(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 698 053**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/6823 (2008.01)
C12Q 1/686 (2008.01)
C12Q 1/6865 (2008.01)
C12Q 1/6818 (2008.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2012** **PCT/AU2012/001081**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013** **WO13033792**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2012** **E 12830774 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018** **EP 2753717**

(54) Título: **Sustratos para enzimas de ácido nucleico**

(30) Prioridad:

09.09.2011 AU 2011903686

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.01.2019

(73) Titular/es:

SPEEDX PTY LTD (100.0%)
Suite G16, National Innovation Centre, Australian Technology Park, 4 Cornwallis St.
Eveleigh, NSW 2015, AU

(72) Inventor/es:

TODD, ALISON VELYIAN;
MOKANY, ELISA;
LINARDY, EVELYN MEIRIA y
LONERGAN, DINA

(74) Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 698 053 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

Sustratos para enzimas de ácido nucleico

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA CRUZADA

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional Australiana N.º 2011903686, presentada el 9 de septiembre de 2011.

CAMPO TÉCNICO

La invención se refiere en general al campo de las enzimas de ácido nucleico. Más específicamente, la invención se refiere a sustratos para enzimas de ácido nucleico y métodos que utilizan los sustratos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

En los últimos 20 años se ha descubierto una amplia diversidad de moléculas de ácido nucleico, con actividad enzimática o catalítica. Las enzimas de ARN ("ribozimas") aparecen en la naturaleza, pero pueden prepararse por ingeniería para reconocer y modificar específicamente un sustrato de ARN diana. Las técnicas de desarrollo *in vitro* han facilitado el descubrimiento y desarrollo de muchos más ácidos nucleicos catalíticos, incluyendo ácidos desoxirribonucleicos frecuentemente denominados "desoxirribozimas", "enzimas de ADN", o "ADNzimas". Se han descubierto ADNzimas y/o ribozimas desarrolladas *in vitro* que tienen la capacidad de catalizar un amplio rango de reacciones incluyendo, pero sin limitación, escisión de ácidos nucleicos, ligación de ácidos nucleicos, metalación de porfirina, y formación de enlaces carbono-carbono, enlaces éster, o enlaces amida.

En particular, se han caracterizado ADNzimas y ribozimas que escinden específicamente distintas secuencias de ácidos nucleicos después de hibridar mediante emparejamiento de bases de Watson Crick. Las ADNzimas son capaces de escindir moléculas de ARN o ADN. Las ribozimas también son capaces de escindir secuencias diana tanto de ARN como de ADN. Las ADNzimas "10-23" y "8-17" son capaces de escindir sustratos de ácido nucleico en enlaces fosfodiéster de ARN específicos para crear productos de reacción que tienen grupos fosfato 2',3'-cíclico y 5'-hidroxilo. Los ejemplos de desoxirribozimas (ADNzimas), que pueden ligar los productos 2', 3'-fosfato cíclico y 5'-hidroxilo incluyen las ligasas "7Z81" y "7Z48".

Más recientemente, se han descrito enzimas de ácidos nucleicos multicomponentes (MNAzimas) que tienen la capacidad de autoensamblarse a partir de dos o más componentes de oligonucleótidos (también denominados en el presente documento "partzimas") en presencia de un facilitador del ensamblaje de MNAzimas (por ejemplo, molécula diana a detectar).

La naturaleza versátil de los ácidos nucleicos catalíticos ha facilitado su uso en muchas aplicaciones diferentes. Un elemento clave para el uso exitoso de los ácidos nucleicos catalíticos es su capacidad para modificar un sustrato apropiado. En general, el sustrato es sustancialmente complementario a los brazos de hibridación del ácido nucleico catalítico y contiene una secuencia específica o un motivo de secuencia en el sitio de la acción catalítica. La naturaleza de la interacción entre un ácido nucleico catalítico dado y su sustrato es determinante de la eficiencia con la que la enzima se acopla y/o modifica catalíticamente su sustrato, y por lo tanto, es una consideración fundamental en el diseño de cualquier sistema que utilice ácidos nucleicos catalíticos.

Los ácidos nucleicos catalíticos tienen aplicaciones de diagnóstico *in vitro* en la detección de ácidos nucleicos, proteínas y moléculas pequeñas. Estas aplicaciones a menudo implican la amplificación de la diana o la señal para generar una señal suficiente para la detección robusta del analito de interés.

Los métodos que emplean ácidos nucleicos catalíticos requieren sustratos que se modifican con una velocidad de actividad catalítica suficiente para permitir una discriminación eficaz sobre el ruido de fondo. Diferentes métodos pueden requerir el uso de diferentes temperaturas de reacción y, por lo tanto, existe la necesidad de que los sustratos se modifiquen eficientemente (por ejemplo, se escindan) a las temperaturas requeridas. Los métodos, tales como los que utilizan MNAzimas y ADNzimas permiten el análisis multiplexado de muchas dianas simultáneamente en una sola reacción, pero la capacidad de multiplexar y distinguir entre las múltiples dianas depende de la existencia de un rango adecuado de sustratos, normalmente al menos uno por diana. El número de sustratos conocidos en la técnica que se modifican (por ejemplo, se escinden) con alta eficiencia es actualmente insuficiente para la multiplexación en masa.

Los sustratos de ADNzima y MNAzima previamente conocidos en la técnica se obtuvieron mediante el cribado de múltiples sustratos posibles para determinar empíricamente los que se escindieron más eficazmente. A menudo, este cribado se realizó utilizando un gran número de ADNzimas dirigidas a escindir sitios de escisión teóricamente posibles dentro de ARNm de longitud completa. Este cribado se realizó normalmente en condiciones fisiológicas (temperatura y fuerza iónica, composición y pH de los tampones). Este sesgo hacia la búsqueda de secuencias de ARNm eficientemente escindidas en condiciones fisiológicas existe porque dichos estudios se centraron en los usos terapéuticos de las ADNzimas como inhibidores de la expresión de ARN *in vivo*. Dichos estudios proporcionan una serie de protocolos laboriosos para la medición empírica de un gran número de sustratos putativos para encontrar los pocos que se escinden de manera eficiente (véase, por ejemplo, Cairns et al., 1999 Nat Biotech 17:480-486). Estos estudios dieron como resultado un conjunto limitado de directrices de diseño para la selección de sustratos eficientemente escindidos, y en muchos casos, las directrices se centraron en el diseño de la ADNzima en lugar del sustrato, ya que la ADNzima se puede ajustar fácilmente y el ARNm no. Una directriz común generada a partir de estos estudios es que la secuencia exacta del motivo de ribonucleótido R-Y en el sitio de escisión del sustrato es importante, ya que la eficiencia de la escisión es en el siguiente orden: GU ≥ AU > GC >>> AC.

La eficiencia de la escisión de un ARNm de longitud completa en condiciones *in vitro* no es una medida absoluta de la eficiencia de escisión en un entorno celular, ya que este último incluye proteínas ribonucleares y otros factores de confusión que no se pueden imitar fácilmente *in vitro*.

Las directrices de diseño generadas en el pasado tienen algún uso en la selección de sitios dentro de una molécula de ARNm larga que puede ser escindida eficientemente por las ADNzimas y las MNAzimas en condiciones fisiológicas, pero tienen una capacidad limitada para predecir qué sustratos se escindirán con suficiente eficiencia para su utilidad en aplicaciones de diagnóstico *in vitro*. Las aplicaciones de diagnóstico *in vitro* pueden requerir condiciones muy diferentes de las condiciones fisiológicas generalmente cribadas y utilizadas para establecer las limitadas directrices de diseño de sustrato que existen en la técnica.

Existe la necesidad de un conjunto de directrices, o motivos de secuencia, para secuencias de sustrato que predicen con mayor certeza si un sustrato se escindirá eficazmente por una MNAzima o ADNzima en condiciones adecuadas para aplicaciones de diagnóstico *in vitro*. También existe la necesidad de sustratos de ácido nucleico catalítico con propiedades que faciliten una mejor función catalítica del ácido nucleico. Estas propiedades pueden incluir, por ejemplo, una capacidad para facilitar una función catalítica mejorada del ácido nucleico en un rango de condiciones y/o una capacidad para ampliar el número de dianas que pueden detectarse simultáneamente en una reacción múltiplex.

RESUMEN

Si bien muchos han intentado establecer un motivo de secuencia o un conjunto de directrices de diseño que produzcan de forma consistente secuencias de sustrato eficaces, hasta la fecha no se ha identificado ninguna secuencia o conjunto de directrices eficaces. La presente divulgación proporciona una serie de principios que ha facilitado el desarrollo de nuevos sustratos eficientemente escindidos. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona sustratos para enzimas de ácidos nucleicos catalíticos con propiedades que mejoran la función del ácido nucleico catalítico, abordando de este modo una necesidad existente en la técnica.

La invención se define en las reivindicaciones.

En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona un sustrato de polinucleótido aislado para una enzima de ácido nucleico catalítica, comprendiendo dicho sustrato de polinucleótido una secuencia N_1-N_2-N_3-N_4-N_5-N_6-N_7-N_8-rR-rY-N_9-N_{10}-N_{11}-N_{12}-N_{13}-N_{14}-N_{15}, en el que:

rR es un ribonucleótido de purina;
rY es un ribonucleótido de pirimidina;
cada uno de N_1-N_{15} son nucleótidos;
seis o más de N_5-N_{13} son nucleótidos de citosina; y
menos de tres de N_9-N_{15} son nucleótidos de guanina.

En una forma de realización del primer aspecto, el sustrato de polinucleótido comprende o consiste en una secuencia definida por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 25-27, 29-30, 33, 72-90, o 172-175.

En una forma de realización del primer aspecto, siete o más, u ocho o más de N_5-N_{13} son nucleótidos de citosina.

En una forma de realización del primer aspecto, siete o más de N_5-N_{13} son nucleótidos de citosina y el sustrato de polinucleótido comprende o consiste en una secuencia definida por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 29, 73, 76-80, 82-83, 85-90, o 172-175.

En una forma de realización del primer aspecto, ocho de N_5-N_{13} son nucleótidos de citosina y el sustrato de polinucleótido comprende o consiste en una secuencia definida por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 76, 77, 80, 83 o 87.

En una forma de realización del primer aspecto, siete o más, u ocho o más de N_4-N_{13} son nucleótidos de citosina.

En una forma de realización del primer aspecto, siete o más de N_4-N_{13} son nucleótidos de citosina y el sustrato de polinucleótido comprende una secuencia definida por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 27, 29, 73, 76-83, 85-90, o 172-175.

En una forma de realización del primer aspecto, ocho de N_4-N_{13} son nucleótidos de citosina y el sustrato de polinucleótido comprende o consiste en una secuencia definida por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 76, 77, 79-80, 82-83, 87, 88 o 90.

En una forma de realización del primer aspecto, seis o más, siete o más, u ocho o más de N_4-N_{12} son nucleótidos de citosina.

En una forma de realización del primer aspecto, siete o más de N_4-N_{12} son nucleótidos de citosina y el sustrato de polinucleótido comprende o consiste en una secuencia definida por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 27, 29, 73, 76, 77, 79-83, 85-88, 90 o 172-175.

En una forma de realización del primer aspecto, ocho de N_4-N_{12} son nucleótidos de citosina y el sustrato de polinucleótido comprende o consiste en una secuencia definida por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 76, 77, 80, 83, 87, o 88.

En una forma de realización del primer aspecto, seis o más, siete o más, u ocho o más de N_5-N_{12} son nucleótidos de citosina.

En una forma de realización del primer aspecto, siete o más de N_5-N_{12} son nucleótidos de citosina y el sustrato de polinucleótido comprende o consiste en una secuencia definida por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 29, 73, 76, 77, 80, 83, 85-88 o 172-175.

En una forma de realización del primer aspecto, ocho de N_5-N_{12} son nucleótidos de citosina y el sustrato de polinucleótido comprende o consiste en una secuencia definida por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 76, 77, 80, 83, o 87.

En una forma de realización del primer aspecto, uno cualquiera o más de N_1, N_2, N_8 y/o N_9 es un nucleótido de citosina.

En una forma de realización del primer aspecto, N_8 y N_9 son nucleótidos de citosina, y el sustrato de polinucleótido comprende o consiste en una secuencia definida por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 25-26, 29-30, 72-90, o 172-175.

En una forma de realización del primer aspecto, dos, uno o ninguno de N_9-N_{15} son nucleótidos de guanina.

En una forma de realización del primer aspecto, uno o ninguno de N_9-N_{15} son nucleótidos de guanina y el sustrato de polinucleótido comprende o consiste en una secuencia definida por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 25-27, 29-30, 33, 72-80, 82-90, o 172-175.

En una forma de realización del primer aspecto, ninguno de N_9-N_{15} son nucleótidos de guanina y el sustrato de polinucleótido comprende o consiste en una secuencia definida por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 25, 26, 30, 33, 72, 75, 77-80, 84-85, o 89.

En una forma de realización del primer aspecto, más de diez, más de once, más de doce, o más de trece de N_1-N_{15} son nucleótidos de pirimidina.

En una forma de realización del primer aspecto, once, doce o más de doce de N_1-N_{15} son nucleótidos de pirimidina y el sustrato de polinucleótido comprende o consiste en una secuencia definida por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 25-27, 29, 33, 73-90 o 173-175.

En una forma de realización del primer aspecto, trece o catorce de N_1-N_{15} son nucleótidos de pirimidina y el sustrato de polinucleótido comprende o consiste en una secuencia definida por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 75, 77-80, 82-85 o 88-89.

En una forma de realización del primer aspecto, más de ocho, más de nueve, más de diez, u once de N_1-N_{14} son nucleótidos de citosina.

En una forma de realización del primer aspecto, diez u once de N_1-N_{14} son nucleótidos de citosina y el sustrato de polinucleótido comprende o consiste en una secuencia definida por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 33, 76-80, 82-83, 85, 87, 88, o 89.

En una forma de realización del primer aspecto, once de N_1-N_{14} son nucleótidos de citosina y el sustrato de polinucleótido comprende o consiste en una secuencia definida por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 77-79.

En una forma de realización del primer aspecto, el sustrato de polinucleótido comprende además un marcador detectable para detectar el sustrato de polinucleótido.

En una forma de realización del primer aspecto, el sustrato de polinucleótido comprende además una porción detectable y una porción de inactivador, en el que un efecto detectable proporcionado por la porción detectable aumenta o disminuye tras la modificación del sustrato de polinucleótido por dicha enzima catalítica de ácido nucleico.

En una forma de realización del primer aspecto, el ribonucleótido de purina comprende guanina.

En una forma de realización del primer aspecto, el ribonucleótido de pirimidina comprende uracilo.

En una forma de realización del primer aspecto, una porción del sustrato de polinucleótido que se une a dicha enzima de ácido nucleico catalítica tiene una temperatura de fusión (Tm) de entre 50 °C y 90 °C, entre 50 °C y 65 °C, entre 50 °C y 60 °C, entre 52 °C y 58 °C, entre 66 °C y 76 °C, entre 68 °C y 76 °C, entre 64 °C y 70 °C, entre 70 °C y 76 °C, entre 70 °C y 75 °C, entre 72 °C y 76 °C, 52 °C, 58 °C, 64 °C, 66 °C, 68 °C, 70 °C, 72 °C, o 76 °C.

En una forma de realización del primer aspecto, la enzima de ácido nucleico catalítica es:

(i) una enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima) y dicha porción se une al menos a un brazo de sustrato de dicha MNAzima; o
(ii) una ADNzima.

En una forma de realización del primer aspecto, el sustrato de polinucleótido es apto para la modificación catalítica por una MNAzima.

En una forma de realización del primer aspecto, el sustrato de polinucleótido es apto para la modificación catalítica por una ADNzima.

En una forma de realización del primer aspecto, el sustrato de polinucleótido comprende un marcador detectable para la detección por espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de giro electrónico, espectroscopía por polarización de fluorescencia, dicroísmo circular, inmunoensayo, cromatografía, radiometría, electroquímica, fotometría, escintigrafía, métodos electrónicos, espectroscopía de UV, luz visible o infrarroja, métodos enzimáticos, o cualquier combinación de los mismos.

En una forma de realización del primer aspecto, el sustrato de polinucleótido comprende un marcador detectable para la detección por espectroscopia de fluorescencia.

En una forma de realización del primer aspecto, el sustrato de polinucleótido comprende un marcador detectable para la detección por espectroscopia de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET).

En un segundo aspecto, la presente divulgación proporciona un sustrato de polinucleótido aislado para una enzima de ácido nucleico catalítica, comprendiendo o consistiendo dicho sustrato de polinucleótido en una secuencia definida por la SEQ ID NO: 28.

En una forma de realización del segundo aspecto, la enzima de ácido nucleico catalítica es una MNAzima que comprende un par de partzimas oligonucleotídicas, comprendiendo o consistiendo dicho par en las SEQ ID NOs: 15 y 8, SEQ ID NOs: 93 y 94, o SEQ ID NOs: 114 y 115.

En una forma de realización del segundo aspecto, la enzima de ácido nucleico catalítica es una ADNzima que comprende o que consiste en una secuencia definida por la SEQ ID NO: 138.

En un tercer aspecto, la presente divulgación proporciona un método para detectar la presencia de al menos una diana que comprende:

(a) proporcionar dos o más partzimas oligonucleotídicas, en las que al menos una primera partzima oligonucleotídica y una segunda partzima oligonucleotídica se autoensamblan en presencia de dicha diana para formar al menos una primera enzima de ácido nucleico multicomponente catalíticamente activa (MNAzima);
(b) proporcionar el sustrato de polinucleótido aislado del primer o segundo aspecto, en el que dicho sustrato de polinucleótido puede modificarse por dicha primera MNAzima, en el que dicha modificación de dicho sustrato de polinucleótido por dicha MNAzima proporciona un efecto detectable;
(c) poner en contacto dichas dos o más partzimas oligonucleotídicas con una muestra que supuestamente contiene dicha diana en condiciones que permiten:

(1) el autoensamblaje de dicha al menos la primera MNAzima, y
(2) la actividad catalítica de dicha al menos la primera MNAzima; y

(d) detectar dicho efecto detectable.

En una forma de realización del tercer aspecto, la diana es un facilitador del ensamblaje de MNAzimas.

En una forma de realización del tercer aspecto, la diana es un ácido nucleico.

En una forma de realización del tercer aspecto, la diana es un ácido nucleico que hibrida con uno o más brazos sensores de dicha MNAzima por complementariedad de pares de bases.

En una forma de realización del tercer aspecto, el ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en ADN, ADN metilado, ADN alquilado, ARN, ARN metilado, microARN, ARNsi, ARNsh, ARNt, ARNm, ARNsno, ARNst, ARNsm, pre- y pri-microARN, otros ARN no codificantes, ARN ribosómico, derivados de los mismos, amplicones o cualquier combinación de los mismos.

En una forma de realización del tercer aspecto, el ácido nucleico se amplifica.

En una forma de realización del tercer aspecto, la amplificación comprende uno o más de: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación mediada por transcripción (TMA), replicación de secuencia autosostenida (3SR), amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA), o reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).

En una forma de realización del tercer aspecto, el sustrato de polinucleótido se hibrida con los brazos de sustrato de dicha MNAzima a una temperatura de entre 50 °C y 90 °C, entre 50 °C y 65 °C, entre 50 °C y 60 °C, entre 52 °C y 58 °C, entre 66 °C y 76 °C, entre 68 °C y 76 °C, entre 64 °C y 70 °C, entre 70 °C y 76 °C, entre 70 °C y 75 °C, entre 72 °C y 76 °C, 52 °C, 58 °C, 64 °C, 66 °C, 68 °C, 70 °C, 72 °C, o 76 °C.

En una forma de realización del tercer aspecto, el método comprende además proporcionar:

(a) dos o más partzimas oligonucleotídicas adicionales capaces de autoensamblarse en presencia de una diana diferente para formar una segunda MNAzima catalíticamente activa; y
(b) al menos un sustrato de polinucleótido adicional;

en el que dicho sustrato de polinucleótido adicional es capaz de modificarse por dicha segunda MNAzima en presencia de dicha diana diferente.

En una forma de realización del tercer aspecto, el sustrato de polinucleótido adicional no es capaz de ser modificado por dicha primera MNAzima.

En una forma de realización del tercer aspecto, la detección en la parte (d) comprende el uso de espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de giro electrónico, espectroscopía por polarización de fluorescencia, dicroísmo circular, inmunoensayo, cromatografía, radiometría, electroquímica, fotometría, escintigrafía, métodos electrónicos, espectroscopía de UV, luz visible o infrarroja, métodos enzimáticos, o cualquier combinación de los mismos.

En una forma de realización del tercer aspecto, la detección en la parte (d) comprende el uso de espectroscopia de fluorescencia.

En una forma de realización del tercer aspecto, la detección en la parte (d) comprende la detección de un efecto detectable de FRET.

En una forma de realización del tercer aspecto, el núcleo catalítico de dicha MNAzima comprende ADN o un análogo del mismo.

En un cuarto aspecto, la presente divulgación proporciona el uso del sustrato de polinucleótido aislado del primer o segundo aspecto como un sustrato para una enzima de ácido nucleico catalítica.

En una forma de realización del cuarto aspecto, la enzima de ácido nucleico catalítica es una enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima),
comprendiendo dicha MNAzima al menos dos o más partzimas oligonucleotídicas en donde al menos una primera partzima oligonucleotídica y una segunda partzima oligonucleotídica se autoensamblan en presencia de un facilitador del ensamblaje de MNAzimas para formar una enzima de ácido nucleico multicomponente catalíticamente activa (MNAzima), en donde cada una de dicha al menos primera y dicha segunda partzimas oligonucleotídicas comprenden una porción de brazo de sustrato, una porción de núcleo catalítico, y una porción de brazo sensor;
en donde, tras autoensamblarse, la porción de brazo sensor de dichas primera y segunda partzimas oligonucleotídicas actúa como brazos sensores de la MNAzima, la porción de brazo de sustrato de la primera y segunda partzimas oligonucleotídicas actúan como brazos de sustrato de la MNAzima, y la porción de núcleo catalítico de la primera y la segunda partzimas oligonucleotídicas actúan como un núcleo catalítico de la MNAzima;
y en donde los brazos sensores de la MNAzima interactúan con dicho facilitador del ensamblaje de MNAzimas para mantener la primera y la segunda partzimas oligonucleotídicas en proximidad para la asociación de sus respectivas porciones de núcleo catalítico para formar el núcleo catalítico de la MNAzima, siendo dicho núcleo catalítico capaz de modificar dicho sustrato de polinucleótido, y en donde dichos brazos de sustrato de dicha MNAzima se acoplan a dicho sustrato de polinucleótido de manera que dicho núcleo catalítico de dicha MNAzima puede modificar dicho sustrato de polinucleótido.

En una forma de realización del tercer o cuarto aspecto, la porción de núcleo catalítico de cada una de dicha partzima oligonucleotídica comprende ADN o un análogo del mismo.

En una forma de realización del cuarto aspecto, el facilitador de ensamblaje es una diana a identificar, detectar o cuantificar.

En una forma de realización del tercer o cuarto aspecto, la primera y segunda partzimas oligonucleotídicas comprenden secuencias respectivas definidas por:
SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 63; SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 49; SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 51; SEQ ID NO: 52 y SEQ ID NO: 51; SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 57; SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO:

61; SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 63; SEQ ID NO: 64 y SEQ ID NO: 65; SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 67; SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 68; SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70; SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 63; SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 68; SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 99; SEQ ID NO: 100 y SEQ ID NO: 103; SEQ ID NO: 104 y SEQ ID NO: 105; SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 107; SEQ ID NO: 108 y SEQ ID NO: 109; SEQ ID NO: 110 y SEQ ID NO: 111; SEQ ID NO: 112 y SEQ ID NO: 113; SEQ ID NO: 116 y SEQ ID NO: 117; SEQ ID NO: 118 y SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 120 y SEQ ID NO: 121; SEQ ID NO: 122 y SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 155 y SEQ ID NO: 156; SEQ ID NO: 157 y SEQ ID NO: 158; SEQ ID NO: 159 y SEQ ID NO: 160; SEQ ID NO: 168 y SEQ ID NO: 169; SEQ ID NO: 179 y SEQ ID NO: 180; SEQ ID NO: 181 y SEQ ID NO: 182; SEQ ID NO: 183 y SEQ ID NO: 184 o SEQ ID NO: 185 y SEQ ID NO: 186.

En una forma de realización del tercer o cuarto aspecto, dicho sustrato oligonucleotídico y dicha primera y segunda partzimas oligonucleotídicas se definen por una combinación de secuencias como se expone en la Tabla 6, 8, 10, 13, 16, 20, 22 y/o 24.

En una forma de realización del cuarto aspecto, la enzima de ácido nucleico catalítica es una ADNzima, y la ADNzima y el sustrato de oligonucleótido se definen por una combinación de secuencias como se expone en la Tabla 15.

En una forma de realización del cuarto aspecto, la diana es un ácido nucleico que hibrida con uno o más brazos sensores de dicha MNAzima por complementariedad de pares de bases.

En una forma de realización del cuarto aspecto, el sustrato de polinucleótido hibrida con dicha enzima de ácido nucleico catalítica a una temperatura de entre 50 °C y 90 °C, entre 50 °C y 65 °C, entre 50 °C y 60 °C, entre 52 °C y 58 °C, entre 66 °C y 76 °C, entre 68 °C y 76 °C, entre 64 °C y 70 °C, entre 70 °C y 76 °C, entre 70 °C y 75 °C, entre 72 °C y 76 °C, 52 °C, 58 °C, 64 °C, 66 °C, 68 °C, 70 °C, 72 °C, o 76 °C.

En un quinto aspecto, la presente divulgación proporciona un kit que comprende el sustrato de polinucleótido aislado del primer o segundo aspecto.

En una forma de realización del quinto aspecto, el kit comprende además una enzima catalítica de ácido nucleico capaz de modificar catalíticamente dicho sustrato de polinucleótido.

En una forma de realización del quinto aspecto, la enzima de ácido nucleico catalítica es una enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima).

En un sexto aspecto, la presente divulgación proporciona un kit que comprende el sustrato de polinucleótido aislado del primer o segundo aspecto y una pluralidad de partzimas oligonucleotídicas diseñadas para ensamblar una enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima) capaz de detectar al menos una diana, en el que dicha MNAzima es capaz de modificar catalíticamente el sustrato de polinucleótido.

En una forma de realización del sexto aspecto, dicho sustrato de oligonucleótido y dicha pluralidad de partzimas de oligonucleótido se definen por una combinación de secuencias como se expone en la Tabla 6, 8, 10, 13, 16, 20, 22 y/o 24.

En un séptimo aspecto, la presente divulgación proporciona un ensamblaje que comprende un soporte sólido unido a un sustrato de polinucleótido del primer o segundo aspecto.

En una forma de realización del primer o tercer a séptimo aspectos, uno cualquiera o más de N_1-N_{15} son desoxirribonucleótidos.

En una forma de realización del primer o tercer a séptimo aspectos, uno cualquiera o más de N_1-N_{15} son ribonucleótidos.

En una forma de realización del primer o tercer a séptimo aspectos, cada uno de N_1-N_{15} son desoxirribonucleótidos.

En una forma de realización del primer o tercer a séptimo aspectos, cada uno de N_1-N_{15} son ribonucleótidos.

