

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 122**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68	(2008.01)
C12M 1/00	(2006.01)
C12N 15/09	(2006.01)
G01N 33/53	(2006.01)
G01N 33/543	(2006.01)
G01N 37/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2010 PCT/JP2010/068964**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO11052586**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2010 E 10826718 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2495334**

54 Título: **Método para la detección de un ácido nucleico diana**

30 Prioridad:

29.10.2009 JP 2009249122

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

12.06.2018

73 Titular/es:

**NGK INSULATORS, LTD. (100.0%)
2-56, Suda-cho Mizuho
Nagoya-shi, Aichi 467-8530, JP**

72 Inventor/es:

**NIWA, KOUSUKE;
HIROTA, TOSHIKAZU y
KAWASE, MITSUO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 672 122 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la detección de un ácido nucleico diana

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una tecnología para detectar ácidos nucleicos diana.

10 **Técnica antecedente**

10 Se ha propuesto convencionalmente detectar exhaustivamente o cuantificar secuencias de ácido nucleico con el fin de llevar a cabo análisis genéticos de organismos individuales y para ensayar una infección de muestras biológicas con virus o bacterias. Por ejemplo, se han utilizado micromatrices (a las que se hace referencia de aquí en adelante simplemente como "matrices") se utilizan para detectar un nivel de expresión de las secuencias de ácido nucleico que se van a detectar (ácidos nucleicos diana) en las muestras (por ejemplo, véase los documentos no patentes 1 a 4). Las matrices son soportes sobre los que se fijan independientemente múltiples fragmentos de ácidos nucleicos (sondas de detección) que tienen secuencias de bases conocidas. Como se muestra en la Fig. 8, en los métodos de matrices convencionales, un cebador directo (cebador F) y un cebador inverso (cebador R) se diseñan de manera que flanquean la secuencia diana se utilizan para amplificar un fragmento de ADN (ácido nucleico diana) que contiene la secuencia diana. El ácido nucleico amplificado se separa entonces como una cadena sencilla. El ácido nucleico diana se une entonces en el soporte mediante hibridación de la secuencia diana con una parte complementaria con una secuencia parcial característica del ácido nucleico diana (secuencia diana). El ácido nucleico diana hibridado se detecta mediante cualquier método adecuado para determinar la presencia o ausencia del ácido nucleico en la muestra.

25 Se han desarrollado matrices específicas para la detección de polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP) (por ejemplo, véase los documentos de Patente 1 y 2). Mediante este método, se puede detectar un tipo de SNP en el ácido nucleico diana de la muestra utilizando tecnología de ADN computarizada.

30 El documento WO-A-2008/003244 desvela un método para la detección de alelos polimórficos. El método emplea cebadores específicos de alelo que comprende cada uno una secuencia marcadora en el extremo 5' y un segundo cebador que comprende una parte de unión a la diana y un marcador.

35 **Listado de citas**

Bibliografía de Patentes

Documento de patente 1: Solicitud de Patente Japonesa abierta a inspección pública N.º 2006-211982

Documento de patente 2: Solicitud de Patente Japonesa abierta a inspección pública N.º 2006-101844

40 **Bibliografía de No patentes**

Documento no patente 1: Baio Jikken de Shippai Shinai! Kenshutsu to Teiryō no Kotsu (Successful Biotechnological Experiments: Tips for Detection and Quantification), Volumen suplementario de Jikken Igaku (Medical Experiments), Yodosha, Capítulo 3, 10. Maikuroarei no Kotsu (Tips for Microarrays)

Documento no patente 2: Bioview, N.º 45, pp. 14-18, 2004, Takara-Bio

Documento no patente 3: Biotechnology series: DNA chip application technology, CMC Publishing, Capítulo 5, Practice and application of DNA microarrays

50 Documento no patente 4: Ministry of Health, Labour and Welfare Grant-in-Aid for Scientific Research, Research project on securement of food safety and reliability (Annual Report of Ministry of Health, Labour and Welfare, 2006)

Sumario

55 En los métodos desvelados en los documentos no patentes 1 a 4, la sonda de detección fijada en la matriz se hibrida con la secuencia diana, cuya hibridación necesita un periodo de tiempo prolongado. Además, la sonda de detección se puede unir no específicamente a otras secuencias de ácido nucleico que tienen una similitud (homología) con la secuencia diana. A saber, con la detección de múltiples secuencias diana en la muestra, la presencia o ausencia de las mismas no puede detectarse con precisión.

60 Con respecto a los problemas de unión no específica, el documento no patente 2 desvela que la homología de la sonda de detección se puede minimizar reduciendo la longitud de la misma. Sin embargo, la reducción de la longitud de la sonda de detección puede disminuir la intensidad de señal de un marcador con la detección. El documento no patente 4 desvela que la unión no específica se puede disminuir aumentando la temperatura de hibridación. Sin embargo, cuando el problema no se resuelve por estos métodos, la secuencia de la sonda de detección se tiene que volver a diseñar y la matriz necesita volver a prepararse. Por lo tanto, los usuarios de las matrices tienen que

considerar la influencia de la homología, haciendo que las etapas del procedimiento para obtener un sistema de detección apropiado para un ácido nucleico diana sean significativamente intrincadas.

5 Por otra parte, los métodos desvelados en los documentos de patente 1 y 2 son específicas para la detección de SNP que permiten la detección precisa de SNP. Sin embargo, son necesarias siete sondas diferentes para la detección de un SNP y los procedimientos son más intrincados. Además, el diseño de sondas es problemático debido a que es necesario que el usuario ligue productos secundarios de la amplificación del ácido nucleico diana antes de la hibridación del ácido nucleico diana por la matriz.

10 Como se ha descrito anteriormente, es necesario mucho esfuerzo en los métodos convencionales para constituir un sistema de detección de los ácidos nucleicos diana que se pretenden. Ha sido también difícil detectar con precisión el ácido nucleico diana en poco tiempo. En consecuencia, un objetivo de la divulgación de la presente memoria descriptiva es proporcionar un método para la detección del ácido nucleico diana que permita la construcción eficaz del sistema de detección del ácido nucleico diana.

15 **Descripción de la invención**

Los presentes inventores han estudiado con el fin de construir eficazmente el sistema de detección por distintos métodos que permitan la hibridación eficaz de la sonda de detección fijada en el soporte con el ácido nucleico diana mientras que se mantenga la selectividad. Como resultado, han llegado a la conclusión de que es difícil construir eficazmente el sistema de detección basándose en la reacción de hibridación debido a la especificidad de secuencia del ácido nucleico diana en un soporte sólido. También han descubierto que la consideración de las condiciones de hibridación se puede omitir y se puede excluir la unión no específica y se puede alcanzar una alta selectividad utilizando múltiples conjuntos de sondas de detección y secuencias marcadoras que se han diseñado de manera que sean capaces de hibridarse específicamente y unirse a las secuencias marcadoras del ácido nucleico diana. Además, sin la necesidad de la unión de dicho ácido nucleico diana quimérico utilizando una sonda específica para la secuencia diana, la unión no específica entre el ácido nucleico diana marcado y la sonda de detección se puede reducir amplificando el ácido nucleico diana marcado utilizando cebadores específicamente que se pueden hibridar con una secuencia parcial que tenga una homología baja, es decir, una secuencia característica del ácido nucleico diana. Se proporciona el siguiente método basándose en estos hallazgos.

La divulgación de la presente memoria descriptiva se refiere a un método para la detección del ácido nucleico diana en la muestra, como se define en las reivindicaciones. El presente método de detección comprende las etapas de preparación de la fase sólida que comprende las sondas de detección que tienen respectivamente diferentes secuencias de bases, la realización de la PCR en la muestra para obtener ADN quiméricos que tienen cada uno un marcador y una secuencia marcadora complementaria a cada una de las sondas de detección que se han correlacionado con el ácido nucleico diana, la puesta en contacto de los ADN quiméricos con las sondas de detección de manera que los ADN quiméricos y las sondas de detección se puedan hibridar mediante las secuencias marcadoras, la obtención de la información de la intensidad de señal basándose en el marcador de la fase sólida, y la detección del ácido nucleico diana basándose en la información de la intensidad de señal.

La etapa de PCR comprende la preparación de un primer cebador que tiene una secuencia de identificación complementaria a la secuencia diana del ácido nucleico diana y una secuencia marcadora adicional complementaria a la secuencia marcadora, y un segundo cebador que tiene una secuencia parcial idéntica a una secuencia parcial adyacente a la secuencia diana y el marcador, y llevar a cabo la PCR en la muestra utilizando el primer cebador y el segundo cebador para sintetizar el ADN quimérico que tiene la secuencia diana, la secuencia marcadora y el marcador.

En la etapa de PCR, se utilizan dos o más primeros cebadores y un segundo cebador común a los dos o más ácidos nucleicos diana para dos o más ácidos nucleicos diana.

La etapa de PCR puede ser la etapa de amplificación de ADN quiméricos mediante PCR asimétrica.

55 El ácido nucleico diana se puede detectar utilizando la matriz que comprende la sonda de detección que se puede hibridar con la secuencia marcadora que se ha correlacionado con el ácido nucleico diana.

Breve descripción de los dibujos

60 La Fig. 1 es una vista esquemática de un ejemplo del método de detección de la presente invención;
 La Fig. 2 es una vista que representa la relación entre el soporte de fase sólida, y las sondas de detección y el ADN quimérico en el soporte de fase sólida de acuerdo con la presente invención;
 La Fig. 3 es una vista que muestra la etapa de amplificación del ácido nucleico diana marcado de acuerdo con la presente invención;
 La Fig. 4 es un diagrama de flujo para la preparación de la matriz y la diana;
 65 La Fig. 5 es una tabla que muestra las secuencias de bases de las sondas de detección;
 La Fig. 6 es una vista que muestra los resultados de la detección obtenidos en los ejemplos de la presente

invención;

La Fig. 7 es una vista que muestra los resultados de detección obtenidos en los ejemplos del método convencional; y

5 La Fig. 8 es una muestra que muestra un método de detección convencional a modo de ejemplo de ácidos nucleicos diana.

Descripción de las realizaciones

10 Se desvela una matriz para la detección de la secuencia diana en el ácido nucleico diana que se va a detectar. De acuerdo con el método de detección del ácido nucleico diana de la presente invención, se puede evitar un procedimiento para construir el sistema de detección diseñando las sondas de detección que tengan secuencias de bases únicas respectivamente para todos los ácidos nucleicos diana y fijándolas en el soporte de fase sólida. Llevando a cabo la PCR en la muestra de manera que se obtenga un ADN quimérico que tenga una secuencia de detección complementaria a la sonda de detección que se ha correlacionado con el ácido nucleico diana y el marcador, se puede identificar el ácido nucleico diana y el ADN quimérico que tiene la secuencia de detección que se ha correlacionado con la sonda de detección, que es específica del ácido nucleico diana y está marcada, se puede obtener mediante PCR por preparación de ADN para la hibridación. Hibridando el ADN quimérico y la sonda de detección mediante la secuencia de detección, el ADN quimérico se hibrida con la sonda de detección basándose en la sonda de detección y la secuencia de detección que se han correlacionado entre ellas, suprimiendo eficazmente o evitando la unión no específica en la hibridación.

20 De acuerdo con la divulgación de la presente memoria descriptiva, el primer cebador que tiene la secuencia de identificación complementaria a la secuencia diana en el ácido nucleico diana y la secuencia de marcador adicional y el segundo cebador que tiene la secuencia parcial adyacente a la secuencia diana y el marcador se utilizan cuando se lleva a cabo la PCR suprimiendo o evitando de esta manera el diseño complicado de sondas o cebadores. El conjunto de cebadores permite la preparación fácil de los ADN quiméricos para la hibridación con las sondas de detección que identifican directamente las secuencias diana y son específicas de los ácidos nucleicos diana.

