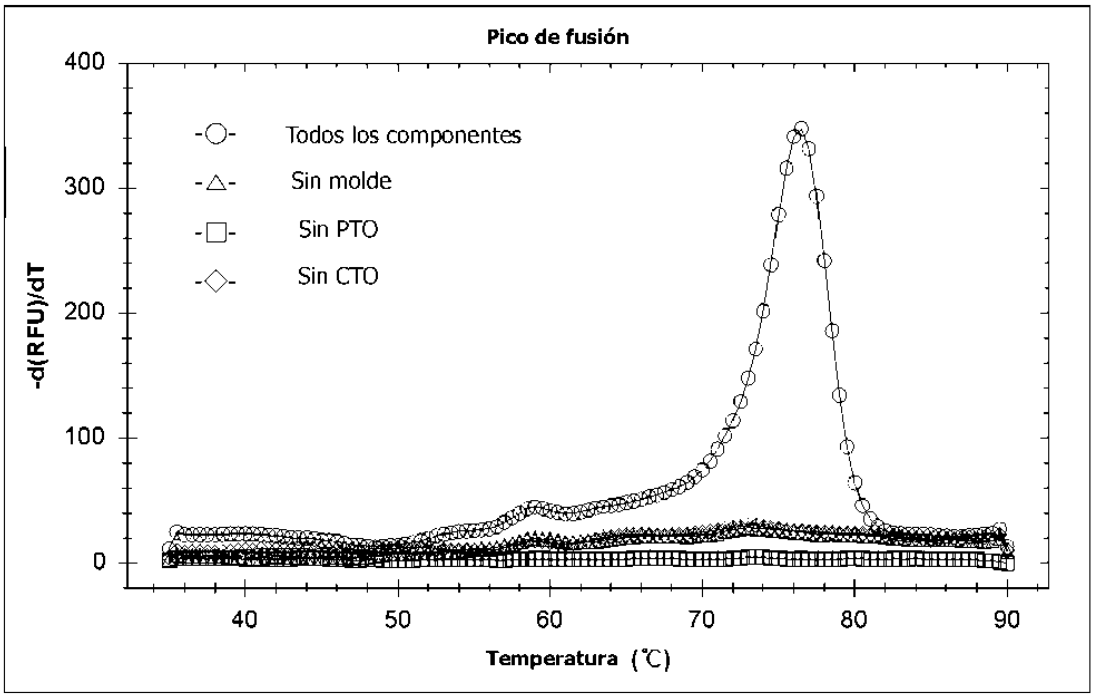

A. Hibridación
ADN o mezcla de ácidos nucleicos
Cebador situada corriente arriba
PTO
5'
3'
Cebador situada corriente abajo
B. Extensión del cebador y escisión del PTO
Fragmento desprendido del PTO (fragmento del PTO)
C. Hibridación del fragmento del PTO con el CTO
Fragmento del PTO
CTO
SYBR green
Híbrido entre el PTO sin escindir y el CTO
Soporte sólido
D. Extensión del fragmento del PTO
Ácido nucleico bicatenario extendido
E. Detección a temperatura prefijada

Fig. 14

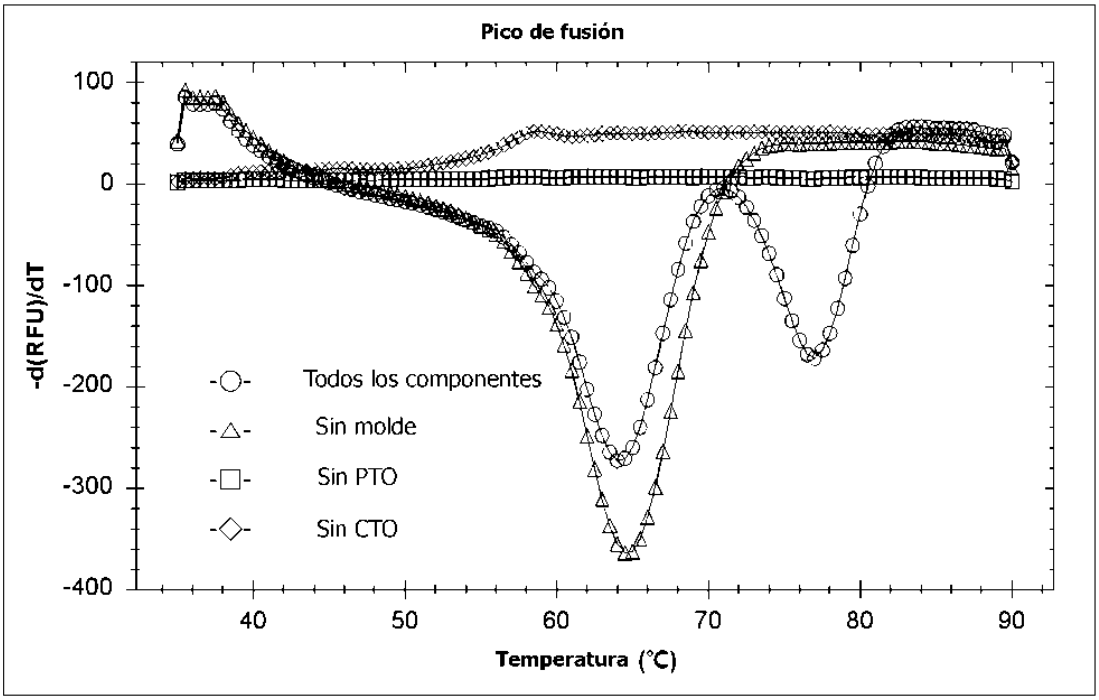


Molde [1]	Cebador situada corriente arriba	PTO [2]	CTO [3]	Tm (°C)	
				Diana [4]	No diana [5]
+	+	+	+	76,5	-
-	+	+	+	-	-
+	+	-	+	-	-
+	+	+	-	-	-

[1] **El molde es un oligonucleótido sintético para el gen de Neisseria gonorrhoeae.**
[2] **El PTO no tiene marcador.**
[3] **El CTO incorpora una molécula amortiguadora y una molécula indicadora fluorescente en su segmento molde.**

[4] **La diana representa una señal diana que es la Tm del ácido nucleico bicatenario extendido.**
[5] **La no diana representa una señal no diana que es la Tm del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO.**

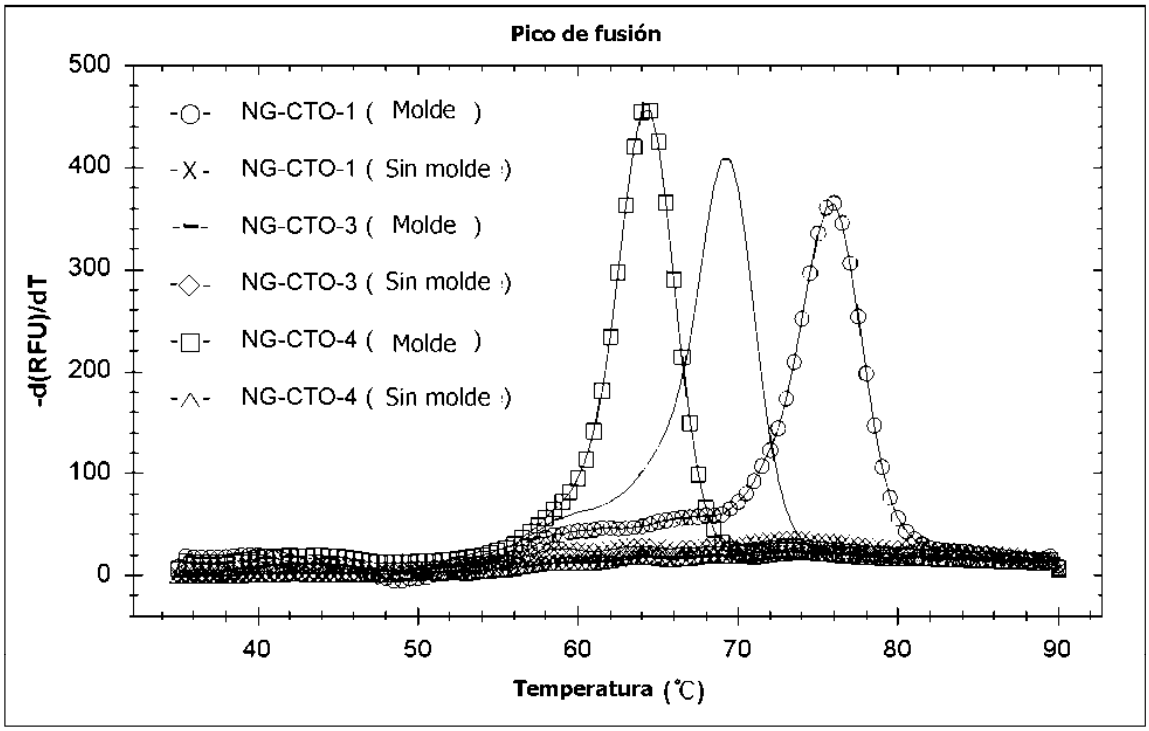
Fig. 15



Molde [1]	Cebador situada corriente arriba	PTO [2]	CTO [3]	Tm (°C)	
				Diana [4]	No diana [5]
+	+	+	+	77,0	64,0
-	+	+	+	-	64,5
+	+	-	+	-	-
+	+	+	-	-	-

[1] **El molde es un oligonucleótido sintético para el gen de Neisseria gonorrhoeae.**
[2] **El PTO tiene una molécula amortiguadora en su extremo 5'.**
[3] **El CTO incorpora una molécula indicadora fluorescente en su extremo 3'.**
[4] **La diana representa una señal diana que es la Tm del ácido nucleico bicatenario extendido.**
[5] **La no diana representa una señal no diana que es la Tm del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO.**

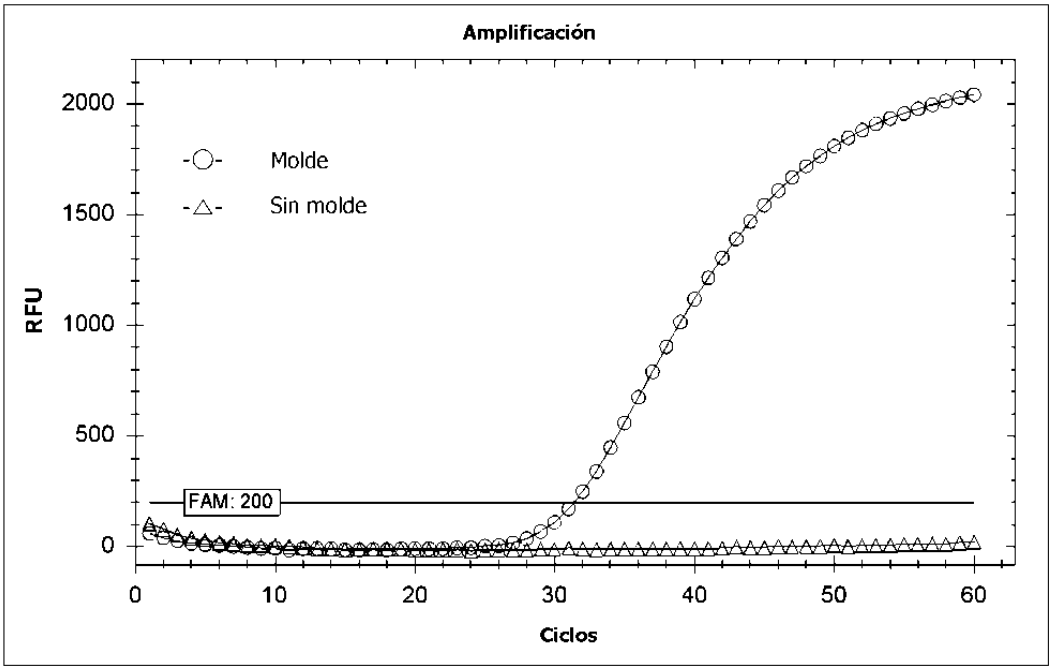
Fig. 16



Molde [1]	Cebador situada corriente arriba	PTO [2]	CTO [3]	Tm (°C) [4]
+	+	+	NG-CTO-1	76,0
-	+	+	NG-CTO-1	-
+	+	+	NG-CTO-3	69,0
-	+	+	NG-CTO-3	-
+	+	+	NG-CTO-4	64,5
-	+	+	NG-CTO-4	-