En una forma de realización del primer o tercer a séptimo aspectos, N_1-N_{15} comprende una mezcla de

desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos.

En una forma de realización del séptimo aspecto, el conjunto comprende una pluralidad de diferentes soportes sólidos unidos a una pluralidad de diferentes sustratos de polinucleótido.

En una forma de realización del primer, segundo, cuarto o quinto aspecto, la enzima de ácido nucleico catalítica es una ADNzima.

En una forma de realización del primer, segundo, cuarto o quinto aspecto, la enzima de ácido nucleico catalítica es una ribozima.

En una forma de realización del primer, segundo, cuarto o quinto aspecto, la enzima de ácido nucleico catalítica es una enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima).

En una forma de realización de los aspectos anteriores, la enzima de ácido nucleico catalítica es capaz de modificar el sustrato de polinucleótido por escisión.

En una forma de realización del primer, segundo o quinto aspecto, la enzima catalítica de ácido nucleico es una MNAzima que comprende la primera y segunda partzimas oligonucleotídicas, y dicho sustrato de oligonucleótido y dichas primera y segunda partzimas oligonucleotídicas se definen por una combinación de secuencias como se expone en la Tabla 6, 8, 10, 13, 16, 20, 22 y/o 24.

En una forma de realización del primer, segundo, o quinto aspecto, la enzima de ácido nucleico catalítica es una ADNzima, y la ADNzima y el sustrato de oligonucleótido se definen por una combinación de secuencias como se expone en la Tabla 15.

En una forma de realización del primer, segundo o quinto aspecto, el sustrato de polinucleótido es capaz de hibridar con dicha enzima catalítica de ácido nucleico mediante un emparejamiento de bases complementarias.

En una forma de realización del cuarto aspecto, el sustrato de polinucleótido se hibrida con dicha enzima catalítica de ácido nucleico mediante un emparejamiento de bases complementarias.

En una forma de realización del tercer y cuarto aspecto, el sustrato de polinucleótido se hibrida a dicha MNAzima mediante el emparejamiento de bases complementarias.

En una forma de realización del primer, segundo, quinto y sexto aspecto, el sustrato de polinucleótido, el sustrato de polinucleótido es capaz de hibridar con dicha MNAzima mediante un emparejamiento de bases complementarias.

En una forma de realización de los aspectos anteriores, una porción del sustrato de polinucleótido aislado se une al menos a un brazo de sustrato de dicha MNAzima.

En una forma de realización de los aspectos anteriores, el sustrato de polinucleótido es un sustrato universal capaz de unirse y modificarse catalíticamente por más de un tipo diferente de enzima de ácido nucleico catalítica.

En una forma de realización de los aspectos anteriores, el sustrato de polinucleótido es un sustrato universal capaz de unirse y modificarse catalíticamente por más de un tipo diferente de enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima).

En una forma de realización de los aspectos anteriores, al menos una de dichas partzimas oligonucleotídicas, facilitador del ensamblaje o sustrato comprende ADN o un análogo del mismo.

En una forma de realización del tercer y sexto aspecto, la modificación es la escisión del sustrato de polinucleótido por la MNAzima.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Ahora se describirán formas de realización preferidas de la presente descripción, sólo a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

La **Figura 1** es un diagrama que representa un diseño ejemplar de un ácido nucleico multicomponente (MNAzima). A modo de divulgación ejemplar, una MNAzima está compuesta por dos componentes oligonucleotídicos (partzima A y partzima B), que se autoensamblan en presencia de un facilitador del ensamblaje. Cuando las dos partzimas se ensamblan en presencia del facilitador del ensamblaje, se forma una MNAzima catalíticamente activa que es capaz de modificar (por ejemplo, escindir o ligar) un sustrato. Las dos partzimas del componente tienen (i) brazos sensores, que se unen al facilitador del ensamblaje, (ii) brazos del sustrato, que se unen al sustrato, y (iii) secuencias del núcleo catalítico parcial. La presencia de una molécula facilitadora del ensamblaje (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico diana) proporciona la señal de "entrada" que dirige el ensamblaje de los componentes de partzima de una manera altamente específica que es susceptible de modulación. En algunas formas de realización, el facilitador del ensamblaje puede ser, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico diana presente en una muestra de ensayo. En otras formas de realización, el facilitador del ensamblaje puede ser, por ejemplo, un oligonucleótido sintético incluido en el medio para dirigir el autoensamblaje de los componentes de partzima en presencia de una entidad o evento detectable. La modificación del sustrato por la MNAzima ensamblada puede proporcionar un "efecto detectable" que puede detectarse y/o cuantificarse. Por ejemplo, cuando el sustrato está doblemente marcado con un fluoróforo (F) y un inactivador (Q), la escisión de este "sustrato indicador" por una MNAzima activa separa el fluoróforo y el inactivador, dando como resultado un aumento concomitante de la fluorescencia.

La **Figura 2** proporciona un diagrama de flujo que muestra aplicaciones ejemplares de métodos para la detección de dianas usando MNAzimas. Las MNAzimas se pueden usar para (1) detección directa; (2) detectar amplicones generados, por ejemplo, por PCR, SDA, LAMP, RCA, TMA, 3SR o NASBA, durante o después de la amplificación de dianas; y (3) iniciar una cascada de amplificación de señal.

La **Figura 3** proporciona una descripción de MNAzimas ejemplares y un método para la detección de dianas usando MNAzimas que escinden sustratos ligados a un soporte. En esta forma de realización, la MNAzima se forma solamente en presencia de un facilitador del ensamblaje (diana). Cuando la MNAzima escinde el sustrato ligado entre un fluoróforo y un inactivador, se genera una señal. Como se muestra aquí, tras la escisión entre el fluoróforo F y el inhibidor Q, hay un aumento resultante en la fluorescencia. En general, el método puede diseñarse de manera tal que el fluoróforo F o el inactivador Q puedan permanecer unidos al soporte una vez que se produzca la escisión. Panel (i): El soporte que se muestra tiene solo un tipo de sustrato (Sustrato 1) ligado a éste. Panel (ii): Puede haber múltiples tipos de sustrato ligados en diferentes posiciones. Cada sustrato puede escindirse solo por una MNAzima formada en presencia de una molécula facilitadora del ensamblaje de MNAzimas específica; aquí, las Dianas 1 y 2 facilitan el autoensamblaje de las MNAzimas 1 y 2, respectivamente. Por lo tanto, en este ejemplo, la MNAzima 1 solo se autoensambla en presencia de la Diana 1 y solo escinde el Sustrato 1. De manera similar, la MNAzima 2 solo se autoensambla en presencia de la Diana 2 y solo escinde el Sustrato 2. La señal se puede localizar por el posicionamiento del sustrato en la superficie, permitiendo de este modo la detección específica de diferentes facilitadores del ensamblaje. El ensayo ejemplar en el Panel (ii) requiere dos secuencias de sustrato distintas.

La **Figura 4** muestra un ensayo ejemplar utilizando productos de sustrato modificados catalíticamente como componentes facilitadores del ensamblaje de MNAzimas. En esta estrategia se forma una MNAzima iniciadora (Mt) en presencia de una diana (T). La MNAzima iniciadora (Mt) escinde un primer sustrato (S1) para crear un primer componente facilitador del ensamblaje (S1f), que dirige la formación de una primera MNAzima en cascada (MNAzima en cascada Mc1). En este ejemplo, la primera MNAzima en cascada (Mc1) comprende dos partzimas y tres componentes facilitadores del ensamblaje designados F1, F2 y S1f. Mc1 puede escindir un sustrato adicional (S2), liberando de este modo un componente facilitador del ensamblaje adicional (S2f), que dirige la formación de una segunda MNAzima en cascada (MNAzima en cascada Mc2). En este ejemplo, la segunda MNAzima en cascada (Mc2) comprende dos partzimas y tres componentes facilitadores del ensamblaje designados F3, F4 y S2f. Mc2 puede escindir entonces más del primer sustrato (S1), creando de este modo más del primer componente facilitador del ensamblaje (S1f). Esto conduce a la formación de una primera MNAzima en cascada (Mc1) adicional, formando de este modo una cascada de amplificación. Este ensayo ejemplar requiere dos secuencias de sustrato distintas.

La **Figura 5** proporciona un gráfico que ilustra los valores de Ct generados por qPCR de MNAzimas usando una gama de diferentes sustratos universales para la detección del gen TFRC humano. La identidad de los sustratos universales utilizados en las reacciones se indica en el eje x (donde "2" se refiere a Sub2, "3" se refiere a Sub3, etc.). Se usaron el mismo conjunto de cebadores y el ADN genómico para todas las reacciones, y todas las partzimas tenían las mismas regiones diana-sensor y dominios catalíticos. Las únicas diferencias entre las reacciones fueron los brazos de sustrato-sensor de las partzimas y los sustratos universales marcados con fluorescencia. Por lo tanto, la diferencia en los valores de Ct entre las reacciones se correlaciona con la eficiencia de la escisión de los sustratos universales. Los valores de Ct más bajos

indican varios ciclos más rápidos para alcanzar un nivel umbral de fluorescencia y, por lo tanto, indican sustratos universales escindidos de manera más eficiente.

La **Figura 6** proporciona gráficos que ilustran las relaciones señal-ruido resultantes de la escisión mediada por MNAzima de una gama de sustratos universales en un formato isotérmico. La diana era un oligonucleótido sintético. La relación señal-ruido se calculó a partir de los datos de fluorescencia normalizados recogidos durante las reacciones de escisión en un intervalo de temperaturas de reacción. La identidad de los sustratos universales utilizados en las reacciones se indica en el eje x (donde "2" se refiere a Sub2, "3" se refiere a Sub3, etc.). En la **Figura 6 (i)**, las diferentes columnas de datos se refieren a los resultados para diferentes temperaturas de reacción (como se indica en la leyenda 52 °C, 54 °C, 56 °C y 58 °C). La **Figura 6 (i)** ilustra la relación señal-ruido en el eje y. La **Figura 6 (ii)** ilustra la desviación estándar del promedio de la relación señal-ruido de las cuatro temperaturas ensayadas y las diferentes series de sustratos se indican mediante diferentes sombreados de columnas.

La **Figura 7** proporciona gráficos que ilustran gráficos de amplificación lineal generados por qPCR de MNAzimas usando una gama de diferentes sustratos universales para la detección de una gama de genes humanos. Cada combinación de sustratos y dianas se realizó a una temperatura de hibridación de **a)** 52 °C o **b)** 58 °C. Los sustratos universales ensayados con cada gen se indican por símbolos situados en la parte superior izquierda de cada gráfico y eran **(i)** Sub3 y Sub61 con CYP2C9, **(ii)** Sub6, Sub72, Sub74 y Sub79, con TP53, **(iii)** Sub60, Sub61 y Sub79 con B2M, **(iv)** Sub49 y Sub75 con HMBS, **(v)** Sub2, Sub72 y Sub80 con TFRC y **(iv)** Sub55, Sub80 y Sub88 con RPL13a. El mismo conjunto de cebadores y el ADN genómico se utilizaron para todas las reacciones con cada gen diferente, y todas las partzimas tenían los mismos dominios catalíticos y regiones diana-sensor coincidentes con el gen particular. Las únicas diferencias entre las reacciones fueron los brazos de sustrato-sensor de las partzimas y los sustratos universales marcados con fluorescencia. Por lo tanto, la diferencia en la forma del gráfico de amplificación y los valores de Ct entre las reacciones para el mismo gen se correlaciona con la eficiencia de la escisión de los sustratos universales. Las curvas más pronunciadas y los valores de Ct anteriores indican varios ciclos más rápidos para alcanzar un umbral de fluorescencia y, por lo tanto, indican sustratos universales escindidos de manera más eficiente.

La **Figura 8** proporciona gráficos que ilustran la relación señal-ruido resultantes de la escisión mediada por ADNzimas de una gama de sustratos universales en un formato isotérmico. La relación señal-ruido se calculó a partir de los datos de fluorescencia normalizados recogidos durante las reacciones de escisión en un intervalo de temperaturas de reacción. La identidad de los sustratos universales utilizados en las reacciones se indica en el eje x (donde "2" se refiere a Sub2, "3" se refiere a Sub3, etc.). En la **Figura 8 (i)**, las diferentes columnas de datos se refieren a los resultados para diferentes temperaturas de reacción (como se indica en la leyenda - 50 °C a 60 °C) con la relación señal-ruido en el eje y. En la **Figura 8 (ii)** las columnas de datos se refieren a la desviación estándar del promedio de la relación señal-ruido de las seis temperaturas ensayadas y las diferentes series de sustratos se indican mediante diferentes sombreados de columnas.

La **Figura 9** proporciona gráficos que ilustran diagramas de amplificación lineal de qPCR de MNAzimas realizada con una gama de diferentes sustratos universales (Sub44, Sub55, Sub61, Sub65, Sub72 y Sub74) para investigar la actividad de escisión no específica con un subconjunto de partzimas (diseñadas con brazos de sustrato-sensor que serán complementarios a Sub44, Sub55, Sub72 y Sub74) para la detección del gen RPL13a humano. Cada sustrato universal se ensayó individualmente con pares de partzimas diseñados para unirse con total complementariedad a los otros sustratos para determinar si se podía detectar una señal. Las partzimas complementarias con **(i)** Sub72, **(ii)** Sub74, **(iii)** Sub55 y **(iv)** Sub44, se ensayaron con todos los sustratos. En el Panel **(a)**, la línea inferior de la tabla indica el sustrato con el que las partzimas en el experimento presentan una complementariedad completa. Las otras filas de la tabla muestran un alineamiento de las secuencias de los otros sustratos ensayados en cada experimento con diferencias entre el sustrato inferior y otras secuencias de sustrato indicadas por letras que están en color gris y subrayadas. En el Panel **(b)** se ilustran gráficos de amplificación lineal. La fluorescencia normalizada (eje y) se representa en función del número de ciclo (eje x). Las curvas de amplificación individuales se etiquetan a la derecha del gráfico para indicar qué curva de amplificación se refiere a cada sustrato. El umbral de fluorescencia se indica mediante una línea horizontal continua sobre el eje x. Una señal creciente sobre el umbral de fluorescencia indica la escisión del sustrato universal.

La **Figura 10** proporciona gráficos que ilustran la relación señal-ruido resultante de la escisión mediada por ADNzimas de cada sustrato universal individualmente con ADNzimas diseñadas para unirse con complementariedad completa a los otros sustratos, en un formato isotérmico. La relación señal-ruido normalizada se calculó a partir de los datos de fluorescencia normalizados recogidos a temperaturas de reacción de **(i)** 52 °C o **(ii)** 58 °C. La identidad de los sustratos universales utilizados en las reacciones se indica en el eje x. Las diferentes columnas de datos se refieren a los resultados de la escisión para cada

ADNzima como se indica en la leyenda, con la relación señal-ruido en el eje y.

La **Figura 11** ilustra gráficas de amplificación exponencial generadas con amplificación a 52 °C (Panel **(i)**) o 58 °C (Panel **(ii)**) para dos reacciones múltiplex de qPCR de MNAzimas Múltiplex 1 usando sustratos de la serie 1 (Sub2, Sub3, Sub4, Sub6 y Sub7) y Múltiplex 2 usando sustratos de las series 2 y 3 (Sub55, Sub61, Sub74, Sub79 y Sub80). Ambos múltiplex midieron los genes humanos TFRC, HPRT, TP53, RPL13a y CYP2C9 en un solo recipiente de reacción. Para cada gen diferente medido en los dos formatos múltiplex, se utilizaron los mismos conjuntos de cebadores y ADN genómico a ambas temperaturas y para todos los sustratos universales, y todas las partzimas tenían los mismos dominios catalíticos y regiones diana-sensor coincidentes con el gen particular. La única diferencia entre las reacciones fueron los brazos de sustrato-sensor de las partzimas y los sustratos universales marcados con fluorescencia. Los sustratos universales ensayados con cada gen se indican en la parte superior izquierda de cada gráfico. Las gráficas de amplificación para el Múltiplex 1 (cruces) y el Múltiplex 2 (círculos) se superpusieron para permitir una comparación directa entre las dos múltiplex a dos concentraciones de ADN diferentes, 100 ng (gráfico de cruces y círculos a la izquierda) y 391 pg (gráfico de cruces y círculos a la derecha). La diferencia en la forma de los gráficos de amplificación se correlacionó con la eficiencia de la escisión de los sustratos universales. Las curvas más pronunciadas y los valores de Ct anteriores indican varios ciclos más rápidos para alcanzar un umbral de fluorescencia y, por lo tanto, indican sustratos universales escindidos de manera más eficiente.

DEFINICIONES

Se usan ciertos términos en el presente documento que tendrán los significados expuestos como se indica a continuación.

Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "un sustrato de polinucleótido" también incluye una pluralidad de sustratos de polinucleótido.

El término "que comprende" significa "incluyendo principalmente, pero no necesariamente únicamente". Además, las variaciones de la palabra "que comprende", tales como "comprender" y "comprende", tienen significados correspondientemente variados.

El uso del término "aproximadamente" en el presente documento con referencia a un valor numérico mencionado incluye el valor numérico mencionado y los valores numéricos dentro de más o menos el diez por ciento del valor mencionado.

El uso del término "entre" en el presente documento cuando se hace referencia a un intervalo de valores numéricos incluye los valores numéricos en cada criterio de valoración del intervalo. Por ejemplo, un polinucleótido de entre 10 nucleótidos y 20 nucleótidos de longitud incluye un polinucleótido de 10 nucleótidos de longitud y un polinucleótido de 20 nucleótidos de longitud.

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan de forma intercambiable en el presente documento y se refieren a un polímero monocatenario o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos y/o ribonucleótidos, y/o análogos, derivados, variantes, fragmentos o combinaciones de los mismos, incluyendo, pero sin limitación, ADN, ADN metilado, ADN alquilado, ARN, ARN metilado, microARN, ARNsi, ARNsh, ARNm, ARNt, ARNsno, ARNst, ARNsm, ARNsm, pre y pri-microARN, otros ARN no codificantes, ARN ribosómico, derivados de los mismos, amplicones de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. A modo de ejemplo no limitativo, la fuente de un ácido nucleico se puede seleccionar del grupo que consiste en fuentes sintéticas, mamíferas, humanas, animales, vegetales, fúngicas, bacterianas, virales, de arqueas o cualquier combinación de las mismas.

El término "oligonucleótido" típicamente representa un segmento de ADN o una molécula de ácido nucleico que contiene ADN, o una molécula que contiene ARN o ARN, o una combinación de los mismos. Por lo tanto, un oligonucleótido puede comprender o consistir en bases de desoxirribonucleótidos y/o ribonucleótidos, y/o análogos, derivados, variantes, fragmentos o combinaciones de los mismos, incluyendo, pero sin limitación, ADN, ADN metilado, ADN alquilado, ARN, ARN metilado, microARN, ARNsi, ARNsh, ARNm, ARNt, ARNsno, ARNst, ARNsm, ARNsm, pre y pri-microARN, otros ARN no codificantes, ARN ribosómico, derivados de los mismos, amplicones de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de oligonucleótidos incluyen dianas de ácido nucleico; sustratos, por ejemplo, aquellos que pueden ser modificados por una ADNzima o una MNAzima con escisión, ligasa u otra actividad enzimática; cebadores tales como los usados para la amplificación diana *in vitro* por

métodos tales como PCR; y componentes de MNAzimas, incluyendo, pero sin limitación, partzimas, y facilitadores del ensamblaje.

El término "nucleótido de pirimidina" incluye cualquier nucleótido que comprende una base de pirimidina incluyendo, pero sin limitación, citosina, timina y uracilo. Un nucleótido de pirimidina puede comprender una molécula de azúcar ribosa (es decir, un "ribonucleótido de pirimidina") o una molécula de azúcar desoxirribosa (es decir, un "desoxirribonucleótido de pirimidina").

El término "nucleótido de purina" incluye cualquier nucleótido que comprende una base de purina incluyendo, pero sin limitación, adenina y guanina. Un nucleótido de purina puede comprender una molécula de azúcar ribosa (es decir, un "ribonucleótido de purina") o una molécula de azúcar desoxirribosa (es decir, un "desoxirribonucleótido de purina").

Los términos "enzima de ácidos nucleicos", "ácido nucleico catalítico", "ácido nucleico con actividad catalítica", y "enzima de ácidos nucleicos catalíticos" se usan en el presente documento indistintamente y se referirán a un ADN o molécula o complejo que contiene ADN, o un ARN o molécula o complejo que contiene ARN o una combinación de los mismos que es una molécula o complejo híbrido de ADN-ARN, que pueden unir al menos un sustrato y catalizar una modificación (tal como ligación o escisión) de al menos un sustrato. Los residuos de nucleótidos en los ácidos nucleicos catalíticos pueden incluir las bases A, C, G, T, y U, así como derivados y análogos de las mismas. Los términos anteriores incluyen enzimas de ácidos nucleicos uni-moleculares que pueden comprender un único ADN o una molécula que contiene ADN (también conocida en la técnica como una "enzima de ADN", "desoxirribozima" o "ADNzima") o un ARN o molécula que contiene ARN (también conocida en la técnica como una "enzima de ARN" o "ribozima") o una combinación de las mismas, que es una molécula híbrida ADN-ARN que puede reconocer al menos un sustrato y catalizar una modificación (tal como ligación o escisión) de al menos un sustrato. Los términos anteriores incluyen enzimas de ácidos nucleicos que comprenden un ADN o complejo que contiene ADN o un ARN o complejo que contiene ARN o una combinación de los mismos, que es un complejo híbrido ADN-ARN que puede reconocer al menos un sustrato y catalizar una modificación (tal como ligación o escisión) de al menos un sustrato. Los términos "enzima de ácidos nucleicos", "ácido nucleico catalítico", "ácido nucleico con actividad catalítica", y "enzima de ácidos nucleicos catalíticos" incluyen en su significado MNAzimas.

Los términos "MNAzima" o "enzima de ácidos nucleicos multi-componente" como se usa en el presente documento, se refiere a dos o más secuencias oligonucleotídicas (por ejemplo, partzimas) que, solamente en presencia de un facilitador del ensamblaje de MNAzima (por ejemplo, una diana), forman una enzima de ácidos nucleicos activa que es capaz de modificar catalíticamente un sustrato. Las MNAzimas pueden catalizar un rango de reacciones, incluyendo la escisión de un sustrato, ligación de sustratos y otras modificaciones enzimáticas de un sustrato o sustratos. Una MNAzima ejemplar que comprende la partzima A y partzima B que tiene actividad de escisión se representa en la **Figura 1**. Las MNAzimas con actividad endonucleasa, o de escisión, también se conocen como "escindidores de MNAzima". Con referencia a la **Figura 1**, las partzimas A y B se unen cada una a un facilitador del ensamblaje (por ejemplo, una secuencia de ADN o ARN diana) a través del emparejamiento de bases de Watson-Crick. La MNAzima sólo se forma cuando los brazos sensores de las partzimas A y B hibridan adyacentes entre sí en el facilitador del ensamblaje. Los brazos de sustrato de la MNAzima se acoplan con el sustrato, cuya modificación (por ejemplo, escisión) es catalizada por el núcleo catalítico de la MNAzima, formado por la interacción de los dominios catalíticos de las partzimas A y B. La escisión de un sustrato indicador quimérico de ADN/ARN se ilustra en el dibujo. La MNAzima escinde el sustrato entre un fluoróforo y un par de colorantes de inactivador, generando de este modo una señal. Las expresiones "enzima de ácidos nucleicos multi-componente" y "MNAzima" comprenden estructuras bipartitas, compuestas por dos moléculas, o estructuras tripartitas, compuestas por tres moléculas de ácido nucleico, u otras estructuras multipartitas, por ejemplo aquellas formadas por cuatro o más moléculas de ácido nucleico.

Se entenderá que los términos "MNAzima" y "enzima de ácido nucleico multicomponente" como se usan en el presente documento incluyen todas las MNAzimas conocidas y MNAzimas modificadas, incluidas las divulgadas en una cualquiera o más de las publicaciones de patente PCT número WO/2007/041774, WO/2008/040095, WO2008/122084, y las publicaciones de patente de Estados Unidos número 2007-0231810, 2010-0136536, y 2011-0143338 relacionadas. Los ejemplos no limitantes de MNAzimas y MNAzimas modificadas incluidas por los términos "MNAzima" y "enzima de ácido nucleico multicomponente" incluyen MNAzimas con actividad catalítica de escisión (como se ilustra en el presente documento), MNAzimas no ensambladas o parcialmente ensambladas que comprenden uno o más inhibidores de ensamblaje, MNAzimas que comprenden uno o más aptámeros ("apta-MNAzimas"), MNAzimas que comprenden uno o más brazos sensores truncados y opcionalmente uno o más oligonucleótidos estabilizantes, MNAzimas que comprenden uno o más inhibidores de la actividad, proenzimas

inactivas de ácidos nucleicos multicomponente (MNAi), y MNAzimas con actividad catalítica de la ligasa ("MNAzima ligasas"), cada una de las cuales se describe en detalle en uno o más de los documentos WO/2007/041774, WO/2008/040095, WO2008/122084, US 2007-0231810, US 2010-0136536, y/o US 2011-0143338.

Como se usa en el presente documento, los términos "partzima", "partzima componente", "componente de partzima", "oligonucleótido componente", "componente de oligonucleótido" y "partzima oligonucleotídica" se refieren a un oligonucleótido que contiene ADN o que contiene ARN o que contiene ADN-ARN, dos o más de los cuales, solo en presencia de un facilitador de ensamblaje de MNAzima como se define en el presente documento, pueden formar juntos una "MNAzima". En ciertas formas de realización preferidas, una o más partzimas de componente, y preferiblemente al menos dos, pueden comprender tres regiones o dominios: un dominio "catalítico", que forma parte del núcleo catalítico que cataliza una modificación; un dominio de "brazo sensor", que puede asociarse y/o unirse a un facilitador del ensamblaje; y un dominio de "brazo de sustrato", que puede asociarse y/o unirse a un sustrato. Las ilustraciones de estas regiones o dominios se muestran en la **Figura 1**. Las partzimas pueden comprender al menos un componente adicional que incluye, pero sin limitación, un aptámero, al que se hace referencia en el presente documento como una "apta-partzima". Una partzima puede comprender múltiples componentes, incluyendo, pero sin limitación, un componente de partzima con un brazo sensor truncado y un componente de brazo estabilizador que estabiliza la estructura de MNAzima interactuando con un facilitador del ensamblaje o un sustrato.

Los términos "molécula facilitadora del ensamblaje", "facilitador del ensamblaje", "molécula facilitadora del ensamblaje de MNAzimas" y "facilitador del ensamblaje de MNAzimas" como se usan en el presente documento, se refieren a entidades que pueden facilitar el autoensamblaje de las partzimas componentes para formar una MNAzima catalíticamente activa por interacción con los brazos sensores de la MNAzima. Como se usa en el presente documento, los facilitadores del ensamblaje pueden facilitar el ensamblaje de MNAzimas que tienen escisión, ligasa u otras actividades enzimáticas. En formas de realización preferidas, se requiere un facilitador de ensamblaje para el autoensamblaje de una MNAzima. Un facilitador de ensamblaje puede estar compuesto por una molécula, o puede estar compuesto por dos o más "componentes facilitadores de ensamblaje" que pueden emparejarse con, o unirse a, los brazos sensores de una o más "partzimas" oligonucleotídicas. El facilitador del ensamblaje puede ser una diana. La diana puede ser un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en ADN, ADN metilado, ADN alquilado, ARN, ARN metilado, microARN, ARNsi, ARNsh, ARNt, ARNm, ARNsno, ARNst, ARNsm, pre- y pri-microARN, otros ARN no codificantes, ARN ribosómico, derivados de los mismos, amplicones o cualquier combinación de los mismos. El ácido nucleico puede amplificarse. La amplificación puede comprender uno o más de: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación de desplazamiento de cadena, amplificación isotérmica mediada por bucle, amplificación por círculo rodante, amplificación mediada por transcripción, replicación de secuencia autosostenida, reacción en cadena de la ligasa, amplificación basada en secuencias de ácido nucleico, o reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).