30 La Fig. 4 muestra un esbozo de los procedimientos de la preparación de la matriz y la diana para la detección del ácido nucleico diana. La Fig. 4 muestra también el diagrama de flujo para el método desvelado en la presente memoria descriptiva, así como el método de detección convencional. Las etapas mostradas con la línea continua son las etapas comunes del método desvelado en la presente memoria descriptiva, y el método convencional, y las etapas mostradas con la línea discontinua son los necesarios solo para el método convencional. En el método convencional se llevan a cabo múltiples etapas para la preparación de matrices para los ácidos nucleicos diana respectivos. La información de la secuencia del ácido nucleico diana que se va a detectar se obtiene primero y la sonda de detección se diseña de acuerdo con la información de secuencia. La sonda de detección se sintetiza entonces de acuerdo con el diseño y se prepara en una solución puntual para la matriz con el fin de fijar la sonda a la matriz. Mientras tanto, el ácido nucleico diana que se va a detectar (una diana tal como ARN o ADN) se extrae y se purifica de la muestra. Los cebadores para amplificar el ácido nucleico diana se diseñan y se sintetizan con un marcador. El ácido nucleico diana se amplifica entonces con los cebadores sintetizados. El ácido nucleico diana amplificado se hibrida entonces con la sonda de detección en la matriz preparada (hibridación). La existencia de la hibridación se examina de acuerdo con la detección de la señal del marcador del a matriz y la señal obtenida del marcador se convierte en un valor numérico. Cuando los resultados obtenidos no son los esperados tales como una señal de fluorescencia anormal o ausente, etc., la matriz se tiene que diseñar de nuevo o se tiene que preparar la muestra de nuevo, como se muestra con las líneas continuas y discontinuas de la Fig. 4.

45 Los métodos convencionales desvelados en los documentos no patentes 1 a 4 necesitan muchas revisiones de las condiciones de hibridación, cebadores, e incluso de las secuencias de las sondas de detección de la matriz. Esto toma un prolongado periodo de tiempo para volver a diseñar y sintetizar oligos ADN para las secuencias de las sondas de detección y sondas de consulta. De acuerdo con el presente método, las sondas de detección y las sondas de consulta se pueden seleccionar simplemente de entre 100 secuencias diferentes (véase el Listado de Secuencias). Los métodos desvelados en los documentos de patente 5 y 6 necesitan siete cebadores diferentes y sondas para la detección de una secuencia diana.

55 Por otra parte, el método desvelado en la presente memoria descriptiva simplemente necesita la preparación de la matriz que comprende múltiples sondas de detección respectivamente que tienen la secuencia de detección única determinada preliminarmente independientemente del ácido nucleico diana. Como la matriz se puede aplicar independientemente del ácido nucleico diana, el diseño, síntesis y fijación de sondas para los ácidos nucleicos diana respectivos y la revisión de las condiciones de hibridación se pueden evitar, a diferencia del método convencional. El sistema de detección se puede construir de acuerdo con el método desvelado en la presente memoria descriptiva considerando principalmente solo el diseño de los cebadores en la preparación de la diana.

60 De acuerdo con el método desvelado en la presente memoria descriptiva, las sondas de detección se pueden preparar para que las condiciones de hibridación se optimicen, así se puede detectar el ácido nucleico diana con precisión en poco tiempo.

Como se utiliza en el presente documento, el "ácido nucleico" incluye todos los ARN y ADN, incluyendo ADNc, ADN genómico, ADN sintético, ARNm, ARN total, hnARN y ARN sintético así como ácidos nucleicos sintéticos artificiales tales como ácidos nucleicos peptídicos, ácido nucleico-morfolino, metilfosfonato de ácido nucleico y S-oligos de ácido nucleico. El ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de doble cadena. Como se utiliza en el presente documento, el "ácido nucleico diana" es cualquier ácido nucleico que tiene cualquier secuencia. Normalmente, el ácido nucleico diana incluye ácidos nucleicos que puede tener secuencias genéticamente indicativas de la constitución o incidencia de enfermedad, diagnóstico de enfermedad, pronóstico de enfermedad, selección de tratamiento de enfermedades específicas tales como enfermedades genéticas o cáncer en seres humanos o animales no humanos. El ácido nucleico diana incluye ácidos nucleicos derivados de microorganismos tales como patógenos o virus.

El ácido nucleico diana puede ser la muestra que se describe posteriormente o una fracción de ácido nucleico de la misma y es preferentemente un producto amplificado en el que todos los múltiples ácidos nucleicos diana se han amplificado mediante reacción de amplificación preferentemente con una PCR, más preferentemente con PCR múltiple.

Como se utiliza en el presente documento, la "muestra" se refiere a la muestra que puede contener el ácido nucleico diana. La muestra puede ser cualquier muestra que contenga un ácido nucleico incluyendo células, tejidos, sangre, orina, saliva y similares. Un experto en la técnica puede obtener apropiadamente una fracción que contiene el ácido nucleico de distintas muestras de acuerdo con la técnica convencional.

Como se utiliza en el presente documento, la "secuencia diana" se refiere a una secuencia formada por una o más bases características del ácido nucleico diana que se va a detectar. La secuencia diana puede ser una secuencia parcial que tiene baja homología entre los ácidos nucleicos diana o una secuencia que tiene baja complementariedad u homología con otros ácidos nucleicos que pueden estar contenidos en la muestra. La secuencia diana puede ser una secuencia característica del ácido nucleico diana. La secuencia diana puede tener una secuencia modificada artificialmente.

Ejemplos específicos representativos y no limitantes de la divulgación de la memoria descriptiva se describen en el presente documento después en referencia a los dibujos. La descripción detallada simplemente pretende ilustrar los detalles a un experto en la técnica para llevar a cabo los ejemplos preferidos de la divulgación de la presente especificación, mientras que no pretende limitar el alcance de la divulgación de la presente memoria descriptiva.

La Fig. 1 es una vista esquemática que muestra un principio del método para la detección de la presente invención. La Fig. 2 muestra un ejemplo de la fase sólida 100 utilizada para la presente invención, y la Fig. 3 muestra detalles para la etapa de amplificación de la Fig. 1. Las Fig. 1 y 3 muestran un ejemplo para el método de detección y el cebador para detectar un ácido nucleico diana contenido en la muestra. En las descripciones de aquí en adelante, una secuencia de bases designada con un número y (-) significa una secuencia de bases complementaria de una secuencia de bases designada con el mismo número.

[Método de detección de la secuencia diana en el ácido nucleico diana]

El método para la detección desvelado en la presente memoria descriptiva comprende etapas de preparación de la fase sólida que comprende sondas de detección múltiples que tienen respectivamente secuencias de bases únicas diferentes, llevar a cabo una PCR sobre la muestra de manera que se obtengan ADN quiméricos que tienen respectivamente una secuencia marcadora complementaria a la secuencia de detección de la sonda de detección que se ha correlacionado con el ácido nucleico diana y el marcador, hibridar los ADN quiméricos y las sondas de detección mediante la secuencia de detección y la secuencia marcadora, obtener la información de intensidad de la señal basada en el marcador del soporte, y detectar el ácido nucleico diana basándose en la información de intensidad de señal. El método para la detección de acuerdo con la divulgación de la presente memoria descriptiva se aplica a más ácidos nucleicos diana y más específicamente, tiene como meta detectar la secuencia(s) característica(s) diana del ácido(s) nucleico(s) diana. Se ilustra principalmente posteriormente en el presente documento una serie de etapas para la detección de un ácido nucleico diana. Sin embargo, las etapas descritas posteriormente se pueden aplicar también para la detección simultánea de varios o muchos ácidos nucleicos diana.

(Etapas de preparación del soporte de la fase sólida)

El método de detección desvelado en la presente memoria descriptiva (al que se hace referencia de aquí en adelante simplemente con el presente método de detección) puede comprender la etapa de preparación de la fase sólida 100 como se muestra en la Fig. 1. La fase sólida 100 puede prepararse preliminarmente antes de llevar a cabo el método de detección, puede obtenerse en el mercado o se puede preparar cada vez que se lleva a cabo el método de detección.

Como se muestra en la Fig. 1, la fase sólida 100 puede comprender múltiples sondas de detección 104 que comprenden respectivamente las secuencias de detección 106 que son secuencias de bases únicas diferentes en el soporte 102. La preparación de dicha fase sólida 100 puede evitar el diseño y síntesis de sondas, la preparación de

matrices y la consideración de las condiciones de hibridación.

La Fig. 2 muestra un ejemplo de fase sólida 100. Las sondas de detección 104 contienen las secuencias de detección 106 que son secuencias de bases únicas respectivamente para el sondaje. Dichas secuencias de detección 106 se pueden establecer independientemente de la secuencia característica del ácido nucleico diana 10, es decir, la secuencia diana 12. Las secuencias de detección 106 en las sondas de detección 104 son independientes de la secuencia diana 12 y se pueden establecer de manera que supriman o eviten la unión no específica entre las múltiples sondas de detección 104 y obtener condiciones de hibridación adecuadas tales como la temperatura y el tiempo. Además, las mismas sondas de detección 104 se pueden utilizar todo el tiempo independientemente de la variación del ácido nucleico diana 10.

La secuencia de detección 106 de la sonda de detección 104 pueden ser las secuencias de bases de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 100 o sus secuencias de bases complementarias. Estas secuencias de bases tienen la misma longitud de bases y tienen una temperatura de fusión (T_m) de 40 °C o mayor y de 80 °C o menor, más preferentemente de 50 °C o mayor y 70 °C o menor, dando de esta manera resultados de hibridación homogéneos bajo las mismas condiciones de hibridación.

La secuencia de detección 106 de la sonda de detección 104 puede seleccionarse apropiadamente a partir de dichas secuencias de bases candidatas. Se van a utilizar dos o más sondas de detección 104 que tengan preferentemente temperaturas de fusión lo más cercanas posible entre ellas. Cuando los múltiples ácidos nucleicos diana 10 se detectan exhaustiva y simultáneamente, se combinan múltiples sondas de detección 104 para los respectivos múltiples ácidos nucleicos diana 10 de manera que tengan temperaturas de fusión lo más cercanas entre ellas. Por ejemplo, cuando las sondas de detección 104 se disponen en orden de sus temperaturas de fusión, se pueden seleccionar dos o más sondas de detección 104 para los respectivos dos o más ácidos nucleicos diana 10 que se van a distinguir de entre dos secuencias de bases adyacentes en la disposición por temperaturas de fusión. La secuencia de detección 106 de la sonda de detección 104 para otro ácido nucleico diana 10 se puede seleccionar de entre secuencias de bases inmediatamente consecutivas o separadas de la secuencia de bases que ya se ha seleccionado. También es preferible el uso de secuencias de bases que tienen temperaturas de fusión consecutivas en la disposición por temperaturas de fusión en todas las sondas de detección para múltiples ácidos nucleicos diana 10 que se van a detectar simultáneamente.

La temperatura de fusión puede ser la calculada de acuerdo con el método GC %, un método Wallace, un método de acuerdo con Current Protocols in Molecular Biology (descrito en Biotechnology Experiments Illustrated 3, Honto ni fueru PCR (Truly amplifiable PCR), Shujunsha, p.25); sin embargo, se calcula preferentemente por el método de Vecino más cercano en el cual se pueden incluir los impactos de un intervalo de temperatura de fusión y una concentración de la secuencia de bases en la presente invención. La temperatura de fusión por el método del vecino más cercano se puede obtener fácilmente utilizando, por ejemplo, un software equipado con Visual OMP (Tomy Digital Biology Co., Ltd.) o el software proporcionado por Nihon Gene Research Laboratories Inc. (<http://www.ngrl.co.jp/>) (OligoCalculator; http://www.ngrl.co.jp/tool/ngrl_tool.html). Las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 100 están dispuestas en orden descendente de temperaturas de fusión calculadas con Visual OMP (concentración de sonda de 0,1 M, 50 mM de ion Na^+ y 1,5 mM de ion Mg^{2+}).