1) **El molde es un oligonucleótido sintético para el gen de Neisseria gonorrhoeae.**
2) **El PTO no tiene marcador.**
3) **El CTO incorpora una molécula amortiguadora y una molécula indicadora fluorescente en su segmento molde. Tres CTO tienen secuencias distintas en sus segmentos molde.**
4) **La Tm representa la temperatura de fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.**

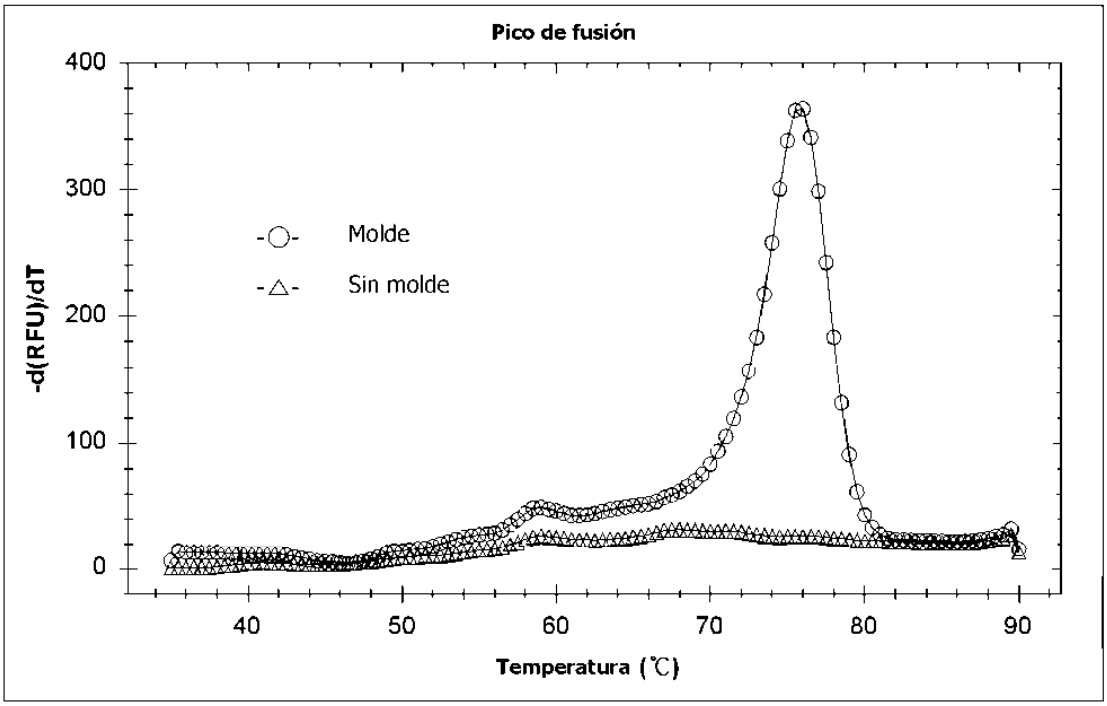
Fig. 17A



Molde [1]	Cebador situada corriente arriba	Cebador situada corriente abajo	PTO [2]	CTO [3]	Ct
+	+	+	+	+	31,36
-	+	+	+	+	-

1) **El molde es un ADN genómico de Neisseria gonorrhoeae.**
2) **El PTO no tiene marcador.**
3) **El CTO incorpora una molécula amortiguadora y una molécula indicadora fluorescente en su segmento molde.**

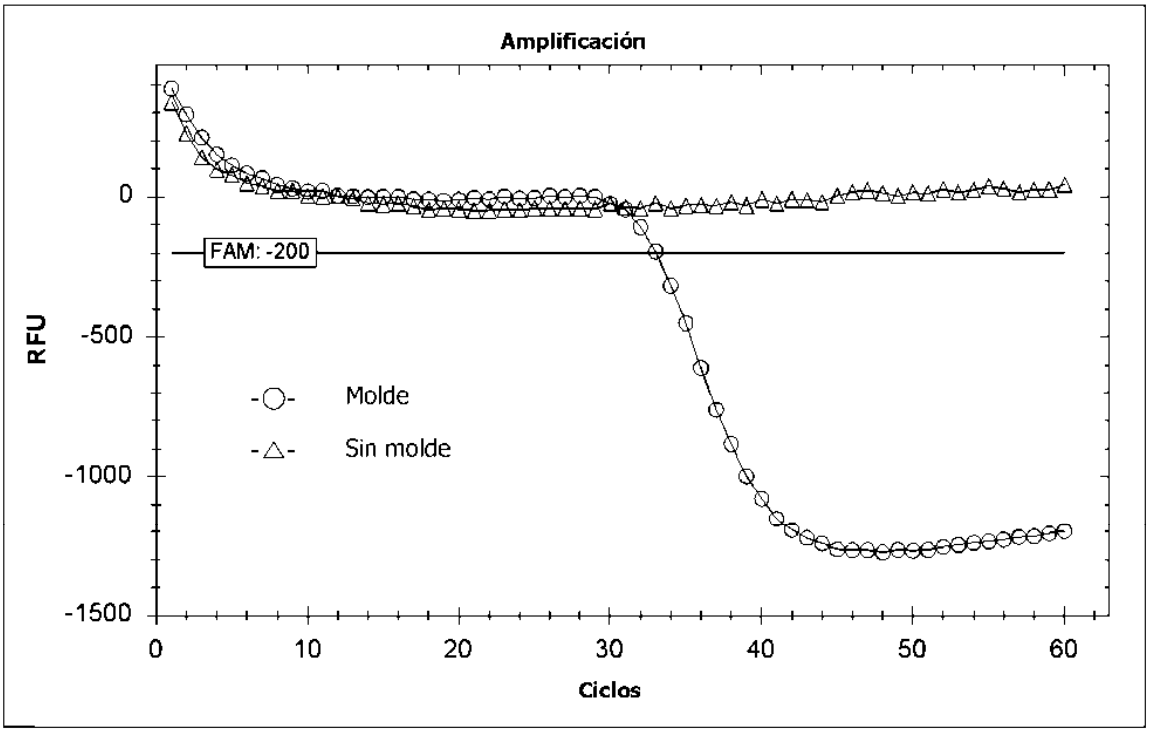
Fig. 17B



Molde [1]	Cebador situada corriente arriba	Cebador situada corriente abajo	PTO [2]	CTO [3]	Tm (°C) [4]
+	+	+	+	+	76,0
-	+	+	+	+	-

1) **El molde es un ADN genómico de Neisseria gonorrhoeae.**
2) **El PTO no tiene marcador.**
3) **El CTO incorpora una molécula amortiguadora y una molécula indicadora fluorescente en su segmento molde.**
4) **La Tm representa la temperatura de fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.**

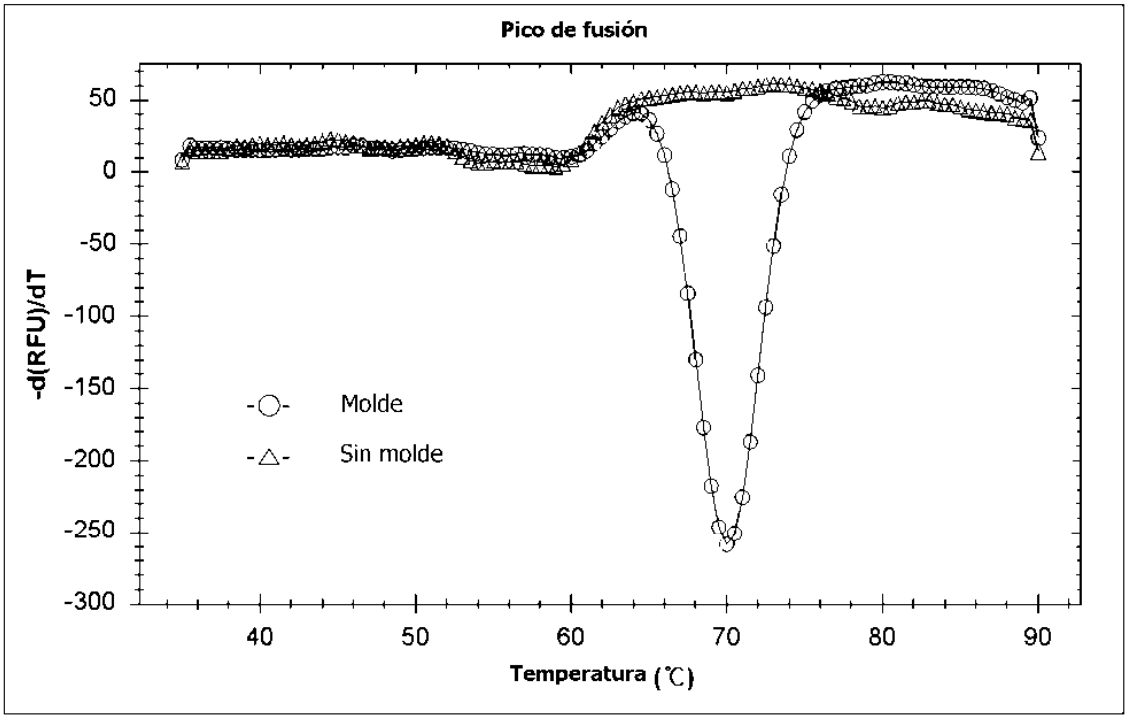
Fig. 18A



Molde [1]	Cebador situada corriente arriba	Cebador situada corriente abajo	PTO [2]	CTO [3]	Ct
+	+	+	+	+	33,03
-	+	+	+	+	-

1) **El molde es un ADN genómico de Neisseria gonorrhoeae.**
2) **El PTO no tiene marcador.**
3) **El CTO contiene un nucleótido no natural (iso-dC) marcado con una molécula indicadora fluorescente en su extremo 5'.**

Fig. 18B

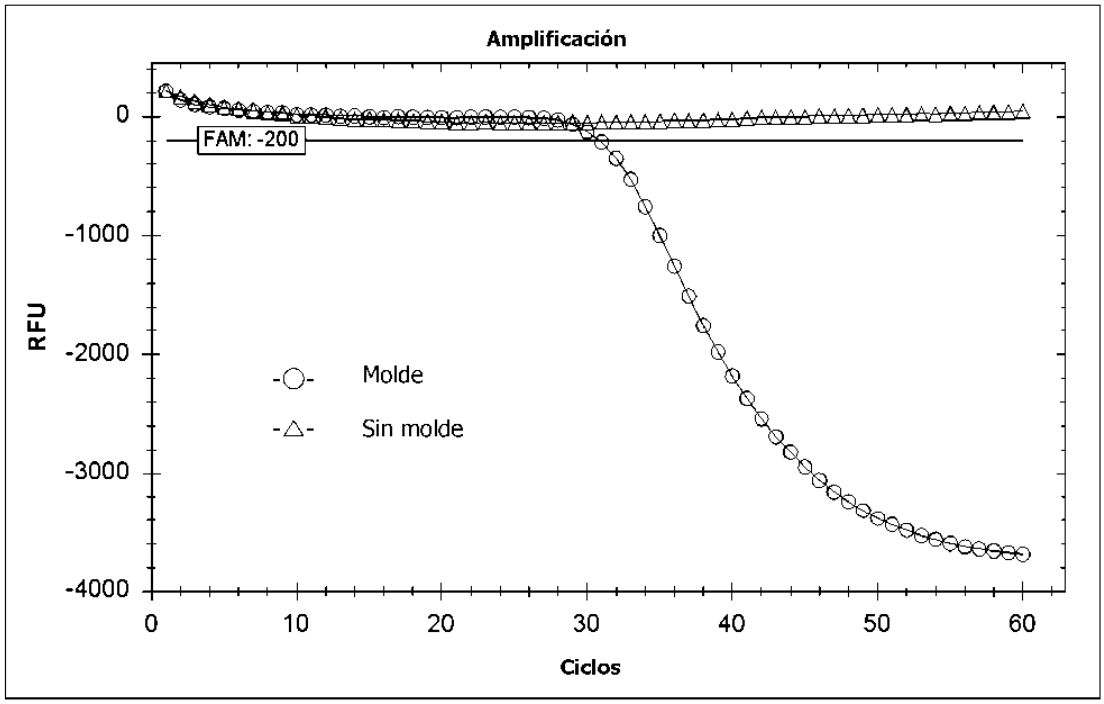


Molde [1]	Cebador situada corriente arriba	Cebador situada corriente abajo	PTO [2]	CTO [3]	Tm(°C) [4]
+	+	+	+	+	70,0
-	+	+	+	+	-

[1] El molde es un ADN genómico de Neisseria gonorrhoeae.
[2] El PTO no tiene marcador.