Un "componente facilitador del ensamblaje" es una molécula que se puede usar para controlar el ensamblaje de MNAzimas activas o facilitar la transición de componentes de MNAzimas inactivas a MNAzimas activas.

El término "diana", como se usa en el presente documento, incluye cualquier entidad natural o sintética, constituyente o analito que se busca detectar, identificar o cuantificar mediante un método que usa una enzima de ácido nucleico particular, tal como una o más MNAzimas, con o sin una etapa y/o cascada de amplificación adicional. Por lo tanto, las dianas incluyen el rango más amplio de entidades, constituyentes o analitos detectables para los que son deseables métodos sensibles de detección, identificación y/o cuantificación. Algunas dianas ejemplares incluyen, pero sin limitación, ácido nucleico, proteína, polipéptido, péptido, glucoproteínas, lípidos, lipoproteínas, organismos completos, células, virus, bacterias, arqueas, levaduras, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, porciones o combinaciones de los mismos. Otras dianas también se contemplan para su uso en el presente documento. Se entenderá que la diana también puede ser un facilitador del ensamblaje o un componente facilitador del ensamblaje.

Un "efecto detectable" es un efecto que puede detectarse o cuantificarse como una indicación de que se ha producido la modificación de uno o más sustratos. La magnitud del efecto puede ser indicativa de la cantidad de una entrada tal como un facilitador del ensamblaje (por ejemplo, una diana). El efecto detectable puede detectarse por una diversidad de métodos, incluyendo la espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de giro electrónico, espectroscopía por polarización de fluorescencia, dicroísmo circular, inmunoensayo, cromatografía, radiometría, fotometría, escintigrafía, métodos electrónicos, espectroscopía de UV, luz visible o infrarrojos, métodos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos.

Los términos "sustrato de polinucleótido" y "sustrato" como se usan en el presente documento, incluyen polímero monocatenario o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos, derivados, variantes, fragmentos o combinaciones de los mismos, incluyendo, pero sin limitación, ADN, ADN metilado, ADN alquilado, ARN, ARN metilado, microARN, ARNsi, ARNsh, ARNm, ARNt, ARNsno, ARNst, ARNsm, ARNsm, pre y pri-microARN, otros ARN no codificantes, ARN ribosómico, derivados de los mismos (incluyendo polímeros mixtos de bases de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos), que es capaz de reconocerse, activarse o modificarse por una enzima que incluye una enzima de ácido nucleico catalítica. Un "sustrato de polinucleótido" o "sustrato" puede modificarse mediante diversas actividades enzimáticas incluyendo, pero sin limitación, escisión o ligación. La modificación de un "sustrato de polinucleótido" o "sustrato" puede proporcionar un "efecto detectable" para controlar la actividad catalítica de una enzima.

Un "sustrato indicador" como se usa en el presente documento, es un sustrato que está particularmente adaptado para facilitar la medida de la desaparición de un sustrato o la aparición de un producto en relación con una reacción catalizada. Los sustratos indicadores pueden estar libres en solución o unidos (o "ligados"), por ejemplo, a una superficie, o a otra molécula. Un sustrato indicador puede estar marcado con cualquiera de una gran diversidad de medios incluyendo, por ejemplo, fluoróforos (con o sin uno o más componentes adicionales, tales como inactivadores), marcadores radiactivos, biotina (por ejemplo, biotinilación) o marcadores quimioluminiscentes.

Como se usa en el presente documento, un "sustrato genérico" o un "sustrato universal" es un sustrato, por ejemplo, un sustrato indicador, que es reconocido por y accionado catalíticamente por una pluralidad de MNAzimas, cada una de las cuales puede reconocer un facilitador del ensamblaje diferente. El uso de dichos sustratos facilita el desarrollo de ensayos separados para la detección, identificación o cuantificación de una amplia diversidad de facilitadores de ensamblaje usando MNAzimas estructuralmente relacionadas, todas las cuales reconocen un sustrato universal. Estos sustratos universales pueden etiquetarse independientemente cada uno con uno o más marcadores. En formas de realización preferidas, se usan marcadores detectables independientemente para marcar uno o más sustratos universales para permitir la creación de un sistema conveniente para detectar independiente o simultáneamente una diversidad de facilitadores del ensamblaje usando MNAzimas. En algunas formas de realización, los sustratos escindidos por MNAzimas podrían reconstituirse, y por lo tanto, reciclarse, usando una MNAzima o ADNzima ligasa. En algunas formas de realización, el sustrato o sustratos escindidos o ligados por MNAzimas pueden usarse adicionalmente como componentes o moduladores de una o más MNAzimas o ADNzimas adicionales.

En algunas formas de realización, los "sustratos universales" pueden ligarse a un soporte sólido en diferentes posiciones para proporcionar una matriz de sustrato. En dichas formas de realización, los sustratos universales ligados pueden estar todos etiquetados con el mismo fluoróforo. En ciertos casos, cada sustrato universal puede escindirse solo por una MNAzima formada en presencia de una molécula facilitadora del ensamblaje de MNAzima específica y la señal puede localizarse colocando el sustrato sobre la superficie, permitiendo así la detección específica de diferentes facilitadores del ensamblaje.

El término "producto" se refiere a la nueva molécula o moléculas que se producen como resultado de la modificación enzimática de un sustrato. Como se usa en el presente documento, la expresión "producto de escisión" se refiere a una nueva molécula producida como resultado de la actividad de escisión o endonucleasa por una enzima. El término "producto de ligación" se refiere a una nueva molécula producida como resultado de la ligación de sustratos por una enzima.

Como se usa en el presente documento, se entenderá que el uso de los términos "temperatura de fusión" y "Tm" en el contexto de un sustrato de polinucleótido de la presente invención es una referencia a la temperatura de fusión (Tm) calculada usando la regla de Wallace, donde Tm = 2 °C(A + T) + 4 °C(G + C) (véase Wallace et al., (1979) Nucl. Acids Res. 6(11):3543-3558), a menos que se indique específicamente otra cosa.

Como se usa en el presente documento, el término "base" se entenderá que incluye todo el ribonucleótido o desoxirribonucleótido al que está unida la base.

ABREVIATURAS

Las siguientes abreviaturas se usan en el presente documento y a lo largo de la memoria descriptiva:

MNAzima: enzima de ácido nucleico multicomponente, o enzima de ácido nucleico multipartita;
ADNzima: enzima de ácido desoxirribonucleico;

Ribozima: enzima de ácido ribonucleico;
Partzima: Oligonucleótido que contiene una enzima parcial
PCR: reacción en cadena de la polimerasa;
qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real;
NF-H_2O: agua sin nucleasa;
LNA: ácido nucleico bloqueado;
F: fluoróforo;
Q: inactivador;
N = A, C, T/U, G, o cualquier análogo de los mismos;
N' = cualquier nucleótido complementario a N, o capaz de emparejarse por bases con N;
$(N)_x$: cualquier número de N;
$(N')_x$: cualquier número de N';
W: A o T;
R: A, G, o AA;
rN: cualquier ribonucleótido;
$(rN)_x$: cualquier número de rN;
rR: ribonucleótido A o G;
rY: ribonucleótido C o U
M: A o C;
H: A, C, o T/U;
D: G, A, o T/U;
JOE o 6-JOE: 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína;
FAM o 6-FAM: 6-Carboxifluoresceína.
BHQ1: Black Hole Quencher®1
BHQ2: Black Hole Quencher®2
IB: Iowa Black®FQ
IBR: Iowa Black®RQ
ARNsh: ARN de horquilla corta
ARNsi: ARN interferente corto
ARNm: ARN mensajero
ARNt: ARN de transferencia
ARNsno: ARN nucleolar pequeño
ARNst: ARN temporal pequeño
ARNsm: ARN modulador pequeño
pre-microARN*:* microARN precursor
pri-microARN*:* microARN primario
UV: ultravioleta

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN ILUSTRATIVAS

Debe entenderse desde el principio, que las figuras y los ejemplos proporcionados en el presente documento son para ilustrar, en lugar de limitar, la presente invención y sus diversas formas de realización.

Existe la necesidad de sustratos catalíticos de ácido nucleico con propiedades que faciliten la función mejorada del ácido nucleico catalítico. En particular, muchas aplicaciones que implican MNAzimas y ADNzimas se beneficiarán significativamente de la provisión de nuevas familias de sustratos universales que tienen una mayor capacidad de modificación catalítica por diferentes MNAzimas con las mismas o diferentes especificidades diana. Por ejemplo, estas familias de sustratos serían ventajosas para aumentar la eficiencia y/o precisión de los ensayos múltiplex que implican MNAzimas. Los sustratos universales adicionales son particularmente útiles en aplicaciones donde las matrices de sustratos se crean ligando los sustratos a soportes sólidos.

La presente divulgación proporciona un conjunto de directrices para producir sustratos de oligonucleótidos universales con una mayor probabilidad de modificarse catalíticamente (por ejemplo, escindirse) de manera eficiente en un amplio intervalo de temperatura con un rendimiento mejorado a temperaturas elevadas. Estas directrices incluyen, pero sin limitación, uno cualquiera o más de: (i) siete o más nucleótidos de citosina en las diez bases que rodean los dos ribonucleótidos centrales; (ii) las bases inmediatamente adyacentes a los dos ribonucleótidos centrales son citosinas (N_8 y N_9); (iii) el contenido total de pirimidina del sustrato de oligonucleótido es superior al 64%; (iv) la Tm total del sustrato de oligonucleótido es de 66 °C o más, aplicable si la temperatura de reacción para la modificación catalítica (por ejemplo, escisión) del sustrato de oligonucleótido por la enzima de ácido nucleico es

superior a 50 °C; y/o (v) un número bajo de nucleótidos de guanina (por ejemplo, tres, dos, uno o ninguno) en las 10 bases que rodean los dos ribonucleótidos centrales.

El desarrollo de estas directrices ha facilitado el desarrollo de sustratos para enzimas de ácido nucleico catalíticas con características que aumentan la función de ácido nucleico catalítico. Se ha identificado que la modificación catalítica de uno o más nucleótidos dentro de un sustrato dirigido por una enzima de ácido nucleico dada puede mejorarse por la presencia de ciertos nucleótidos específicos próximos a los que están modificados catalíticamente.

Por consiguiente, ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a sustratos de polinucleótido para enzimas catalíticas de ácido nucleicas. Los sustratos de polinucleótidos pueden comprender una serie de nucleótidos de pirimidina 5' (es decir, aguas arriba) y/o 3' (es decir, aguas abajo) de uno o más nucleótidos que se modifican catalíticamente por una enzima de ácido nucleico que se dirige al sustrato. Los nucleótidos de pirimidina pueden ser nucleótidos de citosina.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren al uso de sustratos de polinucleótido descritos en el presente documento como sustratos para enzimas de ácido nucleico (por ejemplo, una ADNzima, ribozima o una MNAzima). En ciertas formas de realización, los sustratos se usan como sustratos para MNAzimas. En ciertas formas de realización, los sustratos se usan como sustratos para ADNzimas.

Los aspectos adicionales de la presente divulgación se refieren a métodos para detectar una molécula diana. Los métodos comprenden modificar un sustrato de polinucleótido descrito en el presente documento para proporcionar un efecto detectable. En ciertas formas de realización, los métodos comprenden modificar el sustrato de polinucleótido usando una MNAzima que es capaz de detectar una diana.

Los aspectos adicionales de la presente divulgación se refieren a kits que comprenden uno o más sustratos de polinucleótidos descritos en el presente documento. Los kits pueden comprender una enzima de ácido nucleico capaz de modificar catalíticamente el sustrato o sustratos. En ciertas formas de realización, la enzima de ácido nucleico puede ser una MNAzima.

1. Sustrato o sustratos para enzimas catalíticas de ácido nucleico

La presente descripción proporciona sustratos de polinucleótido para enzimas catalíticas de ácido nucleico. La presente divulgación también proporciona familias de sustratos cuyos miembros tienen mayor capacidad de modificación catalítica por diferentes ácidos nucleicos (por ejemplo, MNAzimas) con las mismas o distintas especificidades diana.

Los sustratos de polinucleótidos comprenden al menos un motivo de secuencia que puede modificarse por una enzima catalítica de ácido nucleico. No existe limitación con respecto al tipo particular de enzima catalítica de ácido nucleico que puede modificar un sustrato de polinucleótido de la presente divulgación. El motivo de la secuencia puede comprender uno cualquiera o más de al menos un nucleótido de ADN, al menos un nucleótido de ARN, al menos un análogo de un nucleótido de ADN, y al menos un análogo de un nucleótido de ARN.

Los ejemplos no limitantes de motivos de secuencia adecuados incluyen los reconocidos y modificados por ADNzimas (por ejemplo, ADNzimas 10-23; ADNzimas 8-17; ADNzima ligasas "7Z81", "7Z48" y "7Q10"; ADNzimas de fotorreversión del dímero de timina "UV1C", ADNzimas de formación de enlaces carbono-carbono "DAB22"; y derivados de los mismos), ribozimas (por ejemplo, ribozimas de cabeza de martillo; ribozimas homodiméricas, ribozimas heterodiméricas; y derivaciones de las mismas), y MNAzimas (véase, por ejemplo, las MNAzimas descritas en las publicaciones de patente PCT número WO/2007/041774, WO/2008/040095 y WO2008/122084, y publicaciones de patente de Estados Unidos número 2007-0231810, 2010-0136536, y 2011-0143338 relacionadas).

Los ejemplos no limitantes de motivos de secuencia adecuados incluyen los que se exponen en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Motivos catalíticos ejemplares

Enzima catalítica	Motivo catalítico del sustrato
ADNzima 8-17	$(N')_x$ **$(rN)_x$G**$(N')_x$
ADNzima 10-23	$(N')_x$ **rRrY** $(N')_x$
N = A, C, T, G o cualquier análogo; N' = cualquier nucleótido complementario con N;$(N)_x$ o $(N')_x$ = cualquier número de nucleótidos; W = A o T; R = A, G o AA; rN = cualquier base de ribonucleótido; $(rN)_x$ = cualquier número de	

ribonucleótidos; rR = ribonucleótidos A o G; rY = ribonucleótidos *C o U; M = A o C; H = A, C o T; D = G, A o T*

Se ha demostrado que los ácidos nucleicos catalíticos toleran solo ciertas modificaciones en el área que forma el núcleo catalítico (Perreault et al., 1990 Nature 344(6266): 565-7.; Perreault et al., 1991 Biochemistry 30(16): 4020-5; Zaborowska et al., 2002 J Biol Chem. 277(43): 240617-22; Cruz et al., 2004 Chem Biol. Jan;11(1): 57-6; Silverman, 2004 Chem Biol. Jan;11(1): 7-8). Los ejemplos de secuencias responsables de la actividad catalítica de las ADNzimas se enumeran en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Secuencias ejemplares para algunas ADNzimas activas y sus sustratos

Tipo de ADNzima	Secuencia de ADNzima	Secuencia de sustrato
8-17	$(N)_x$TNNNAGCNNNWCGR$(N)_x$ SEQ ID NO: 189	$(N')_x$ $(rN)_x$ G $(N')_x$
10-23	$(N)_x$GGMTMGHNDNNNMGD$(N)_x$ SEQ ID NO: 190	$(N')_x$ rR rY $(N')_x$
Para la secuencia de ADNzima N es generalmente A, C, T o G o cualquier análogo, en algunos casos N puede ser U; para la secuencia de sustrato N = A, C, T/U, G o cualquier análogo; N' = cualquier nucleótido complementario con N; $(N)_x$ o $(N')_x$ = cualquier número de nucleótidos; W = A o T, en algunos casos W puede ser U; R = A, G o AA; rN = cualquier base de ribonucleótido; $(rN)_x$ = cualquier número de ribonucleótidos; rR = ribonucleótido A o G; rY = ribonucleótido C o U; M = A o C; H = A, C o T, en algunos casos H puede ser U; D = G, A o T, en algunos casos D puede ser U.		

Los sustratos de polinucleótido pueden comprender múltiples motivos de secuencia. Los motivos pueden ser reconocidos y modificados por un tipo de enzima catalítica de ácido nucleico. Como alternativa, diferentes motivos de secuencia dentro del sustrato pueden ser reconocidos y modificados por diferentes tipos de enzimas catalíticas de ácido nucleico.

Como se ha indicado anteriormente, los sustratos de polinucleótido de la presente divulgación comprenden al menos un motivo de secuencia apto para la modificación por una enzima catalítica de ácido nucleico. En algunas formas de realización, los nucleótidos en la proximidad del motivo de secuencia son nucleótidos de pirimidina. Por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más nucleótidos precedentes y/o posteriores (es decir, los siguientes) al motivo de secuencia pueden ser nucleótidos de pirimidina. Uno cualquiera o más de los nucleótidos de pirimidina pueden ser nucleótidos de citosina.

En otras formas de realización, el motivo de secuencia va precedido y/o seguido directamente (es decir, en secuencia continua) de uno o más nucleótidos de pirimidina. Por ejemplo, el motivo de secuencia puede estar precedido directamente y/o seguido directamente de una secuencia de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más nucleótidos de pirimidina. Uno cualquiera o más de los nucleótidos de pirimidina pueden ser nucleótidos de citosina.

En formas de realización adicionales, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 o más nucleótidos dentro diez nucleótidos 5' (es decir, aguas arriba) y/o dentro de diez nucleótidos 3' (es decir, aguas abajo) del motivo de secuencia son nucleótidos de pirimidina. Uno cualquiera o más de los nucleótidos de pirimidina pueden ser nucleótidos de citosina.

En otras formas de realización adicionales, más de 9, más de 10 o más de 11 nucleótidos del sustrato de polinucleótido pueden ser nucleótidos de citosina. Por ejemplo, el sustrato puede comprender o consistir en 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más de 15 nucleótidos, y 9, 10, 11 o más de 11 de estos nucleótidos pueden ser nucleótidos de citosina.

Adicionalmente o como alternativa, menos de 5, menos de 4, menos de 3 o menos de 2 nucleótidos del sustrato de polinucleótido pueden ser nucleótidos de guanina. Por ejemplo, el sustrato puede comprender o consistir en 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más de 15 nucleótidos, y 4, 3, 2, 1 o ninguno de estos nucleótidos pueden ser nucleótidos de guanina.

No existe ninguna limitación particular con respecto a la longitud de un sustrato de polinucleótido de la presente divulgación. Por ejemplo, el sustrato puede tener menos de 100, 75, 50, 40, 30, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, o 5 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, el sustrato puede tener entre 5 y 30, 10 y 15, 10 y 20, 10 y 25, 10 y 30, 16 y 23, 16 y 21, 16 y 18, 18 y 21, 18 y 23, o 21 y 23 nucleótidos de longitud.

Un sustrato de polinucleótido de la presente divulgación puede diseñarse para que posea una temperatura de fusión específica (Tm) calculada utilizando la regla de Wallace, donde Tm = 2 °C (A+T) + 4 °C (G+C) (véase Wallace et al., (1979) Nucl. Acids Res. 6(11):3543-3558). En ciertas formas de realización, el sustrato puede ser reconocido y

modificado catalíticamente por una MNAzima, y la Tm de las bases que están unidas por el brazo o brazos de sustrato de partzima de la MNAzima puede estar entre aproximadamente 52 °C y aproximadamente 76 °C, entre aproximadamente 55 °C y aproximadamente 75 °C, entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 70 °C, entre aproximadamente 65 °C y aproximadamente 70 °C, entre aproximadamente 64 °C y 68 °C, o entre 64 °C y 70 °C (según lo calculado utilizando la regla de Wallace).

En otras formas de realización, el sustrato puede ser reconocido y modificado catalíticamente por una MNAzima o una ADNzima, y la Tm de las bases que están unidas por el brazo o brazos de sustrato de partzima de la MNAzima puede estar entre 68 °C y 90 °C, entre 66 °C y 76 °C, entre 68 °C y 76 °C, entre 64 °C y 70 °C, entre 70 °C y 76 °C, entre 70 °C y 75 °C, entre 72 °C y 76 °C, 52 °C, 58 °C, 64 °C, 66 °C, 68 °C, 70 °C, 72 °C, o 76 °C.

A modo de ejemplo no limitante, un sustrato de polinucleótido de la presente divulgación puede comprender una secuencia definida en una cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 25-27, 29-30, 72-90, o 172-175. En ciertas formas de realización, el sustrato de polinucleótido puede consistir en una secuencia definida en una o más de las SEQ ID NOs: 25-27, 29-30, 72-90, o 172-175.

En algunas formas de realización, un sustrato de polinucleótido de la presente divulgación puede comprender una secuencia definida por la SEQ ID NO: 28. En otras formas de realización, el sustrato de polinucleótido puede consistir en una secuencia definida por la SEQ ID NO: 28.

En algunas formas de realización, los sustratos de polinucleótidos de la presente divulgación son aptos para la modificación catalítica por una MNAzima que comprende dos partzimas oligonucleotídicas. Las secuencias del sustrato de polinucleótido y las partzimas oligonucleotídicas pueden ser cualquier combinación específica de tres secuencias (como se representa por las SEQ ID NOs) que se muestra en la Tabla 6, 8, 10, 13, 16, 20, 22 y/o 24.

En otras formas de realización, los sustratos de polinucleótido de la presente divulgación son aptos para la modificación catalítica por una ADNzima. Las secuencias del sustrato de polinucleótido y la ADNzima pueden ser cualquier par de secuencias específico (como se muestra en las SEQ ID NOs) que se muestra en la Tabla 15.

Los sustratos de polinucleótido de la presente divulgación pueden contener una o más sustituciones tales como análogos, derivados, bases modificadas o alteradas, ribonucleótidos, alteraciones del esqueleto de azúcar o fosfato, diversas deleciones, inserciones, sustituciones, duplicaciones u otras modificaciones, o cualquier combinación de estos, bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los ejemplos no limitantes de adiciones o sustituciones incluyen LNA fosforamidita, 4-acetilcitidina, 5-(carboxihidroxilmetil)uridina, 2'-O-metilcitidina, 5-carboximetilaminometil tiouridina, dihidrouridina, 2'-O-metilpseudouridina, beta D-galactosilqueosina, 2'-O-metilguanosina, inosina, N6-isopenteniladenosina, 1-metiladenosina, 1-metilpseudouridina, 1-metilguanosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosina, 2-metiladenosina, 2-metilguanosina, 3-metilcitidina, 5-metilcitidina, N6-metiladenosina, 7-metilguanosina, 5-metilaminometiluridina, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, beta D-manosilmetiluridina, 5-metoxicarbonilmetiluridina, 5-metoxiuridina, 2-metiltio-N6-isopenteniladenosina, N-((9-beta-ribofuranosil-2-metiltiopurina-6-il)carbamoil)treonina, N-((9-beta-ribofuranosilpurina-6-il)N-metilcarbamoil)treonina, éster metílico del ácido uridina-5-oxiacético, ácido uridina-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouridina, queosina, 2-tiocitidina, 5-metil-2-tiouridina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, 5-metiluridina, N-((9-beta-D-ribofuranosilpurina-6-il)carbamoil)treonina, 2'-O-metil-5-metiluridina, 2'-O-metiluridina, wibutosina, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina, beta D-arabinosil uridina, y beta D-arabinosil timidina.

Los ejemplos no limitantes de derivados incluyen ácidos nucleicos o nucleótidos funcionalmente equivalentes, incluyendo cualquier molécula de fusión producida integralmente (por ejemplo, por medios recombinantes) o post-síntesis añadida (por ejemplo, por medios químicos). Dichas fusiones pueden comprender oligonucleótidos de la divulgación con ARN o ADN añadido a los mismos o conjugados con un polipéptido (por ejemplo, puromicina u otro polipéptido), una molécula pequeña (por ejemplo, psoraleno), un microvehículo o nanovehículo, o un anticuerpo.

Los ejemplos no limitantes de análogos incluyen compuestos que tienen una estructura física que está relacionada con una molécula o residuo de ADN o ARN, y pueden ser capaces de formar un enlace de hidrógeno con un residuo de ADN o ARN o un análogo del mismo (es decir, es capaz de hibridar con un residuo de ADN o ARN o un análogo del mismo para formar un par de bases), pero dicho enlace no es tan necesario para que dicho compuesto se incluya dentro del término "análogo". Dichos análogos pueden poseer diferentes propiedades químicas y biológicas al residuo de ribonucleótido o desoxirribonucleótido con el que están relacionados estructuralmente. Los residuos metilados, yodados, bromados o biotinilados son ejemplos de análogos. Se han descrito ADNzimas activas que

contienen análogos de nucleótidos, incluyendo desoxiinosina, C-5-imidazol desoxiuridina, 3-(aminopropinil)-7-deaza-dATP, 2'-O-metil ARN, caperuza de 2' O-metilo. Otros análogos también podrían ser compatibles con la actividad catalítica de ADNzimas y MNAzimas. La alteración de un ácido nucleico con actividad catalítica, por ejemplo, por sustitución de una base por otra, por sustitución de un análogo por una base, o alteración del componente de azúcar o esqueleto de fosfodiéster, pueden ser sencillas para el experto en la técnica. Por ejemplo, las alteraciones pueden hacerse durante la síntesis, o por modificación de bases específicas después de la síntesis. El ensayo empírico de los ácidos nucleicos catalíticos que incorporan alteraciones tales como cambios de bases o análogos de bases permite la evaluación del impacto de las secuencias alteradas, o análogos específicos, en la actividad catalítica. Los análogos de las bases A, C, G, T y U son conocidos en la técnica, y un subconjunto se enumera en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Análogos nucleotídicos ejemplares

Abreviatura	Nombre
ac4c	4-acetilcitidina
chm5u	5-(carboxihidroxilmetil)uridina
Cm	2'-O-metilcitidina
Cmnm5s2u	5-carboximetilaminometil tiouridina
D	Dihidrouridina
Fm	2'-O-metilpseudouridina
Galq	beta, D-galactosilqueosina
Gm	2'-O-metilguanosina
I	Inosina
i6a	N6-isopenteniladenosina
m1a	1-metiladenosina
m1f	1-metilpseudouridina
m1g	1-metilguanosina
Ml1	1-metilinosina
m22g	2,2-dimetilguanosina
m2a	2-metiladenosina
m2g	2-metilguanosina
m3c	3-metilcitidina
m5c	5-metilcitidina
m6a	N6-metiladenosina
m7g	7-metilguanosina
mam5u	5-metilaminometiluridina
mam5s2u	5-metoxiaminometil-2-tiouridina
Manq	beta, D-manosilmetiluridina
mcm5s2u	5-metoxicarbonilmetiluridina
Mo5u	5-metoxiuridina
Ms2i6a	2-metiltio-N6-isopenteniladenosina
Ms2t6a	N-((9-beta-ribofuranosil-2-metiltiopurina-6-il)carbamoil)treonina
Mt6a	N-((9-beta-ribofuranosilpurina-6-il)N-metil-carbamoil)treonina
Mv	Éster metílico del ácido uridina-5-oxiacético
o5u	Ácido uridina-5-oxiacético (v)
Osyw	Wibutoxosina
P	Pseudouridina
Q	Queosina
s2c	2-tiocitidina
s2t	5-metil-2-tiouridina
s2u	2-tiouridina
s4u	4-tiouridina
T	5-metiluridina
t6a	N-((9-beta-D-ribofuranosilpurina-6-il)carbamoil) treonina
Tm	2'-O-metil-5-metiluridina
Um	2'-O-metiluridina
Yw	Wibutosina
X	3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina, (acp3)u

AraU	beta D-arabinosiluridina
AraT	beta D-arabinosiltimidina

Los sustratos de polinucleótido de la presente divulgación pueden incorporar entidades adicionales tales como ácidos nucleicos marcados, nanopartículas, micropartículas, proteínas, anticuerpos, ARN, ADN, análogos de ácidos nucleicos, proteínas, glucoproteínas, lipoproteínas, ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos bloqueados, quimeras de péptido-ácido nucleico, o cualquier combinación de los mismos. Las nanopartículas pueden ser nanopartículas de oro.