La secuencia de detección 106 de la sonda de detección 104 se denomina secuencia de ortonormalización y se diseña basándose en los cálculos de una longitud idéntica consecutiva, predicción de la temperatura de fusión por el método del vecino más cercano, una distancia Hamming, predicción de la estructura secundaria en las secuencias de ADN que tienen ciertas longitudes de bases obtenidas a partir de números aleatorios. Las secuencias de ortonormalización son secuencias de bases de ácidos nucleicos que tienen temperaturas de fusión homogéneas y por lo tanto se diseñan de manera que tengan temperaturas de fusión en un intervalo constante, que no inhiban la hibridación con las secuencias complementarias debido a que los ácidos nucleicos están estructurados intramolecularmente, y que no se hibriden establemente con secuencias de bases distintas de las secuencias de bases complementarias. Las secuencias contenidas en un grupo de secuencias de ortonormalización difícilmente reaccionan o no reaccionan con secuencias distintas de la combinación deseada o con sus secuencias. Cuando las secuencias de ortonormalización se amplifican por PCR, la cantidad de los ácidos nucleicos amplificados cuantitativamente se corresponden con una cantidad inicial de ácidos nucleicos que tienen secuencias de ortonormalización sin estar influenciadas por un problema tal como la hibridación cruzada como se menciona anteriormente. Dichas secuencias de ortonormalización se revisan en H. Yoshida y A. Suyama, "Solution to 3-SAT by breadth first search", DIMACS Vol. 54, 9-20 (2000) y Solicitud de Patente Japonesa N° 2003-108126. Las secuencias de ortonormalización se pueden designar utilizando los métodos descritos en estos documentos.

Las sondas de detección 104 se fijan en el soporte 102. El soporte 102 puede ser el soporte de la fase sólida. El soporte 102 puede ser, por ejemplo, de plástico, cristal o cualquiera otro material sin limitación. Una forma del soporte 102 puede ser una placa como se muestra en la Fig. 1 o puede ser una perla sin limitación. La fase sólida 100 es preferentemente la matriz (particularmente una micromatriz) en el que el soporte 102 es una placa de fase sólida y múltiples sondas de detección 104 se fijan con una secuencia regular. La matriz se puede fijar con muchas sondas de detección 104 y es adecuada para detectar distintos ácidos nucleicos diana 10 simultánea y exhaustivamente. La fase sólida 100 puede comprender múltiples regiones de matriz definidas en el soporte 102. En las múltiples regiones de matriz, se pueden fijar los mismos conjuntos de sondas de detección 104 o diferentes

conjuntos de sondas de detección 104. Cuando se fijan diferentes combinaciones de los conjuntos de sondas de detección 104 en múltiples regiones de matriz, las regiones individuales de matriz se pueden asignar para la detección de ácidos nucleicos diana 10 en diferentes genes.

- 5 La fase sólida 100 preferida puede comprender dos o más sondas de detección 104 dispuestas en orden de sus temperaturas de fusión. Por ejemplo, utilizando dicha fase sólida 100 en la que se colocan en dicho orden dos o más sondas de detección 104 para dos o más ácidos nucleicos diana 10 correspondientes a dos o más secuencias diana 12 que pueden existir en ciertos sitios en ciertos genes, la variación en la hibridación debido a la diferencia en las temperaturas de fusión de las secuencias de detección 106 de las sondas de detección 104 o las posiciones a las que las sondas de detección 104 se fijan están suprimidas, permitiendo de esta manera una detección con precisión de los ácidos nucleicos diana 10 en la muestra.

15 Las sondas de detección 104 se pueden fijar por cualquier modo sin limitación, que puede ser covalente o no covalente. Las sondas de detección 104 se pueden fijar en la superficie del soporte 102 por cualquiera de distintos métodos bien conocidos en la técnica. La superficie del soporte 102 puede comprender secuencias enlazadoras adecuadas. Las secuencias enlazadoras tienen preferentemente la misma longitud de bases y la misma secuencia para las sondas de detección 104 respectivas.

(Etapa de obtención del ADN quimérico: etapa de PCR)

20 Como se muestra en la Fig. 1, la etapa de PCR puede comprender llevar a cabo una PCR con la muestra de manera que se obtenga el ADN quimérico 60 que tiene el marcador 42 y la secuencia marcadora 66 que es capaz de hibridarse con la secuencia de detección 106 en la sonda de detección 104 específica que se ha correlacionado con el ácido nucleico diana 10. Obteniendo dicho ADN quimérico 60, puede emplearse la sonda de detección 104 que tiene la secuencia de detección 106 única de la que se había determinado anteriormente independientemente de la secuencia de bases de la secuencia diana 12 en el ácido nucleico diana 10. La secuencia marcadora 66 es preferentemente complementaria de manera que se puede hibridar específicamente a la secuencia de detección 106 única de la sonda de detección 104, y más preferentemente completamente complementaria a la secuencia de detección 106. El marcador se describe posteriormente en el presente documento.

30 Los cebadores que se utilizan en la etapa de PCR no están limitados específicamente a condición de que el ADN quimérico 60 anterior se pueda obtener. La etapa a modo de ejemplo preferida de PCR en el presente método de detección se describe ahora en referencia a la Fig. 1. La parte superior derecha de la Fig. 1 muestra una etapa de llevar a cabo una PCR con el ácido nucleico diana 10 y su cadena complementaria 20 en la muestra con el primer cebador 30 y el segundo cebador 40 para obtener un producto de amplificación, el ADN quimérico 60.

(Primer cebador)

40 Como se muestra en la Fig. 1, el primer cebador 30 contiene la secuencia de identificación 32 y la secuencia de adición de marcador 36. El primer cebador 30 se prepara en igual número que los ácidos nucleicos diana 10. Cuando se esperan dos tipos de mutaciones en cierta parte del ADN genómico de cierta clase de animal, que sean, por ejemplo, sustituciones de nucleótidos únicos con A para un tipo silvestre y T para una mutación, hay dos ácidos nucleicos diana 10 para esta parte. Por lo tanto, un ácido nucleico diana 10 para esta parte contiene la secuencia diana 12 que tiene la base de tipo silvestre y el otro ácido nucleico diana 10 que contiene la secuencia diana 12 que tiene la base mutada. En consecuencia, cuando hay dos ácidos nucleicos diana 10 para un cierto sitio de un gen, se preparan dos primeros cebadores 30 que tienen cada uno la secuencia de identificación 32 complementaria a la secuencia diana 12 en cada uno de los ácidos nucleicos diana 10 (secuencia de identificación).

50 La secuencia de identificación 32 se puede hibridar específicamente con la secuencia diana 12 que es una secuencia característica del ácido nucleico diana 10, con el fin de identificar el ácido nucleico diana 10. La secuencia de identificación 32 se establece para que sea complementaria de manera que se pueda hibridar con la secuencia diana 12 del ácido nucleico diana 10 con alta selectividad, y preferentemente se establece para que sea completamente complementaria (específica) La longitud preferida de la secuencia de identificación 32 puede variar de acuerdo con las mutaciones y no está limitada específicamente, pero es preferentemente de 15 bases o más, por ejemplo. La secuencia de identificación 32 que tiene 15 bases o más de longitud se puede hibridar con la secuencia diana 12 con alta selectividad. La secuencia de identificación que tiene 60 bases o menos de longitud es preferible debido a la reducción de hibridación no específica.

(Secuencia de adición de marcador)

60 El primer cebador 30 puede comprender la secuencia de adición de marcador 36 para añadir la secuencia marcadora 66 al producto amplificado, el ADN quimérico 60, de manera que permite que el ADN quimérico 60 sea capaz de hibridarse a la secuencia de detección 106 en la sonda de detección 104. La secuencia marcadora 66 del ADN quimérico 60 es para la detección del ácido nucleico diana 10, por lo tanto se establece que es capaz de hibridarse a la secuencia de detección 106 en la sonda de detección 104 para cada ácido nucleico diana 10. Por lo tanto, un ADN quimérico 60 que se corresponde con un ácido nucleico diana 10 se correlacione con una sonda de

detección 104. La secuencia marcadora 66 es preferentemente completamente complementaria a la secuencia de detección 106 única de la sonda de detección 104. Por lo tanto, la secuencia de adición del marcador 36 preferentemente tiene la misma secuencia de bases que la secuencia de detección 106 única de la sonda de detección 104 para la detección.

5 Como se ha descrito anteriormente, el primer cebador 30 se prepara de manera que se una específicamente a la secuencia diana 12 del ácido nucleico diana 10 y se prepara en el mismo número que los ácidos nucleicos diana 10, amplificando específicamente de esta manera los ácidos nucleicos diana 10 mientras se detectan los mismos. El primer cebador 30 también se forma para permitir la unión específica del producto amplificado por PCR, el ADN quimérico 60, a la sonda de detección 104 particular que se ha correlacionado con el ácido nucleico diana 10.

(Segundo cebador)

15 Como se muestra en la Fig. 1, el segundo cebador 40 puede contener el marcador 43 y la secuencia parcial 44 que es idéntica a la secuencia de bases adyacente a la secuencia diana 12 del ácido nucleico diana 10. El marcador 42 puede estar en el lado 5' del segundo cebador.

(Marcador)

20 El marcador 42 es para detectar el producto amplificado por PCR, el ADN quimérico 60. El marcador 42 puede seleccionarse apropiadamente de entre marcadores bien conocidos. El marcador puede ser cualquiera de distintos marcadores que emiten una señal fluorescente después de la excitación tal como sustancias fluorescentes, o una sustancia que emite cualquiera de distintas señales después de combinarlo con un componente secundario mediante una reacción enzimática, o una reacción antígeno-anticuerpo. El marcador puede ser normalmente sustancias marcadoras fluorescentes tales como Cy3, Alexa 555, Cy5, Alexa 647. La detección por desarrollo de color se puede utilizar combinando biotina y estreptavidina-HRP y procesándolas con un sustrato.

(Secuencia parcial)

30 La secuencia parcial 44 tiene la misma secuencia de bases que la secuencia parcial 14 adyacente a la secuencia diana 12 del ácido nucleico diana 10. La secuencia parcial 14 adyacente a la secuencia diana 12 no significa que la secuencia parcial 14 esté inmediatamente en el lado 5' de la secuencia diana 12 sin la interposición de una base (nucleótido) entre ellas, sino que puede haber una secuencia con un número apropiado de bases (nucleótidos) interpuesta. La secuencia parcial 44 del segundo cebador 40 es la secuencia que permite la hibridación del segundo cebador 40 a la secuencia complementaria 20 del ácido nucleico diana 10.

40 Cuando se detecta una mutación en el ADN, el primer cebador 30 y el segundo cebador 40 se diseñan para los ácidos nucleicos diana 10 respectivamente de tipo silvestre y el mutante. En este caso, la secuencia parcial 44 del segundo cebador 40 puede ser común a estos ácidos nucleicos diana 10. A saber, la secuencia parcial 44 puede ser una secuencia parcial común adyacente a la secuencia diana 12 en estos ácidos nucleicos diana 10. La secuencia parcial común es una secuencia de bases que es común independientemente de la mutación. Debido a esto, la eficacia de amplificación de los ácidos nucleicos diana 10 se puede promediar y la cantidad del primer cebador 40 que se utiliza se puede disminuir. La secuencia parcial 44 puede ser la secuencia que tenga una homología para múltiples ácidos nucleicos diana 10 que se corresponden con múltiples secuencias diana 12 que constituyen las mutaciones.

50 Como se ha descrito anteriormente, el segundo cebador 40 contiene el marcador 42 y la secuencia parcial 44 y está formado de manera que sintetiza el ADN quimérico 60 que contiene la secuencia diana 12 debido a la secuencia parcial 44. Cuando el presente método es para detectar múltiples ácidos nucleicos diana 10 que tienen múltiples secuencias diana 12 que constituyen mutaciones, el segundo cebador 40 puede tener una secuencia parcial 44 común que permite la amplificación de múltiples ácidos nucleicos diana 10 que tienen múltiples secuencias diana 12 que constituyen mutaciones con la misma condición.

55 La etapa de obtención del ADN quimérico 60 con el primer cebador 30 y el segundo cebador 40 se describe ahora en referencia a las Fig. 1 y 3. En la siguiente descripción, solo se explica la reacción PCR que puede dar el ADN quimérico 60 deseado.

60 Como se muestra en la Fig. 3, el primer cebador 30 se hibrida con la secuencia diana 12 del ácido nucleico diana 10 mediante la secuencia de identificación 32. Como resultado, se extiende una nueva cadena de ADN a partir del primer cebador 30 con el ácido nucleico diana 10 como matriz, sintetizando de esta manera una cadena de ADN 50 que comprende una nueva secuencia parcial 14 (-) sintetizada. La cadena de ADN 50 tiene la secuencia de adición de marcador 36, la secuencia de identificación 32 y la secuencia parcial 14 (-).