[3] El CTO contiene un nucleótido no natural (iso-dC) y una molécula indicadora fluorescente en su extremo 5'.
[4] La Tm representa la temperatura de fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

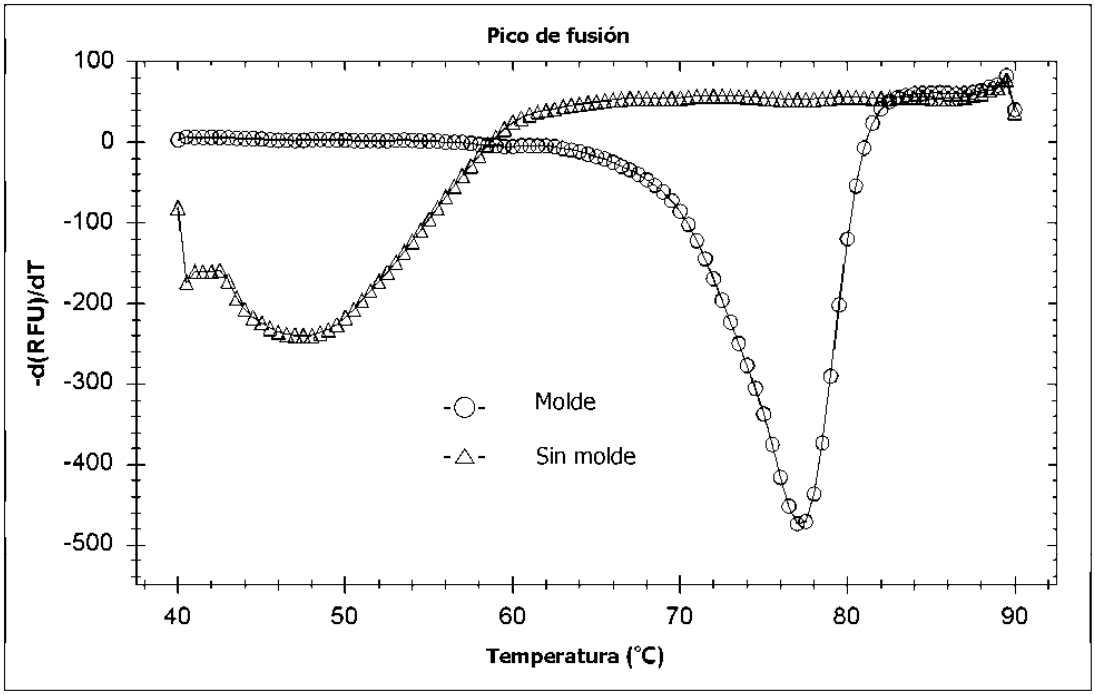
Fig. 19A



Molde [1]	Cebador situada corriente arriba	Cebador situada corriente abajo	PTO [2]	CTO [3]	Ct
+	+	+	+	+	29,79
-	+	+	+	+	-

[1] **El molde es un ADN genómico de Neisseria gonorrhoeae.**
[2] **El PTO tiene una molécula amortiguadora en su extremo 5'.**
[3] **El CTO incorpora una molécula indicadora fluorescente en su extremo 3'.**

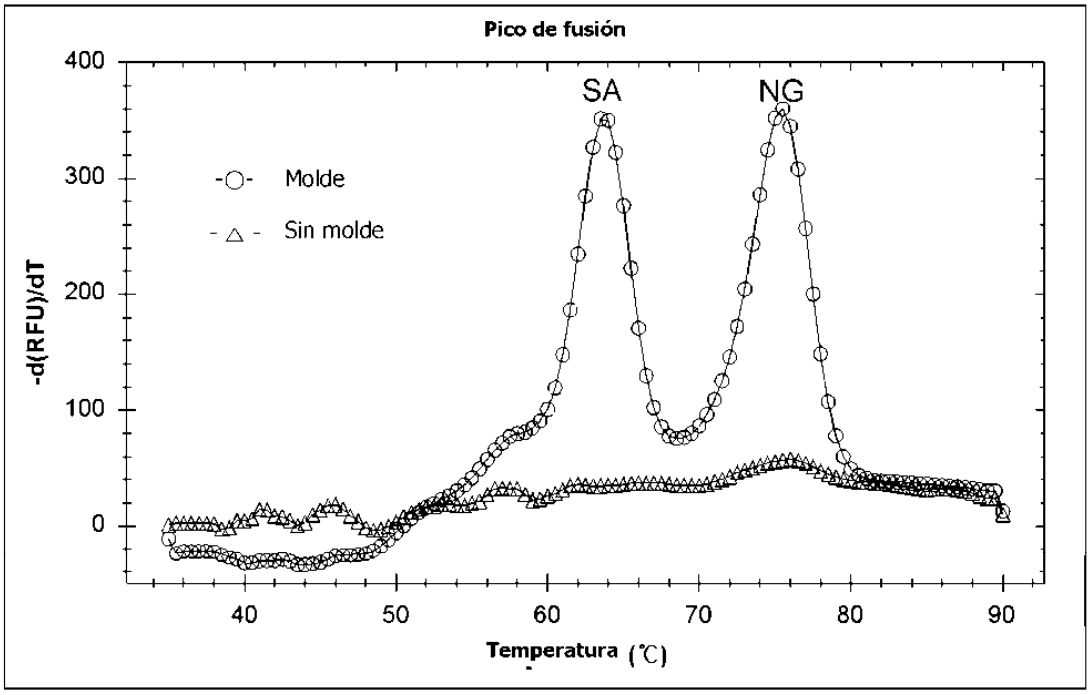
Fig. 19B



Molde [1]	Cebador situada corriente arriba	Cebador situada corriente abajo	PTO [2]	CTO [3]	Tm (°C)	
					Diana [4]	No diana [5]
+	+	+	+	+	76,5	-
-	+	+	+	+	-	48,0

1) **El molde es un ADN genómico de Neisseria gonorrhoeae.**
2) **El PTO tiene una molécula amortiguadora en su extremo 5'.**
3) **El CTO incorpora una molécula indicadora fluorescente en su extremo 3'.**
4) **La diana representa una señal diana que es la Tm del ácido nucleico bicatenario extendido.**
5) **La no diana representa una señal no diana que es la Tm del híbrido formado por el PTO sin escindir con el CTO.**

Fig. 20



Moldes [1]	Cebador situada corriente arriba	Cebador situada corriente abajo	PTO [2]	CTO [3]	Tm (°C) [4]
NG y SA	+	+	+	+	75,5 y 63,5
-	+	+	+	+	-

1) **Los moldes son ADN genómicos de Neisseria gonorrhoeae (NG) y de Staphylococcus aureus (SA).**

2) **El PTO no tiene marcador.**

3) **El CTO incorpora una molécula amortiguadora y una molécula indicadora fluorescente en su segmento molde. Los CTO de NG y de SA incorporan el mismo tipo de molécula indicadora fluorescente (FAM).**

4) **La Tm representa la temperatura de fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.**

Fig. 21A

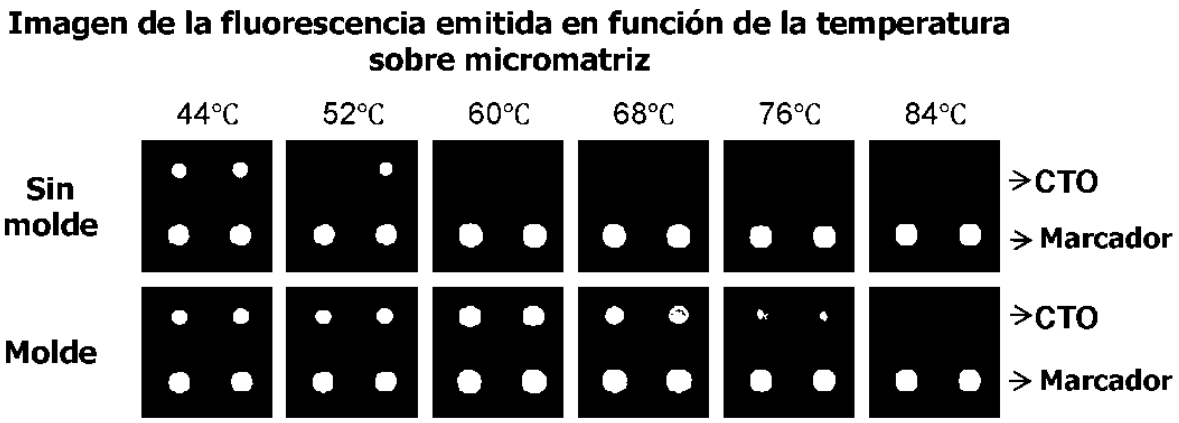


Imagen de la fluorescencia emitida en función de la temperatura sobre micromatriz
44°C
52°C
60°C
68°C
76°C
84°C
Sin molde
Molde
CTO
Marcador
CTO
Marcador

Fig. 21B

Imagen de la fluorescencia emitida en función de la temperatura sobre micromatriz

Molde [1]	Cebador situada corriente arriba	PTO [2]	CTO [3]	Unidades de fluorescencia relativa					
				44°C	52°C	60°C	68°C	76°C	84°C
-	+	+	+	65.438 (±1,4)	58.761 (±2.249,3)	9.989 (±473,1)	1.728 (±188,1)	862 (±184,6)	303 (±82,7)
+	+	+	+	65.434 (±3,5)	65.424 (±11,3)	65.397 (±9,9)	65.393 (±12,7)	40.184 (±3.297,9)	3.490 (±246,8)

[1] **El molde es un oligonucleótido sintético para el gen de Neisseria gonorrhoeae.**
[2] **El PTO incorpora una molécula indicadora fluorescente en su extremo 5'.**
[3] **El CTO permanece inmovilizado sobre la superficie de un sustrato sólido a través de un grupo amino ubicado en su extremo 5'.**

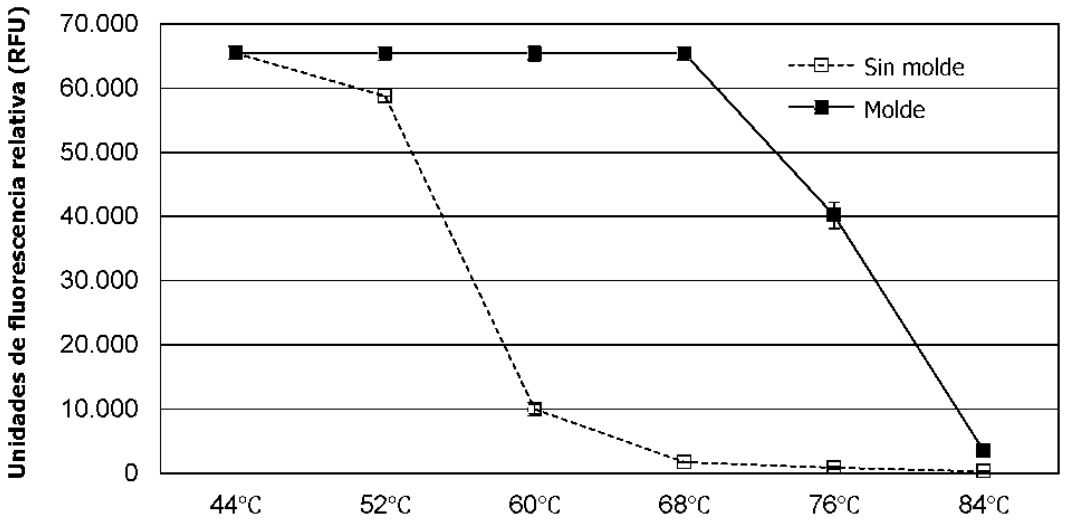


Fig. 22A

Imágenes de la fluorescencia emitida en función del número de ciclos sobre micromatriz