Los sustratos de polinucleótido de la presente divulgación pueden modificarse catalíticamente por una enzima catalítica de ácido nucleico. Los ejemplos no limitantes de modificaciones catalíticas potenciales incluyen la escisión de ácidos nucleicos, la ligación de ácidos nucleicos, la fosforilación de ácidos nucleicos, la protección terminal de ácidos nucleicos, la adenilación de aminoácidos, la síntesis de cofactor, la polimerización de ARN, la polimerización dirigida por plantilla, la conjugación de ARN-proteína, la reacción de aldol, la oxidación de alcohol, la reducción de aldehído, la síntesis de nucleótidos de purina y pirimidina, la alquilación, la síntesis de amida, la síntesis de urea, la formación de enlaces peptídicos, la síntesis de peptidilo-ARN, la transferencia de acilo, aminoacilación, la hidrólisis de carbonato, la alquilación de fosforotioato, la metilación de porfirina, la formación de enlaces carbono-carbono, la formación de nanopartículas de Pd, la isomerización de bifenilo, la formación de enlaces éster, la formación de enlaces amida, la desglucosilación de ADN, la fotorreversión del dímero de timina y la escisión de fosforamidato.

En ciertas aplicaciones, puede ser deseable detectar el producto o productos que surgen de la modificación catalítica de los sustratos de polinucleótidos de la presente divulgación. Esto se puede lograr utilizando cualquier número de técnicas estándar conocidas en la técnica.

Por ejemplo, el sustrato puede comprender una porción detectable y una porción de inactivador, en donde tras la modificación de dicho sustrato por un ácido nucleico catalítico, se aumenta o se disminuye un efecto detectable proporcionado por dicha porción detectable. El efecto detectable puede detectarse por espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de giro electrónico, espectroscopía por polarización de fluorescencia, dicroísmo circular, inmunoensayo, cromatografía, radiometría, electroquímica, fotometría, escintigrafía, métodos electrónicos, espectroscopía de UV, luz visible o infrarrojos, métodos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos.

Adicional o como alternativa, el producto o productos que surgen de la modificación catalítica de los sustratos de polinucleótidos de la presente divulgación pueden detectarse en base al tamaño (por ejemplo, mediante electroforesis estándar), secuenciación de ácido nucleico, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, quimioluminiscencia, potenciometría, espectrometría de masas, resonancia de plasmón, colorimetría, polarimetría, citometría de flujo, escanometría y secuenciación de ADN o cualquier combinación de los mismos.

El producto o productos de ácido nucleico que surgen de la modificación catalítica de los sustratos de polinucleótido de la presente divulgación pueden amplificarse para ayudar a la detección usando técnicas tales como, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los sustratos de polinucleótidos de la presente divulgación pueden reconocerse y modificarse por enzimas catalíticas de ácido nucleico (por ejemplo, MNAzimas) diseñadas para detectar una diana que difiere del sustrato a modificar por la enzima. Por consiguiente, los sustratos de polinucleótido de la presente divulgación pueden ser sustratos "genéricos" o "universales" que son reconocidos y actúan de forma catalítica por una pluralidad de enzimas catalíticas de ácido nucleico (por ejemplo, una pluralidad de MNAzimas), cada una de las cuales puede reconocer una diana diferente. El uso de dichos sustratos puede facilitar el desarrollo de ensayos separados para la detección, identificación o cuantificación de una amplia diversidad de dianas usando enzimas nucleicas catalíticas que reconocen un sustrato universal. Los sustratos universales pueden etiquetarse independientemente cada uno con una o más etiquetas. En ciertas formas de realización, se pueden usar etiquetas detectables independientemente para marcar uno o más sustratos universales para permitir la detección independiente o simultánea de una diversidad de dianas usando MNAzimas. Por ejemplo, se puede usar una serie de sustratos universales en una reacción múltiplex que permita la detección simultánea de múltiples dianas.

Los sustratos de polinucleótido de la presente divulgación pueden proporcionarse unidos, fijados o ligados a un soporte insoluble o sólido para su uso en diversas aplicaciones (por ejemplo, cascadas enzimáticas o cualquier otra cascada de transducción de señal). El soporte puede ser un material insoluble, o una matriz que retiene el sustrato y lo excluye de moverse libremente en la mayor parte de la mezcla de reacción. Dichos soportes se conocen en la

técnica para inmovilizar o localizar sustratos, incluidas las dianas de ácido nucleico. El experto en la técnica apreciará que el soporte puede seleccionarse de una amplia diversidad de matrices, polímeros y similares en una diversidad de formas, incluyendo perlas convenientes para su uso en microensayos, así como otros materiales compatibles con las condiciones de reacción. En ciertas formas de realización preferidas, el soporte puede ser un material plástico, tal como perlas u obleas de plástico, o el de un pozo o tubo en el que se realiza un ensayo particular. En ciertas formas de realización, el soporte puede ser un microvehículo o un nanovehículo. La unión del sustrato al soporte puede diseñarse de manera que tras la modificación (por ejemplo, escisión) del sustrato por el ácido nucleico catalítico (por ejemplo, MNAzima), una porción del sustrato modificado permanezca unida al soporte, mientras que la otra se libera para pasar a la mayor parte de la mezcla de reacción, lejos de la porción que queda unida.

2. Métodos ejemplares

Los sustratos de polinucleótido de la presente divulgación pueden usarse en cualquier número de aplicaciones potenciales utilizando ácidos nucleicos catalíticos que reconocen/modifican los sustratos.

Por ejemplo, los sustratos se pueden usar en aplicaciones que implican ADNzimas (por ejemplo, ADNzimas 10-23; ADNzimas 8-17; ADNzimas ligasas "7Z81", "7Z48" y "7Q10"; ADNzimas de fotorreversión de dímero de timina "UV1C", ADNzimas de formación de enlaces carbono-carbono "DAB22"; y derivaciones de las mismas), ribozimas (por ejemplo, ribozimas de cabeza de martillo; ribozimas homodiméricas, ribozimas heterodiméricas; y derivaciones de las mismas), y/o MNAzimas,
En ciertas formas de realización de la divulgación, los sustratos se pueden usar como sustratos para MNAzimas. Las características de las MNAzimas y diversas aplicaciones que utilizan MNAzimas se describen en detalle en las publicaciones de patente PCT número WO/2007/041774, WO/2008/040095 y WO2008/122084, y las publicaciones de patente de Estados Unidos números 2007-0231810, 2010-0136536, y 2011-014333 8 relacionadas. Las MNAzimas son capaces de autoensamblarse a partir de dos o más componentes de oligonucleótidos, también denominados en el presente documento partzimas. Los oligonucleótidos de partzima se autoensamblan en presencia de un facilitador del autoensamblaje de MNAzimas para formar una MNAzima. Las MNAzimas son, por lo tanto, enzimas catalíticamente activas de ácido nucleico. En algunas formas de realización, la presencia de una MNAzima puede detectarse, y es indicativa de la presencia de una diana, porque la MNAzima se forma solo en presencia de la diana, en donde la diana comprende el facilitador del ensamblaje.

En formas de realización preferidas, las estructuras de la MNAzima se basan en una o más ADNzimas y/o ribozimas. Más preferidas son las estructuras de MNAzima que se basan en una estructura de ADNzima particular. Las estructuras actualmente preferidas se basan en ADNzimas, incluyendo las ADNzimas 10-23 y 8-17. En diversas formas de realización, las MNAzimas comprenden cualquiera o tanto bases de ribonucleótidos como bases de desoxirribonucleótidos. En formas de realización más preferidas, una estructura de MNAzima se basa, al menos en parte, en la estructura de una ADNzima. En otras formas de realización preferidas, las MNAzimas comprenden al menos algunas bases de desoxirribonucleótidos o análogos de las mismas. En formas de realización más preferidas, el núcleo catalítico de una MNAzima comprende una o más bases de desoxirribonucleótidos o análogos de las mismas. En formas de realización aún más preferidas, una o más bases de desoxirribonucleótidos o análogos de las mismas están implicadas en la catálisis de un sustrato. En otras formas de realización, al menos una base de desoxirribonucleótido, o su análogo, en el núcleo catalítico mejora la actividad catalítica. En aún otras formas de realización, existe un requisito estricto de que al menos una base de desoxirribonucleótido, o su análogo, en el núcleo catalítico de la MNAzima para que la catálisis se produzca a una velocidad mensurable, en relación con la de una MNAzima comparable sin la base de desoxirribonucleótido presente.

Las MNAzimas pueden contener una o más sustituciones tales como análogos, derivados, bases modificadas o alteradas, ribonucleótidos, alteraciones del esqueleto de azúcar o fosfato, diversas deleciones, inserciones, sustituciones, duplicaciones u otras modificaciones, o cualquier combinación de estos, bien conocidos por los expertos en la técnica. Dichas modificaciones, sustituciones, eliminaciones, inserciones, etc. pueden realizarse en los brazos sensor y/o de sustrato y/o en las porciones del núcleo catalítico, de manera que la molécula conserve la actividad catalítica. Las sustituciones y modificaciones de los brazos que se unen al sustrato o al facilitador del ensamblaje pueden tolerarse bien y, de hecho, son la base para permitir la adaptación de las moléculas a diferentes sustratos/facilitadores del ensamblaje. Por ejemplo, la modificación de los brazos sensores permitirá la adaptación a diferentes facilitadores de ensamblaje, mientras que la modificación de los brazos de sustrato permitirá la adaptación a diferentes sustratos.

La MNAzima puede comprender desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o incluso ambos. Se prefieren las

MNAzimas que comprenden al menos uno y más preferiblemente, todos los oligonucleótidos de componentes desoxirribonucleótidos. También se prefieren las MNAzimas que comprenden al menos una base de desoxirribonucleótido, o su análogo, dentro del núcleo catalítico de la MNAzima. Incluso más preferidas son aquellas formas de realización en las que se requiere una base de este tipo para la actividad catalítica.

El ensamblaje y desensamblaje de MNAzimas también se puede controlar cambiando el microentorno. Los ejemplos de dichos cambios incluyen, pero sin limitación, temperatura, tipo y concentración de cationes divalentes, concentración de sal, pH, aditivos, y la presencia o ausencia de componentes críticos esenciales para el ensamblaje y/o actividad de una MNAzima activa. Por consiguiente, se puede evitar que las MNAzimas desensambladas o parcialmente ensambladas se monten en una MNAzima catalíticamente activa en presencia de un facilitador del ensamblaje mediante la modulación del microambiente, proporcionando de este modo un "interruptor molecular".

Un ejemplo básico de una estructura de MNAzima se representa en la **Figura 1**. La estructura mostrada comprende la partzima A y la partzima B, cuyos brazos sensores (i) están emparejados por bases con una molécula facilitadora del ensamblaje de MNAzima, por ejemplo, un ADN o ARN diana. Las partzimas A y B al interactuar con el facilitador del ensamblaje han permitido que los núcleos catalíticos parciales (iii) se acerquen y formen de este modo un solo núcleo catalítico. Los brazos de sustrato (ii) de la MNAzima han interactuado y se han emparejados en bases con un sustrato, representado aquí como un Sustrato indicador. Por lo tanto, la MNAzima se autoensambla y este proceso se facilita a través de la presencia de la molécula facilitadora del ensamblaje de MNAzimas. En ausencia de facilitador del ensamblaje, no se formará MNAzima. La modificación (en este caso, la escisión) de un sustrato de polinucleótido de la presente divulgación se cataliza por el núcleo catalítico de la MNAzima en el sitio de modificación de MNAzima (por ejemplo, el sitio de escisión dentro del sustrato indicado por una cruz (X)). El sustrato de polinucleótido en esta forma de realización particular comprende una porción detectable que tiene una señal detectable, por ejemplo, fluoróforo F, y una porción de inactivador Q que tiene un efecto de inactivación sobre la señal detectable F a través de la acción del inactivador Q. Después de la escisión en el sitio de escisión de MNAzima, hay un aumento sustancial en la señal detectable, aquí la fluorescencia, que puede detectarse y cuantificarse fácilmente si así se desea.

Se puede entender además que la **Figura 1** representa un ejemplo de un método básico de uso de MNAzimas para detectar una diana, que en algunas formas de realización comprende un facilitador del ensamblaje. Más específicamente, la partzima A y la partzima B se muestran en la **Figura 1**, comprendiendo cada una, una porción de brazo de sustrato (ii), una porción de núcleo catalítico (iii) y una porción de brazo sensor (i). En presencia de una diana, las porciones de brazo sensor de la partzima A y la partzima B pueden comenzar a hibridar, y emparejarse en bases con porciones complementarias, de la diana, por ejemplo, una secuencia de ADN o ARN. Tras entrar en contacto con la diana de esta manera, la MNAzima se autoensambla formando un núcleo catalítico que puede modificar un sustrato que está unido por los brazos de sustrato. Preferiblemente, la presencia de la MNAzima se detecta a través de la detección o medición de su actividad catalítica. Los brazos de sustrato de la MNAzima ensamblada de este modo pueden acoplarse con un sustrato de polinucleótido de la presente divulgación a través de la interacción de las secuencias complementarias en los brazos de sustrato y el sustrato. Una vez que el sustrato está acoplado de este modo con los brazos de sustrato, el núcleo catalítico puede promover la modificación (por ejemplo, escisión) del sustrato, que a su vez se puede medir o detectar, directa o indirectamente.

El experto en la técnica apreciará fácilmente que los métodos descritos en el presente documento pueden implicar la amplificación de una diana antes, durante o después de la actividad catalítica de la MNAzima. Dicha amplificación de la diana encuentra una aplicación particular en las formas de realización de la presente divulgación donde la cantidad de diana que se busca detectar, identificar o cuantificar es de tal cuantía para proporcionar una señal que, de otro modo, podría no ser detectable. Dicha amplificación puede comprender uno o más de: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación mediada por transcripción (TMA), replicación de secuencia autosostenida (3SR), amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA), o reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).

La **Figura 2** proporciona aplicaciones ejemplares de métodos para la detección de dianas usando MNAzimas. La Estrategia 1 ilustra las MNAzimas adaptadas para la detección de dianas, incluyendo ADN, ARN y proteínas. Como se ha descrito anteriormente (véase la descripción de la **Figura 1**), una MNAzima compuesta por dos oligonucleótidos separados con secuencias de reconocimiento para una diana y un sustrato se forma cuando los oligonucleótidos reconocen y se unen a una diana. El sustrato, por ejemplo, el sustrato indicador, se modifica por la acción catalítica de la MNAzima y provoca la generación de una señal detectable, ya sea directamente (Estrategia 1), durante o después de la amplificación de la diana (Estrategia 2) o mediante una cascada de señales (Estrategia

3). En algunas formas de realización, tanto la amplificación de dianas como la amplificación de señales se producen de forma simultánea o secuencial.

La Estrategia 2 de la **Figura 2** ilustra el uso de una MNAzima adaptada para controlar la acumulación de amplicones durante, o después de, la amplificación *in vitro* de dianas de ácido nucleico. Las técnicas para la amplificación *in vitro* de secuencias de ácido nucleico se conocen en la técnica. Estas incluyen técnicas mediadas por una ADN polimerasa, tal como la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") (véanse, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 4.683.202; Patente de Estados Unidos N.º 4.683.195; Patente de Estados Unidos N.º 4.800.159; Patente de Estados Unidos N.º 4.965.188; Patente de Estados Unidos N.º 5.176.995), amplificación de desplazamiento de cadena ("SDA"), amplificación por círculo rodante ("RCA"), reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) y amplificación isotérmica mediada por bucle ("LAMP"). Otras técnicas de amplificación de diana están mediadas por una ARN polimerasa, por ejemplo, amplificación mediada por transcripción ("TMA"), replicación de secuencia autosostenida ("3SR") y amplificación basada en la replicación de secuencias de ácido nucleico ("NASBA"). Los productos de amplificación ("amplicones") producidos por PCR, RT-PCR, SDA, RCA y LAMP están compuestos por ADN, mientras que los amplicones de ARN son producidos por TMA, 3SR y NASBA.

Con referencia adicional a la estrategia 2 de la **Figura 2**, se puede usar una MNAzima que reconoce y modifica un sustrato de polinucleótido de la presente divulgación junto con métodos de amplificación de diana que incluyen, por ejemplo, PCR, RT-PCR, SDA, RCA, LAMP, TMA, 3SR y NASBA mencionados anteriormente. La acumulación de amplicones producidos por PCR utilizando relaciones de cebadores asimétricas o simétricas se puede controlar usando MNAzimas. Los ejemplos 1, 2, 4, 6, 8 y 9 de la presente memoria descriptiva demuestran la detección de amplicones de PCR en tiempo real utilizando MNAzimas que modifican catalíticamente diversos sustratos de polinucleótidos de la presente divulgación.

De nuevo, refiriéndose a la estrategia 2 de la **Figura 2**, un ácido nucleico diana puede amplificarse de acuerdo con un procedimiento para amplificar ese ácido nucleico (es decir, ADN o ARN). Preferiblemente, se usan métodos estándar de amplificación *in vitro*. Los amplicones generados durante la amplificación pueden servir como facilitadores del ensamblaje de diana para una MNAzima. La actividad de la MNAzima, que se hace detectable por la modificación de un sustrato de polinucleótido de la presente divulgación por la MNAzima, es indicativa de la presencia de la diana. El experto en la técnica apreciará que los ensayos de esta naturaleza pueden realizarse en un solo recipiente en condiciones que permitan tanto la amplificación del ácido nucleico diana como el ensamblaje de MNAzimas y la actividad catalítica. Adicional o como alternativa, se pueden realizar después de, o en puntos de tiempo a lo largo de la amplificación del ácido nucleico diana, mediante la eliminación de muestras al final o durante el transcurso de las reacciones de amplificación.

La estrategia 3 de la **Figura 2** muestra una descripción general de un método para usar una MNAzima para iniciar la amplificación de una señal mediante el uso de una cascada de señal. El Ejemplo 3 de la presente memoria descriptiva demuestra la detección directa isotérmica de una diana utilizando MNAzimas que modifican catalíticamente diversos sustratos de polinucleótidos de la presente divulgación, que podrían usarse para iniciar una cascada de señales.

El experto en la técnica apreciará que los métodos o protocolos que combinan la amplificación de diana con la actividad catalítica del ácido nucleico pueden requerir condiciones de reacción específicas (por ejemplo, las descritos en los Ejemplos 1, 2, 4, 6, 8 y 9 de la presente memoria descriptiva). Preferiblemente, las condiciones de reacción son compatibles tanto con la actividad de la polimerasa (para amplificación), como con la modificación catalítica del ácido nucleico de un sustrato (para detección). Los protocolos para determinar las condiciones para la actividad catalítica concurrente y la actividad de la polimerasa a alta temperatura, tal como durante la PCR, se han descrito para las ADNzimas. La influencia de factores que incluyen la longitud del brazo de ADNzima, el tampón, la temperatura, la concentración de iones divalentes y los efectos de los aditivos se conocen en la técnica. Las enzimas de ADN son adecuadas para su uso en combinación con estrategias de amplificación *in vitro*. Por ejemplo, no se desnaturalizan irreversiblemente por la exposición a altas temperaturas durante la amplificación.

En ciertas formas de realización, un sustrato de polinucleótido de la presente divulgación apto para el reconocimiento y modificación por una MNAzima puede unirse, fijarse o ligarse a un soporte insoluble o sólido. Por ejemplo, con referencia a la **Figura 3**, Panel **(i)**, se describe un método ejemplar para detectar dianas usando una MNAzima y un sustrato de polinucleótido de la presente divulgación anclado a un soporte. En esta forma de realización, el sustrato es preferiblemente un sustrato con una porción detectable que comprende una señal detectable, por ejemplo, un fluoróforo, y una porción de inactivador que disminuye o elimina la señal detectable mientras que la porción detectable y la porción de inactivador del sustrato permanecen en proximidad cercana, por

ejemplo, hasta que se modifique el sustrato (por ejemplo, por escisión). El sustrato está unido a un soporte. Preferiblemente, el soporte es un material insoluble, o una matriz que retiene el sustrato y lo excluye de moverse libremente en la mayor parte de la mezcla de reacción. La unión del sustrato al soporte puede diseñarse de tal manera que, tras la modificación (por ejemplo, por escisión) del sustrato por la MNAzima, cualquiera de la porción detectable o la porción de inactivador, pero no ambas, permanezca unida al soporte, mientras que la otra sea libre de moverse en la mayor parte de la mezcla de reacción, lejos de la porción que queda unida. Por lo tanto, en un ejemplo de escisión, la señal detectable aumenta enormemente a medida que la porción de inactivador y la porción detectable se separan tras la escisión. En la forma de realización mostrada en la **Figura 3**, Panel **(i)**, la porción detectable que contiene fluoróforo permanece unida después de la escisión. Esto tiene la ventaja de permitir la localización de la señal en el soporte, pero en ciertos casos, el fluoróforo o los fluoróforos pueden liberarse en la solución. En una forma de realización adicional en la que, por ejemplo, se produce la ligación, el inactivador puede ligarse a un fluoróforo, disminuyendo de este modo la señal detectable.

En ciertas formas de realización, múltiples sustratos universales pueden ligarse a un soporte sólido en diferentes posiciones para proporcionar una matriz de sustrato. Con referencia a la **Figura 3** Panel **(ii)**, dos sustratos pueden unirse en las posiciones definidas sobre una superficie sólida. Cada sustrato universal puede escindirse solo por una MNAzima formada en presencia de una molécula facilitadora del ensamblaje de MNAzima específica (por ejemplo, diana 1 o diana 2) y la señal puede localizarse colocando el sustrato sobre la superficie (posición 1 o posición 2), permitiendo así la detección específica de diferentes facilitadores del ensamblaje. En dichas formas de realización, los sustratos universales ligados pueden estar todos etiquetados con el mismo fluoróforo. En otras formas de realización, los sustratos universales ligados pueden marcarse con diferentes fluoróforos. La estrategia representada en la **Figura 3(ii)** se puede ampliar para crear matrices de sustratos universales con muchos sustratos universales diferentes unidos en posiciones definidas sobre una superficie sólida. En tales formas de realización, aumentar el número de sustratos universales que están disponibles para su uso en matrices puede proporcionar una ventaja al permitir la creación de matrices más complejas. Dichas matrices universales de sustratos universales pueden tener utilidad para su uso en el análisis altamente multiplexado de analitos diana. La presente descripción proporciona sustratos universales adicionales con características que pueden aumentar la función de la actividad catalítica que puede ser útil para mejorar la capacidad de realizar un análisis cada vez más complejo utilizando MNAzimas.

En ciertas formas de realización, un sustrato de polinucleótido de la presente divulgación puede ser reconocido y modificado por una MNAzima para proporcionar un facilitador del ensamblaje, componente facilitador del ensamblaje, o partzima para una segunda MNAzima diferente.

Con referencia a la **Figura 4**, se puede formar una MNAzima iniciadora (Mt) en presencia de una diana (T). La MNAzima iniciadora (Mt) escinde un (primer) sustrato de polinucleótido de la presente divulgación (S1) para crear un primer componente facilitador del ensamblaje (S1f), que dirige la formación de una primera MNAzima en cascada (MNAzima en cascada Mc1). En este ejemplo, la primera MNAzima en cascada (Mc1) comprende dos partzimas y tres componentes facilitadores del ensamblaje designados F1, F2 y S1f. Mc1 puede escindir un sustrato adicional (S2), liberando de este modo un componente facilitador del ensamblaje adicional (S2f), que dirige la formación de una segunda MNAzima en cascada (MNAzima en cascada Mc2). En este ejemplo, la segunda MNAzima en cascada (Mc2) comprende dos partzimas y tres componentes facilitadores del ensamblaje designados F3, F4 y S2f. Mc2 puede escindir entonces más del primer sustrato (S1), creando de este modo más del primer componente facilitador del ensamblaje (S1f). Esto conduce a la formación de una primera MNAzima en cascada (Mc1) adicional, formando de este modo una cascada de amplificación. El experto en la técnica reconocerá que la **Figura 4** muestra que se requieren tres componentes facilitadores del ensamblaje para facilitar el ensamblaje de MNAzima activa. Se podrían utilizar más o menos componentes facilitadores del ensamblaje en un esquema similar.

El experto en la materia entenderá fácilmente que los métodos descritos en el presente documento pueden optimizarse usando una diversidad de parámetros experimentales para optimizar la detección, identificación y/o cuantificación de una diana, y/o el reconocimiento y modificación catalítica de un sustrato de polinucleótido de la presente divulgación por un ácido nucleico catalítico (por ejemplo, una MNAzima o una ADNzima). Los parámetros experimentales particulares que se optimizan, y el nivel de dicha optimización dependerán del método particular que se emplee y la diana y/o sustrato particular implicado. Dichos parámetros incluyen, pero sin limitación, tiempo, temperatura, concentración de sales, detergentes, cationes y otros reactivos, incluyendo, pero sin limitación, dimetilsulfóxido (DMSO), y longitud, complementariedad, contenido de GC y punto de fusión (Tm) de ácidos nucleicos.

En algunas formas de realización, por ejemplo, los métodos que implican la detección de la variación de secuencia y/o la detección de ADN metilado, los parámetros experimentales, e incluyendo preferiblemente la temperatura a la

que se realiza el método, pueden optimizarse para discriminar entre la unión de un ácido nucleico componente de MNAzima a un ácido nucleico diana que comprende o no una variación de secuencia o un nucleótido metilado, respectivamente. La temperatura a la que se pueden realizar dichos métodos puede estar en el intervalo de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 96 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 75 °C, de 20 °C a aproximadamente 60 °C o de aproximadamente 20 a aproximadamente 55 °C.