65 A la secuencia parcial 14 (-) en la cadena de ADN 50 obtenida de esta manera se hibrida entonces el segundo cebador 40 mediante su secuencia parcial 44. Como resultado se extiende una nueva cadena de ADN a partir del segundo cebador 40 con la cadena de ADN 50 como matriz, sintetizando de esta manera una cadena de ADN 60

que comprende una secuencia de bases complementaria a la secuencia de identificación 32 y una secuencia de bases complementaria a la secuencia de adición de marcador 36. Como la secuencia de identificación 32 tiene una secuencia de bases idéntica a la secuencia diana 12(-), la secuencia de bases complementaria a la secuencia de identificación 32 tiene la misma secuencia que la secuencia diana 12. Como la secuencia de adición de marcador 36 es idéntica a la secuencia de detección 106 única de la sonda de detección 104, la secuencia de bases complementaria a la secuencia de adición de marcador es la secuencia marcadora 66 que es complementaria a la secuencia de detección 106 en la sonda de detección 104. La cadena de ADN 60 así obtenida es el ADN quimérico 60 que comprende el marcador 42 y que se ha correlacionado con la secuencia diana 12 y la sonda de detección 104. El ADN quimérico 60 se utiliza como matriz en la reacción de amplificación posterior.

La etapa de PCR para la obtención del ADN quimérico 60 es preferentemente la etapa de PCR asimétrica. La PCR asimétrica se puede llevar a cabo variando las concentraciones del primer y segundo cebadores, por ejemplo.

Como el ADN quimérico 60 se obtiene como un ADN de doble cadena, se disocia en cadenas sencillas para someterlas a la etapa de hibridación. La disociación en este contexto se puede conseguir por un tratamiento desnaturizante que comprende la desnaturalización química y la desnaturalización térmica. Cuando los oligonucleótidos unidos se disocian por desnaturalización química, se puede llevar a cabo un tratamiento conocidos por los expertos en la técnica tal como la desnaturalización alcalina. Cuando los oligonucleótidos unidos se disocian por desnaturalización térmica, se pueden colocar a una temperatura de 85 °C o más, preferentemente de 90 °C o más en condiciones fisiológicas; sin embargo un experto en la técnica puede seleccionar apropiadamente el método de disociación.

De acuerdo con la etapa de PCR en la que la muestra que puede contener posiblemente el ácido nucleico diana 10 se somete a la etapa de PCR, se pueden obtener inmediatamente los ADN quiméricos 60 que se pueden detectar específicamente los ácidos nucleicos diana 10 mediante las sondas de detección 104 que se han correlacionado con el ácido nucleico diana 10.

Se puede someter el producto de reacción PCR a una nueva etapa sin recolectar los ADN quiméricos 60, debido a que solamente los ADN quiméricos 60 se pueden unir a las sondas de detección 104 que se detectan entonces mediante el marcador 42. Los ADN quiméricos 60 se pueden recolectar por un método bien conocido. Por ejemplo, los ADN quiméricos 60 se pueden separar y recolectar por un método bien conocido tal como utilizando un soporte de fase sólida apropiado después de disociarse en cadenas sencillas.

(Etapa de hibridación)

La etapa de hibridación es la etapa en la que las sondas de detección 104 que tienen las secuencias de detección 106 complementarias a las secuencias marcadoras 66 de los ADN quiméricos 60 en la fase sólida 100 fijada en el soporte 102 y los ADN quiméricos 60 se ponen en contacto de manera que se permita la hibridación. Como se muestra en las Fig. 1 y 2(c), cuando el ADN quimérico 60 es complementario a la secuencia de detección 106 de la sonda de detección 104 de manera que se puedan hibridar entre ellos en ciertas condiciones, se hibridan entre ellas para formar una cadena doble en una cierta sonda de detección 104 del soporte 102 en esta etapa. Puede estar contenida apropiadamente una etapa de lavado adicionalmente a continuación de la etapa de hibridación.

Para la etapa de hibridación se proporciona el ADN quimérico 60 que se ha sintetizado en la etapa de PCR solo cuando el ácido nucleico diana 10 está presente en la muestra y que se hibrida solo con la sonda de detección 104 que se había correlacionado. La secuencia de detección 106 en la sonda de detección 104 y la secuencia marcadora 66 en el ADN quimérico 60 se seleccionan con alta selectividad de manera que se suprima altamente la mala hibridación, suprimiendo altamente de esta manera la hibridación no específica del ADN quimérico 60 a la sonda de detección 104 en la etapa de hibridación.

(Etapa de obtención de la información de la intensidad de señal)

La etapa de obtención de la información de la intensidad de señal es la etapa en la que la información de la intensidad de la señal sobre el ácido nucleico diana 10 basado en el marcador 42 del soporte 102 se obtiene después de la hibridación. De acuerdo con la presente etapa de obtención de la información de la intensidad de la señal, el ADN quimérico 60 se hibrida a la sonda de detección 104 para proporcionar una información de la intensidad de la señal basada en el marcador 42.

Como se muestra en la Fig. 1, en la etapa de obtención de la información de la intensidad de la señal, se puede detectar la señal 48 derivada del marcador 42 asociada con la sonda de detección 104 en la fase sólida 100. Como la posición de la sonda de detección 104 correlacionada ya se conocía en la fase sólida 100, la presencia o ausencia o la relación del ácido nucleico diana 10 se puede determinar detectando la señal 48 en la siguiente etapa de detección.

La etapa de obtención de la información de la intensidad de la señal se puede llevar a cabo seleccionando un método convencional bien conocido de acuerdo con la forma del soporte 102 o el marcador 42. Normalmente,

después de retirar los oligonucleótidos no hibridados y similares del soporte 102 por lavado, la señal fluorescente de la sustancia de marcado añadida se puede detectar con un explorador de matriz y similares o la sustancia de marcado se puede someter a una reacción de luminiscencia química. Cuando el soporte es una perla, se puede emplear un método de detección utilizando un citómetro de flujo.

5
(Etapa de detección)

10 La etapa de detección es la etapa en la que se detecta el ácido nucleico diana 10 en la muestra basándose en la información de intensidad de la señal del marcador 42 obtenida por la sonda de detección 104. De acuerdo con el presente método, cuando se detectan múltiples ácidos nucleicos diana 10 simultáneamente, las secuencias dianas se pueden detectar con seguridad. De acuerdo con el presente método, como se suprime altamente la unión no específica a la sonda de detección 104 en la etapa de hibridación, el ácido nucleico diana 10 se puede detectar con precisión con alta sensibilidad de detección y se puede obtener la presencia o ausencia o la relación del mismo.

15 (Conjunto de cebadores)

20 El conjunto de cebadores comprende el primer y segundo cebadores descritos anteriormente en el presente documento. El conjunto de cebadores se utiliza en combinación con la fase sólida en la que se han fijado las sondas de detección 104, y es adecuado para la obtención del ADN quimérico descrito anteriormente en el presente documento. El primer cebador comprende la secuencia de identificación 32 que es específica del ácido nucleico diana particular para la detección de una mutación entre los individuos con respecto al mismo gen y similares o una diferencia entre especies o géneros y la secuencia de adición de marcador 36 que se ha correlacionado con la secuencia de detección 106. El segundo cebador comprende el marcador. El conjunto de cebadores puede ser para la detección de dos o más ácidos nucleicos diana. En este caso, el conjunto de cebadores puede comprender 25 primeros cebadores específicos para los respectivos ácidos nucleicos diana y el único segundo cebador común a dos o más ácidos nucleicos diana. El conjunto de cebadores puede estar comprendido en un kit junto con el soporte tal como la matriz a la que se ha fijado las sondas de detección descritas anteriormente en el presente documento.

30 Ejemplo 1

Los siguientes ejemplos no limitan la presente invención.

Ejemplo 2

35 El ácido nucleico diana se detectaba por el método de detección de la presente invención en el presente ejemplo de acuerdo con los siguientes procedimientos, que se describan ahora paso a paso.

- (1) Preparación de la micromatriz de ADN
- (2) Preparación y amplificación de los ácidos nucleicos diana y cebadores
- 40 (3) Hibridación
- (4) Detección con el explorador
- (5) Análisis de los datos

45 (1) Preparación de la micromatriz de ADN

Sobre una placa de plástico, se puntearon soluciones acuosas de oligos ADN sintéticos (Nihon Gene Research Laboratories Inc.) modificados en el extremo 3' con un grupo amino como las sondas de detección utilizando el punteador GENESHOT® en NGK Insulators, Ltd. Como se muestra en la Tabla 1, se utilizaron 100 oligos ADN sintéticos que eran de D1_001 a D1_100 que se muestran en la Tabla suplementaria 1 en un documento (Analytical Biochemistry 364 (2007) 78-85) (véase la Fig. 5). Después del punteo, la placa se metió en el horno a 80 °C durante una hora. Estas sondas se dispusieron en orden descendente de temperaturas de fusión correspondientes con la T_m calculadas con el Visual OMP (0,1 M de concentración de sonda, 40 mM de ion Na⁺ y 1,5 mM de ion Mg⁺).

50 Los oligos ADN sintéticos se fijaron de acuerdo con los siguientes procedimientos. A saber, la placa se lavó con 2 x SSC/un 0,2 % de SDS durante 15 minutos, con 2 x SSC/un 0,2 % de SDS a 95 °C durante 5 minutos, antes del lavado tres veces con agua esterilizada (mezclando por volteo vertical 10 veces). La placa se secó entonces por centrifugación (1000 rpm x 3 minutos).

60 (2) Preparación de los ácidos nucleicos diana y los cebadores para la amplificación

Los genes de la muestra que se van a detectar se derivaron de dos tipos de microorganismos orales, *Enterococcus faecalis* (muestra 1) *Pseudorambibacter alactolyticus* (muestra 2). La longitud de estas muestras era aproximadamente de 15 pb, que rodeaban las secuencias características de los microorganismos, y se utilizaron genes artificiales que tenían estas secuencias de bases como ácidos nucleicos diana. Los cebadores para amplificar 65 estos ácidos nucleicos diana se sintetizaron artificialmente de la siguiente manera. El segundo cebador, es decir el cebador directo (cebador F) era 5' -AGGTTAAACTCAAAGGAATTGACG-3' (SEQ ID NO: 101), que estaba

marcado con Cy3 en el lado 5'. Los primeros cebadores, es decir, los cebadores inversos (cebadores R) se prepararon de acuerdo con las secuencias diana de las muestras. El cebador inverso para la muestra 1 era 5'-GCAGATTCATTGGTCAGAGAACATATCTCTAGAGTGGT-3' (SEQ ID NO: 102) y el cebador inverso para la muestra 2 era 5'-CATCTAAAGCGTTCCCAGTTCCATATCTCTATTGCGCT-3' (SEQ ID NO: 103).

5 Estas muestras se amplificaron de la siguiente manera. Un reactivo utilizado para la amplificación de las muestras era un kit de PCR múltiple de QIAGEN. El ciclador térmico utilizado era el sistema de PCRGeneAmp 9700 de Applied Biosystems.

10 Se prepararon los siguientes reactivos para cada muestra. El cebador F y los cebadores R utilizados se ajustaron respectivamente a 10 pmol/μl.

(Preparación del reactivo)

15 dH₂O 15,0 μl
 kit de PCR múltiple 25,0 μl
 cebador F 3,75 μl
 cebador R 3,75 μl
 muestra 2,5 μl
 20 Total 50,0 μl

Los reactivos preparados se transfirieron a la placa de ciclo térmico y se llevó a cabo la reacción de ciclo térmico (95 °C durante 15 min; luego 50 ciclos de 94 °C durante 30 s, 62 °C durante 30 s y 72 °C durante 10 min, y se disminuyó a 4 °C). Las muestras marcadas amplificadas se purificaron con el kit de Purificación de PCR MinElute de QIAGEN, antes de verificar que los productos amplificados tenían la longitud deseada.