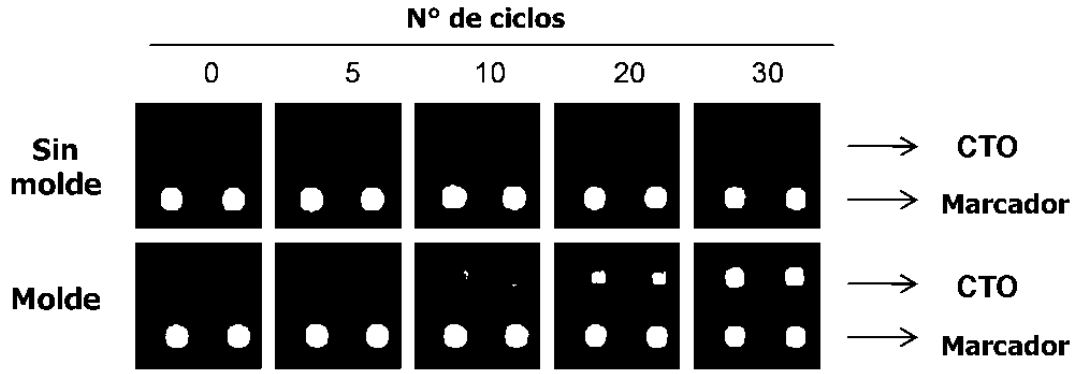


Fig. 22B

Imágenes de la fluorescencia emitida en función del número de ciclos sobre micromatriz

Molde [1)]	Cebador situada corriente arriba	PTO [2)]	CTO [3)]	Unidades de fluorescencia relativa				
				N° de ciclos:	0	5	10	20	30
-	+	+	+		1.216 (±86,3)	3.012 (±929,1)	1.988 (±276,5)	1.961 (±25,5)	3.261 (±279,3)
+	+	+	+		1.304 (±0,7)	18.939 (±1.342,1)	30.619 (±258,0)	56.248 (±2.208,3)	64.645 (±1.110,2)

1) **El molde es un oligonucleótido sintético para el gen de Neisseria gonorrhoeae.**
2) **El PTO incorpora una molécula indicadora fluorescente en su extremo 5'.**
3) **El CTO permanece inmovilizado sobre la superficie de un sustrato sólido a través de un grupo amino ubicado en su extremo 5'.**

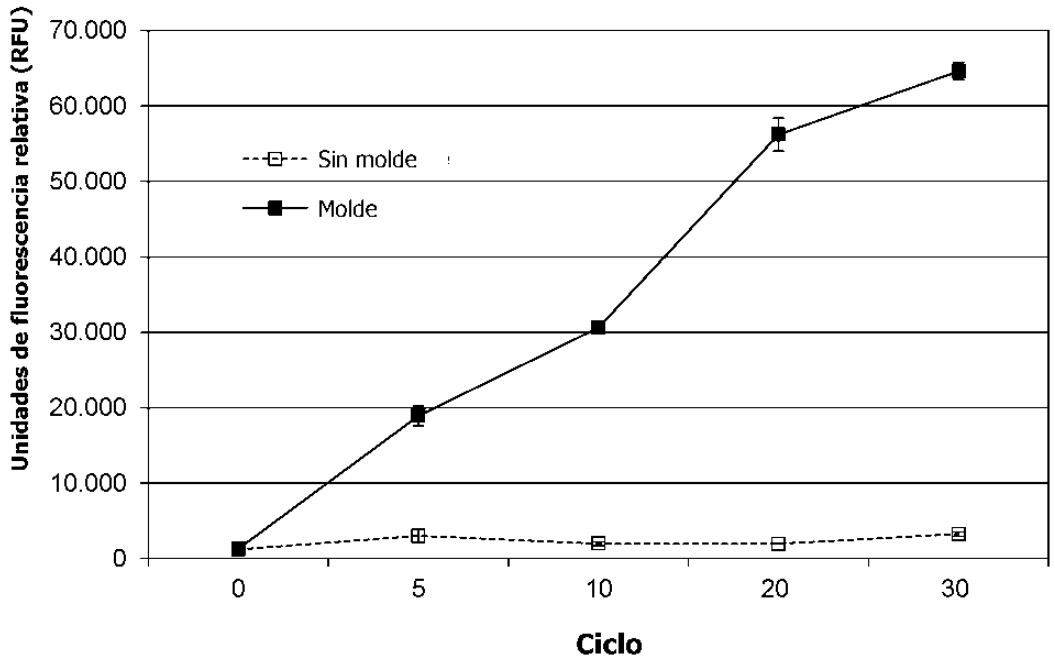


Fig. 23A

Imágenes de la fluorescencia emitida en función del número de ciclos sobre micromatriz

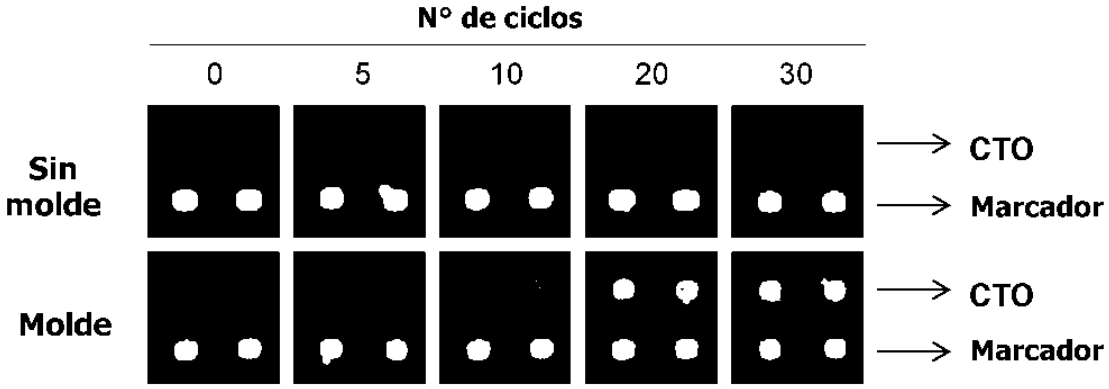


Fig. 23B

Cambio de la intensidad de la fluorescencia en función del número de ciclos sobre una micromatriz

Molde [1]	Cebador situada corriente arriba	PTO [2]	CTO [3]	Unidades de fluorescencia relativa				
				N° de ciclos:	0	5	10	20	30
-	+	+	+		21.047 (±334,5)	17.867 (±478,7)	19.739 (±82,0)	19.144 (±176,8)	21.259 (±1.130,7)
+	+	+	+		28.078 (±460,3)	35.967 (±555,1)	44.674 (±186,0)	65.423 (±2,1)	65.426 (±2,8)

1) **El molde es un oligonucleótido sintético para el gen de Neisseria gonorrhoeae.**
2) **El PTO no tiene marcador.**
3) **El CTO incorpora una molécula amortiguadora y una molécula indicadora fluorescente en su segmento molde. El CTO permanece inmovilizado sobre la superficie de un sustrato sólido a través de un grupo amino ubicado en su extremo 3'.**

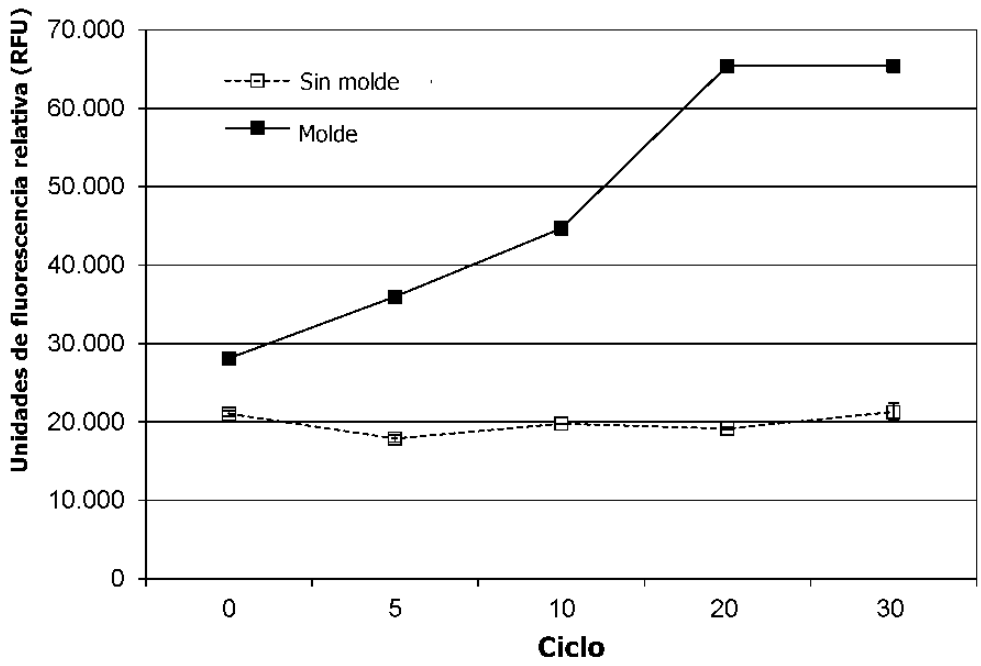
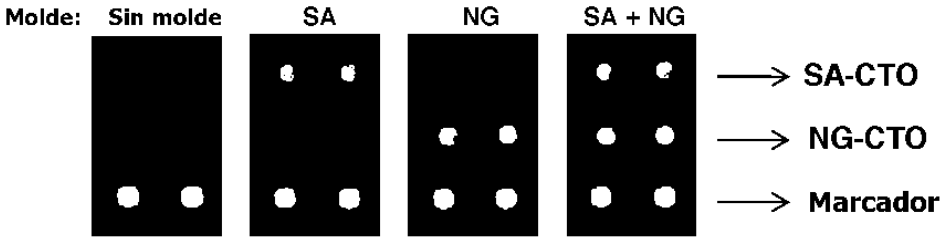


Fig. 24

Imagen de fluorescencia en una micromatriz



Intensidad de la fluorescencia sobre micromatriz

Molde [1]	Cebadores [2]	PTO [3]	CTO [4]	Unidades de fluorescencia relativa	
				SA	NG
-	+	+	+	448 (±29,7)	2522 (±116,0)
SA	+	+	+	65.192 (±198,7)	4183 (±323,9)
NG	+	+	+	603 (±36,8)	65.332 (±1,4)
SA y NG	+	+	+	65.302 (±0,7)	65.302 (±0,7)

[1] **El molde es un ADN genómico de Staphylococcus aureus (SA) y/o de Neisseria gonorrhoeae (NG).**

[2] **Los cebadores son un cebador en anteposición y otro en retroposición para la PCR.**

[3] **El PTO incorpora una molécula indicadora fluorescente en su extremo 5'.**

[4] **El CTO permanece inmovilizado sobre la superficie de un sustrato sólido a través de un grupo amino ubicado en su extremo 5'.**