En algunas formas de realización, las reacciones optimizadas para poner en práctica los métodos de uso de MNAzimas y ADNzimas se proporcionan en el presente documento. En dichas reacciones optimizadas, la actividad catalítica se aumenta hasta en un 10, 20 o un 30% por encima de las reacciones no optimizadas. Las condiciones de reacción más preferidas mejoran la actividad catalítica en al menos un 35%, o un 40%, y preferiblemente hasta un 50% o más. En formas de realización aún más preferidas, las reacciones optimizadas tienen un aumento de la actividad catalítica de más del 50%, y hasta el 66%, 75% o incluso el 100%. En formas de realización aún más preferidas, un método de reacción completamente optimizado ofrecerá 100, 200 o incluso el 300% o más de aumento en la actividad catalítica. Otras condiciones de reacción preferidas pueden mejorar la actividad catalítica hasta en un 1.000% o más en los métodos practicados con condiciones de reacción no optimizadas. Una condición de reacción muy preferida para optimizar los métodos proporcionados en el presente documento es la inclusión de ciertos cationes divalentes. La actividad catalítica de la mayoría de las enzimas de ácido nucleico puede verse influida de forma dependiente de la concentración por la concentración de cationes divalentes. Las reacciones optimizadas preferidas se optimizan para uno o más de Ba^{2+} , Sr^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, y Pb^{2+}.

En algunas formas de realización, el uso de sustratos de polinucleótido de la presente divulgación en ensayos con enzimas de ácido nucleico (por ejemplo, MNAzimas o ADNzimas) puede aumentar un efecto detectable (por ejemplo, un aumento o disminución en la señal fluorescente) que surja de la modificación catalítica del sustrato por la enzima por encima del efecto detectable ganado usando un sustrato conocido en el mismo ensayo en las mismas condiciones. Por ejemplo, el efecto detectable puede aumentarse en más del 2%, más del 3%, más del 4%, más del 5%, más del 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, o más del 50% en comparación con el sustrato conocido. En ciertas formas de realización, el efecto detectable es una señal fluorescente.

En algunas formas de realización, los métodos de la divulgación implican el uso de un sustrato de polinucleótido para una MNAzima junto con una MNAzima que comprende dos partzimas oligonucleotídicas. Las secuencias del sustrato de polinucleótido y las partzimas oligonucleotídicas pueden ser cualquier combinación específica de tres secuencias (como se representa por las SEQ ID NOs) que se muestra en la Tabla 6, 8, 10, 13, 16, 20, 22 y/o 24.

En algunas formas de realización, los métodos de la divulgación implican el uso de un sustrato de polinucleótido en combinación con una ADNzima. Las secuencias del sustrato de polinucleótido y la ADNzima pueden ser cualquier par de secuencias específico (como se muestra en las SEQ ID NOs) que se muestra en la Tabla 15.

3. Kits

En el presente documento también se proporcionan kits que comprenden uno o más sustratos de polinucleótidos de la presente divulgación.

Los kits pueden comprender reactivos adicionales para poner en práctica los métodos divulgados en el presente documento. Por ejemplo, los kits pueden comprender uno o más ácidos nucleicos catalíticos capaces de reconocer y modificar el sustrato. Los ejemplos no limitantes de ácidos nucleicos catalíticos adecuados incluyen ADNzimas (por ejemplo, ADNzimas 10-23; ADNzimas 8-17; ADNzimas ligasas "7Z81", "7Z48" y "7Q10"; ADNzimas de fotorreversión de dímero de timina "UV1C", ADNzimas de formación de enlaces carbono-carbono "DAB22"; y derivaciones de las mismas), ribozimas (por ejemplo, ribozimas de cabeza de martillo; ribozimas homodiméricas, ribozimas heterodiméricas; y derivaciones de las mismas), y MNAzimas.

Los kits de la presente divulgación pueden ser kits "compartimentados". Un kit compartimentado incluye cualquier kit en el que los reactivos se proporcionan en recipientes separados tales como, por ejemplo, pequeños recipientes de vidrio, recipientes de plástico o tiras de plástico o papel. Dichos recipientes pueden permitir la transferencia eficiente de reactivos de un compartimento a otro mientras se evita la contaminación cruzada de las muestras y reactivos, y/o permitir la adición de agentes o soluciones de cada recipiente de un compartimento a otro de forma cuantitativa. Dichos kits también pueden incluir un recipiente que aceptará una muestra a ensayar, un recipiente que contiene reactivos a usar en el ensayo, recipientes que contienen reactivos de lavado, y recipientes que contienen un reactivo de detección.

En ciertas formas de realización, los kits comprenden uno o más sustratos de polinucleótidos de la presente divulgación y una pluralidad de partzimas oligonucleotídicas diseñadas para ensamblar una MNAzima capaz de reconocer y modificar catalíticamente el sustrato de polinucleótido en presencia de una diana. La diana puede actuar como un facilitador del ensamblaje que causa el ensamblaje de las partzimas oligonucleotídicas en una MNAzima catalíticamente activa capaz de reconocer y modificar el sustrato de polinucleótido.

En algunas formas de realización, los kits comprenden un sustrato de polinucleótido de la presente divulgación y una MNAzima que comprende dos partzimas oligonucleotídicas. Las secuencias del sustrato de polinucleótido y las partzimas oligonucleotídicas pueden ser cualquier combinación específica de tres secuencias (como se representa por las SEQ ID NOs) que se muestra en la Tabla 6, 8, 10, 13, 16, 20, 22 y/o 24.

En otras formas de realización, los kits comprenden un sustrato de polinucleótido de la presente divulgación y una ADNzima. Las secuencias del sustrato de polinucleótido y la ADNzima pueden ser cualquier par de secuencias específico (como se muestra en las SEQ ID NOs) que se muestra en la Tabla 15.

Las partzimas de oligonucleótidos individuales pueden estar presentes en el mismo recipiente. Como alternativa, una o más partzimas oligonucleotídicas individuales pueden estar presentes en recipientes separados. Se entenderá que no todos los componentes para todas las MNAzimas que se pretenden usar en un método dado necesariamente deben proporcionarse en un kit, ya que dicho componente o componentes pueden generarse como parte de una reacción en cascada.

En otras formas de realización, los componentes para ácidos nucleicos catalíticos adicionales con, por ejemplo, escisión o actividad de ligasa, también pueden formar parte de los kits de la presente divulgación. En aún otras formas de realización, los kits de la presente divulgación pueden incluir ADNzimas o componentes de las mismas.

Los kits de la presente divulgación pueden incluir instrucciones para usar los componentes del kit para realizar los métodos deseados.

Los kits y métodos de la divulgación se pueden usar junto con equipos y sistemas de análisis automatizados incluyendo, pero sin limitación, máquinas de PCR en tiempo real.

Los kits de la presente divulgación pueden incluir reactivos adicionales para realizar reacciones de amplificación de diana (por ejemplo, PCR) incluyendo, por ejemplo, cebadores de oligonucleótidos, tampones, iones de magnesio, enzimas de polimerasa y similares.

Los kits de la presente divulgación pueden comprender uno o más conjuntos que comprenden uno o más soportes sólidos y uno o más sustratos de polinucleótidos de la presente divulgación. Uno o más de los soportes sólidos pueden estar unidos a uno o más de los sustratos de polinucleótido. En ciertas formas de realización, los kits pueden comprender uno o más conjuntos que comprenden una pluralidad de diferentes soportes sólidos. La pluralidad de diferentes soportes sólidos puede unirse a una pluralidad de diferentes sustratos de polinucleótidos de la presente divulgación.

Ejemplos

En los siguientes ejemplos, se ensayó la capacidad de las MNAzimas basadas en la ADNzima 10-23 y las ADNzimas 10-23 para escindir de manera eficaz los sustratos universales. Los sustratos universales ensayados incluyeron algunos de los conocidos previamente en la técnica (**Tabla 4**) y los nuevos sustratos diseñados de acuerdo con la totalidad o un subconjunto de las directrices de diseño de la presente divulgación (**Tabla 5**). Estos ejemplos demuestran la robustez, según lo indicado por la escisión eficiente en un intervalo de condiciones, de sustratos universales diseñados de acuerdo con todas o un subconjunto de las directrices de diseño de la presente divulgación.

Tabla 4: Sustratos universales conocidos previamente usados en los Ejemplos

Nombre	Secuencia*
Sub2 (SEQ ID NO: 21)	AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA
Sub3 (SEQ ID NO: 22)	CAGCACAACCguCACCAACCG
Sub6 (SEQ ID NO: 23)	ATCACGCCTCguTCCTCCCAG
Sub7 (SEQ ID NO: 24)	TTAACATGGCACguTGGCTGTGATA

Sub4 (SEQ ID NO: 171)	CATGGCGCACguTGGGAGAAGTA
*Las letras mayúsculas indican ADN, las minúsculas indican ARN.	

Tabla 5: Sustratos universales mejorados de la divulgación actual usados en los Ejemplos

Nombre	Secuencia*
Sub44 (SEQ ID NO: 25)	CAGGTCTCCTCguCCCTATAGTGA
Sub45 (SEQ ID NO: 26)	ACGGGTCCCguCTCCTTTGGAA
Sub46 (SEQ ID NO: 27)	ACCGCACCTguCCCCAGCTC
Sub49 (SEQ ID NO: 28)	TAAACTTGGCTCguTGGCTGTGATA
Sub55 (SEQ ID NO: 29)	ACCGCACCTCguCCCCAGCTC
Sub59 (SEQ ID NO: 33)	CCTCCTCCCTguCCCTCCTCCT
Sub60 (SEQ ID NO: 30)	GCCAACCACguCCAACACGAC
Sub60T (SEQ ID NO: 72)	TGCCAACCACguCCAACACGAC
Sub61 (SEQ ID NO: 73)	CTCGACCCCguCTCCACGCCA
Sub65 (SEQ ID NO: 74)	TCTCGACCTCguCTCCACGCCA
Sub72 (SEQ ID NO: 75)	ATCACGCCTCguCTCCTCCCAG
Sub73 (SEQ ID NO: 76)	TGGCGTCCCCguCCCCTCGTG
Sub74 (SEQ ID NO: 77)	ATCACTCCCCguCCCCTCCCAG
Sub75 (SEQ ID NO: 78)	TGACCCTCCTCguCTCCCCACTA
Sub77 (SEQ ID NO: 79)	CTCCTCCCTCguCCCTCCTCCT
Sub79 (SEQ ID NO: 80)	TCCTCTCCCCguCCCCTTCAACC
Sub80 (SEQ ID NO: 81)	AACCGCCCTCguCCCGTGAACC
Sub82 (SEQ ID NO: 82)	CTCCTCCCTCguCCCTCGTCCA
Sub83 (SEQ ID NO: 83)	TCCGCTCCCCguCCCCTGCAAC
Sub84 (SEQ ID NO: 84)	ACCGCACCTCguCTCCTCCCAG
Sub85 (SEQ ID NO: 85)	ACCGCACCTCguCCCCTCCCAG
Sub86 (SEQ ID NO: 86)	ATCACGCCTCguCCCCAGCTC
Sub87 (SEQ ID NO: 87)	ATCACTCCCCguCCCCAGCTC
Sub88 (SEQ ID NO: 88)	CTCCTCCCTCguCCCCAGCTC
Sub89 (SEQ ID NO: 89)	ACCGCACCTCguCCCTCCTCCT
Sub90 (SEQ ID NO: 90)	CTCGACCCTCguCCCTCGTCCA
Sub55(16) (SEQ ID NO: 172)	GCACCTCguCCCCAGC
Sub55(18) (SEQ ID NO: 173)	CGCACCTCguCCCCAGCT
Sub55(23A) (SEQ ID NO: 174)	AACCGCACCTCguCCCCAGCTCA
Sub55(23C) (SEQ ID NO: 175)	CACCGCACCTCguCCCCAGCTCC
*Las letras mayúsculas indican ADN, las minúsculas indican ARN.	

Ejemplo 1: Uso de sustratos universales con MNAzimas en PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), a una temperatura de hibridación de 52 °C.

Las MNAzimas se pueden usar para controlar la amplificación de ácidos nucleicos diana en tiempo real usando métodos de amplificación de dianas *in vitro* tal como PCR, denominada qPCR de MNAzimas. Además, el control en tiempo real durante la qPCR usando sustratos de MNAzima marcados con fluoróforo y pares de inactivadores genera una curva en la que se puede colocar una línea de umbral, de un nivel arbitrario de fluorescencia, sobre la fase exponencial de las reacciones, produciendo un valor que puede ser conocido como Ct (ciclo umbral). Las reacciones que producen un valor de Ct inferior son indicativas de una escisión más eficiente de un sustrato específico, ya que dichas reacciones alcanzan el ciclo umbral más rápido. En este ejemplo, la amplificación y la detección se realizan en un proceso de una sola etapa, en el que la amplificación por PCR y la detección mediada por MNAzima ocurren simultáneamente en un solo tubo. La secuencia del sustrato universal puede influir en la cantidad de tiempo que se tarda en alcanzar el umbral de fluorescencia, medida por el valor de Ct generado.

En este ejemplo, los sustratos universales conocidos previamente de la serie 1 (Sub2, Sub3, Sub6 y Sub7, véase la **Tabla 4**) se comparan con los nuevos sustratos universales mejorados, la serie 2 (Sub44, Sub45, Sub46, Sub49, Sub55 y Sub60, véase la **Tabla 5**) que son objeto de la presente divulgación para determinar si los sustratos de la serie 2 tienen el mismo nivel de actividad, mayor o menor, en la PCR en tiempo real que los sustratos de la serie 1. El nivel de actividad se determinó por el Ct obtenido para cada reacción que contenía sustratos individuales durante

la PCR en tiempo real.

1.1. Oligonucleótidos de partzima

En los experimentos realizados para medir la eficiencia de la escisión de sustratos universales previamente conocidos (**Tabla 4**) y sustratos universales nuevos (**Tabla 5**) en tiempo real, todos los oligonucleótidos de partzima A y B se diseñaron con brazos sensores complementarios a la misma secuencia del gen RPLPO humano. Las secuencias de las partzimas A y B se enumeran a continuación de 5' a 3', donde las bases subrayadas se hibridan con su sustrato emparejado. "-P" indica la fosforilación en 3' del oligonuleótido.

SEQ ID NO: 1 partzima A RPLPOA/2-P:
CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACAACGAGAGGAAACCTT
SEQ ID NO: 2 partzima B RPLPOB/2-P:
TGCCCAGGGAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC
SEQ ID NO: 3 partzima A RPLPOA/3-P:
CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACAACGAGGTTGTGCTG
SEQ ID NO: 4 partzima B RPLPOB/3-P:
CGGTTGGTGAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC
SEQ ID NO: 5 partzima A RPLPOA/6-P:
CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACAACGAGAGGCGTGAT
SEQ ID NO: 6 partzima B RPLPOB/6-P:
CTGGGAGGAAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC
SEQ ID NO: 7 partzima A RPLPOA/7-P:
CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACAACGAGTGCCATGTTAA
SEQ ID NO: 8 partzima B RPLPOB/7-P:
TATCACAGCCAAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC
SEQ ID NO: 9 partzima A RPLPOA/44-P:
CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACAACGAGAGGAGACCTG
SEQ ID NO: 10 partzima B RPLPOB/44-P:
TCACTATAGGGAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC
SEQ ID NO: 11 partzima A RPLPOA/45-P:
CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACAACGAGGGACCCGT
SEQ ID NO: 12 partzima B RPLPOB/45-P:
TTCCAAAGGAGAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC
SEQ ID NO: 13 partzima A RPLPOA/46-P:
CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACAACGAAGGTGCGGT
SEQ ID NO: 14 partzima B RPLPOB/46-P:
GAGCTGGGGAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC
SEQ ID NO: 15 partzima A RPLPOA/49-P:
CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACAACGAGAGCCAAGTTTA
SEQ ID NO: 16 partzima A RPLPOA/55-P:
CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACAACGAGAGGTGCGGT
SEQ ID NO: 17 partzima A RPLPOA/6O-P:
CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACAACGAGTGGTTGGC
SEQ ID NO: 18 partzima B RPLPOB/6O-P:
GTCGTGTTGGAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC

1.2. Sustratos indicadores

Los sustratos indicadores ensayados en este ejemplo se muestran a continuación con la secuencia, 5' a 3'. Las bases en minúsculas representan ARN y las bases en mayúsculas representan ADN. En el ejemplo actual, los sustratos, distintos de Sub60, se marcaron en su extremo con un resto 6-FAM en el extremo 5' y un resto de inactivador en el extremo 3'. La molécula de inactivador era Black Hole Quencher 1 (indicado por una "B" en el nombre del sustrato a continuación) o Iowa Black® FQ (indicado por una "IB" en el nombre de los sustratos a continuación). Sub60 se marcó terminalmente con un resto de inactivador en el extremo 5' y un resto FAM en el extremo 3' (debido a que la base terminal 5' que es "G" que se sabe que inactiva la fluorescencia FAM). La escisión de los sustratos se controló entre 510-530 nm (rango de longitud de onda de emisión de FAM en CFX96 (BioRad)) con excitación entre 450-490 nm (rango de longitud de onda de excitación de FAM en CFX96 (BioRad)).

SEQ ID NO: 21 Sub2-FIB:
AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA
SEQ ID NO: 22 Sub3-FB:
CAGCACAACCguCACCAACCG
SEQ ID NO: 23 Sub6-FIB:
ATCACGCCTCguTCCTCCCAG
SEQ ID NO: 24 Sub7-FB:
TTAACATGGCACguTGGCTGTGATA
SEQ ID NO: 25 Sub44-FIB:
CAGGTCTCCTCguCCCTATAGTGA
SEQ ID NO: 26 Sub45-FIB:
ACGGGTCCCguCTCCTTTGGAA
SEQ ID NO: 27 Sub46-FIB:
ACCGCACCTguCCCCAGCTC
SEQ ID NO: 28 Sub49-FB:
TAAACTTGGCTCguTGGCTGTGATA
SEQ ID NO: 29 Sub55-FIB:
ACCGCACCTCguCCCCAGCTC
SEQ ID NO: 30 Sub60-IBF:
GCCAACCACguCCAACACGAC

1.3. Cebadores de PCR para la amplificación de RPLPO

El amplicón de PCR diana para este ejemplo se generó mediante amplificación por PCR *in vitro* de ADN genómico humano usando los cebadores de PCR de oligonucleótidos enumerados a continuación. Las secuencias de cebadores se escriben de 5' a 3'.

SEQ ID NO: 31 Cebador directo 5RPLPO:
CCCATTCTATCATCAACGGGTA
SEQ ID NO: 32 Cebador inverso 3RPLPO:
GCCCACTGTGGTCCTGGTG

1.4. Secuencia diana

La secuencia diana para este ejemplo era un amplicón de PCR del gen RPLPO generado por amplificación por PCR *in vitro* de ADN genómico humano extraído de células K562.

1.5. Componentes de reacción: Amplificación y detección de una secuencia diana

La amplificación por PCR en tiempo real y la detección de la secuencia diana se realizó en un volumen de reacción total de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron en un sistema de detección por PCR en tiempo real CFX96 (Bio-Rad). Los parámetros de ciclado fueron 95 °C durante 10 minutos, 10 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 30 segundos (-1 °C por ciclo para la última temperatura), 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 52 °C durante 60 segundos (datos recogidos en la etapa de 52 °C). Las reacciones se configuraron con sustratos y sus partzimas asociadas como se muestra en la **Tabla 6**. Cada conjunto de condiciones de reacción se ejecutó por duplicado y contenía 80 nM de 5RPLPO y 400 nM de 3RPLPO, 200 nM de cada una de la partzima A y la partzima B, 200 nM de sustrato, 8 mM de $MgCl_2$, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de inhibidor de RiboSafe RNase (Bioline), 1 x Inmunotampón (Bioline), 2 unidades de Immolase (Bioline) y una plantilla de ADN genómica (50 ng) o diana sin ADN (H_2O sin nucleasa (NF-H_2O)). Se establecieron reacciones separadas para ensayar cada sustrato con sus partzimas emparejadas. Se usaron los mismos cebadores de PCR para todas las reacciones y todas las partzimas tenían las mismas porciones de detección de dianas. Por lo tanto, cualquier diferencia en la eficiencia de las reacciones será atribuible a diferencias en la eficiencia de la escisión de los sustratos.

Tabla 6: Combinaciones de partzimas usadas para cada sustrato universal

Sustrato	Partzima A	Partzima B
Sub2 SEQ ID NO: 21	RPLPOA/2-P SEQ ID NO:1	RPLPOB/2-P SEQ ID NO: 2
Sub3 SEQ ID NO: 22	RPLPOA/3-P SEQ ID NO: 3	RPLPOB/3-P SEQ ID NO: 4
Sub6 SEQ ID NO: 23	RPLPOA/6-P SEQ ID NO: 5	RPLPOB/6-P SEQ ID NO: 6
Sub7 SEQ ID NO: 24	RPLPOA/7-P SEQ ID NO: 7	RPLPOB/7-P SEQ ID NO: 8

Sub44 SEQ ID NO: 25	RPLPOA/44 SEQ ID NO: 9	RPLPOB/44-P SEQ ID NO: 10
Sub45 SEQ ID NO: 26	RPLPOA/45-P SEQ ID NO: 11	RPLPOB/45-P SEQ ID NO: 12
Sub46 SEQ ID NO: 27	RPLPOA/46-P SEQ ID NO: 13	RPLPOB/46-P SEQ ID NO: 14
Sub49 SEQ ID NO: 28	RPLPOA/49-P SEQ ID NO: 15	RPLPOB/7-P SEQ ID NO: 8
Sub55 SEQ ID NO: 29	RPLPOA/55-P SEQ ID NO: 16	RPLPOB/46-P SEQ ID NO: 14
Sub60 SEQ ID NO: 30	RPLPOA/60-P SEQ ID NO: 17	RPLPOB/60-P SEQ ID NO: 18

1.6. Resultados: Amplificación de diana y escisión del sustrato indicador

Cada reacción por qPCR de MNAzimas que contenía ADN genómico humano, con cada sustrato diferente, mostró un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo para la detección en tiempo real de RPLPO de ADN genómico humano. Para todos los sustratos, la fluorescencia del control de diana sin ADN fue menor que en las reacciones que contenían diana de ADN. Esto demuestra que el aumento de la fluorescencia producida en las reacciones que contienen la diana se debe al ensamblaje dependiente de la diana de las MNAzimas catalíticamente activas que después escindió uno de los sustratos universales.

Los sustratos de la serie 1 y 2 cruzaron el umbral produciendo un valor de Ct, como se ve en la **Tabla 7**. Los sustratos de la serie 1 tenían valores de Ct en el intervalo de 16,9 (Sub6) a 18,4 (Sub3 y Sub7) y los sustratos de la serie 2 tenían valores de Ct en el intervalo de 17.1 (Sub55) a 19,2 (Sub45). Esto indica que los sustratos de la serie 2 son altamente activos y muy comparables con los sustratos de la serie 1 en las condiciones de reacción ensayadas. Estos resultados demuestran que, en promedio, los sustratos que se escindieron con la mayor eficiencia (es decir, el Ct más bajo) fueron aquellos con un mayor número de pirimidinas en las ocho bases que rodean los ribonucleótidos en el sustrato (subrayado en la **Tabla 7**).

Tabla 7: Eficiencia de la escisión de sustratos universales (enumerados en orden de eficiencia de escisión basada en Ct)

Nombre	Secuencia^	n.º de pirimidinas en 8 bases que rodean los ribonucleótidos	Tm*	Ct
Sub6	ATCACGCCTCguTCCTCCCAG SEQ ID NO: 23	8	64	16,9
Sub2	AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA SEQ ID NO: 21	8	66	17,0
Sub55	ACCGCACCTCguCCCCAGCTC SEQ ID NO: 29	8	68	17,1
Sub44	CAGGTCTCCTCguCCCTATAGTGA SEQ ID NO: 25	8	70	18,0
Sub46	ACCGCACCTguCCCCAGCTC SEQ ID NO: 27	7	64	18,1
Sub60	GCCAACCACguCCAACACGAC SEQ ID NO: 30	5	64	18,3
Sub3	CAGCACAACCguCACCAACCG SEQ ID NO: 22	5	64	18,4
Sub7	TTAACATGGCACguTGGCTGTGATA SEQ ID NO: 24	4	68	18,4
Sub49	TAAACTTGGCTCguTGGCTGTGATA SEQ ID NO: 28	5	68	18,5
Sub45	ACGGGTCCCguCTCCTTTGGAA SEQ ID NO: 26	8	66	19,2~

^ Las mayúsculas representan ADN y las minúsculas representan ARN
* La Tm dada aquí equivale a la temperatura de fusión de las bases unidas a las dos partzimas calculadas usando la regla de Wallace. Cuando el sustrato se une a la MNAzima basándose en la ADNzima 10-23, el ribonucleótido "g" permanece sin unir, por lo tanto, no contribuye a la Tm unida global.
~ Solamente una réplica debido a un error experimental.

Ejemplo 2: Uso de sustratos universales con qPCR de MNAzimas a una temperatura de hibridación de 58 °C.

Las MNAzimas se pueden usar para controlar la amplificación de ácidos nucleicos diana en tiempo real usando métodos de amplificación de dianas *in vitro* tal como PCR. Además, el control en tiempo real durante la qPCR usando sustratos de MNAzima marcados con pares de fluoróforo e inactivador genera una curva en la que se puede colocar una línea de umbral, de un nivel arbitrario de fluorescencia, sobre la fase exponencial de las reacciones, produciendo un valor que puede ser conocido como Ct (ciclo umbral). Las reacciones que producen un valor de Ct inferior son indicativas de una escisión más eficiente de un sustrato específico, ya que dichas reacciones alcanzan el ciclo umbral más rápido. En este ejemplo, la amplificación y la detección se realizan en un proceso de una sola

etapa, en el que la amplificación por PCR y la detección mediada por MNAzima ocurren simultáneamente en un solo tubo. Cuando todas las demás condiciones de reacción son las mismas, el valor de Ct puede verse influenciado por la secuencia del sustrato universal. La temperatura de hibridación/detección para qPCR de MNAzimas usadas en la técnica está entre 50 y 54 °C. Esta temperatura fue dictada por el hecho de que los sustratos universales conocidos en la técnica tenían una limitación de la temperatura a la que se escindieron eficientemente con 54 °C, siendo el límite superior para los sustratos universales de la serie 1. Existe la necesidad de sustratos universales que se escindan a temperaturas más altas para permitir una mayor flexibilidad en el diseño de cebadores y partzimas que hibriden a temperaturas más altas. Esta flexibilidad de diseño para cebadores y partzimas podría ser de gran beneficio para muchas aplicaciones tales como dianas genéticas de interés que tienen altos porcentajes de bases G y C en su secuencia, requiriendo temperaturas de reacción más altas y, por lo tanto, partzimas y cebadores con Tm más altas para la detección específica.

La investigación sobre la eficiencia de la escisión de sustratos basándose en el rendimiento de los sustratos de las series 1 y 2, condujo al desarrollo de directrices para ayudar en una tercera ronda de diseños de sustratos, lo que dio como resultado los sustratos de la serie 3. Estas directrices incluían, pero sin limitación, (i) siete o más nucleótidos de citosina en las diez bases que rodean los ribonucleótidos (N_4-N_{13}), (ii) las bases inmediatamente adyacentes a los ribonucleótidos son citosinas (N_8 y N_9), (iii) el contenido total de sustrato tiene >64% de pirimidinas y (iv) la Tm total del oligonucleótido es de 66 °C o más (donde esta última directriz solo es aplicable si la temperatura de reacción para la escisión de sustrato es superior a 50 °C).