25

(3) Hibridación

30 Con el fin de hibridar las muestras amplificadas obtenidas en (2) con las sondas de detección fijadas en la micromatriz, se prepararon las siguientes soluciones Hybri e Hybri de control, que se utilizaron para la preparación de un reactivo de hibridación. Una secuencia de oligo ADN marcada con Alexa 555 que se utilizaba para Hybri control era Alexa 555-rD1_100 que se obtenía marcando el extremo 5' de una secuencia complementaria de D1_100, entre las sondas descritas en la Fig. 5 con Alexa 555.

35 (Hybri de control)

Alexa555-rD1_100 10 μl
 TE (pH 8,0) 390 μl
 Total 400 μl

40 (Solución Hybri)

20 x SSC 2,0 ml
 10 % SDS 0,8 ml
 45 100 % Formamida 12,0 ml
 100 mM EDTA 0,8 ml
 milliQ 24,4 ml
 Total 40,0 ml

50 (Reactivo para la hibridación)

Hybri de control 1,5 μl
 solución Hybri 9,0 μl
 Subtotal 10,5 μl
 55 muestra marcada 7,5 μl
 Total 18,0 μl

La solución de muestra marcada que se prepara se calienta en el sistema de PCR GeneAmp 9700 de Applied Biosystems a 90 °C durante 1 minuto antes de calentarse en un bloque de calor (TAITEC, DTU-N) a 80 °C durante 1 minuto. Las soluciones de muestra (9 μl de cada) se depositaron en un área punteada de la micromatriz y se dejó en reposo a 37 °C durante 30 minutos para la reacción de hibridación mientras se evita la evaporación con el cubreobjetos Thermoblock para Comfort/plus (Eppendorf).

60

(Lavado)

65 Después de la hibridación, el sustrato de la micromatriz después de la reacción se sumergió en una cubeta de

tinción de cristal cargado con solución de lavado que tenía la siguientes composición, se incubó con agitado vertical durante 5 minuto y el sustrato de cristal se transfirió a una cubeta de tinción de cristal cargada con agua esterilizada, se incubó con agitado vertical durante 1 minuto, y se secó por centrifugación a 2000 rpm durante 1 minuto para retirar el agua remanente en la superficie del sustrato de la micromatriz.

5

(Composición de la solución de lavado)

10 milliQ 188,0 ml
20 x SSC 10,0 ml
10 % SDS 2,0 ml
Total 200,0 ml

(4) Detección con explorador

15 Se obtuvieron imágenes fluorescentes con el Array-WoRx de Applied Precision, Inc. ajustando apropiadamente el tiempo de exposición. La señal fluorescente de las imágenes obtenidas se convirtió en valores numéricos con el GenePix Pro.

(5) Análisis de datos

20

La señal fluorescente de las imágenes obtenidas se convirtió en valores numéricos con GenePix Pro, que es un software para la conversión numérica de imágenes. La Fig. 6 muestra los resultados de la verificación si las muestras 1 y 2 se unían o no, de manera no específica, respectivamente a las sondas de detección.

25 Como se muestra en la Fig. 6 (a), la reacción con la mezcla de las muestras 1 y 2 daba una señal de fluorescencia para ambas sondas, indicando que las muestras se detectaban. Como se muestra en las Fig. 6(b) y 6 (c) en las que la muestra 1 o la muestra 2 se sometían a la reacción sin mezclar, se descubrió que la unión no específica a una sonda no deseada disminuía significativamente. También se descubrió que cada muestra se unía específicamente a las respectivas sondas de detección diseñadas para identificar las muestras respectivas.

30

A continuación, se verificó un método de detección convencional de ácidos nucleicos diana (método descrito en el documento no patente 4) como ejemplo comparativo. En el siguiente ejemplo comparativo, el ácido nucleico diana se detectó con el método de detección convencional de acuerdo con los siguientes procedimientos que se describen ahora paso por paso.

35

En una placa de plástico, se puntean soluciones acuosas de oligos ADN sintéticos (Nihon Gene Research Laboratories Inc.) modificados en el extremo 3' con un grupo amino como sondas de detección utilizando el punteador GENESHOT® en NGK Insulators, Ltd. Las secuencias de oligo ADN sintético que se utilizaron eran 5'-ACCACTCTAGAGATA-3' (SEQ ID NO: 104) para una muestra 1, y 5'-AGCGCAATAGAGATA-3' (SEQ ID NO: 105) para una muestra 2. Después del punteo, la placa se metió en el horno a 80 °C durante una hora, y los ADN se dispusieron en orden descendente de Tm.

40

Los genes de la muestra que se van a detectar eran las mismas muestras 1 y 2 utilizados en el ejemplo. Los cebadores comunes para la amplificación de los ácidos nucleicos diana se sintetizaron artificialmente de la siguiente manera. El cebador F era 5'-AGGTTAAACTCAAAGGAATTGACG-3' (SEQ ID NO: 106), que estaba marcado con Cy3 en el lado 5'. El cebador R era 5'-ATGGTGTGACGGCGGTGTGT-3' (SEQ ID NO: 107).

45

Las muestras 1 y 2 se amplificaron mediante reacción de ciclo térmico como se describe en (3) y (5) anteriores, y se hibridan con las sondas de detección preparadas en el Ejemplo 6 antes del lavado y la detección de la señal. La Fig. 7 muestra los resultados de verificación de si las muestras 1 y 2 se unen no específicamente o no respectivamente a las sondas de detección.

50

Como se muestra en las Fig. 7 (a) a 7 (c), se detectó una débil señal con la sonda de detección para la muestra 1 incluso cuando la muestra no contenía la muestra 1, y se detectó una débil señal contra la sonda de detección para la muestra 2 incluso cuando la muestra no contenía la muestra 2, lo que mostraba por lo tanto una unión no específica de las muestras.

55

El tiempo necesario para la hibridación en el método convencional era de aproximadamente dos horas. Se observaba reacción no específica para las sondas de detección (aproximadamente un 10 % de intensidad de fluorescencia). Por otra parte, el tiempo necesario para la hibridación de la presente invención disminuía hasta aproximadamente 30 minutos y la reacción no específica de las muestras a sondas de detección no deseada en la micromatriz de ADN podría estar reducida significativamente (menos del 1 % de intensidad de fluorescencia). Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, la hibridación se puede llevar a cabo siempre a una temperatura constante (aproximadamente 37 °C) en aproximadamente 30 minutos de tiempo (un cuarto del método convencional). La presente invención también puede proporcionar resultados con una señal más intensa que el método convencional y permite la detección más precisa de las bases en un ácido nucleico particular y una

65

determinación más precisa de la secuencia que en el método convencional. El método convencional necesita a veces una optimización de las condiciones de hibridación, volver a diseñar las secuencias de las sondas o volver a preparar las matrices hasta que se obtienen los resultados deseados. Por otra parte, la presente invención no necesita volver a diseñar las secuencias de las sondas ni volver a producir matrices y permite el examen con matrices que tienen la misma especificación todo el tiempo.

[Texto libre del listado de secuencias]

SEQ ID NO: 1 a 100: sondas, SEQ ID NO: 101 a 103: cebadores, SEQ ID NO: 104 y 105: sondas, SEQ ID NO: 106 y 107: cebadores.

[Listado de secuencias]

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NGK INSULATORS,LTD.

<120> Método de detección de un nucleótido diana y matriz de detección

<130> K09-347-PCT

<160> 107

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 1

gcctatatga accaagccac tgc 23

<210> 2

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 2

gagacaggta aaccctcaga gca 23

<210> 3

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 3

gtcccaaaag cttcttacgg acg 23

<210> 4

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 4

ES 2 672 122 T3

cgatcagctc tatttcctc cca 23
 <210> 5
 <211> 23
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 10 <400> 5
 gcattgaggt attgttgctc cca 23

 <210> 6
 <211> 23
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda
 20
 <400> 6
 gcctcacttg taataagcgg gac 23

 <210> 7
 25 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> Sonda

 <400> 7
 ggggtgtgag agcttttag acg 23

 35 <210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Sonda

 <400> 8
 cgcgataatt gataacctacg ggc 23
 45
 <210> 9
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Sonda

 <400> 9
 55 cgatcacgga tfaatgtcac ccc 23

 <210> 10
 <211> 23
 <212> ADN
 60 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 65 <400> 10
 cgcagtttgc aagaacgaac aaa 23

ES 2 672 122 T3

<210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 11
 10 cgcgacattt agtccaggag atg 23
 <210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 20 <400> 12
 accactatga ttgaggaaac gcg 23
 <210> 13
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 30 <400> 13
 cgctgttggt attacctcc tcg 23
 <210> 14
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Sonda
 <400> 14
 gagtcgaaga cctcctccta ctc 23
 45 <210> 15
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Sonda
 <400> 15
 55 tggaactggg aacgcttag atg 23
 <210> 16
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Sonda
 <400> 16
 65 cgtcttagt atcaaccctc cgc 23

ES 2 672 122 T3

<210> 17
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 17
 10 ggggggtact tcatacaaga tgc 23
 <210> 18
 <211> 23
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 20 <400> 18
 tgccgtcatt taaacgtaag ggt 23
 <210> 19
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 30 <400> 19
 catctccaag aattgaccca cca 23
 <210> 20
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Sonda
 <400> 20
 atgccgttgt caagagttat ggt 23
 45 <210> 21
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Sonda
 <400> 21
 55 cgagagtctg taatagccga tgc 23
 <210> 22
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Sonda
 <400> 22
 65 cacgcttagt tctaccta ggc 23

ES 2 672 122 T3

<210> 23
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 23
 10 gcccggaat agattataac gca 23
 <210> 24
 <211> 23
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 20 <400> 24
 gcagcccta tagataacgg gac 23
 <210> 25
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 30 <400> 25
 cgctctggtt actattggac gtt 23
 <210> 26
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Sonda
 <400> 26
 gcatttttag taatccgagc gcc 23
 45 <210> 27
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Sonda
 <400> 27
 55 cgccattata caacggtca tgc 23
 <210> 28
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Sonda
 <400> 28
 65 ggctggttaa atgtaaatcc gcg 23

ES 2 672 122 T3

<210> 29
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 29
 10 gtcggtatcg aaaaggctact gca 23
 <210> 30
 <211> 23
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 20 <400> 30
 cgccaatgac aataagttga ggc 23
 <210> 31
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 30 <400> 31
 ggtcgttaaca ttgagaggag acg 23
 <210> 32
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Sonda
 <400> 32
 gaagccatga tactgttcag ggt 23
 45 <210> 33
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Sonda
 <400> 33
 55 aggcagttca acctatatct gcg 23
 <210> 34
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Sonda
 <400> 34
 65 gcctcacata actggagaaa cct 23

ES 2 672 122 T3

<210> 35
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 35
 10 gcatatagtg acggaaggc gaa 23
 <210> 36
 <211> 23
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 20 <400> 36
 tgccggttat accttaagg acg 23
 <210> 37
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 30 <400> 37
 gcctatagtg tcgattgtcc tcg 23
 <210> 38
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda
 40 <400> 38
 ggctcgtagt actcctaca tgc 23
 <210> 39
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Sonda
 <400> 39
 50 ctagtccatt gtaacgaagg cca 23
 55 <210> 40
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Sonda
 <400> 40
 65 ccgctcgtgtt attaaagacc cct 23

ES 2 672 122 T3

<210> 41
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 41
 10 ccgtgtgat gagtatgaca gca 23
 <210> 42
 <211> 23
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 20 <400> 42
 tgccggctat cgtaagtata tgc 23
 <210> 43
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 30 <400> 43
 gggatagga ttatgctcca gcc 23
 <210> 44
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda
 40 <400> 44
 ccatcagta ttcggaggga ctc 23
 <210> 45
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Sonda
 <400> 45
 50 agtcgcttaa ttactccgga tgg 23
 55 <210> 46
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Sonda
 <400> 46
 65 gcagctgaat tgctatgatc acc 23

<210> 47
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 47
 10 gcacctcata ccttcataga gca 23
 <210> 48
 <211> 23
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 20 <400> 48
 agtcagtcca aatctcagga tgg 23
 <210> 49
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 30 <400> 49
 aggtccggta gtaatttagg tgc 23
 <210> 50
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda
 40 <400> 50
 cgctaaatg aaactcactc tgc 23
 <210> 51
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Sonda
 <400> 51
 50 gccacactc ttactatcg act 23
 55 <210> 52
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Sonda
 <400> 52
 65 ttcgcttcgt tgaatttcg gac 23