Fig. 25

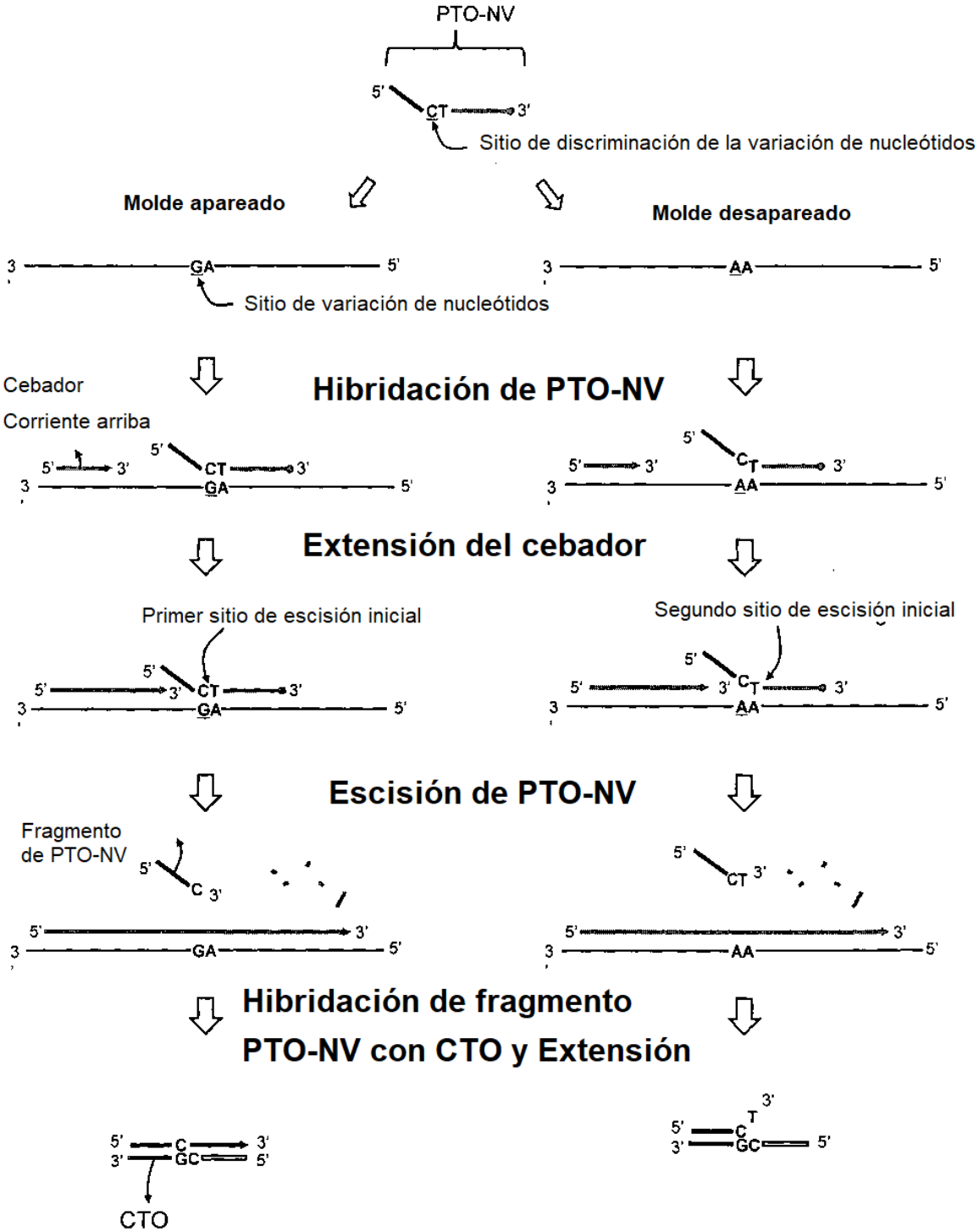

PTO-NV
5' CT 3'
Sitio de discriminación de la variación de nucleótidos
Molde apareado
Molde desapareado
3 GA 5'
3 AA 5'
Sitio de variación de nucleótidos
Cebador
Corriente arriba
Hibridación de PTO-NV
Extensión del cebador
Primer sitio de escisión inicial
Segundo sitio de escisión inicial
Escisión de PTO-NV
Fragmento de PTO-NV
Hibridación de fragmento PTO-NV con CTO y Extensión
CTO

Fig. 26

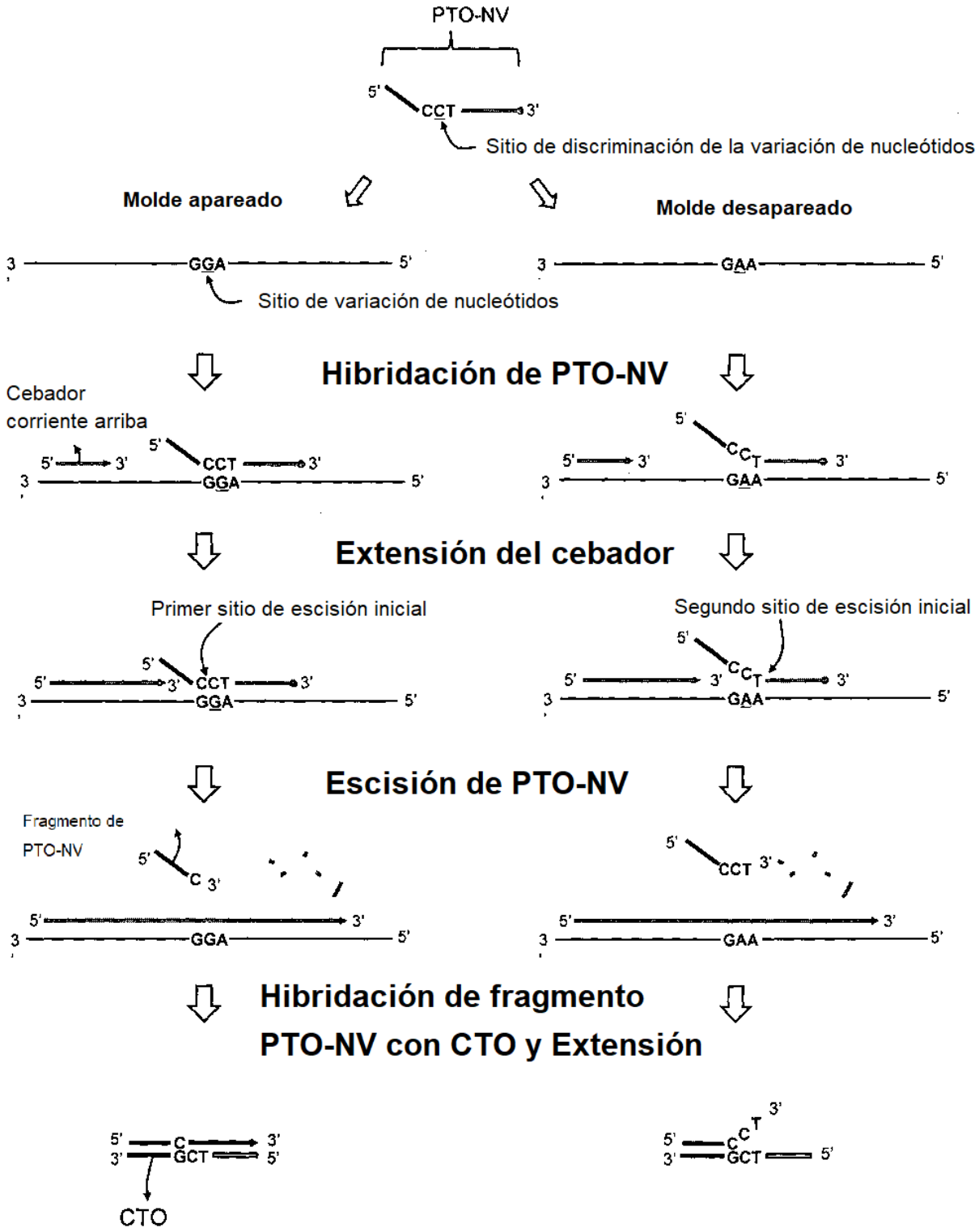

PTO-NV
5' CCT 3'
Sitio de discriminación de la variación de nucleótidos
Molde apareado
Molde desapareado
3 GGA 5'
3 GAA 5'
Sitio de variación de nucleótidos
Hibridación de PTO-NV
Cebador
corriente arriba
Extensión del cebador
Primer sitio de escisión inicial
Segundo sitio de escisión inicial
Escisión de PTO-NV
Fragmento de
PTO-NV
Hibridación de fragmento
PTO-NV con CTO y Extensión
CTO

Fig. 27

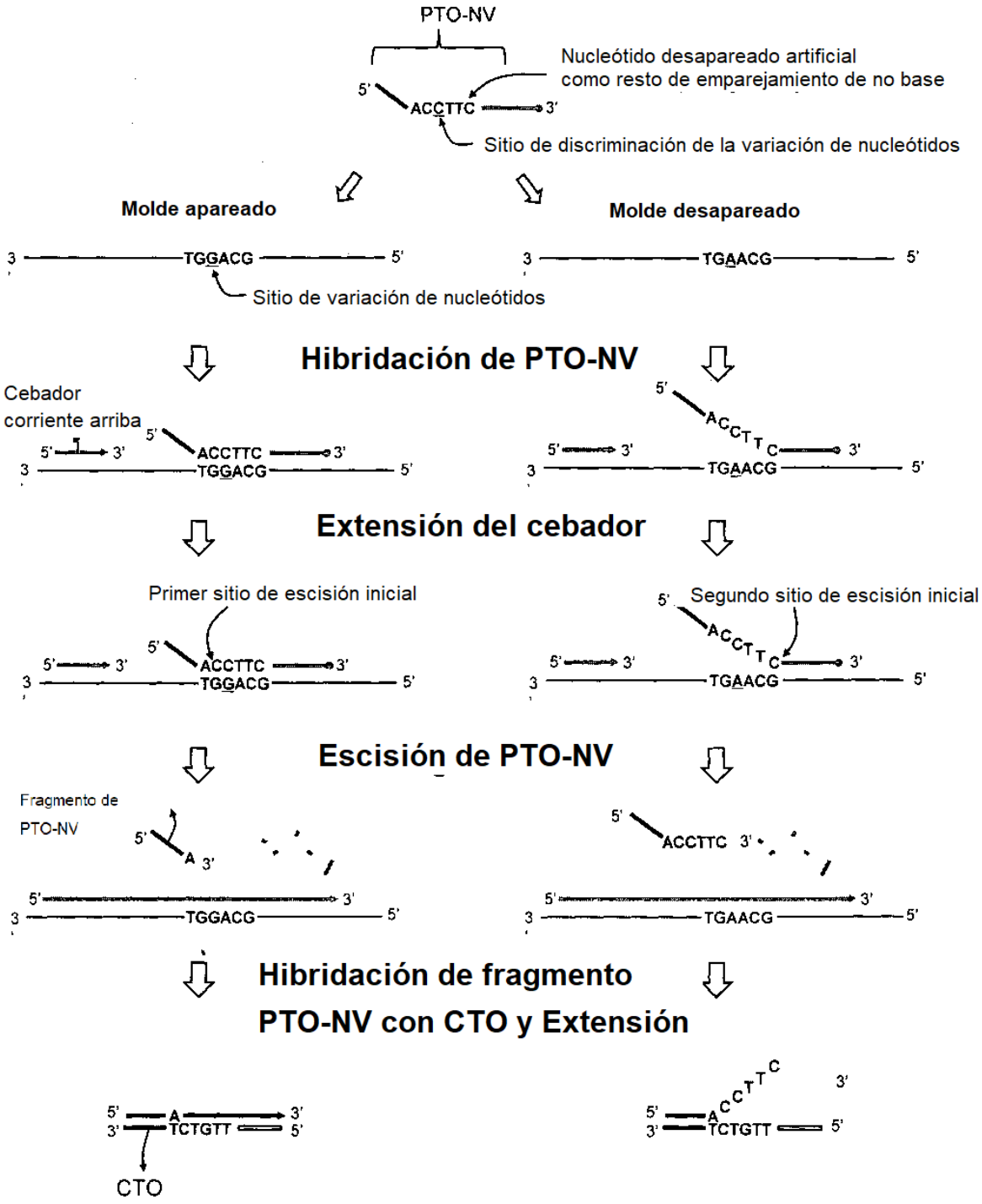

PTO-NV
Nucleótido desapareado artificial como resto de emparejamiento de no base
5' ACCTTC 3'
Sitio de discriminación de la variación de nucleótidos
Molde apareado
Molde desapareado
3 TGGACG 5'
3 TGAACG 5'
Sitio de variación de nucleótidos
Hibridación de PTO-NV
Cebador corriente arriba
Extensión del cebador
Primer sitio de escisión inicial
Segundo sitio de escisión inicial
Escisión de PTO-NV
Fragmento de PTO-NV
Hibridación de fragmento PTO-NV con CTO y Extensión
TCTGTT
CTO