En este ejemplo, los sustratos universales de la serie 1 (Sub2, Sub3 y Sub6) se comparan con los sustratos universales de la serie 2 (Sub44, Sub45, Sub46, Sub60T y Sub55) y los sustratos de la serie 3 (Sub61, Sub65, Sub72, Sub73, Sub74, Sub75, Sub77, Sub79, Sub80, Sub82, Sub83, Sub84, Sub85, Sub86, Sub87, Sub88, Sub89 y Sub90) para comparar la eficiencia de escisión de todos los sustratos en PCR de tiempo real a 58 °C para asegurarse de que las directrices de diseño produzcan sustratos universales con una alta probabilidad de aplicabilidad a qPCR de MNAzimas a una temperatura elevada. El nivel de eficiencia de escisión se determinó midiendo el valor de Ct para reacciones que contienen diferentes sustratos universales.

2.1. Oligonucleótidos de partzima

En los experimentos realizados para medir la eficacia de la escisión de los sustratos universales de las series 1, 2 y 3 en la PCR en tiempo real, todos los oligonucleótidos de partzima A y B se diseñaron con brazos sensores complementarios con la misma secuencia del gen TFRC humano. Las secuencias de las partzimas A y B se enumeran a continuación de 5' a 3', donde las bases <u>subrayadas</u> se hibridan con su sustrato universal emparejado. "-P" indica la fosforilación en 3' del oligonuleótido.

SEQ ID NO: 34 partzima A TFRCA/2-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGA<u>GAGGAAACCTT</u>
SEQ ID NO: 35 partzima B TFRCB/2-P:
<u>TGCCCAGGGA</u>GGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 36 partzima A TFRCA/3-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGA<u>GGTTGTGCTG</u>
SEQ ID NO: 37 partzima B TFRCB/3-P:
<u>CGGTTGGTGA</u>GGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 38 partzima A TFRCA/6-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAAC<u>GAGAGGCGTGAT</u>
SEQ ID NO: 39 partzima B TFRCB/6-P:
<u>CTGGGAGGAA</u>GGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 40 partzima A TFRCA/44-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGA<u>GAGGAGACCTG</u>
SEQ ID NO: 41 partzima B TFRCB/44-P:
<u>TCACTATAGGGA</u>GGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 42 partzima A TFRCA/45-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGA<u>GGGACCCGT</u>
SEQ ID NO: 43 partzima B TFRCB/45-P:
<u>TTCCAAAGGAGA</u>GGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 44 partzima A TFRCA/46-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGA<u>AGGTGCGGT</u>
SEQ ID NO: 45 partzima B TFRCB/46-P:

GAGCTGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 46 partzima A TFRCA/55-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGTGCGGT
SEQ ID NO: 48 partzima A TFRCA/60-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGTGGTTGGC
SEQ ID NO: 49 partzima B TFRCB/60-P:
GTCGTGTTGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 50 partzima A TFRCA/61-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGGGGTCGAG
SEQ ID NO: 51 partzima B TFRCB/61-P:
TGGCGTGGAGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 52 partzima A TFRCA/65-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGTCGAGA
SEQ ID NO: 55 partzima B TFRCB/72-P:
CTGGGAGGAGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 56 partzima A TFRCA/73-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGGGGACGCCA
SEQ ID NO: 57 partzima B TFRCB/73-P:
CACGAGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 58 partzima A TFRCA/74-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGGGGAGTGAT
SEQ ID NO: 59 partzima B TFRCB/74-P:
CTGGGAGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 60 partzima A TFRCA/75-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGAGGGTCA
SEQ ID NO: 61 partzima B TFRCB/75-P:
TAGTGGGGAGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 62 partzima A TFRCA/77-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGGAGGAG
SEQ ID NO: 63 partzima B TFRCB/77-P:
AGGAGGAGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 64 partzima A TFRCA/79-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGGGGAGAGGA
SEQ ID NO: 65 partzima B TFRCB/79-P:
GGTTGAAGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 66 partzima A TFRCA/80-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGGCGGTT
SEQ ID NO: 67 partzima B TFRCB/80-P:
GGTTCACGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 68 partzima B TFRCB/82-P:
TGGACGAGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 69 partzima A TFRCA/83-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGGGGAGCGGA
SEQ ID NO: 70 partzima B TFRCB/83-P:
GTTGCAGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 71 partzima A TFRCA/90-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGGTCGAG

2.2. Sustratos indicadores

Los sustratos indicadores para este ejemplo se muestran a continuación con la secuencia, de 5' a 3'. Las bases en minúsculas representan ARN y las bases en mayúsculas representan ADN. En el ejemplo actual, los sustratos se marcaron en sus extremos con un resto 6-FAM en el extremo 5' (indicado por "F" en el nombre de los sustratos a continuación) y un resto inactivador Iowa Black® FQ en el extremo 3' (indicado por "IB" en el nombre de los sustratos a continuación). La secuencia de Sub60 se modificó para incluir una "T" en el extremo 5', lo que le permitió etiquetarse en el extremo 5' con 6-FAM. La secuencia de unión al sustrato de la partzima A no ha cambiado y, por lo tanto, la eficiencia de la escisión es comparable con la secuencia Sub60 en el Ejemplo 1, que carece de la "T" adicional en el extremo 5'. La escisión de los sustratos se controló entre 510-530 nm (rango de longitud de onda de emisión de FAM en CFX96 (BioRad)) con excitación entre 450-490 nm (rango de longitud de onda de excitación de

FAM en CFX96 (BioRad)).

SEQ ID NO: 21 Sub2-FIB:
AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA
SEQ ID NO: 22 Sub3-FIB:
CAGCACAACCguCACCAACCG
SEQ ID NO: 23 Sub6-FIB:
ATCACGCCTCguTCCTCCCAG
SEQ ID NO: 25 Sub44-FIB:
CAGGTCTCCTCguCCCTATAGTGA
SEQ ID NO: 26 Sub45-FIB:
ACGGGTCCCguCTCCTTTGGAA
SEQ ID NO: 27 Sub46-FIB:
ACCGCACCTguCCCCAGCTC
SEQ ID NO: 29 Sub55-FIB:
ACCGCACCTCguCCCCAGCTC
SEQ ID NO: 72 Sub60T-FIB:
TGCCAACCACguCCAACACGAC
SEQ ID NO: 73 Sub61-FIB:
CTCGACCCCguCTCCACGCCA
SEQ ID NO: 74 Sub65-FIB:
TCTCGACCTCguCTCCACGCCA
SEQ ID NO: 75 Sub72-FIB:
ATCACGCCTCguCTCCTCCCAG
SEQ ID NO: 76 Sub73-FIB:
TGGCGTCCCCguCCCCTCGTG
SEQ ID NO: 77 Sub74-FIB:
ATCACTCCCCguCCCCTCCCAG
SEQ ID NO: 78 Sub75-FIB:
TGACCCTCCTCguCTCCCCACTA
SEQ ID NO: 79 Sub77-FIB:
CTCCTCCCTCguCCCTCCTCCT
SEQ ID NO: 80 Sub79-FIB:
TCCTCTCCCCguCCCCTTCAACC
SEQ ID NO: 81 Sub80-FIB:
AACCGCCCTCguCCCGTGAACC
SEQ ID NO: 82 Sub82-FIB:
CTCCTCCCTCguCCCTCGTCCA
SEQ ID NO: 83 Sub83-FIB:
TCCGCTCCCCguCCCCTGCAAC
SEQ ID NO: 84 Sub84-FIB:
ACCGCACCTCguCTCCTCCCAG
SEQ ID NO: 85 Sub85-FIB:
ACCGCACCTCguCCCCTCCCAG
SEQ ID NO: 86 Sub86-FIB:
ATCACGCCTCguCCCCAGCTC
SEQ ID NO: 87 Sub87-FIB:
ATCACTCCCCguCCCCAGCTC
SEQ ID NO: 88 Sub88-FIB:
CTCCTCCCTCguCCCCAGCTC
SEQ ID NO: 89 Sub89-FIB:
ACCGCACCTCguCCCTCCTCCT
SEQ ID NO: 90 Sub90-FIB:
CTCGACCCTCguCCCTCGTCCA

2.3. Secuencia diana y cebadores de PCR para la amplificación de TFRC

La secuencia diana para este ejemplo fue un amplicón de PCR a partir del gen TFRC generado por la amplificación *in vitro* de ADN genómico humano, extraído de la línea celular IM9 (Promega), usando los cebadores de PCR de

oligonucleótidos enumerados a continuación. La secuencia en negrita en las secuencias de cebador corresponde a un marcador universal (U1 o U2) que aumenta la Tm del cebador sin afectar a la especificidad del cebador con respecto a la diana génica. Este marcador mejora la eficiencia de amplificación en las reacciones de PCR. Las secuencias de cebador se enumeran de 5' a 3'.

SEQ ID NO: 91 Cebador directo 5TFRC_U1:
GCTAAAACAATAACTCAGAACTTACG
SEQ ID NO: 92 Cebador inverso 3TFRC_U2:
CAGCTTTCTGAGGTTACCATCCTA

2.4. Componentes de reacción: Amplificación y cuantificación de la secuencia diana

La amplificación por PCR en tiempo real y la detección de la secuencia diana se realizó en un volumen de reacción total de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron en un sistema de detección por PCR en tiempo real CFX96 (Bio-Rad). Las reacciones se configuraron con sustratos y sus partzimas asociadas como se muestra en la **Tabla 8**. Los parámetros de ciclado fueron 95 °C durante 2 minutos, 50 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 58 °C durante 60 segundos (datos recogidos en la etapa de 58 °C). Cada conjunto de condiciones de reacción se realizó por duplicado y contenía 40 nM de 5TFRC_U1, 200 nM de 3TFRC_U2, 200 nM de cada una de la partzima A y la partzima B, 200 nM de sustrato, 8 mM de $MgCl_2$, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de inhibidor RiboSafe RNase (Bioline), 1 x Inmunotampón (Bioline), 2 unidades de ADN polimerasa MyTaqHS™ (Bioline) y una plantilla de ADN genómico (50 ng) o (NF-H_2O) no diana.

Tabla 8: Combinaciones de partzimas usadas para cada sustrato universal

Sustrato	Partzima A	Partzima B
Sub2 SEQ ID NO: 21	TFRCA/2-P SEQ ID NO: 34	TFRCB/2-P SEQ ID NO: 35
Sub3 SEQ ID NO: 22	TFRCA/3-P SEQ ID NO: 36	TFRCB/3-P SEQ ID NO: 37
Sub6 SEQ ID NO: 23	TFRCA/6-P SEQ ID NO: 38	TFRCB/6-P SEQ ID NO: 39
Sub44 SEQ ID NO: 25	TFRCA/44 SEQ ID NO: 40	TFRCB/44-P SEQ ID NO: 41
Sub45 SEQ ID NO: 26	TFRCA/45-P SEQ ID NO: 42	TFRCB/45-P SEQ ID NO: 43
Sub46 SEQ ID NO: 27	TFRCA/46-P SEQ ID NO: 44	TFRCB/46-P SEQ ID NO: 45
Sub55 SEQ ID NO: 29	TFRCA/55-P SEQ ID NO: 46	TFRCB/46-P SEQ ID NO: 45
Sub60T SEQ ID NO: 72	TFRCA/60-P SEQ ID NO: 48	TFRCB/60-P SEQ ID NO: 49
Sub61 SEQ ID NO: 73	TFRCA/61-P SEQ ID NO: 50	TFRCB/61-P SEQ ID NO: 51
Sub65 SEQ ID NO: 74	TFRCA/65-P SEQ ID NO: 52	TFRCB/61-P SEQ ID NO: 51
Sub72 SEQ ID NO: 75	TFRCA/6-P SEQ ID NO: 38	TFRCB/72-P SEQ ID NO: 55
Sub73 SEQ ID NO: 76	TFRCA/73-P SEQ ID NO: 56	TFRCB/73-P SEQ ID NO: 57
Sub74 SEQ ID NO: 77	TFRCA/74-P SEQ ID NO: 58	TFRCB/74-P SEQ ID NO: 59
Sub75 SEQ ID NO: 78	TFRCA/75-P SEQ ID NO: 60	TFRCB/75-P SEQ ID NO: 61
Sub77 SEQ ID NO: 79	TFRCA/77-P SEQ ID NO: 62	TFRCB/77-P SEQ ID NO: 63
Sub79 SEQ ID NO: 80	TFRCA/79-P SEQ ID NO: 64	TFRCB/79-P SEQ ID NO: 65
Sub80 SEQ ID NO: 81	TFRCA/80-P SEQ ID NO: 66	TFRCB/80-P SEQ ID NO: 67
Sub82 SEQ ID NO: 82	TFRCA/77-P SEQ ID NO: 62	TFRCB/82-P SEQ ID NO: 68
Sub83 SEQ ID NO: 83	TFRCA/83-P SEQ ID NO: 69	TFRCB/83-P SEQ ID NO: 70
Sub84 SEQ ID NO: 84	TFRCA/55-P SEQ ID NO: 46	TFRCB/72-P SEQ ID NO: 55
Sub85 SEQ ID NO: 85	TFRCA/55-P SEQ ID NO: 46	TFRCB/74-P SEQ ID NO: 59
Sub86 SEQ ID NO: 86	TFRCA/6-P SEQ ID NO: 38	TFRCB/46-P SEQ ID NO: 45
Sub87 SEQ ID NO: 87	TFRCA/74-P SEQ ID NO: 58	TFRCB/46-P SEQ ID NO: 45
Sub88 SEQ ID NO: 88	TFRCA/77-P SEQ ID NO: 62	TFRCB/46-P SEQ ID NO: 45
Sub89 SEQ ID NO: 89	TFRCA/55-P SEQ ID NO: 46	TFRCB/77-P SEQ ID NO: 63
Sub90 SEQ ID NO: 90	TFRCA/90-P SEQ ID NO: 71	TFRCB/82-P SEQ ID NO: 68

2.5. Resultados: Amplificación de diana y escisión del sustrato indicador

Cada reacción por qPCR de MNAzimas que contenía ADN genómico humano mostró un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo para la detección en tiempo real de TFRC de ADN genómico humano. Para todas las reacciones, la fluorescencia del control de diana sin ADN fue menor que en las reacciones que contenían diana de ADN. Esto demuestra que el aumento de la fluorescencia producida en las reacciones que contienen la diana se

debe al ensamblaje dependiente de la diana de las MNAzimas catalíticamente activas que después escindió uno de los sustratos indicadores universales.

La comparación de los valores de Ct para cada sustrato universal (**Figura 5** y **Tabla 9**) muestra que los sustratos de la serie 1 (Sub2, Sub3 y Sub6) y los sustratos de la serie 2 (Sub44, Sub45, Sub46 y Sub60T) tienen valores de Ct > 27, mientras que los otros sustratos de la serie 2 y todos los sustratos de la serie 3 ensayados (Sub55, Sub61, Sub65, Sub72, Sub73, Sub74, Sub75, Sub77, Sub79, Sub80, Sub82, Sub83, Sub84, Sub85, Sub86, Sub87, Sub88, Sub89 y Sub90) tenían valores de Ct menores de 27. Esto indica que el último sustrato universal de la serie 2 y todos los sustratos universales de la serie 3 ensayados mostraron una mayor eficiencia de la reacción de escisión de MNAzimas a una temperatura de hibridación/detección más alta que la previamente posible para la qPCR de MNAzimas. Esta eficiencia mejorada de escisión ahora permite una detección eficiente y robusta de la diana usando qPCR de MNAzimas a una temperatura más alta de lo que antes era posible. Esto también puede resultar beneficioso cuando se usan formulaciones de ADN polimerasa que requieren una temperatura más alta para la amplificación.

Cabe destacar la importancia de la naturaleza de la secuencia de nucleótidos de estos sustratos eficientemente escindidos y la proximidad de nucleótidos específicos a los ribonucleótidos de los sustratos. Estas características forman la base de un conjunto de directrices que dan como resultado sustratos universales con una mayor probabilidad de ser escindidos eficientemente a temperaturas elevadas. Estas directrices de diseño incluyen, pero sin limitación (no todas pueden ser necesarias): (i) siete o más nucleótidos de citosina en las diez bases que rodean los ribonucleótidos (N_4-N_{13}); (ii) las bases inmediatamente adyacentes a los ribonucleótidos son citosinas (N_8 y N_9); (iii) el contenido total de sustrato tiene >64% de pirimidinas; y (iv) la Tm total del oligonucleótido es de 66 °C o más (donde esta última directriz solo es aplicable si la temperatura de reacción para la escisión de sustrato es superior a 50 °C) (**Tabla 9**). Además, se observó que también es beneficioso un bajo número de nucleótidos de guanina (por ejemplo, tres, dos, uno o ninguno) en las 10 bases que rodean los ribonucleótidos.

Todos los sustratos universales en la **Figura 5** que tenían un Ct <27 a una temperatura de hibridación de 58 °C obedecían tres o más de estas directrices de diseño (**Tabla 9**).

Tabla 9: Eficiencia de la escisión de sustratos universales (enumerados en orden de eficiencia de escisión basada en Ct)

Nombre	**Secuencia^**	**N.º de C N_4-N_{13}**	**CguC**	**% de C/T$^+$**	**Tm***	**Ct**	N.º de **(i-iv)$^-$**
Sub80	AACCGCCCTCguCCCGTGAACC SEQ ID NO: 81	7	Sí	65	70	25,2	4
Sub55	ACCGCACCTCguCCCCAGCTC SEQ ID NO: 29	7	Sí	74	68	25,4	4
Sub85	ACCGCACCTCguCCCCTCCCAG SEQ ID NO: 85	7	Sí	75	72	25,4	4
Sub79	TCCTCTCCCCguCCCCTCCTACC SEQ ID NO: 80	8	Sí	90	72	25,5	4
Sub61	CTCGACCCCguCTCCACGCCA SEQ ID NO: 73	7	Sí	74	68	25,5	4
Sub65	TCTCGACCTCguCTCCACGCCA SEQ ID NO: 74	6	Sí	75	68	25,5	3
Sub89	ACCGCACCTCguCCCTCCTCCT SEQ ID NO: 89	7	Sí	85	70	25,7	4
Sub90	CTCGACCCTCguCCCTCGTCCA SEQ ID NO: 90	8	Sí	80	70	25,7	4
Sub87	ATCACTCCCCguCCCCAGCTC SEQ ID NO: 87	8	Sí	79	66	25,7	4
Sub83	TCCGCTCCCCguCCCCTGCAAC SEQ ID NO: 83	8	Sí	80	72	25,8	4
Sub86	ATCACGCCTCguCCCCAGCTC SEQ ID NO: 86	7	Sí	74	66	25,9	4
Sub88	CTCCTCCCTCguCCCCAGCTC SEQ ID NO: 88	8	Sí	89	68	26,2	4

Sub82	CTCCTCCCTCguCCCTCGTCCA SEQ ID NO: 82	8	Sí	90	70	26,2	4
Sub74	ATCACTCCCCguCCCCTCCCAG SEQ ID NO: 77	8	Sí	80	70	26,2	4
Sub84	ACCGCACCTCguCTCCTCCCAG SEQ ID NO: 84	6	Sí	75	70	26,3	3
Sub75	TGACCCTCCTCguCTCCCCACTA SEQ ID NO: 78	7	Sí	81	70	26,3	4
Sub73	TGGCGTCCCCguCCCCTCGTG SEQ ID NO: 76	8	Sí	74	70	26,3	4
Sub77	CTCCTCCCTCguCCCTCCTCCT SEQ ID NO: 79	8	Sí	100	70	26,3	4
Sub72	ATCACGCCTCguCTCCTCCCAG SEQ ID NO: 75	6	Sí	75	68	26,9	3
Sub2	AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA SEQ ID NO: 21	6	Sí	60	66	27,2	2
Sub60T §	TGCCAACCACguCCAACACGAC SEQ ID NO: 72	6	Sí	53	64	27,3	2
Sub46	ACCGCACCTguCCCCAGCTC SEQ ID NO: 27	7	No	72	64	27,5	2
Sub45	ACGGGTCCCguCTCCTTTGGAA SEQ ID NO: 26	6	Sí	60	66	27,6	2
Sub3	CAGCACAACCguCACCAACCG SEQ ID NO: 22	6	Sí	53	64	28,2	1
Sub44	CAGGTCTCCTCguCCCTATAGTGA SEQ ID NO: 25	6	Sí	64	70	28,4	2
Sub6	ATCACGCCTCguTCCTCCCAG SEQ ID NO: 23	6	No	74	64	29,0	1

^Las bases en mayúscula representan ADN, y las bases en minúscula representan ARN, y la posición de la base en un sustrato se representa por (N_x)-N_1-N_2-N_3-N_4-N_5-N_6-N_7-N_8-rR-rY-N_9-N_{10}-N_{11}-$N_{12}N_{13}$-N_{14}-N_{15}-(N_x)
+% de C/T (pirimidinas) de la longitud de secuencia mostrada anteriormente para cada sustrato, no incluye ribonucleótidos
*La Tm dada aquí equivale a la temperatura de fusión de las bases unidas calculada usando la regla de Wallace; solo calculada para las bases que se hibridan con su complemento. Cuando el sustrato se une a la MNAzima basándose en la ADNzima 10-23, el ribonucleótido "g" permanece sin unir, por lo tanto, no contribuye a la Tm unida global.
~ El número de las directrices de diseño (i), (ii), (iii) y/o (iv) que ha cumplido la secuencia de sustrato. § La "T" adicional en Sub60T no está unida por un brazo de partzima y, por lo tanto, no se incluye en los cálculos del % de C/T y la Tm.

Ejemplo 3: Uso de sustratos universales con MNAzimas en un formato para la detección directa de una diana de ácido nucleico.

La investigación sobre la eficiencia de la escisión de sustratos basándose en el rendimiento de los sustratos de las series 1 y 2, condujo al desarrollo de directrices para ayudar en el diseño de una tercera ronda de sustratos, serie 3. Estas directrices incluían, pero sin limitación, (i) siete o más nucleótidos de citosina en las diez bases que rodean los ribonucleótidos (N_4-N_{13}), (ii) las bases inmediatamente adyacentes a los ribonucleótidos son citosinas (N_8 y N_9), (iii) el contenido total de sustrato tiene >64% de pirimidinas y (iv) la Tm total del oligonucleótido es de 66 °C o más (donde esta última directriz solo es aplicable si la temperatura de reacción para la escisión de sustrato es superior a 50 °C).

Las MNAzimas se pueden usar para detectar directamente ácidos nucleicos diana en una reacción isotérmica sin ninguna amplificación de diana. Este método de detección de diana directa puede utilizarse para evaluar la eficiencia de la escisión de sustratos. Las partzimas se diseñaron para ensayar la eficiencia de la escisión de una gama de sustratos universales cuando se acoplan con la detección directa del gen TFRC en un intervalo de temperaturas. En este ejemplo, los sustratos universales de la serie 1 conocidos previamente (Sub2, Sub3 y Sub6) se compararon con los sustratos universales de la serie 2 (Sub44, Sub45, Sub46, Sub49, Sub55 y Sub60T) y los sustratos de la serie 3 (Sub61, Sub65, Sub72, Sub73, Sub74, Sub75, Sub77, Sub79, Sub80, Sub82, Sub83, Sub84, Sub85, Sub86, Sub87, Sub88, Sub89 y Sub90) para determinar si las directrices de diseño derivadas de los análisis de los sustratos de las

series 1 y 2 serían útiles en el desarrollo de sustratos de la serie 3 que se escinden con el mismo o mayor nivel de actividad que los sustratos de las series 1 y 2. El nivel de eficiencia de escisión se determinó calculando la relación señal-ruido (a partir de los resultados de una reacción de "ensayo" que contiene una reacción de control con plantilla y sin plantilla) después de 10 minutos en un intervalo de temperatura de 52, 54, 56 y 58 °C. La desviación estándar de las relaciones señal-ruido en este intervalo de temperatura también se calculó como una medida de la robustez de los sustratos con respecto a la temperatura.

3.1. Oligonucleótidos de partzima

En los experimentos realizados para medir la eficiencia de escisión de los sustratos universales de las series 1, 2 y 3 descritos en las **Tablas 4 y 5** usando la detección directa de dianas, todos los oligonucleótidos de partzima A y B se diseñaron con brazos sensores complementarios con la misma secuencia del gen TFRC humano. Las secuencias de las partzimas A y B se enumeran a continuación de 5' a 3', donde las bases subrayadas se hibridan con el sustrato. "-P" indica la fosforilación en 3' del oligonuleótido.

SEQ ID NO: 34 partzima A TFRCA/2-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGAAACCTT
SEQ ID NO: 35 partzima B TFRCB/2-P:
TGCCCAGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 36 partzima A TFRCA/3-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGGTTGTGCTG
SEQ ID NO: 37 partzima B TFRCB/3-P:
CGGTTGGTGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 38 partzima A TFRCA/6-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGCGTGAT
SEQ ID NO: 39 partzima B TFRCB/6-P:
CTGGGAGGAAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 40 partzima A TFRCA/44-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGAGACCTG
SEQ ID NO: 41 partzima B TFRCB/44-P:
TCACTATAGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 42 partzima A TFRCA/45-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGGGACCCGT
SEQ ID NO: 43 partzima B TFRCB/45-P:
TTCCAAAGGAGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 44 partzima A TFRCA/46-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAAGGTGCGGT
SEQ ID NO: 45 partzima B TFRCB/46-P:
GAGCTGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 93 partzima A TFRCA/49-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGCCAAGTTTA
SEQ ID NO: 94 partzima B TFRCB/49-P:
TATCACAGCCAAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 46 partzima A TFRCA/55-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGTGCGGT
SEQ ID NO: 48 partzima A TFRCA/60-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGTGGTTGGC
SEQ ID NO: 49 partzima B TFRCB/60-P:
GTCGTGTTGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 50 partzima A TFRCA/61-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGGGGTCGAG
SEQ ID NO: 51 partzima B TFRCB/61-P:
TGGCGTGGAGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 52 partzima A TFRCA/65-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGTCGAGA
SEQ ID NO: 55 partzima B TFRCB/72-P:
CTGGGAGGAGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 56 partzima A TFRCA/73-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGGGGACGCCA

SEQ ID NO: 57 partzima B TFRCB/73-P:
CACGAGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 58 partzima A TFRCA/74-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGGGGAGTGAT
SEQ ID NO: 59 partzima B TFRCB/74-P:
CTGGGAGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 60 partzima A TFRCA/75-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGAGGGTCA
SEQ ID NO: 61 partzima B TFRCB/75-P:
TAGTGGGGAGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 62 partzima A TFRCA/77-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGGAGGAG
SEQ ID NO: 63 partzima B TFRCB/77-P:
AGGAGGAGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 64 partzima A TFRCA/79-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGGGGAGAGGA
SEQ ID NO: 65 partzima B TFRCB/79-P:
GGTTGAAGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 66 partzima A TFRCA/80-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGGCGGTT
SEQ ID NO: 67 partzima B TFRCB/80-P:
GGTTCACGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 68 partzima B TFRCB/82-P:
TGGACGAGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 69 partzima A TFRCA/83-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGGGGAGCGGA
SEQ ID NO: 70 partzima B TFRCB/83-P:
GTTGCAGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 71 partzima A TFRCA/90-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGGTCGAG

3.2. Sustratos indicadores

Los sustratos indicadores para este ejemplo se muestran a continuación con la secuencia, de 5' a 3'. Las bases en minúsculas representan ARN y las bases en mayúsculas representan ADN. En el ejemplo actual, los sustratos se marcaron en sus extremos con un resto 6-FAM en el extremo 5' (indicado por "F" en el nombre de los sustratos a continuación) y un resto inactivador Iowa Black® FQ en el extremo 3' (indicado por "IB" en el nombre de los sustratos a continuación). La escisión de los sustratos se controló entre 510-530 nm (rango de longitud de onda de emisión de FAM en CFX96 (BioRad)) con excitación entre 450-490 nm (rango de longitud de onda de excitación de FAM en CFX96 (BioRad)).