ES 2 672 122 T3

<210> 53
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 53
 10 agacaattag aatcagtgcc cct 23
 <210> 54
 <211> 23
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 20 <400> 54
 agtcagttaa tcagacgtga gca 23
 <210> 55
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 30 <400> 55
 cgcggtacta ttagaaagg cta 23
 <210> 56
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Sonda
 <400> 56
 ggctctacaa acttgtgtcc atg 23
 45 <210> 57
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Sonda
 <400> 57
 55 cgatcatgta aagctaactc gcg 23
 <210> 58
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Sonda
 <400> 58
 65 tagcaccgt taaaacggaa atg 23

<210> 59
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 59
 10 tttgtgttc gatatcaggc gtg 23
 <210> 60
 <211> 23
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 20 <400> 60
 gcactaccgc taactatacg cta 23
 <210> 61
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 30 <400> 61
 tatgtttagt tgtgaaccg gcg 23
 <210> 62
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Sonda
 <400> 62
 tggcaattac agttgtaac gca 23
 45 <210> 63
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Sonda
 <400> 63
 55 cgcgatataa cattaaccga ggc 23
 <210> 64
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Sonda
 <400> 64
 65 ggggtcaaac caacaattga tct 23

ES 2 672 122 T3

<210> 65
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 65
 10 tggcaataca ataacgtatc gcg 23
 <210> 66
 <211> 23
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 20 <400> 66
 aggcatccta agaaatcgct act 23
 <210> 67
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 30 <400> 67
 gagtagcagg caaataccct aga 23
 <210> 68
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Sonda
 <400> 68
 cgcgattcct atgattgat ccc 23
 45 <210> 69
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Sonda
 <400> 69
 55 gccattgat agaattacga ggc 23
 <210> 70
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Sonda
 <400> 70
 65 ggtccgcaa aaatatagga ggc 23

ES 2 672 122 T3

<210> 71
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 71
 10 tgccgtgata cttaactacg cta 23
 <210> 72
 <211> 23
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 20 <400> 72
 ttcggtgtc gatagagga tct 23
 <210> 73
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 30 <400> 73
 cgcgtcgaat tacttaatca cca 23
 <210> 74
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Sonda
 <400> 74
 gaaggatcgc tttatctgg cat 23
 45 <210> 75
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Sonda
 <400> 75
 55 ggcgatttat tgctaactgg cta 23
 <210> 76
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Sonda
 <400> 76
 65 ggtggagtga atctcactag act 23

ES 2 672 122 T3

<210> 77
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 77
 10 gcatacgaac ttctatatcg gcg 23
 <210> 78
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Sonda
 20
 <400> 78
 tgcactctga tatatacagg cca 23
 <210> 79
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Sonda
 30
 <400> 79
 ccgtctgggt taaagattgc tag 23
 35 <210> 80
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Sonda
 <400> 80
 aagagattta actgagctc gcc 23
 45
 <210> 81
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 81
 55 tgttctctga ccaatgaatc tgc 23
 <210> 82
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> Sonda
 65 <400> 82
 gggatccgta acaagtgtgt tag 23

ES 2 672 122 T3

<210> 83
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Sonda

 <400> 83
 10 tagcccagtg atttatgaca tgc 23

 <210> 84
 <211> 23
 <212> ADN
 15 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 84
 20 ccatatccga ttattagcga cgg 23

 <210> 85
 <211> 23
 <212> ADN
 25 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 85
 30 tgctcactta cattacgtcc atg 23

 <210> 86
 <211> 23
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 40 <223> Sonda

 <400> 86
 catttgcag gtacagtcca ctt 23

 <210> 87
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45

 <220>
 <223> Sonda
 50

 <400> 87
 55 catggataag tttcaagct gcg 23

 <210> 88
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 88
 65 cgctgttact gtaagcgtac tag 23

<210> 89
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 89
 10 tgctgtcttc gtgtttacc tag 23
 <210> 90
 <211> 23
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 20 <400> 90
 tacacctatc aactcgtaga gca 23
 <210> 91
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 30 <400> 91
 cgccgtcagt actgtatag atg 23
 <210> 92
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Sonda
 <400> 92
 tattctacca acgacatcac tgc 23
 45 <210> 93
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Sonda
 <400> 93
 cattcgacat aagctgttga tgc 23
 55 <210> 94
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Sonda
 <400> 94
 65 tgcagtgtaa gcaactattg tct 23

ES 2 672 122 T3

<210> 95
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Sonda

 <400> 95
 10 ctaggtacaa caccaactgt ctc 23

 <210> 96
 <211> 23
 <212> ADN
 15 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 96
 20 gcctattaag gtctacgtca tcg 23

 <210> 97
 <211> 23
 <212> ADN
 25 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 97
 30 atgccaatat gtactcgtga ctc 23

 <210> 98
 <211> 23
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 98
 40 agtcatacag tgaggaccaa atg 23

 <210> 99
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45

 <220>
 <223> Sonda
 50

 <400> 99
 55 tagccaactc taaataacgg acg 23

 <210> 100
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 100
 65 ctagcacaat taatcaatcc gcc 23

<210> 101
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 101
 10 aggttaaac tcaaaggaat tgacg 25

 <210> 102
 <211> 38
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 102
 20 gcagattcat tggcagaga acatatctct agagtgg 38

 <210> 103
 <211> 38
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador
 30
 <400> 103
 catctaaagc gttcccagtt ccatatctct attgcgct 38

 <210> 104
 <211> 15
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 40 <223> Sonda

 <400> 104
 accactctag agata 15

 <210> 105
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Sonda

 <400> 105
 55 agcgcaatag agata 15

 <210> 106
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador

 <400> 106
 65 aggttaaac tcaaaggaat tgacg 25

ES 2 672 122 T3

<210> 107
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Cebador

<400> 107

10 atggtgtgac gggcgggtgtg t 21

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de dos o más ácidos nucleicos diana en una muestra, que comprende:

- 5 preparar una fase sólida que comprende sondas de detección que tienen respectivamente ciertas secuencias de bases diferentes;
- 10 llevar a cabo una PCR en la muestra para obtener ADN quiméricos que tienen cada uno un marcador y una secuencia marcadora complementaria a cada una de las sondas de detección que se han correlacionado con los ácidos nucleicos diana; poner en contacto los ADN quiméricos con las sondas de detección de manera que los ADN quiméricos y las sondas de detección se puedan hibridar por medio de las secuencias marcadoras;
- 15 obtener información de intensidad de la señal basándose en el marcador de la fase sólida; y
detectar los ácidos nucleicos diana basándose en la información de intensidad de la señal en donde las secuencias diana de los ácidos nucleicos diana se seleccionan de entre secuencias características que tienen secuencias de bases genéticamente indicativas de la constitución o la incidencia de enfermedades, diagnóstico de enfermedades, pronóstico de enfermedades, selección de fármacos o tratamiento de enfermedades específicas tales como enfermedades genéticas o cáncer en seres humanos y animales no humanos y secuencias de bases que se derivan de microorganismos tales como patógenos y virus y en donde las secuencias diana no contienen polimorfismos y la etapa de PCR comprende:
- 20 la preparación de primeros cebadores que tienen secuencias de identificación complementarias a cada una de las secuencias diana de los ácidos nucleicos diana y secuencias de adición de marcador complementarias a las secuencias marcadoras y un segundo cebador que tiene una secuencia parcial idéntica a una secuencia parcial adyacente a la secuencia diana y al marcador,
- 25 la realización de una PCR de la muestra utilizando los primeros cebadores y el segundo cebador para sintetizar los ADN quiméricos que tienen una secuencia diana, una secuencia marcadora y el marcador; y en donde la etapa de PCR es la etapa de utilización, para dos o más ácidos nucleicos diana, de dos o más primeros cebadores y un segundo cebador común a los dos o más ácidos nucleicos diana.
- 30 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los ácidos nucleicos diana se seleccionan de entre ácidos nucleicos derivados de microorganismos tales como patógenos o virus.
- 35 3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el segundo cebador tiene una secuencia parcial común idéntica a una secuencia parcial diferente y adyacente a la secuencia diana y la secuencia parcial común es una secuencia de bases que es común en los ácidos nucleicos diana independientemente de las secuencias diana.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa de PCR es la etapa de amplificación de los ADN quiméricos mediante PCR asimétrica.