Fig. 28

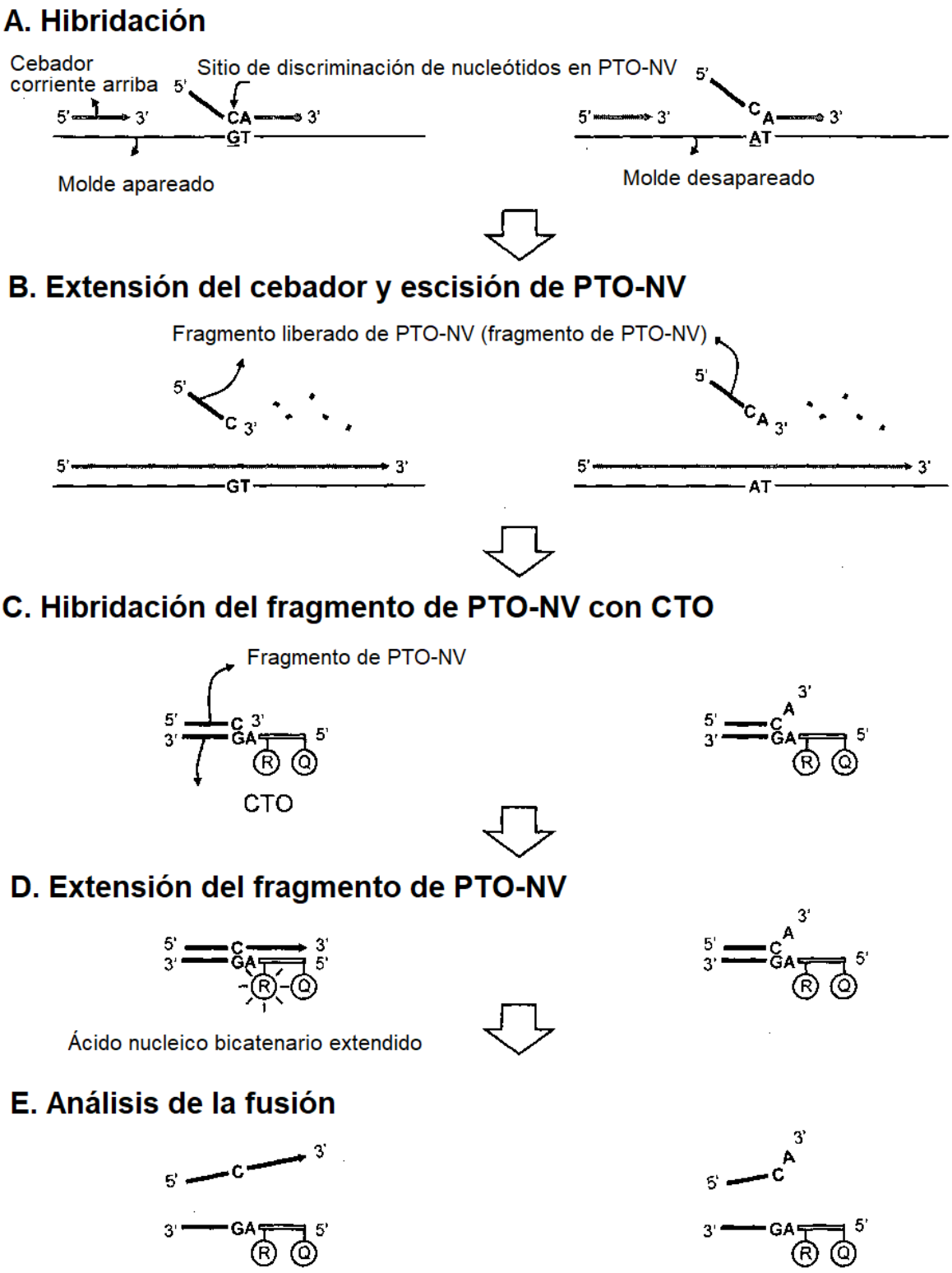

A. Hibridación
Cebador corriente arriba
Sitio de discriminación de nucleótidos en PTO-NV
Molde apareado
Molde desapareado
B. Extensión del cebador y escisión de PTO-NV
Fragmento liberado de PTO-NV (fragmento de PTO-NV)
C. Hibridación del fragmento de PTO-NV con CTO
Fragmento de PTO-NV
CTO
D. Extensión del fragmento de PTO-NV
Ácido nucleico bicatenario extendido
E. Análisis de la fusión

Fig. 29

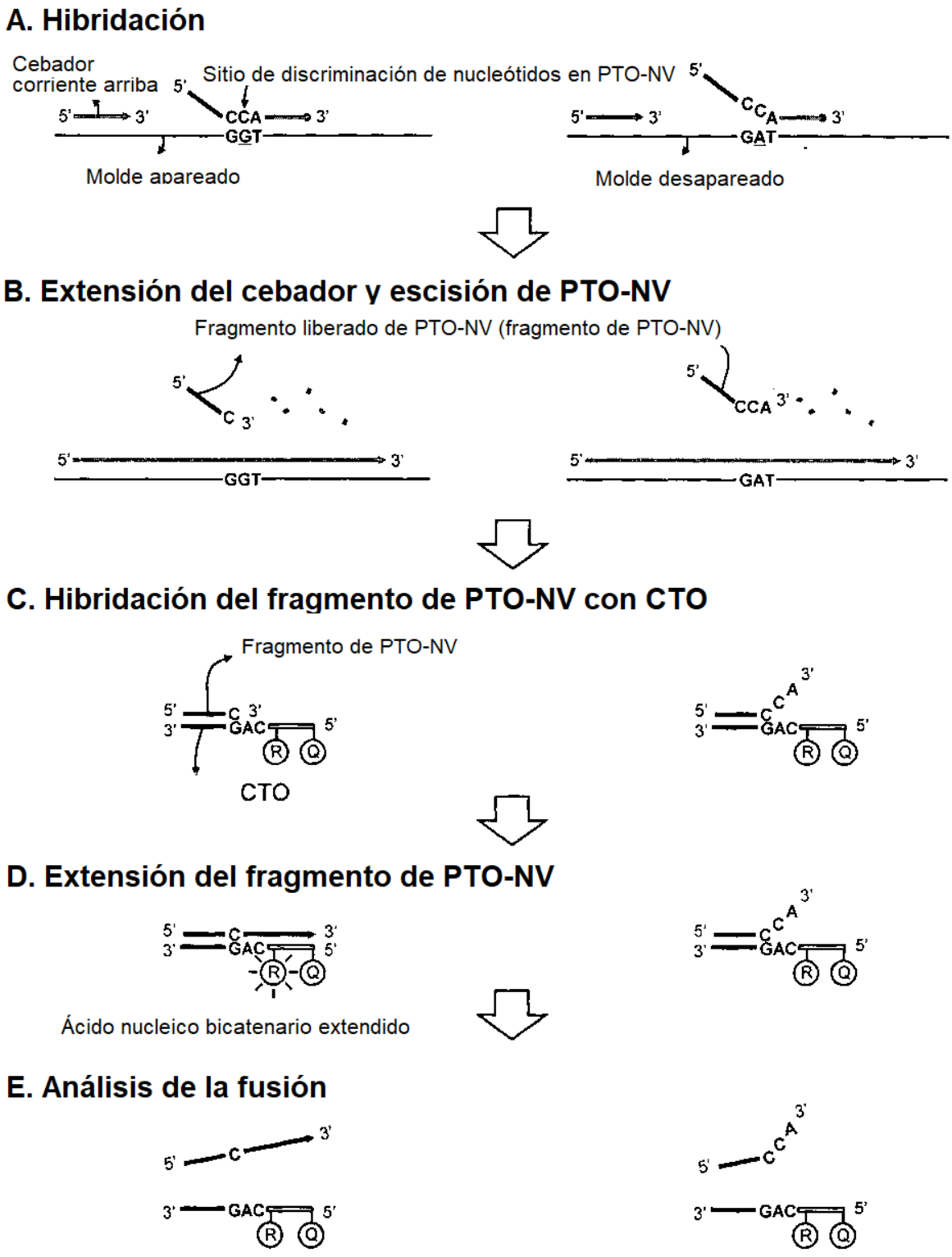

A. Hibridación
Cebador corriente arriba
Sitio de discriminación de nucleótidos en PTO-NV
Molde apareado
Molde desapareado
B. Extensión del cebador y escisión de PTO-NV
Fragmento liberado de PTO-NV (fragmento de PTO-NV)
C. Hibridación del fragmento de PTO-NV con CTO
Fragmento de PTO-NV
CTO
D. Extensión del fragmento de PTO-NV
Ácido nucleico bicatenario extendido
E. Análisis de la fusión

Fig. 30

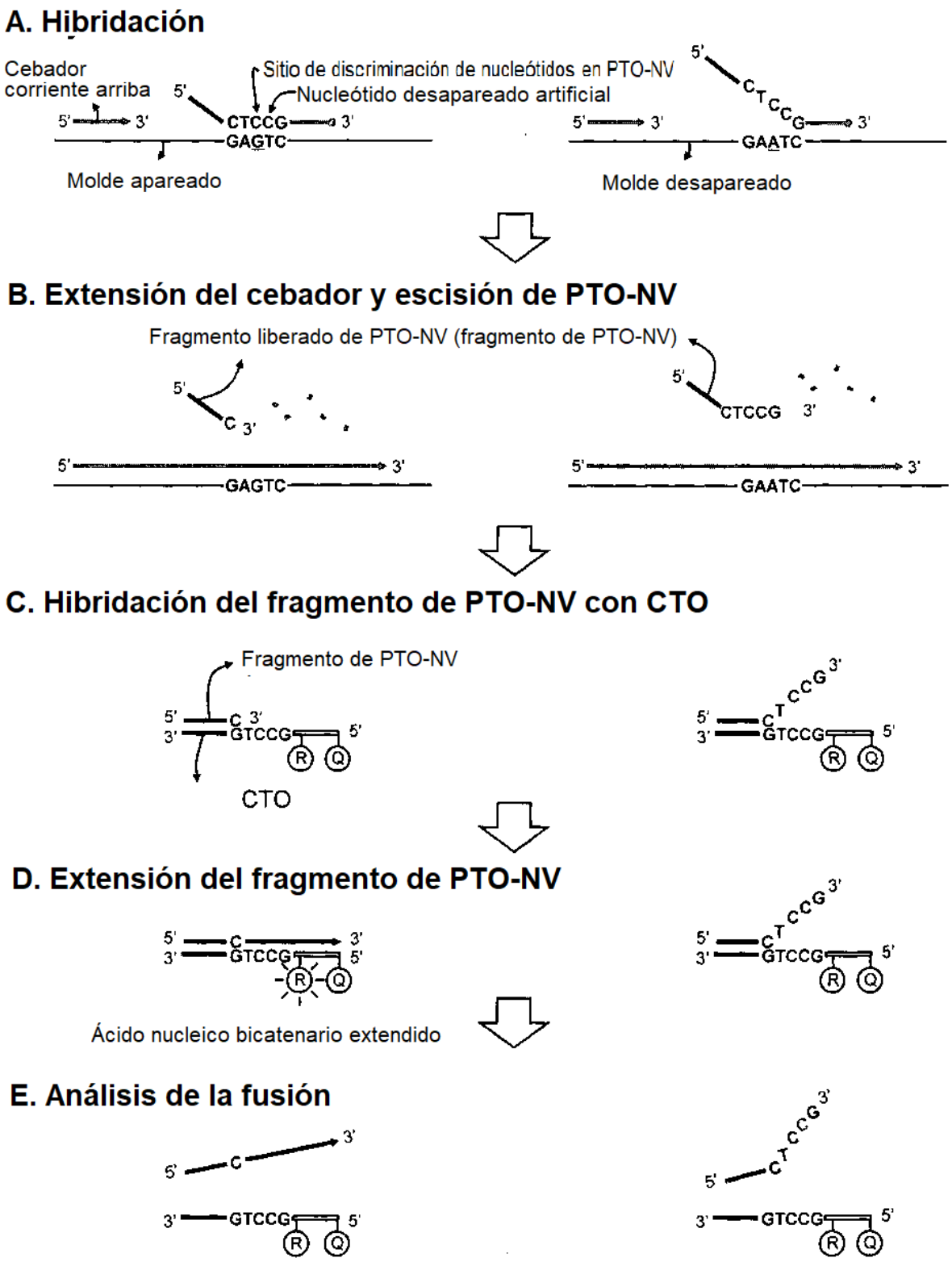

A. Hibridación
Cebador corriente arriba
Sitio de discriminación de nucleótidos en PTO-NV
Nucleótido desapareado artificial
Molde apareado
Molde desapareado
B. Extensión del cebador y escisión de PTO-NV
Fragmento liberado de PTO-NV (fragmento de PTO-NV)
C. Hibridación del fragmento de PTO-NV con CTO
Fragmento de PTO-NV
CTO
D. Extensión del fragmento de PTO-NV
Ácido nucleico bicatenario extendido
E. Análisis de la fusión