SEQ ID NO: 21 Sub2-FIB:
AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA
SEQ ID NO: 22 Sub3-FIB:
CAGCACAACCguCACCAACCG
SEQ ID NO: 23 Sub6-FIB:
ATCACGCCTCguTCCTCCCAG
SEQ ID NO: 25 Sub44-FIB:
CAGGTCTCCTCguCCCTATAGTGA
SEQ ID NO: 26 Sub45-FIB:
ACGGGTCCCguCTCCTTTGGAA
SEQ ID NO: 27 Sub46-FIB:
ACCGCACCTguCCCCAGCTC
SEQ ID NO: 28 Sub49-FB:
TAAACTTGGCTCguTGGCTGTGATA
SEQ ID NO: 29 Sub55-FIB:
ACCGCACCTCguCCCCAGCTC
SEQ ID NO: 72 Sub60T-FIB:
TGCCAACCACguCCAACACGAC

SEQ ID NO: 73 Sub61-FIB:
CTCGACCCCguCTCCACGCCA
SEQ ID NO: 74 Sub65-FIB:
TCTCGACCTCguCTCCACGCCA
SEQ ID NO: 75 Sub72-FIB:
ATCACGCCTCguCTCCTCCCAG
SEQ ID NO: 76 Sub73-FIB:
TGGCGTCCCCguCCCCTCGTG
SEQ ID NO: 77 Sub74-FIB:
ATCACTCCCCguCCCCTCCCAG
SEQ ID NO: 78 Sub75-FIB:
TGACCCTCCTCguCTCCCCACTA
SEQ ID NO: 79 Sub77-FIB:
CTCCTCCCTCguCCCTCCTCCT
SEQ ID NO: 80 Sub79-FIB:
TCCTCTCCCCguCCCCTTCAACC
SEQ ID NO: 81 Sub80-FIB:
AACCGCCCTCguCCCGTGAACC
SEQ ID NO: 82 Sub82-FIB:
CTCCTCCCTCguCCCTCGTCCA
SEQ ID NO: 83 Sub83-FIB:
TCCGCTCCCCguCCCCTGCAAC
SEQ ID NO: 84 Sub84-FIB:
ACCGCACCTCguCTCCTCCCAG
SEQ ID NO: 85 Sub85-FIB:
ACCGCACCTCguCCCCTCCCAG
SEQ ID NO: 86 Sub86-FIB:
ATCACGCCTCguCCCCAGCTC
SEQ ID NO: 87 Sub87-FIB:
ATCACTCCCCguCCCCAGCTC
SEQ ID NO: 88 Sub88-FIB:
CTCCTCCCTCguCCCCAGCTC
SEQ ID NO: 89 Sub89-FIB:
ACCGCACCTCguCCCTCCTCCT
SEQ ID NO: 90 Sub90-FIB:
CTCGACCCTCguCCCTCGTCCA

3.3. Secuencia diana

La secuencia diana para este ejemplo era un oligonucleótido sintético AF-TFRC con la secuencia, de 5' a 3' a continuación. Esta secuencia diana tiene la misma secuencia que una sección del gen TFRC.

SEQ ID NO: 95 Facilitador del ensamblaje AF-TFRC:
AGTCTGTTTTCCAGTCAGAGGGACAGTCTCCTTCCATATTCC

3.4. Componentes de reacción: Detección isotérmica directa de la secuencia diana

La detección de la secuencia diana se midió por un aumento en la señal fluorescente causada por la escisión del sustrato indicador por la MNAzima catalíticamente activa. El volumen total de todas las reacciones fue de 25 µl y todas las reacciones se realizaron en los sistemas de detección de PCR en tiempo real CFX96™ (BioRad), ensayándose cada combinación de partzimas y sustratos (**Tabla 10**) a 52 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C y 60 °C. La fluorescencia para cada reacción se programó para leerse después de 1 segundo durante los primeros 50 ciclos y luego se programó para que se leyera después de 25 segundos para los siguientes 50 ciclos. Todas las reacciones contenían 1 x Tampón de PCR II (Applied Biosystems), 10 mM de $MgCl_2$ y 0,2 µM de Partzimas A y B y 0,2 µM de sustrato (ensayado en combinaciones como en la **Tabla 10**). Cada reacción se realizó por duplicado como un "ensayo" con una secuencia diana 10 nM (AF-TFRC) o control sin plantilla (NF-H_2O).

Tabla 10: Combinaciones de partzimas usadas para cada sustrato

Sustrato	Partzima A	Partzima B

Sub2 SEQ ID NO: 21	TFRCA/2-P SEQ ID NO: 34	TFRCB/2-P SEQ ID NO: 35
Sub3 SEQ ID NO: 22	TFRCA/3-P SEQ ID NO: 36	TFRCB/3-P SEQ ID NO: 37
Sub6 SEQ ID NO: 23	TFRCA/6-P SEQ ID NO: 38	TFRCB/6-P SEQ ID NO: 39
Sub44 SEQ ID NO: 25	TFRCA/44 SEQ ID NO: 40	TFRCB/44-P SEQ ID NO: 41
Sub45 SEQ ID NO: 26	TFRCA/45-P SEQ ID NO: 42	TFRCB/45-P SEQ ID NO: 43
Sub46 SEQ ID NO: 27	TFRCA/46-P SEQ ID NO: 44	TFRCB/46-P SEQ ID NO: 45
Sub49 SEQ ID NO: 28	TFRCA/49-P SEQ ID NO: 93	TFRCB/49-P SEQ ID NO: 94
Sub55 SEQ ID NO: 29	TFRCA/55-P SEQ ID NO: 46	TFRCB/46-P SEQ ID NO: 45
Sub60T SEQ ID NO: 72	TFRCA/60-P SEQ ID NO: 48	TFRCB/60-P SEQ ID NO: 49
Sub61 SEQ ID NO: 73	TFRCA/61-P SEQ ID NO: 50	TFRCB/61-P SEQ ID NO: 51
Sub65 SEQ ID NO: 74	TFRCA/65-P SEQ ID NO: 52	TFRCB/61-P SEQ ID NO: 51
Sub72 SEQ ID NO: 75	TFRCA/6-P SEQ ID NO: 38	TFRCB/72-P SEQ ID NO: 55
Sub73 SEQ ID NO: 76	TFRCA/73-P SEQ ID NO: 56	TFRCB/73-P SEQ ID NO: 57
Sub74 SEQ ID NO: 77	TFRCA/74-P SEQ ID NO: 58	TFRCB/74-P SEQ ID NO: 59
Sub75 SEQ ID NO: 78	TFRCA/75-P SEQ ID NO: 60	TFRCB/75-P SEQ ID NO: 61
Sub77 SEQ ID NO: 79	TFRCA/77-P SEQ ID NO: 62	TFRCB/77-P SEQ ID NO: 63
Sub79 SEQ ID NO: 80	TFRCA/79-P SEQ ID NO: 64	TFRCB/79-P SEQ ID NO: 65
Sub80 SEQ ID NO: 81	TFRCA/80-P SEQ ID NO: 66	TFRCB/80-P SEQ ID NO: 67
Sub82 SEQ ID NO: 82	TFRCA/77-P SEQ ID NO: 62	TFRCB/82-P SEQ ID NO: 68
Sub83 SEQ ID NO: 83	TFRCA/83-P SEQ ID NO: 69	TFRCB/83-P SEQ ID NO: 70
Sub84 SEQ ID NO: 84	TFRCA/55-P SEQ ID NO: 46	TFRCB/72-P SEQ ID NO: 55
Sub85 SEQ ID NO: 85	TFRCA/55-P SEQ ID NO: 46	TFRCB/74-P SEQ ID NO: 59
Sub86 SEQ ID NO: 86	TFRCA/6-P SEQ ID NO: 38	TFRCB/46-P SEQ ID NO: 45
Sub87 SEQ ID NO: 87	TFRCA/74-P SEQ ID NO: 58	TFRCB/46-P SEQ ID NO: 45
Sub88 SEQ ID NO: 88	TFRCA/77-P SEQ ID NO: 62	TFRCB/46-P SEQ ID NO: 45
Sub89 SEQ ID NO: 89	TFRCA/55-P SEQ ID NO: 46	TFRCB/77-P SEQ ID NO: 63
Sub90 SEQ ID NO: 90	TFRCA/90-P SEQ ID NO: 71	TFRCB/82-P SEQ ID NO: 68

3.5. Resultados: Detección isotérmica directa de la secuencia diana

Cada reacción con cada sustrato universal mostró un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo para reacciones que contenían la plantilla sintética AF-TFRC (secuencia diana correspondiente a una porción del gen TFRC). Para todos los sustratos, la fluorescencia del control sin plantilla fue menor que en las reacciones que contenían secuencias diana. Esto demuestra que el aumento de la fluorescencia producida en las reacciones que contienen la diana se debe al ensamblaje dependiente de la diana de las MNAzimas catalíticamente activas que después escindió el sustrato indicador universal.

Para cada reacción, los puntos de datos fluorescentes sin procesar obtenidos a partir de CFX96 se normalizaron dividiendo cada punto de datos por el valor obtenido para la reacción emparejada sin plantilla en la primera lectura. Estos datos normalizados se utilizaron entonces para calcular el valor de la relación señal-ruido en aproximadamente la marca de 10 minutos dividiendo los puntos de datos de ensayo por los puntos de datos sin plantilla. Este cálculo se realizó para cada sustrato a cada temperatura de reacción. El valor de la relación señal-ruido proporciona una medición de la eficiencia de la escisión de sustratos (**Figura 6, (i)**), con una relación señal-ruido alta que indica una escisión eficiente. La desviación estándar de la relación señal-ruido para cada sustrato en el intervalo de temperatura también se calculó y se representó para determinar los sustratos con una actividad consistentemente alta en el intervalo de temperaturas analizado (**Figura 6, (ii)**). Un valor bajo para esta desviación estándar indica un cambio mínimo de los niveles de la relación señal-ruido entre temperaturas. Esto sugiere que estos sustratos son robustos con respecto a la temperatura.

El análisis de la relación señal-ruido para cada sustrato en el intervalo de temperaturas (**Figura 6, (i)**) muestra que los sustratos de la serie 1 (Sub2, Sub3 y Sub6) tenían una mayor relación señal-ruido a las temperaturas más bajas medidas. Sin embargo, la eficiencia de escisión de estos sustratos disminuyó drásticamente a medida que la temperatura de reacción se aumentó a 58 °C. Se observó un patrón similar para un subconjunto de los sustratos de la serie 2 (Sub44, Sub45, Sub46 y Sub60T). El sustrato de la serie 2, Sub49, tuvo un rendimiento deficiente a temperaturas más bajas y ligeramente mejor a temperaturas más altas, pero en general tuvo una menor relación señal-ruido que otros sustratos. El sustrato de la serie 2 Sub60T mostró una disminución de la relación señal-ruido con el aumento de la temperatura y, en general, una relación señal-ruido menor a las temperaturas más bajas que la

mayoría de los otros sustratos de la serie 1 y 2. El otro sustrato de la serie 2 (Sub55) y un subconjunto de los sustratos de la serie 3 (Sub61, Sub65, Sub74, Sub79, Sub80, Sub82, Sub83, Sub84, Sub85, Sub86, Sub87, Sub88, Sub89 y Sub90) mostraron niveles de fluorescencia altos y, por lo tanto, se escindieron de forma eficiente en todas las temperaturas ensayadas. Los sustratos de la serie 3 Sub73, Sub75 y Sub77 mostraron aproximadamente el mismo valor de la relación señal-ruido a través de las temperaturas ensayadas, sin embargo, el nivel general de la relación señal-ruido fue bajo. Estos tres sustratos dieron buenos resultados con valores de Ct relativamente bajos cuando se ensayaron con qPCR de MNAzimas (véase el Ejemplo 2). La comparación de los datos de estos sustratos para los Ejemplos 2 y 3 puede indicar que, cuando se usa una temperatura constante en el intervalo de 52 a 58 °C, la renovación de estos sustratos es menor, lo que afecta a la eficiencia de la escisión. Esta disminución en la renovación de sustratos podría estar relacionada con la tasa "off" de productos escindidos. En el Ejemplo 2, los productos escindidos se disociaron de los brazos de sustrato de la partzima al menos una vez cada ciclo cuando la temperatura se aumentó a más de 90 °C como parte del perfil de termociclado de la PCR.

En general, los sustratos que cumplen con las directrices de diseño (**Tabla 9**) mostraron una mayor relación señal-ruido en todo el intervalo de temperatura ensayado que los sustratos que quedaron fuera de estas directrices (**Figura 6, (i)**). Más específicamente, las reacciones con Sub55, Sub61, Sub65, Sub72, Sub74, Sub79, Sub80, Sub82, Sub83, Sub84, Sub85, Sub86, Sub87, Sub88, Sub89 y Sub90 mostraron valores altos de la relación señal-ruido a cada temperatura ensayada, lo que demuestra que son sustratos robustos en un intervalo de temperaturas. Esta mejora fue más evidente cuando se calculó la desviación estándar de la relación señal-ruido a través de las temperaturas para cada sustrato (**Figura 6, (ii)**). Esta medida de la variabilidad emparejada con los valores absolutos de la relación señal-ruido indicó que, en el intervalo de temperatura ensayado, el sustrato de la serie 2 Sub55, y los sustratos de la serie 3 Sub61, Sub65, Sub74, Sub79, Sub80, Sub82, Sub83, Sub85, Sub86, Sub87 Sub88, Sub89 y Sub90, tenían una alta relación señal-ruido con poca variabilidad en un amplio intervalo de temperatura. Hubo tres sustratos de la serie 3, Sub65, Sub72 y Sub84, que solo coinciden con tres de las cuatro directrices de diseño y dos de estos, Sub72 y Sub84, tuvieron una desviación estándar ligeramente mayor de la relación señal-ruido que los sustratos de la serie 3 que coinciden con cuatro de las directrices de diseño especificadas en la **Tabla 9**.

Los sustratos que tenían valores de la relación señal-ruido inferiores a 1,6 a 3 o más temperaturas (Sub60, Sub73, Sub75 y Sub77) no se consideraron robustos con respecto al intervalo de temperaturas ensayado.

Estos datos sugieren que el cumplimiento de estas cuatro directrices de diseño (**Tabla 9**) producirá, en general, sustratos que se escinden de manera eficiente y robusta en un intervalo de temperaturas.

Un estudio de la secuencia de los sustratos más exitosos de las series 2 y 3 muestra que estos sustratos comparten características comunes. Los sustratos que tienen poca variación entre las relaciones señal-ruido sobre las temperaturas ensayadas (**Figura 6, (i)** y **(ii)**) generalmente contenían siete o más nucleótidos de citosina dentro de las bases N_4 a N_{13}. Esto indica que la región del núcleo, es decir, las 10 bases que rodean los ribonucleótidos, es altamente influyente en la actividad del sustrato. Además, se observó que también es beneficioso un bajo número de nucleótidos de guanina (por ejemplo, tres, dos, uno o ninguno) en las 10 bases que rodean los ribonucleótidos.

Ejemplo 4: Uso de sustratos universales con qPCR de MNAzimas, a temperaturas de hibridación de 52 °C y 58 °C.

Las MNAzimas se pueden usar para controlar la amplificación de ácidos nucleicos diana en tiempo real usando métodos de amplificación de dianas *in vitro* tal como PCR. Además, el control en tiempo real durante la qPCR usando sustratos de MNAzima marcados con fluoróforos y pares de inactivadores genera una curva que puede indicar la eficiencia de una reacción por su valor de Ct y su inclinación (tasa de reacción). En este ejemplo, la amplificación y la detección se realizan en un proceso de una sola etapa, en el que la amplificación por PCR y la detección mediada por MNAzima ocurren simultáneamente en un solo tubo. La tasa de producción de la señal (medida por Ct y la inclinación de las curvas de reacción) a diferentes temperaturas de hibridación, tales como 52 °C y 58 °C (la temperatura de la que se recogieron los datos), puede verse influida por la secuencia del sustrato universal.

La temperatura de hibridación/detección para qPCR de MNAzimas usadas en la técnica está entre 50 y 54 °C. Esta temperatura fue dictada por el hecho de que los sustratos universales conocidos en la técnica tenían una limitación de la temperatura a la que se escindieron eficientemente con 54 °C, siendo el límite superior para los sustratos universales de la serie 1. Existe la necesidad de sustratos universales que se escindan a temperaturas más altas para permitir una mayor flexibilidad en el diseño de cebadores y partzimas que hibriden a temperaturas más altas.

Esta flexibilidad de diseño para cebadores y partzimas será de gran beneficio para muchas aplicaciones tales como dianas genéticas de interés que tienen altos porcentajes de bases G y C en su secuencia, requiriendo partzimas y cebadores con Tm más altas para la detección específica. La utilidad de los sustratos universales aumentaría enormemente si existieran sustratos que se escindieran eficientemente a un intervalo de temperaturas entre 52 y 58 °C.

En este ejemplo, las partzimas correspondientes a los sustratos universales de las series 1, 2 y 3 se diseñaron para dirigirse a una gama de genes, como se describe en la **Tabla 11**. Un experto en la técnica apreciará que cualquier secuencia de genes o transcripción de genes o cualquier otro producto de amplificación de ácido nucleico podría usarse como una diana como se describe aquí. Cada combinación de partzimas y sus sustratos universales asociados se ensayaron a temperaturas de hibridación de 52 °C y 58 °C en qPCR. Los resultados de esta comparación determinarán si los sustratos de las series 1, 2 y 3 dirigidos a diferentes genes, y a diferentes temperaturas de hibridación permiten el mismo nivel, mayor o menor, de eficiencia de escisión en la PCR en tiempo real. El nivel de eficiencia de escisión se determinó midiendo el valor de Ct y observando la inclinación de las curvas de reacción para las reacciones que contenían diferentes sustratos universales.

Tabla 11. Sustratos usados para detectar diferentes genes por qPCR de MNAzimas

Gen	Sustrato de la serie 1	Sustrato de la serie 2	Sustrato de la serie 3
CYP2C9	Sub3	-	Sub61
TP53	Sub6	-	Sub72, Sub74, y Sub79
B2M	-	Sub60	Sub61 y Sub79
HMBS	-	Sub49	Sub75
TFRC	Sub2	-	Sub72 y Sub80
RPL13a	-	Sub55	Sub80 y Sub88

4.1. Oligonucleótidos de partzima

En los experimentos realizados para medir la eficiencia de la escisión de los sustratos universales en la PCR en tiempo real, los oligonucleótidos de partzimas A y B se diseñaron con brazos sensores complementarios con los genes humanos CYP2C9, TP53, B2M, HMBS, RPL13a o TFRC. Las secuencias de las partzimas A y B se enumeran a continuación de 5' a 3', donde las bases subrayadas se hibridan con el sustrato. "-P" indica la fosforilación en 3' del oligonuleótido.

SEQ ID NO: 96 partzima A CYP2C9A/3-P:
GGGAAGAGGAGCATTGAGGAACAACGAGGTTGTGCTG
SEQ ID NO: 97 partzima B CYP2C9B/3-P:
CGGTTGGTGAGGCTAGCTCCGTGTTCAAGAGGAAGC
SEQ ID NO: 98 partzima A CYP2C9A/61-P:
GGGAAGAGGAGCATTGAGGAACAACGAGGGGTCGAG
SEQ ID NO: 99 partzima B CYP2C9B/61-P:
TGGCGTGGAGAGGCTAGCTCCGTGTTCAAGAGGAAGC
SEQ ID NO: 100 partzima A TP53A/6-P:
GACGGAACAGCTTTGAGGTGACAACGAGAGGCGTGAT
SEQ ID NO: 101 partzima B TP53B/6-P:
CTGGGAGGAAGGCTAGCTCGTGTTTGTGCCTGTCCTGG
SEQ ID NO: 103 partzima B TP53B/72-P:
CTGGGAGGAGAGGCTAGCTCGTGTTTGTGCCTGTCCTGG
SEQ ID NO: 104 partzima A TP53A/74-P:
GACGGAACAGCTTTGAGGTGACAACGAGGGGAGTGAT
SEQ ID NO: 105 partzima B TP53B/74-P:
CTGGGAGGGGAGGCTAGCTCGTGTTTGTGCCTGTCCTGG
SEQ ID NO: 106 partzima A TP53A/79-P:
GACGGAACAGCTTTGAGGTGACAACGAGGGGAGAGGA
SEQ ID NO: 107 partzima B TP53B/79-P:
GGTTGAAGGGGAGGCTAGCTCGTGTTTGTGCCTGTCCTGG
SEQ ID NO: 108 partzima A B2MA/60-P:
ATTCAGGTTTACTCACGTCATCACAACGAGTGGTTGGC
SEQ ID NO: 109 partzima B B2MB/60-P:

GTCGTGTTGGAGGCTAGCTCAGCAGAGAATGGAAAGTCAAA
SEQ ID NO: 110 partzima A B2MA/61-P
ATTCAGGTTTACTCACGTCATCACAACGAGGGGTCGAG
SEQ ID NO: 111 partzima B B2MB/61-P
TGGCGTGGAGAGGCTAGCTCAGCAGAGAATGGAAAGTCAAA
SEQ ID NO: 112 partzima A B2MA/79-P
ATTCAGGTTTACTCACGTCATCACAACGAGGGGAGAGGA
SEQ ID NO: 113 partzima B B2MB/79-P
GGTTGAAGGGGAGGCTAGCTCAGCAGAGAATGGAAAGTCAAA
SEQ ID NO: 114 partzima A HMBSA/49-P:
GCCATGTCTGGTAACGGCAAACAACGAGAGCCAAGTTTA
SEQ ID NO: 115 partzima B HMBSB/49-P:
TATCACAGCCAAGGCTAGCTTGCGGCTGCAACGGCGGTG
SEQ ID NO: 116 partzima A HMBSA/75-P:
GCCATGTCTGGTAACGGCAAACAACGAGAGGAGGGTCA
SEQ ID NO: 117 partzima B HMBSB/75-P:
TAGTGGGGAGAGGCTAGCTTGCGGCTGCAACGGCGGTG
SEQ ID NO: 34 partzima A TFRCA/2-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGAAACCTT
SEQ ID NO: 35 partzima B TFRCB/2-P:
TGCCCAGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 38 partzima A TFRCA/72-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGCGTGAT
SEQ ID NO: 55 partzima B TFRCB/72-P:
CTGGGAGGAGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 66 partzima A TFRCA/80-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGGCGGTT
SEQ ID NO: 67 partzima B TFRCB/80-P:
GGTTCACGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 118 partzima A RPL13aA/55-P
TTGACAAATACACAGAGGTCACAACGAGAGGTGCGGT
SEQ ID NO: 119 partzima B RPL13aB/55-P
GAGCTGGGGAGGCTAGCTCTCAAGACCCACGGACTCCT
SEQ ID NO: 120 partzima A RPL13aA/80-P
AATTGACAAATACACAGAGGTCACAACGAGAGGGCGGTT
SEQ ID NO: 121 partzima B RPL13aB/80-P
GGTTCACGGGAGGCTAGCTCTCAAGACCCACGGACTCCT
SEQ ID NO: 122 partzima A RPL13aA/88-P
AATTGACAAATACACAGAGGTCACAACGAGAGGGAGGAG

4.2. Sustratos indicadores

En el ejemplo actual, los sustratos se marcaron en el extremo 5' con un fluoróforo y se marcaron en el extremo 3' con un resto de inactivador. La **Tabla 12** muestra las combinaciones Sustrato - fluoróforo/inactivador. Algunos sustratos se ensayaron con más de una combinación particular de fluoróforo/inactivador. La escisión de los sustratos se control a diversas longitudes de onda de emisión y excitación (**Tabla 12**).

Tabla 12. Sustratos y su etiquetado fluorescente

Sustrato	Nombre	Fluoróforo	Inactivador^	Excitación*	Emisión*
Sub49	Sub49-FB	6-FAM	BHQ1	450-490	510-530
Sub3	Sub3-FIB		IB		
Sub61	Sub61-FIB				
Sub75	Sub75-FIB				
Sub55	Sub55-HIB	HEX	IB	515-535	560-580
Sub80	Sub80-HIB				
Sub88	Sub88-HIB				
Sub6	Sub6-TRB2	Texas Red	BHQ2	560-590	610-650
Sub72	Sub72-TRIBR		IBR		

Sub74	Sub74-TRIBR				
Sub79	Sub79-TRIBR				
Sub2	Sub2-Q670B2	Quasar 670	BHQ2	620-650	675-690
Sub72	Sub72-Q670B2				
Sub80	Sub80-Q670B2				
Sub60	Sub60-Q705B2	Quasar 705	BHQ2	672-684	705-730
Sub61	Sub61-Q705B2				
Sub79	Sub79-Q705B2				
^BHQ1; black hole quencher 1, BHQ2; black hole quencher 2, IB; Iowa black® FQ, IBR; Iowa black® RQ * El sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 (Biorad) excita y mide la emisión de cada fluoróforo en un intervalo de longitudes de onda para cada canal.					

Los sustratos indicadores ensayados en este ejemplo se muestran a continuación con la secuencia, 5' a 3'. Las bases en minúsculas representan ARN y las bases en mayúsculas representan ADN.

SEQ ID NO: 21 Sub2:
AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA
SEQ ID NO: 22 Sub3:
CAGCACAACCguCACCAACCG
SEQ ID NO: 23 Sub6:
ATCACGCCTCguTCCTCCCAG
SEQ ID NO: 28 Sub49:
TAAACTTGGCTCguTGGCTGTGATA
SEQ ID NO: 29 Sub55:
ACCGCACCTCguCCCCAGCTC
SEQ ID NO: 30 Sub60:
GCCAACCACguCCAACACGAC
SEQ ID NO: 73 Sub61:
CTCGACCCCguCTCCACGCCA
SEQ ID NO: 75 Sub72:
ATCACGCCTCguCTCCTCCCAG
SEQ ID NO: 77 Sub74:
ATCACTCCCCguCCCCTCCCAG
SEQ ID NO: 78 Sub75:
TGACCCTCCTCguCTCCCCACTA
SEQ ID NO: 80 Sub79:
TCCTCTCCCCguCCCCTTCAACC
SEQ ID NO: 81 Sub80:
AACCGCCCTCguCCCGTGAACC
SEQ ID NO: 88 Sub88:
CTCCTCCCTCguCCCCAGCTC

4.3. Secuencia diana y cebadores PCR para la amplificación de los genes CYP2C9, TP53, B2M, HMBS, TFRC y RPL13a

El ADN genómico humano extraído de la línea celular IM9 (Promega) se usó como plantilla para la amplificación *in vitro* de los genes diana. Los amplicones se generaron por qPCR usando los cebadores de oligonucleótidos de PCR que se enumeran a continuación. Las secuencias de cebador se enumeran de 5' a 3'. La secuencia en negrita en las secuencias de cebador corresponde a un marcador universal (U1, U2 o U3) que aumenta la Tm del cebador sin afectar a la especificidad del cebador con respecto a la diana génica. Este marcador mejora la eficiencia de amplificación en las reacciones de PCR.