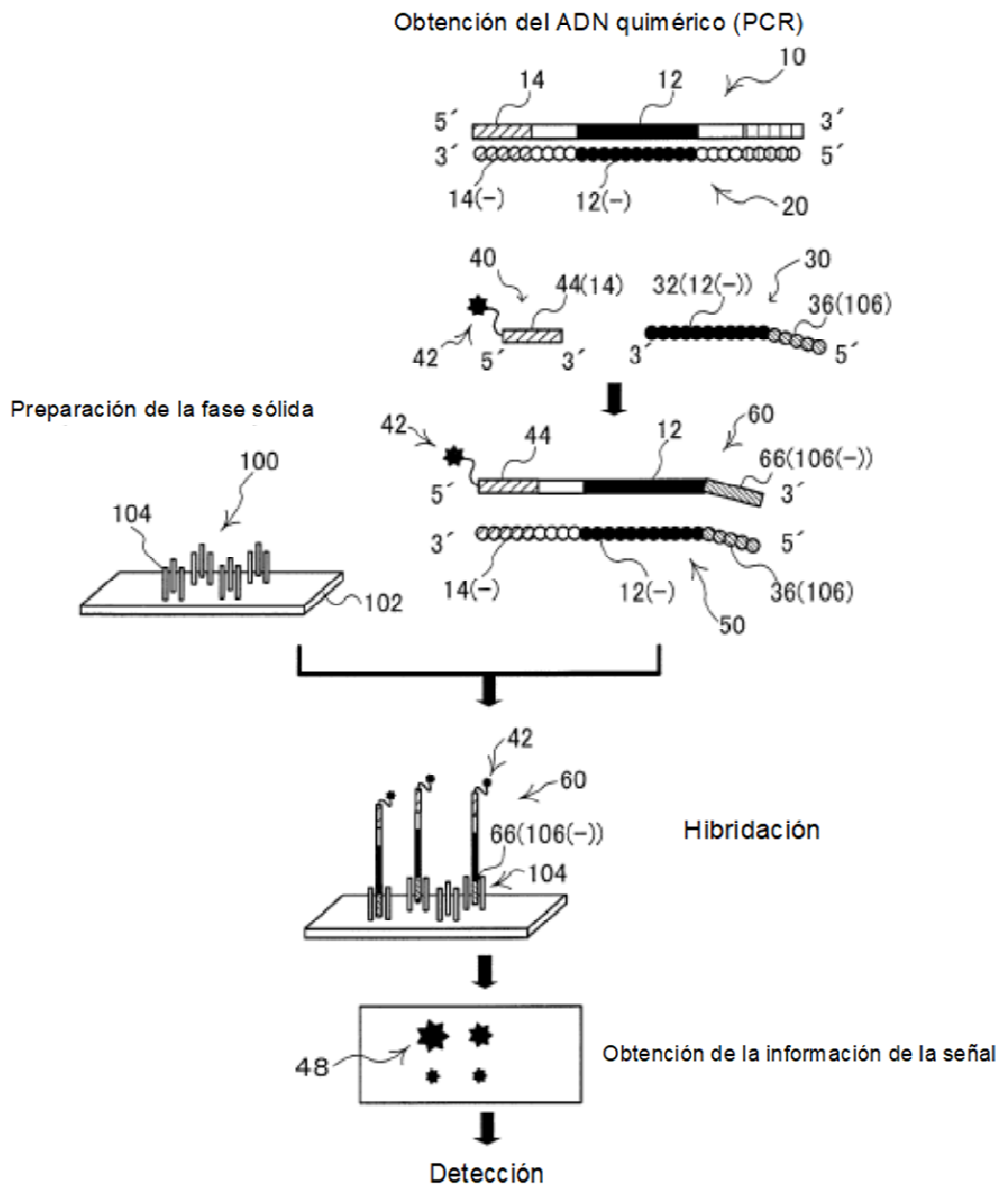


Fig.1

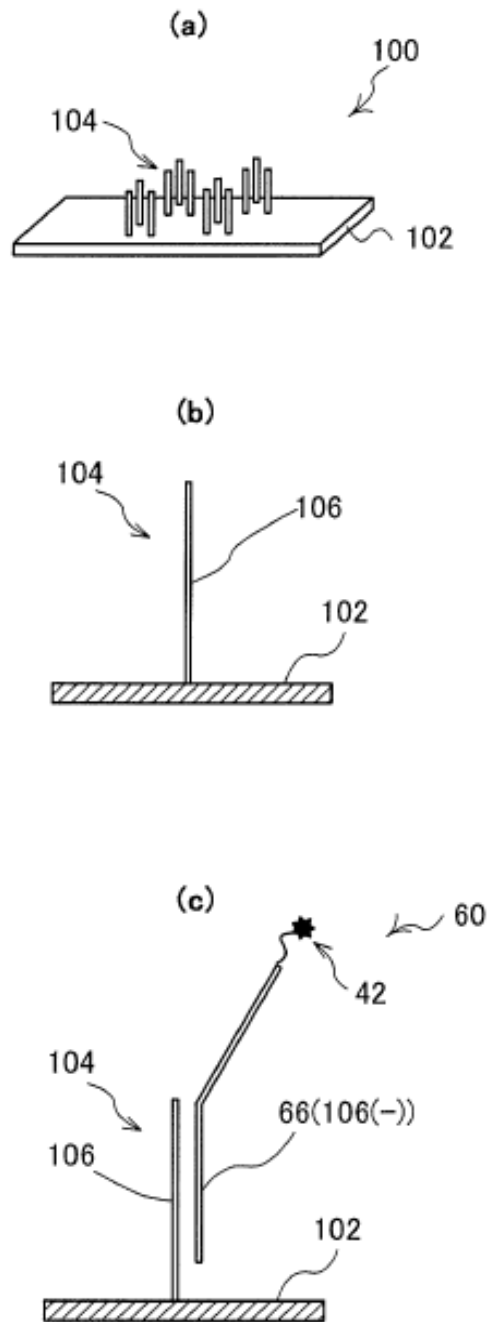


Fig.2

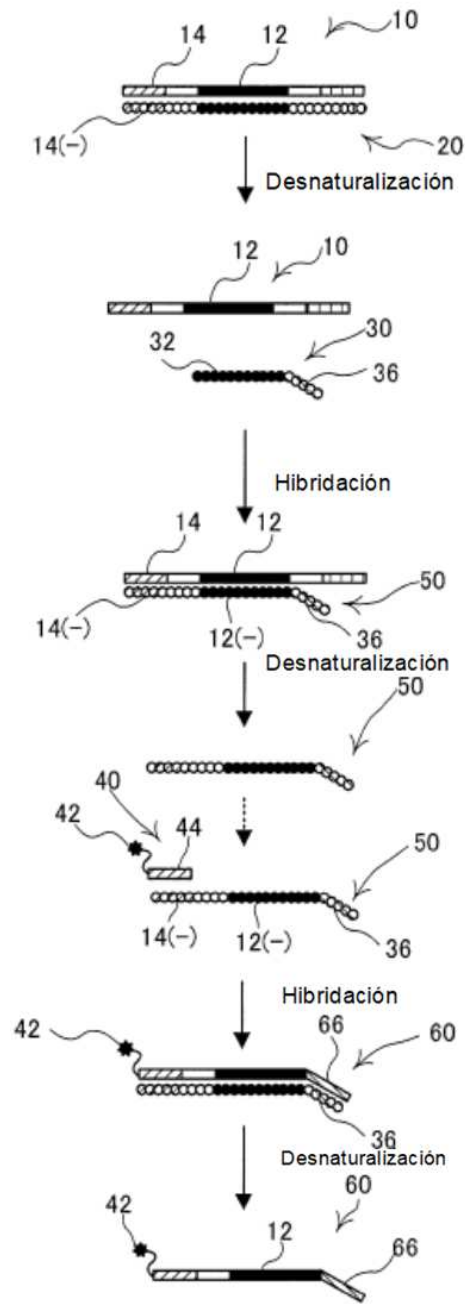


Fig.3

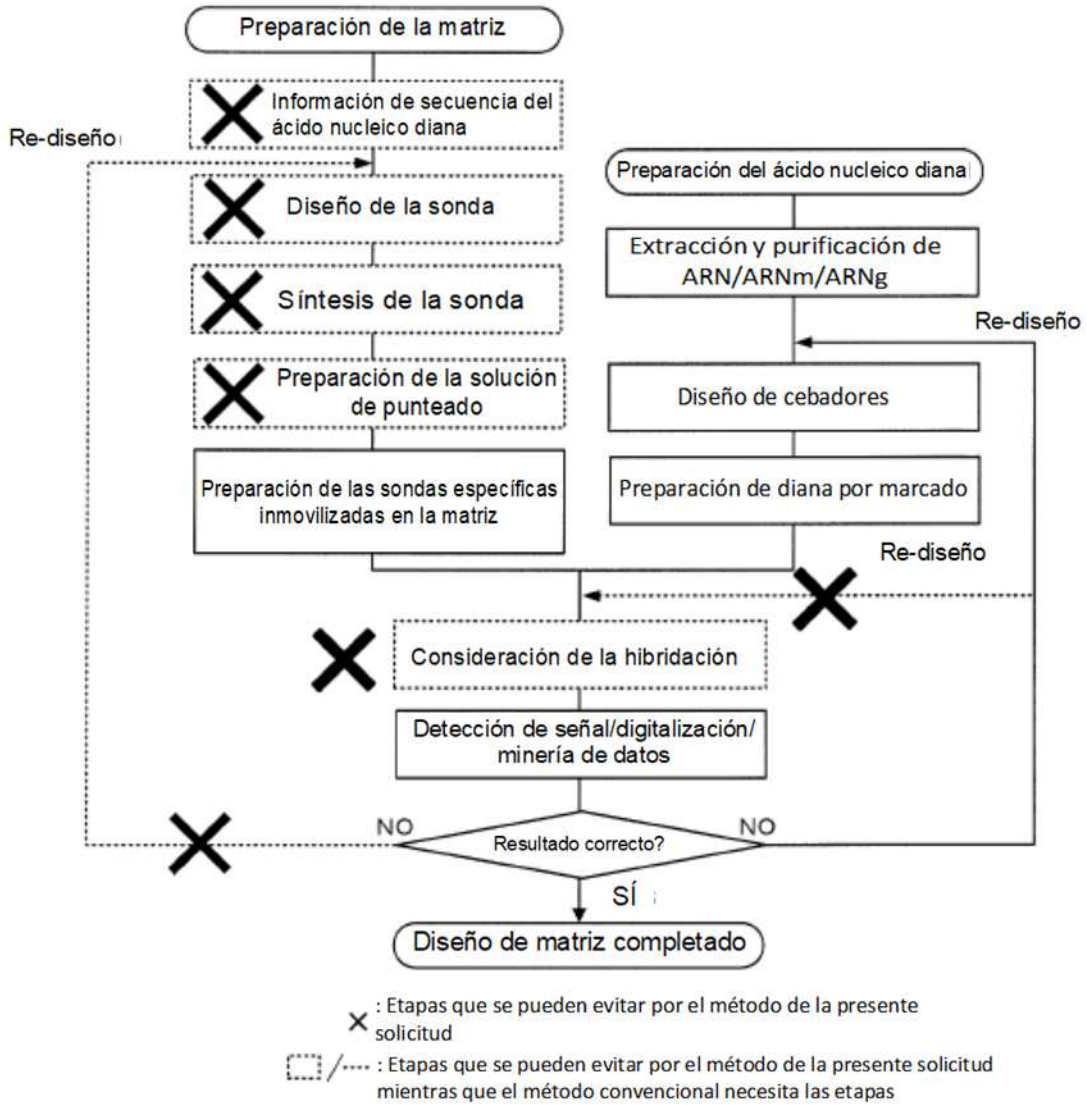
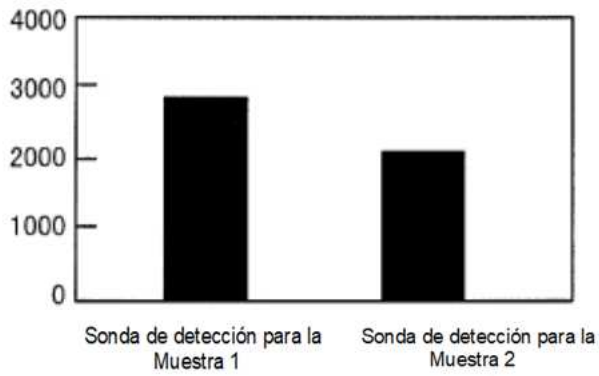