Fig. 31

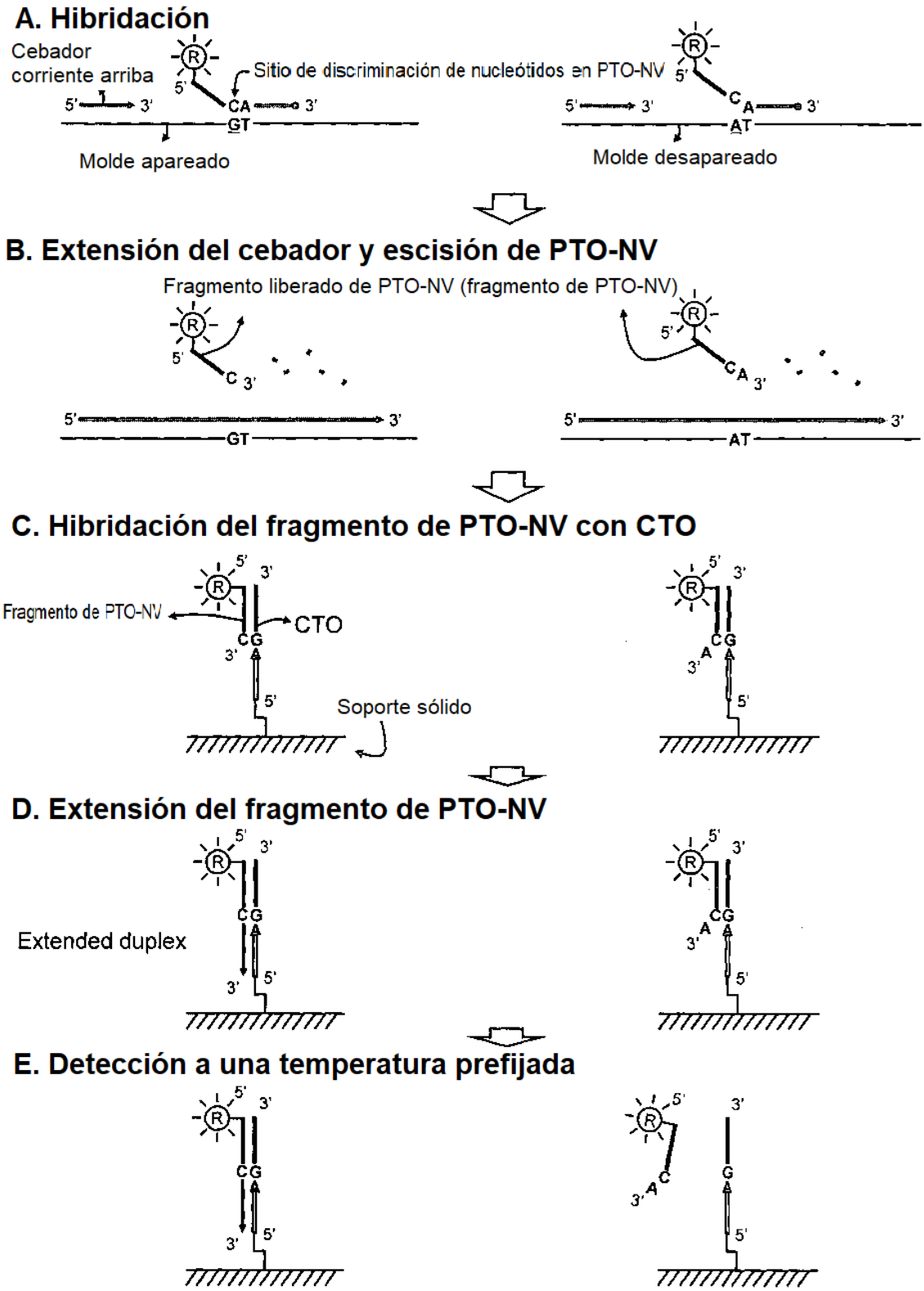

A. Hibridación
Cebador corriente arriba
Sitio de discriminación de nucleótidos en PTO-NV
Molde apareado
Molde desapareado
B. Extensión del cebador y escisión de PTO-NV
Fragmento liberado de PTO-NV (fragmento de PTO-NV)
C. Hibridación del fragmento de PTO-NV con CTO
Fragmento de PTO-NV
CTO
Soporte sólido
D. Extensión del fragmento de PTO-NV
Extended duplex
E. Detección a una temperatura prefijada

Fig. 32

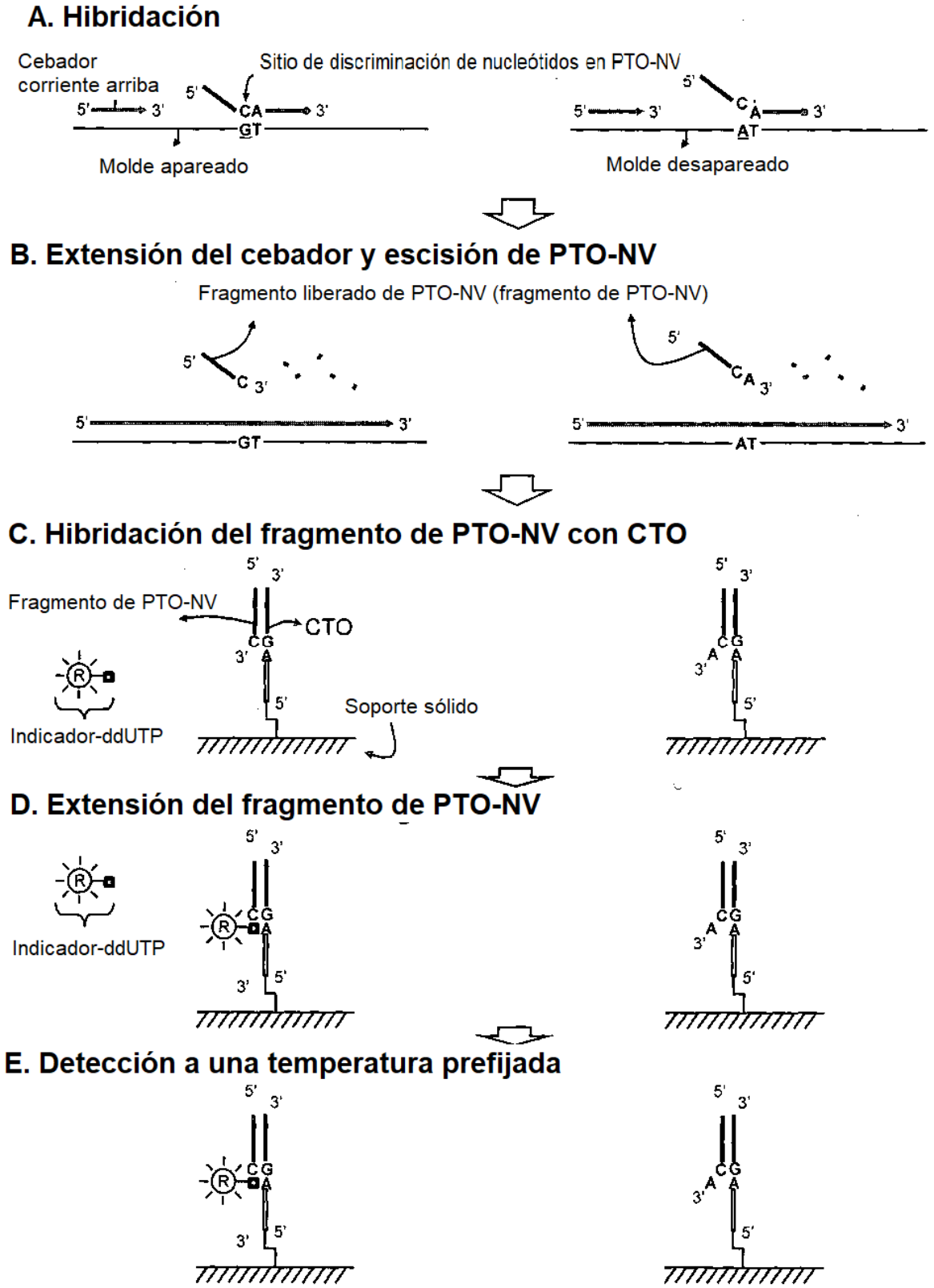
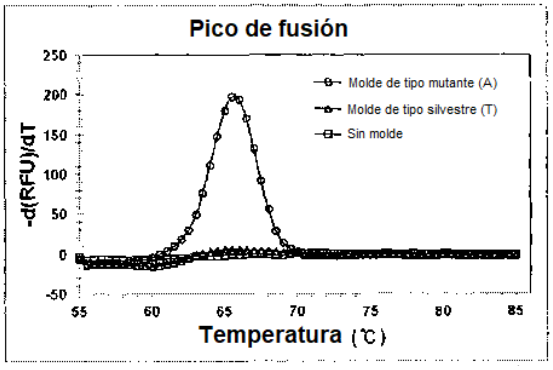

A. Hibridación
Cebador corriente arriba
Sitio de discriminación de nucleótidos en PTO-NV
Molde apareado
Molde desapareado
B. Extensión del cebador y escisión de PTO-NV
Fragmento liberado de PTO-NV (fragmento de PTO-NV)
C. Hibridación del fragmento de PTO-NV con CTO
Fragmento de PTO-NV
CTO
Soporte sólido
Indicador-ddUTP
D. Extensión del fragmento de PTO-NV
Indicador-ddUTP
E. Detección a una temperatura prefijada

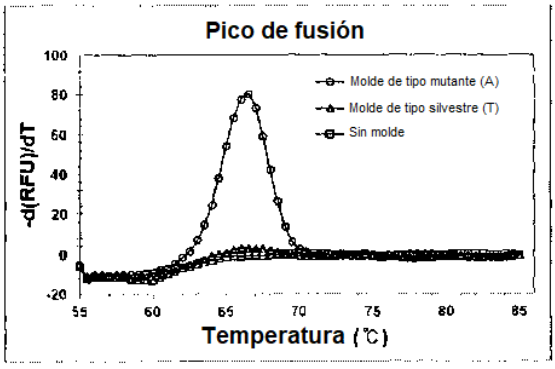
Fig. 33A

Ensayo PTOCE con PTO-NV

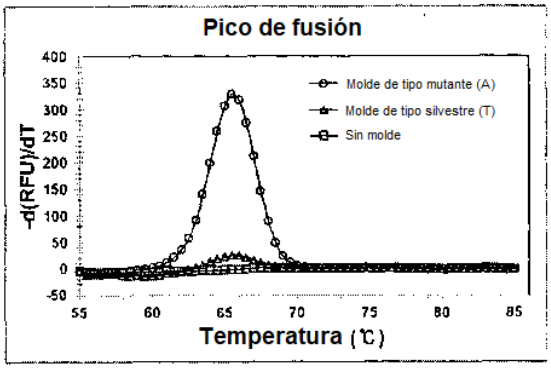
BRAF-PTO-NV-1 (SEQ ID NO. 27)



BRAF-PTO-NV-2 (SEQ ID NO. 28)



BRAF-PTO-NV-3 (SEQ ID NO. 29)



BRAF-PTO-NV-4 (SEQ ID NO. 30)

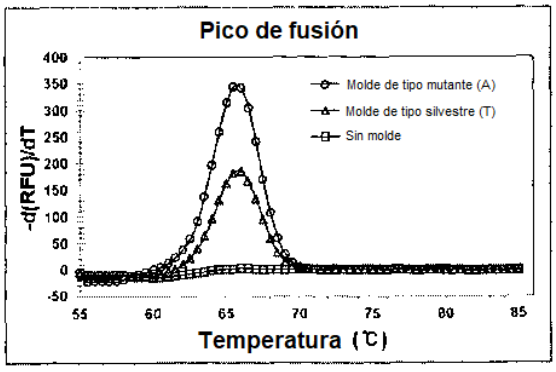


Fig. 33B

Ensayo PTOCE con PTO-NV (continuación)

PTO-NV [1] (SEQ ID NO.)	CTO [2] (SEQ ID NO.)	Molde [3]	Cebador [4]	Tm [5] (℃)	d(RFU)/dT [6]
27	31	De tipo mutante (A)	+	65,5	197,14
27	31	De tipo silvestre (T)	+	-	-
27	31	-	+	-	-
28	32	De tipo mutante (A)	+	65,5	80,19
28	32	De tipo silvestre (T)	+	-	-
28	32	-	+	-	-
29	31	De tipo mutante (A)	+	65,5	329,25
29	31	De tipo silvestre (T)	+	-	-
29	31	-	+	-	-
30	33	De tipo mutante (A)	+	65,5	345,32
30	33	De tipo silvestre (T)	+	65,5	185,07
30	33	-	+	-	-

[1] PTO-NV (Oligonucleótido de Sondaje y Marcaje para la Variación de Nucleótidos) se bloquea con un espaciador de carbonos en su extremo 3'. El sitio de discriminación de variación de nucleótidos de PTO-NV tiene un nucleótido complementario al molde de tipo mutante (A).

[2] CTO (Oligonucleótido de Captura y Molde) tiene una molécula amortiguadora y una molécula indicadora fluorescente en el segmento de molde.

[3] El molde es ADN genómico humano BRAF V600E de tipo silvestre (T) o BRAF V600E de tipo mutante (A).

[4] El cebador representa un par de cebadores para PCR.

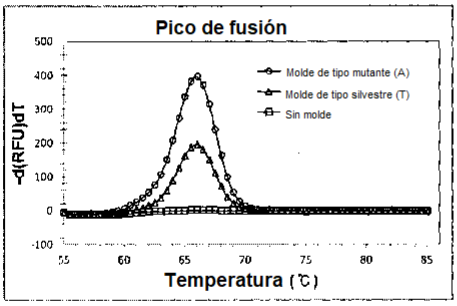
[5] Tm representa la temperatura de fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

[6] RFU representa unidades de fluorescencia relativa.

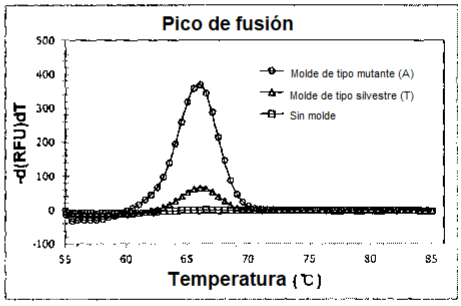
Fig. 34A

Ensayo PTOCE con PTO-NV que tiene un resto de emparejamiento de no base

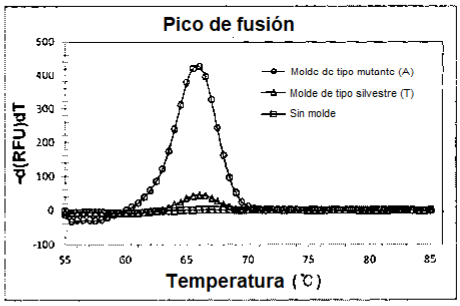
BRAF-PTO-NV-4 (SEQ ID NO. 30)



BRAF-PTO-NV-5 (SEQ ID NO. 34)



BRAF-PTO-NV-6 (SEQ ID NO. 35)



BRAF-PTO-NV-7 (SEQ ID NO. 36)

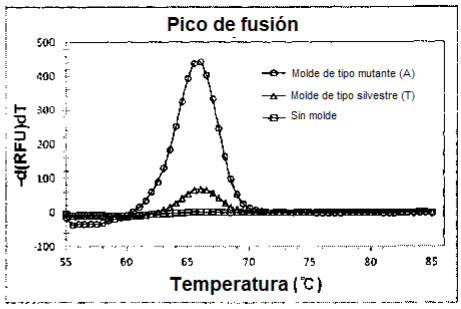


Fig. 34B

Ensayo PTOCE con PTO-NV que tiene un resto de emparejamiento de no base (continuación)

PTO-NV [1] (SEQ ID NO.)	CTO [2] (SEQ ID NO.)	Molde [3]	Cebador [4]	Tm [5] (℃)	d(RFU)/dT [6]
30	33	De tipo mutante (A)	+	65,5	395,6
30	33	De tipo silvestre (T)	+	65,5	194,9
30	33	-	+	-	-
34	33	De tipo mutante (A)	+	65,5	370,3
34	33	De tipo silvestre (T)	+	65,5	66,3
34	33	-	+	-	-
35	33	De tipo mutante (A)	+	65,5	426,7
35	33	De tipo silvestre (T)	+	65,5	45,3
35	33	-	+	-	-
36	33	De tipo mutante (A)	+	65,5	441,7
36	33	De tipo silvestre (T)	+	65,5	68,0
36	33	-	+	-	-

[1] PTO-NV (Oligonucleótido de Sondaje y Marcaje para la Variación de Nucleótidos) se bloquea con un espaciador de carbonos en su extremo 3'. El sitio de discriminación de variación de nucleótidos de PTO-NV tiene un nucleótido complementario al molde de tipo mutante (A).

[2] CTO (Oligonucleótido de Captura y Molde) tiene una molécula amortiguadora y una molécula indicadora fluorescente en el segmento de molde.

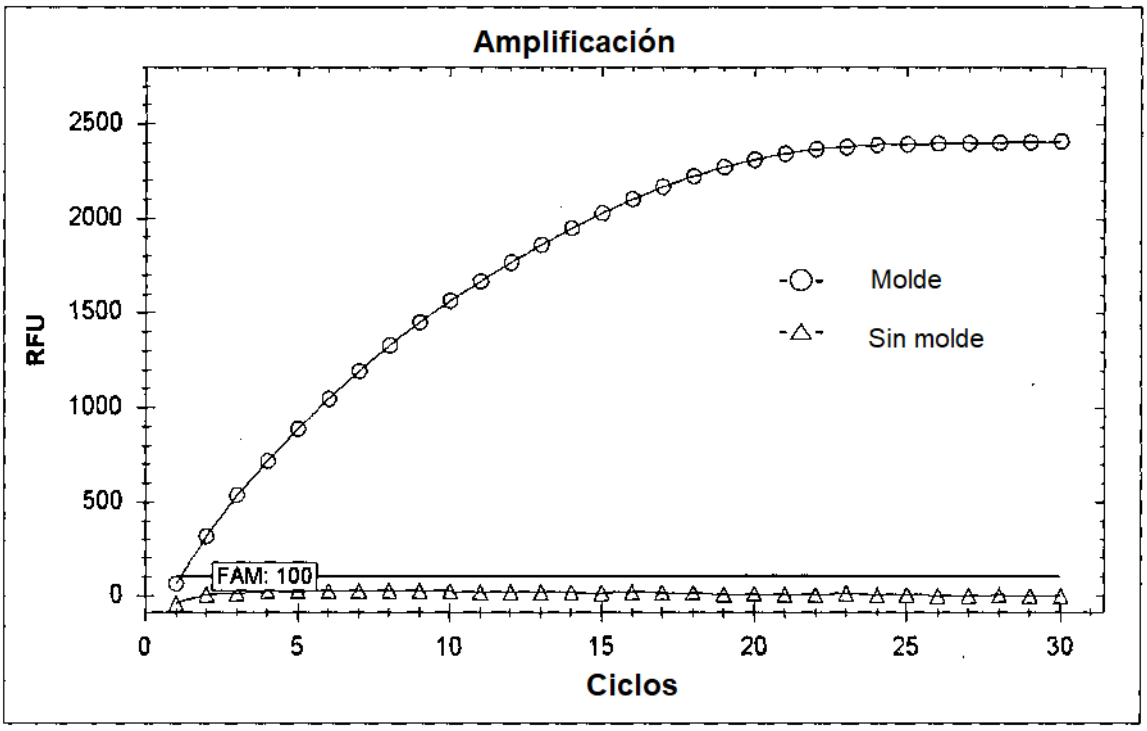
[3] El molde es ADN genómico humano BRAF V600E de tipo silvestre (T) o BRAF V600E de tipo mutante (A).

[4] El cebador representa un par de cebadores para PCR.

[5] Tm representa la temperatura de fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.

[6] RFU representa unidades de fluorescencia relativa.

Fig. 35A



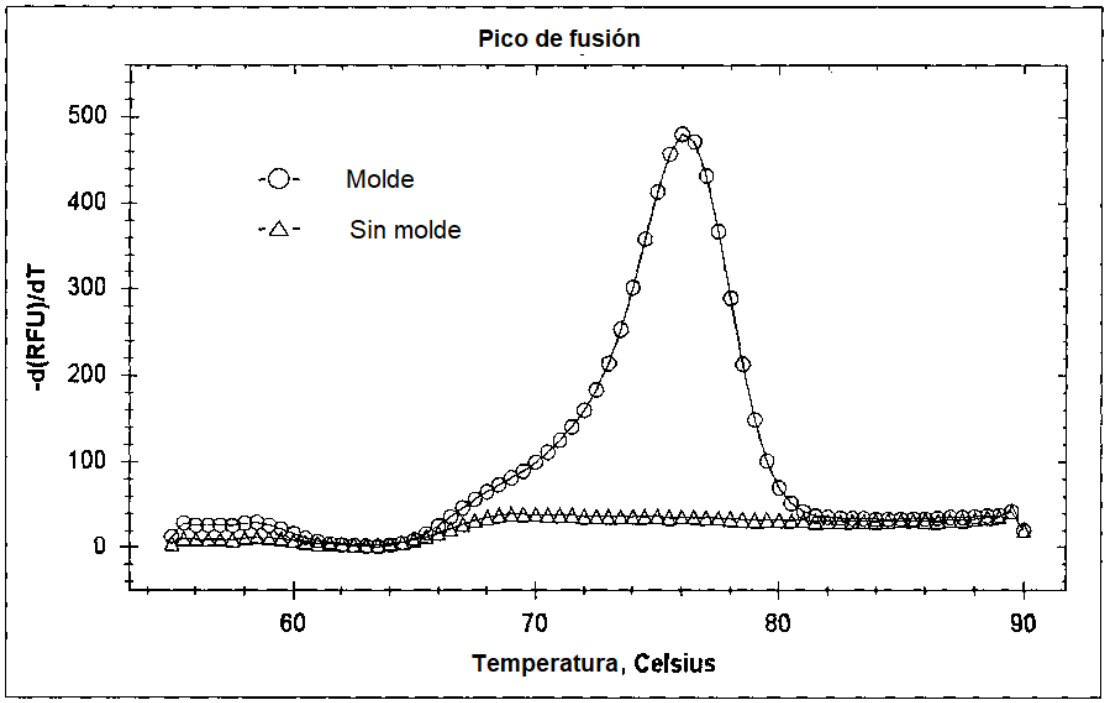
Molde [1)]	Oligonucleótido corriente arriba	PTO [2)]	CTO [3)]	Ct
+	-	+	+	1,15
-	-	+	+	-

[1)] El molde es un oligonucleótido sintético para el gen de *Neisseria gonorrhoeae.*

[2)] PTO no tiene molde.

[3)] CTO tiene una molécula amortiguadora y una molécula indicadora fluorescente en el segmento de molde.

Fig. 35B



Molde [1)]	Oligonucleótido corriente arriba	PTO [2)]	CTO [3)]	Tm (°C) [4)]
+	-	+	+	76,0
-	-	+	+	-

[1)] El molde es un oligonucleótido sintético para el gen de *Neisseria gonorrhoeae.*

[2)] PTO no tiene molde.

[3)] CTO tiene una molécula amortiguadora y una molécula indicadora fluorescente en el segmento de molde.

[4)] Tm representa la temperatura de fusión del ácido nucleico bicatenario extendido.