Fig.4

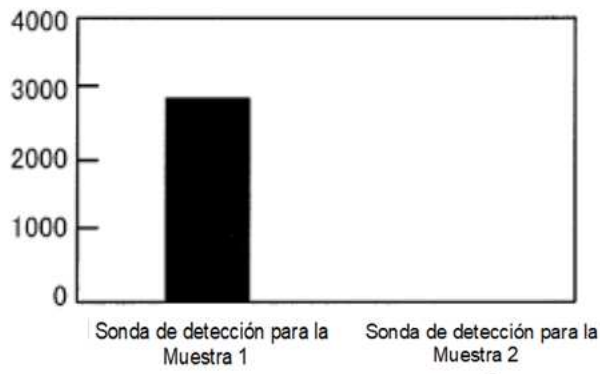
D1 1	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC	57.9	D1 51	CGCCATTATACAACGGTTCATGC	59.4
D1 2	TGGAACCTGGGAACGCTTTAGATG	59.8	D1 52	GCCTATATGAACCAAGCCACTGC	60.7
D1 3	TTGCTTCGTTGTAATTTCCGGAC	58.7	D1 53	CGCCGTCAGTACTTGTATAGATG	57.4
D1 4	AGGCATCCTAAGAAATCGCTACT	58.4	D1 54	GTCGGTATCGAAAAGGTACTGCA	59.4
D1 5	TAGCCAGTGATTTATGACATGC	57.8	D1 55	AGGCAGTTCAACCTATATCTGCG	59.4
D1 6	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT	59.5	D1 56	GGTCGTAACATTGAGAGGAGACG	59.4
D1 7	TAGCCAACCTAAATAACGGACG	57.1	D1 57	GGCGATTTATTGCTAACTGGCTA	58.0
D1 8	TTCCGGTTGTCGATATGAGGATCT	58.1	D1 58	GCACTACCGCTAACTATACGCTA	58.5
D1 9	GGGGGGTACTTCATACAAGATGC	59.7	D1 59	GGCTCGTAGTACTCCTTACATGC	59.3
D1 10	GAGTAGCAGGCAATACCCTAGA	58.4	D1 60	GGCTCTACAACTTGTGTCCATG	58.6
D1 11	GCCTATTAAGGTCTACGTCATCG	57.2	D1 61	GGTGGAGTGAATCTCACTAGACT	58.0
D1 12	AGTCATACAGTGAGGACCAATG	57.1	D1 62	CTAGCACAATTAATCAATCCGCC	56.9
D1 13	CATTTCGACATAAGCTGTTGATGC	57.3	D1 63	GCAGCTGAATTTGCTATGATCACC	59.0
D1 14	TGCTCACTTACATTACGTCCATG	57.6	D1 64	GCCTATAGTGTGCGATTGCTCCG	59.3
D1 15	TACACCTATCAACTCGTAGAGCA	57.4	D1 65	CGATCACGGATTAATGTCACCCC	60.1
D1 16	AGGTCCGGTAGTAATTTAGGTGC	58.8	D1 66	AAGAGATTTAACTTGAAGCTCGCC	57.9
D1 17	TGCACCTCGATATATACAGGCCA	57.9	D1 67	TTTGTGTTTCGATATCAGGCGTG	58.5
D1 18	GCAGCCCTTAGATAACGGGAC	59.5	D1 68	GCCCGGAATAGATTATAACGCA	59.5
D1 19	GAAGCCATGATACTGTTACAGGT	59.4	D1 69	GCATTTTTAGTAATCCGAGCGCC	59.4
D1 20	TATTCTACCAACGACATCACTGC	57.3	D1 70	CATGGATAAGTTTTCAAGCTGCG	57.5
D1 21	CCATCAGTTATTCGGAGGGACTC	59.1	D1 71	GAGACAGGTAACCCCTCAGAGCA	60.7
D1 22	CCATATCCGATTATTAGCGACGG	57.6	D1 72	TAGCACCCGTTAAAACGGAAATG	58.6
D1 23	CATCTCCAAGAAATGACCCACCA	59.6	D1 73	TATGTTTAGTTGTTGAACCGGCG	58.5
D1 24	CCGTCGTGTTATTAAGACCCCT	59.3	D1 74	CGATCAGCTCATTTCCCTCCCA	60.6
D1 25	GAAGGATCGCTTTATCTGGCAT	58.0	D1 75	AGTCAGTTAATCAGACGTGAGCA	58.6
D1 26	CATTTGTCCAGGTACAGTCCACTT	57.5	D1 76	TGGCAATACAATAACGTATCGCG	58.4
D1 27	GCCACACTCTTACTTATCGACT	58.7	D1 77	CGCAGTTTGAAGAACGAACAAA	60.1
D1 28	CGCTGTTACTGTAAGCGTACTAG	57.5	D1 78	CGCGATAATTGATACCTACGGCG	60.2
D1 29	CGCGATTCCTATTGATTGATCCC	58.3	D1 79	GGGGTGTGAGAGCTTTTITAGACG	60.2
D1 30	CCGTCTGGGTTAAAGATTGCTAG	57.9	D1 80	GGGATCCGTAACAAGTGTGTTAG	57.8
D1 31	AGTCAGTCCAAATCTCAGGATGG	58.9	D1 81	ACCACTATGATTGAGGAACGCG	60.0
D1 32	CGCCTAAATGAAACTCACTCTGC	58.8	D1 82	CGTCTTTAGTATCAACCCCTCCG	59.8
D1 33	GGGGTCAAACCAACAATTGATCT	58.4	D1 83	GCATACGAACTTCTATATCGGCG	58.0
D1 34	GCCATTGATAGAATTACGAGGC	58.3	D1 84	CCGTGTGATGAGTATGACAGCA	59.2
D1 35	ATGCCGTTGTCAAGAGTTATGGT	59.5	D1 85	TGCTGTCTTCGTGTTTTACCTAG	57.4
D1 36	TGCCGGCTATCGTAAGTATATGC	59.2	D1 86	CGATCATGTAAGCTAACTCGCG	58.6
D1 37	GCACCTCATACCTTCATAGAGCA	58.9	D1 87	TGCCGTCAATTAACGTAAGGGT	59.7
D1 38	CGCGACATTTAGTCCAGGAGATG	60.0	D1 88	TGGCAATTACAGTTGTTAACGCA	58.5
D1 39	CTAGTCCATTGTAACGAAGGCCA	59.3	D1 89	GAGTCGAAGACCTCCTCCTACTC	59.9
D1 40	AGACAATTAGAATCAGTGCCCT	58.6	D1 90	ATGCCAATATGTAAGTCTGACTC	57.2
D1 41	GCATTGAGGTATTGTTGCTCCCA	60.4	D1 91	GCATATAGTGACGGTAAGGCGAA	59.3
D1 42	CGAGAGTCTGTAATAGCCGATGC	59.5	D1 92	GCCTCACTTGTAAATAGCGGGAC	60.3
D1 43	TGCCGTGATACTTAACTACGCTA	58.2	D1 93	GTCCCAAAGCTTCTTACGGACG	60.6
D1 44	GAGTCCGCAAAAATATAGGAGGC	58.3	D1 94	CTAGGTACAACACCAACTGTCTC	57.2
D1 45	GCCTCACATAACTGGAGAACT	59.3	D1 95	TGCCGGTTATACCTTTAAGGACG	59.3
D1 46	CGCCAATGACAATAAGTTGAGGC	59.4	D1 96	GGCTGGTTAAATGTAATCCGCG	59.4
D1 47	CGCGATATAACATTAACCGAGGC	58.5	D1 97	CGCGGTACTATTAGAAAGGGCTA	58.6
D1 48	CACGCTTAGTTTCTACCTTAGGC	59.5	D1 98	AGTCGCTTAATTACTCCGGATGG	59.1
D1 49	CGCGTCAATTACTTAAATCACCA	58.0	D1 99	CGCTGTTGGTATTACCTTCTCG	60.0
D1 50	GGGATAGGTATTATGCTCCAGCC	59.1	D1 100	TGCAGTGAAGCAACTATTGTCT	57.3

Fig.5

(a) Muestra mezclada



(b) Muestra 1 sola



(c) Muestra 2 sola

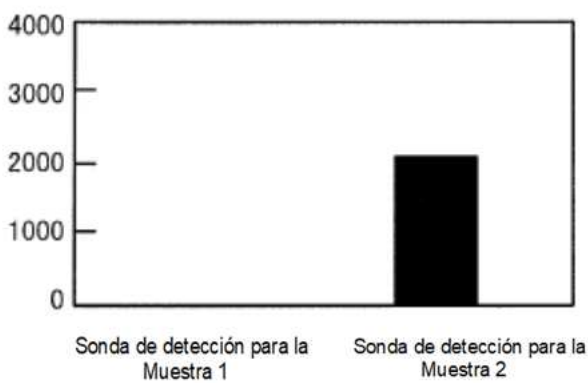


Fig.6

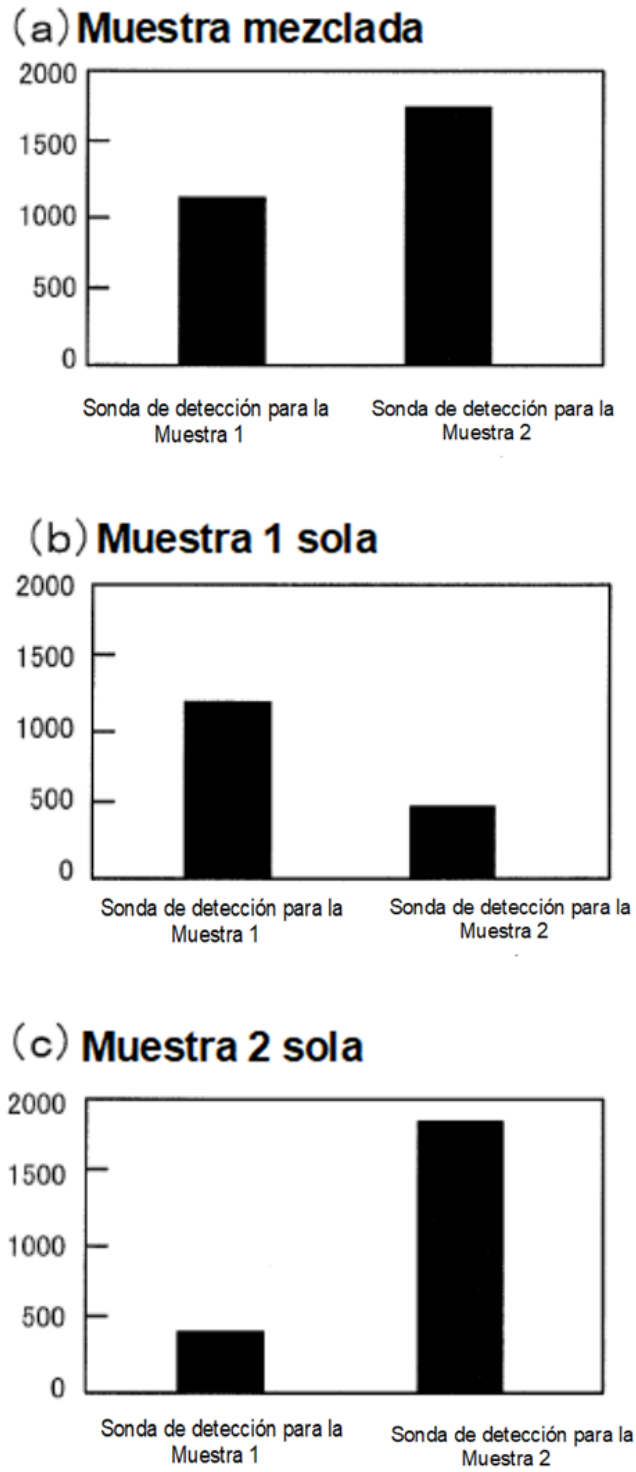


Fig.7

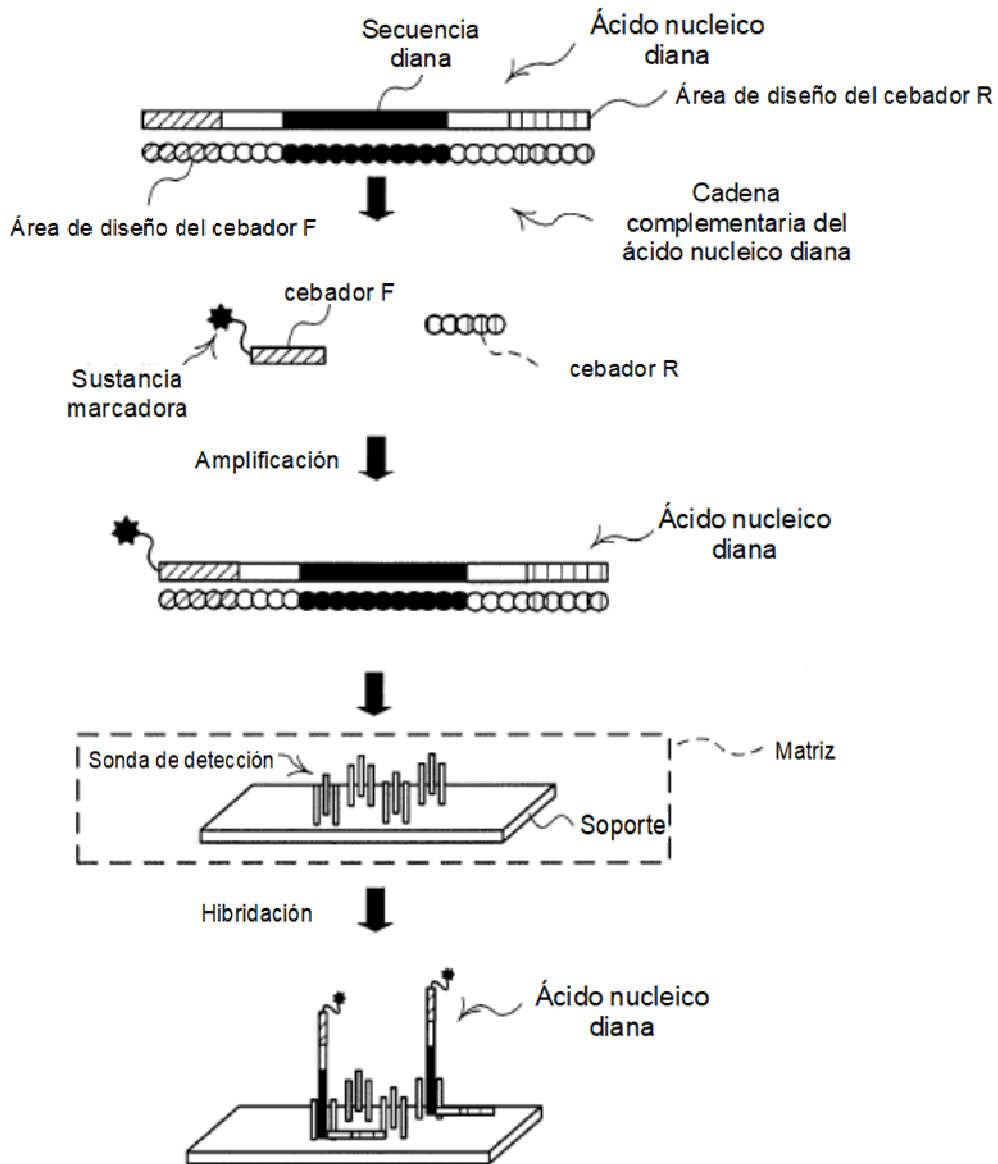


Fig.8