SEQ ID NO: 91 Cebador directo 5TFRC_U1
GCTAAAACAATAACTCAGAACTTACG
SEQ ID NO: 92 Cebador inverso 3TFRC_U2
CAGCTTTCTGAGGTTACCATCCTA
SEQ ID NO: 123 Cebador directo 5B2M_U1
GCTAATCTTTTCCCGATATTCCTCAG

SEQ ID NO: 124 Cebador inverso 3B2M_U2
CAGCCCAGACACATAGCAATTCAG
SEQ ID NO: 125 Cebador directo 5TP53_U3
CTAACTTACTGCCTCTTGCTTCTC
SEQ ID NO: 126 Cebador inverso 3TP53_U2
CAGCTCTGTGCGCCGGTCTCTC
SEQ ID NO: 127 Cebador directo 5RPL13a_U3
CTAAACCGGAAGAAGAAACAGCTCA
SEQ ID NO: 128 Cebador inverso 3RPL13a_U2
CAGGAGGAATTAACAGTCTTTATTGG
SEQ ID NO: 129 Cebador directo 5CYP2C9_U3
CTAACCTCATGACGCTGCGGAA
SEQ ID NO: 130 Cebador inverso 3CYP2C9_U2
CAGATATGGAGTAGGGTCACCCA
SEQ ID NO: 131 Cebador directo 5HMBS_U3
CTAAACCCACACACAGCCTACTTTC
SEQ ID NO: 132 Cebador inverso 3HMBS_U2
CAGAGCCCAAAGTGTGCTGGTCA

4.4. Componentes de reacción: Amplificación y cuantificación de la secuencia diana

La amplificación por PCR en tiempo real y la detección de la secuencia diana se realizó en un volumen de reacción total de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron en un sistema de detección por PCR en tiempo real CFX96 (Bio-Rad). Las reacciones se configuraron con sustratos y sus partzimas asociadas como se muestra en la **Tabla 13**. Los parámetros de ciclado fueron;

1) 95 °C durante 2 minutos, 50 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 52 °C durante 60 segundos (datos recogidos en la etapa de 52 °C) o
2) 95 °C durante 2 minutos, 50 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 58 °C durante 60 segundos (datos recogidos en la etapa de 58 °C).

Cada conjunto de condiciones de reacción se realizó por duplicado y contenía 40 nM de cebador directo y 200 nM de cebador inverso, 200 nM de cada una de la partzima A y la partzima B, 200 nM de sustrato, 8 mM de $MgCl_2$, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de inhibidor RiboSafe RNase (Bioline), 1 x Inmunotampón (Bioline), 2 unidades de ADN polimerasa MyTaqHS™ (Bioline) y plantilla de ADN genómico (100 ng) o (NF-H_2O) no diana.

Tabla 13: Combinaciones de oligonucleótidos usadas para cada sustrato universal

Sustrato	Partzima A	Partzima B	Cebadores
Sub3 SEQ ID NO: 22	CYP2C9A/3-P SEQ ID NO: 96	CYP2C9B/3-P SEQ ID NO: 97	5CYP2C9 _U1 y 3CYP2C9_ U2 SEQ ID NO: 129 y SEQ ID NO: 130 respectivamente
Sub61 SEQ ID NO: 73	CYP2C9A/61-P SEQ ID NO: 98	CYP2C9B/61-P SEQ ID NO: 99	
Sub6 SEQ ID NO: 23	TP53A/6-P SEQ ID NO: 100	TP53B/6-P SEQ ID NO: 101	5TP53 _U1 y 3TP53_ U2 SEQ ID NO: 125 y SEQ ID NO: 126 respectivamente
Sub72 SEQ ID NO: 75	TP53A/6-P SEQ ID NO: 100	TP53B/72-P SEQ ID NO: 103	
Sub74 SEQ ID NO: 77	TP53A/74-P SEQ ID NO: 104	TP53B/74-P SEQ ID NO: 105	
Sub79 SEQ ID NO: 80	TP53A/79-P SEQ ID NO: 106	TP53B/79-P SEQ ID NO: 107	
Sub60 SEQ ID NO: 30	B2MA/60-P SEQ ID NO: 108	B2MB/60-P SEQ ID NO: 109	5B2M_U1 y 3B2M_U2 SEQ ID NO: 123 y SEQ ID NO: 124 respectivamente
Sub61 SEQ ID NO: 73	B2MA/61-P SEQ ID NO: 110	B2MB/61-P SEQ ID NO: 111	
Sub79 SEQ ID NO: 80	B2MA/79-P SEQ ID NO: 112	B2MB/79-P SEQ ID NO: 113	

Sub49 SEQ ID NO: 28	HMBSA/49-P SEQ ID NO: 114	HMBSB/49-P SEQ ID NO: 115	5HMBS _U1 y 3HMBS_ U2 SEQ ID NO: 131 y SEQ ID NO: 132 respectivamente
Sub75 SEQ ID NO: 72	HMBSA/75-P SEQ ID NO: 116	HMBSB/75-P SEQ ID NO: 117	
Sub2 SEQ ID NO: 21	TFRCA/2-P SEQ ID NO: 34	TFRCB/2-P SEQ ID NO: 35	5TFRC _U1 y 3TFRC_ U2 SEQ ID NO: 91 y SEQ ID NO: 92 respectivamente
Sub72 SEQ ID NO: 75	TFRCA/72-P SEQ ID NO: 38	TFRCB/72-P SEQ ID NO: 55	
SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 67	
Sub55 SEQ ID NO: 29	RPL13aA/55-P SEQ ID NO: 118	RPL13aB/55-P SEQ ID NO: 119	5RPL13a_U1 y 3RPL13a_U2 SEQ ID NO: 127 y SEQ ID NO: 128 respectivamente
Sub80 SEQ ID NO: 81	RPL13aA/80-P SEQ ID NO: 120	RPL13aB/80-P SEQ ID NO: 121	
Sub88 SEQ ID NO: 88	RPL13aA/88-P SEQ ID NO: 122	RPL13aB/55-P SEQ ID NO: 119	

4.5. Resultados: Amplificación de diana y escisión del sustrato indicador

Cada reacción de qPCR de MNAzimas que contenía ADN genómico humano mostró un aumento en la fluorescencia en el tiempo para la detección en tiempo real de los genes CYP2C9, TP53, B2M, HMBS, RPL13a y TFRC, a temperaturas de hibridación de 52 °C y 58 °C (**Figura 7**). Para todos los sustratos universales, la fluorescencia del control de diana sin ADN fue menor que en las reacciones que contenían diana de ADN. Esto demuestra que el aumento de la fluorescencia producida en las reacciones que contienen la diana se debe al ensamblaje dependiente de la diana de las MNAzimas catalíticamente activas que después escindió uno de los sustratos indicadores universales.

Los resultados de la detección por qPCR de MNAzimas de los genes CYP2C9 y TP53 mostraron que todos los sustratos universales ensayados se realizaron de manera equivalente a 52 °C con menos de 0,5 Ct de diferencia entre los sustratos y pendientes similares de las curvas de amplificación (**Tabla 14** y **Figura 7**, **(i)a** y **(ii)a** respectivamente). Los sustratos de la serie 1 ensayados (Sub3 y Sub6) tuvieron un rendimiento peor a la temperatura más alta de 58 °C que los sustratos de la serie 3 ensayados (Sub61, Sub72, Sub74 y Sub79) con una diferencia de más de 1 Ct entre los sustratos y una pendiente mucho más superficial para las curvas de amplificación para Sub3 y Sub6, lo que indica una reacción menos eficiente (**Tabla 14** y **Figura 7**, **(i)b** y **(ii)b** respectivamente). Estos datos muestran que el diseño mejorado de estos sustratos de la serie 3 (Sub61, Sub72, Sub74 y Sub79) conduce a una escisión más eficiente a 58 °C, y que este rendimiento mejorado a temperaturas elevadas no evita que estos sustratos se escindan de manera eficiente a una temperatura inferior.

Los resultados de la detección por qPCR de MNAzimas de los genes B2M y HMBS mostraron que todos los sustratos universales ensayados se realizaron de manera equivalente a 52 °C con solamente aproximadamente 0,5 Ct de diferencia entre los sustratos y pendientes similares de las curvas de amplificación (**Tabla 14** y **Figura 7**, **(iii)a** y **(iv)a** respectivamente). Los sustratos de la serie 2 ensayados (Sub60 y Sub49) tuvieron un rendimiento peor a la temperatura más alta de 58 °C que los sustratos de la serie 3 ensayados (Sub61 y Sub75, y Sub79) con una diferencia de más de 1 Ct entre los sustratos y una pendiente más superficial para las curvas de amplificación para Sub60 y Sub49 lo que indica una reacción menos eficiente (**Tabla 14** y **Figura 7**, **(iii)b** y **(iv)b** respectivamente). Estos datos muestran que el diseño mejorado de estos sustratos de la serie 3 (Sub61, Sub75 y Sub79) conduce a una escisión más eficiente a 58 °C, pero que este rendimiento mejorado a temperaturas elevadas no evita que los sustratos se escindan de manera eficiente a una temperatura inferior. El mejor rendimiento de los sustratos de la serie 3 frente a los sustratos de la serie 2 a 58 °C es atribuible al hecho de que los sustratos de la serie 3 siguen todas las directrices de diseño para sustratos altamente activos y los sustratos de la serie 2 no (véase la **Tabla 9**).

Los resultados de la detección por qPCR de MNAzimas del gen TFRC mostraron que todos los sustratos universales ensayados se realizaron de manera equivalente a 52 °C con solamente aproximadamente 0,5 Ct de diferencia entre los sustratos y pendientes similares de las curvas de amplificación (**Tabla 14** y **Figura 7**, **(v)a**). Los sustratos de la serie 3 ensayados (Sub72 y Sub80) tuvieron ambos un mejor rendimiento a 58 °C que el sustrato de la serie 1 ensayado (Sub2) con una diferencia de más de 1 Ct entre los sustratos y una pendiente más superficial para la curva de amplificación para Sub2, lo que indica una menor reacción eficiente (**Tabla 14** y **Figura 7**, **(v)b**). El sustrato

de la serie 3, Sub80, tuvo un mejor rendimiento a 58 °C que el sustrato de la serie 3, Sub72, con una diferencia de más de 1 Ct entre los sustratos. Sub80 sigue todas las directrices de diseño para sustratos altamente activos y Sub72 no (véase la **Tabla 9**).

Los resultados de la detección de qPCR de MNAzimas del gen RPL13a mostraron que a 52 °C, el sustrato de la serie 2 Sub55 y el sustrato de la serie 3 Sub88 eran mejores que el sustrato de la serie 3 Sub80 (**Tabla 14** y **Figura 7**, **(vi)a**). A 58 °C, el sustrato de la serie 3 Sub80 y el Sub55 de la serie 2 tuvieron el mismo rendimiento, y ambos sustratos tuvieron un mejor rendimiento que el sustrato de la serie 3 Sub88 (**Tabla 14** y **Figura 7**, **(vi)b**). El sustrato de la serie 2 Sub55 cumple con todas las directrices de diseño para sustratos altamente activos (véase la **Tabla 9**) y, por lo tanto, se espera que tenga un buen rendimiento. Sub88 de la serie 3 también cumple con todas las directrices de diseño para sustratos altamente activos (**Tabla 9**), pero no rinde tan bien como Sub55. En general, las directrices de diseño muestran una alta probabilidad de producir sustratos que se escindan de manera eficiente en condiciones de qPCR de MNAzimas.

En general, con un rango de diferentes secuencias diana, los sustratos de las series 1, 2 y 3 tuvieron un rendimiento de manera comparable en qPCR de MNAzimas realizada a 52 °C. A 58 °C, los sustratos de la serie 3 superaron a los sustratos de las series 1 y 2, con la excepción del sustrato de la serie 2 Sub55 que, como se ha explicado anteriormente, se encuentra dentro de todas las directrices de diseño para sustratos altamente activos. Estos datos muestran que las directrices de diseño, en general, producen sustratos que son fuertes y se escinden de manera eficiente a un intervalo de temperaturas en el contexto de los protocolos de termociclado utilizados para la qPCR.

Cabe destacar que algunos de los sustratos de la serie 3, indicados por (^) en la **Tabla 14**, tienen Tm muy altas y, por lo tanto, a temperaturas más bajas pueden tener una renovación más deficiente sobre el sustrato escindido y, por lo tanto, aunque la actividad es comparable con los otros sustratos, el valor de fluorescencia final es menor.

Tabla 14. Sustrato escindido por MNAzimas dirigidas a diferentes genes.

		52 °C			58 °C		
Gen	**Sustrato**	**Curva de amplificación***	**Ct**	**Dif. en Ct**	**Curva de amplificación***	**Ct**	**Dif. en Ct**
CYP2C9	Sub3	Sub3 = Sub61	22,9	<0,5	Sub61 > Sub3	26,7	>1,0
	Sub61		22,5			25,2	
TP53	Sub6	Todos equivalentes (^Sub79)	23,0	<0,5	Sub79 > Sub74 > Sub72 >> Sub6	27,4	(Sub79 y Sub6) > 1,5
	Sub72		22,7			24,2	
	Sub74		22,7			25,1	
	Sub79		22,6			25,8	
B2M	Sub60	Sub60 = Sub61>Sub79 (^Sub79)	24,0	(Sub60 y Sub61) 0,1	Sub61 = Sub79 >> Sub60	28,5	>2,0
	Sub61		23,9			25,5	
	Sub79		24,6			25,7	
HMBS	Sub49	Sub49 = Sub75 (^Sub75)	25,1	0,1	Sub75 > Sub49	28,1	>1,0
	Sub75		25,0			27,0	
TFRC	Sub2	Sub72 > Sub2 = Sub80 (^Sub80)	23,8	0,6	Sub80 > Sub72 >> Sub2	27,1	(Sub80 y Sub2) > 2,0
	Sub72		23,2			25,7	
	Sub80		23,4			24,8	
RPL13a	Sub55	Sub55 = Sub88 > Sub80 (^Sub80)	20,3	(Sub55 y Sub88) < 0,5	Sub80 > Sub55 > Sub88	22,6	(Sub55 y Sub88) > 2,0
	Sub80		21,0			22,3	
	Sub88		20,3			24,3	

*La forma de la curva de amplificación (inclinación y tiempo necesario para alcanzar la meseta) demuestra la eficacia de la reacción.
^ La Tm de estos sustratos es demasiado alta para temperaturas de reacción más bajas y esto puede dar como resultado una baja renovación de las porciones escindidas del sustrato y, por lo tanto, valores de fluorescencia finales más bajos.

Ejemplo 5: Uso de sustratos universales con ADNzimas

La ADNzima 10-23 es una estructura unimolecular que puede unirse directamente, y modificar, una secuencia de sustrato. La ADNzima 10-23 tiene utilidad en aplicaciones de diagnóstico *in vitro*. Debido a la similitud en la región catalítica, la ADNzima 10-23 puede unirse y escindir los sustratos que se pueden escindir por la MNAzima basada

en la ADNzima 10-23. A diferencia de la MNAzima, la ADNzima no necesita una secuencia diana para formar el núcleo activo y, por lo tanto, la unión y la escisión posterior del sustrato por la ADNzima 10-23 no se ve influenciada por la secuencia diana y no utiliza un núcleo catalítico dividido. La capacidad de las ADNzimas 10-23 emparejadas para escindir los sustratos universales de la serie 1 (Sub2, Sub3 y Sub6), los sustratos universales de la serie 2 (Sub44, Sub45, Sub49, Sub55 y Sub60T) y los sustratos de la serie 3 (Sub61, Sub72, Sub73, Sub74, Sub75, Sub77, Sub79, Sub80, Sub84, Sub85, Sub86, Sub87, Sub88, y Sub89) se midió para determinar si las directrices de diseño de la presente divulgación conducen al desarrollo de sustratos que pueden escindirse por las ADNzimas 10-23 con alta actividad y robustez en un intervalo de temperaturas.

5.1. Oligonucleótidos de ADNzimas 10-23

Se diseñó una serie de ADNzimas 10-23 con brazos sensores complementarios a los sustratos descritos anteriormente y enumerados en las Tablas 4 y 5. Las secuencias de las ADNzimas se enumeran a continuación de 5' a 3', donde las bases subrayadas se hibridan con el sustrato y las bases en cursiva forman el núcleo catalítico. Algunas de las secuencias de ADNzima a continuación contienen una G extra en los extremos 5' y 3' (por ejemplo, Dz55). Estas bases añadidas no se hibridan con los sustratos y no afectan a la eficiencia con la que la ADNzima escindió el sustrato.

SEQ ID NO: 133 ADNzima Dz2
TGCCCAGGGAGGCTAGCTACAACGAGAGGAAACCTT
SEQ ID NO: 134 ADNzima Dz3
CGGTTGGTGAGGCTAGCTACAACGAGGTTGTGCTG
SEQ ID NO: 135 ADNzima Dz6
CTGGGAGGAAGGCTAGCTACAACGAGAGGCGTGAT
SEQ ID NO: 136 ADNzima Dz44
TCACTATAGGGAGGCTAGCTACAACGAGAGGAGACCTG
SEQ ID NO: 137 ADNzima Dz45
TTCCAAAGGAGA*GGCTAGCTACAACGA*GGGACCCGT
SEQ ID NO: 138 ADNzima Dz49
TATCACAGCCAA*GGCTAGCTACAACGA*GAGCCAAGTTTA
SEQ ID NO: 139 ADNzima Dz55
G*GAGCTGGGGA*GGCTAGCTACAACGAGAGGTGCGGTG
SEQ ID NO: 140 ADNzima Dz60
GTCGTGTTGGA*GGCTAGCTACAACGA*GTGGTTGGC
SEQ ID NO: 141 ADNzima Dz61
GTGGCGTGGAGA*GGCTAGCTACAACGA*GGGGTCGAGG
SEQ ID NO: 142 ADNzima Dz72
GCTGGGAGGAGA*GGCTAGCTACAACGA*GAGGCGTGATG
SEQ ID NO: 143 ADNzima Dz73
GCACGAGGGGA*GGCTAGCTACAACGA*GGGGACGCCAG
SEQ ID NO: 144 ADNzima Dz74
GCTGGGA*GGGGAGGCTAGCTACAACGA*GGGGAGTGATG
SEQ ID NO: 145 ADNzima Dz75
GTAGTGGGGAGA*GGCTAGCTACAACGA*GAGGAGGGTCAG
SEQ ID NO: 146 ADNzima Dz77
GAGGAGGAGGGA*GGCTAGCTACAACGA*GAGGGAGGAGG
SEQ ID NO: 147 ADNzima Dz79
GGGTTGAAGGGGA*GGCTAGCTACAACGAGGGGA*GAGGAG
SEQ ID NO: 148 ADNzima Dz80
GGGTTCACGGGA*GGCTAGCTACAACGA*GAGGGCGGTTGG
SEQ ID NO: 149 ADNzima Dz84
GCTGGGAGGAGA*GGCTAGCTACAACGA*GAGGTGCGGTG
SEQ ID NO: 150 ADNzima Dz85
GCTGGGAGGGGA*GGCTAGCTACAACGA*GAGGTGCGGTG
SEQ ID NO: 151 ADNzima Dz86
GGAGCTGGGGA*GGCTAGCTACAACGA*GAGGCGTGATG
SEQ ID NO: 152 ADNzima Dz87
GGAGCTGGGGA*GGCTAGCTACAACGA*GGGGAGTGATG
SEQ ID NO: 153 ADNzima Dz88

GGAGCTGGGGA*GGCTAGCTACAACGA*GAGGGAGGAGG
SEQ ID NO: 154 ADNzima Dz89
GAGGAGGAGGGAGGCTAGCTACAACGAGAGGTGCGGTG

5.2. Sustratos indicadores

En el ejemplo actual, los sustratos se marcaron en sus extremos con un resto 6-FAM en el extremo 5' (indicado por "F" en el nombre de los sustratos a continuación) y un resto inactivador Iowa Black® FQ en el extremo 3' (indicado por "IB" en el nombre de los sustratos a continuación). La escisión de los sustratos se controló entre 510-530 nm (rango de longitud de onda de emisión de FAM en CFX96 (BioRad)) con excitación entre 450-490 nm (rango de longitud de onda de excitación de FAM en CFX96 (BioRad)). Los sustratos indicadores para este ejemplo se muestran a continuación con la secuencia, de 5' a 3'. Las bases en minúsculas representan ARN y las bases en mayúsculas representan ADN.

SEQ ID NO: 21 Sub2-FIB:
AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA
SEQ ID NO: 22 Sub3-FIB:
CAGCACAACCguCACCAACCG
SEQ ID NO: 23 Sub6-FIB:
ATCACGCCTCguTCCTCCCAG
SEQ ID NO: 25 Sub44-FIB:
CAGGTCTCCTCguCCCTATAGTGA
SEQ ID NO: 26 Sub45-FIB:
ACGGGTCCCguCTCCTTTGGAA
SEQ ID NO: 28 Sub49-FB:
TAAACTTGGCTCguTGGCTGTGATA
SEQ ID NO: 29 Sub55-FIB:
ACCGCACCTCguCCCCAGCTC
SEQ ID NO: 72 Sub60T-FIB:
TGCCAACCACguCCAACACGAC
SEQ ID NO: 73 Sub61-FIB:
CTCGACCCCguCTCCACGCCA
SEQ ID NO: 75 Sub72-FIB:
ATCACGCCTCguCTCCTCCCAG
SEQ ID NO: 76 Sub73-FB:
TGGCGTCCCCguCCCCTCGTG
SEQ ID NO: 77 Sub74-FIB:
ATCACTCCCCguCCCCTCCCAG
SEQ ID NO: 78 Sub75-FIB:
TGACCCTCCTCguCTCCCCACTA
SEQ ID NO: 79 Sub77-FB:
CTCCTCCCTCguCCCTCCTCCT
SEQ ID NO: 80 Sub79-FIB:
TCCTCTCCCCguCCCCTTCAACC
SEQ ID NO: 81 Sub80-FIB:
AACCGCCCTCguCCCGTGAACC
SEQ ID NO: 84 Sub84-FIB:
ACCGCACCTCguCTCCTCCCAG
SEQ ID NO: 85 Sub85-FIB:
ACCGCACCTCguCCCCTCCCAG
SEQ ID NO: 86 Sub86-FIB:
ATCACGCCTCguCCCCAGCTC
SEQ ID NO: 87 Sub87-FIB:
ATCACTCCCCguCCCCAGCTC
SEQ ID NO: 88 Sub88-FIB:
CTCCTCCCTCguCCCCAGCTC
SEQ ID NO: 89 Sub89-FIB:
ACCGCACCTCguCCCTCCTCCT

5.3. Componentes de reacción: Escisión de un sustrato por una ADNzima a temperaturas entre 50 °C y 60 °C

La escisión de un sustrato se midió por un aumento en la señal fluorescente causada por la unión y la posterior escisión por una ADNzima emparejada. Se establecieron reacciones separadas para medir la escisión de cada sustrato con su ADNzima correspondiente (oligonucleótidos como en la **Tabla 15**). Las reacciones contenían 1 x Tampón PCR II (Applied Biosystems), $MgCl_2$ 10 mM, sustrato 200 nM y NF-H_2O en un volumen total de 25 µl. Cada reacción se realizó por duplicado como una reacción de "prueba" (adición de ADNzima 1 nM) o "control" (adición de NF-H_2O). Las reacciones se realizaron en un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96™ (BioRad) a 50, 52, 54, 56, 58 y 60 °C. La fluorescencia para cada reacción se programó para leerse después de 1 segundo durante los primeros 50 ciclos y luego se programó para que se leyera después de 25 segundos para los siguientes 50 ciclos.

Tabla 15: ADNzimas ensayadas con sustratos coincidentes

Sustrato	ADNzima
Sub2 SEQ ID NO: 21	Dz2 SEQ ID NO: 133
Sub3 SEQ ID NO: 22	Dz3 SEQ ID NO: 134
Sub6 SEQ ID NO: 23	Dz6 SEQ ID NO: 135
Sub44 SEQ ID NO: 25	Dz44 SEQ ID NO: 136
Sub45 SEQ ID NO: 26	Dz45 SEQ ID NO: 137
Sub49 SEQ ID NO: 28	Dz49 SEQ ID NO: 138
Sub55 SEQ ID NO: 29	Dz55 SEQ ID NO: 139
Sub60T SEQ ID NO: 72	Dz60 SEQ ID NO: 140
Sub61 SEQ ID NO: 73	Dz61 SEQ ID NO: 141
Sub72 SEQ ID NO: 75	Dz72 SEQ ID NO: 142
Sub73 SEQ ID NO: 76	Dz73 SEQ ID NO: 143
Sub74 SEQ ID NO: 77	Dz74 SEQ ID NO: 144
Sub75 SEQ ID NO: 78	Dz75 SEQ ID NO: 145
Sub77 SEQ ID NO: 79	Dz77 SEQ ID NO: 146
Sub79 SEQ ID NO: 80	Dz79 SEQ ID NO: 147
Sub80 SEQ ID NO: 81	Dz80 SEQ ID NO: 148
Sub84 SEQ ID NO: 84	Dz84 SEQ ID NO: 149
Sub85 SEQ ID NO: 85	Dz85 SEQ ID NO: 150
Sub86 SEQ ID NO: 86	Dz86 SEQ ID NO: 151
Sub87 SEQ ID NO: 87	Dz87 SEQ ID NO: 152
Sub88 SEQ ID NO: 88	Dz88 SEQ ID NO: 153
Sub89 SEQ ID NO: 89	Dz89 SEQ ID NO: 154

5.5. Resultados: Escisión de un sustrato por una ADNzima a diversas temperaturas

Cada reacción de ensayo que contenía ADNzimas con sustratos emparejados mostró un aumento de la fluorescencia con el tiempo. No hubo aumento en la fluorescencia de las reacciones de control de agua solamente (sin adición de ADNzima). Esto demuestra que el aumento en la fluorescencia producida en las reacciones que contenían ADNzima se debió a la unión y posterior escisión catalítica del sustrato indicador por la ADNzima.

Para cada conjunto de datos de sustrato (reacciones de ensayo y control), los puntos de datos de fluorescencia sin procesar se exportaron a Excel (Microsoft), los valores duplicados se promediaron y luego se normalizaron. La normalización se realizó dividiendo cada punto de datos promedio por el valor promedio de la reacción sin ADNzima en la primera lectura de reacciones que contenían el mismo sustrato (por ejemplo, los datos promediados para las reacciones de ensayo para Sub61 se dividieron por la fluorescencia promediada en el ciclo 1 para la reacción de control sin ADNzima Sub61; los datos promediados para las reacciones de control sin ADNzima para Sub61 se dividieron por la fluorescencia promediada en el ciclo 1 para la reacción de control sin ADNzima Sub61). Estos datos normalizados se utilizaron entonces para calcular la relación señal-ruido aproximadamente 10 minutos después del inicio de la reacción, dividiendo la fluorescencia normalizada de la reacción de ensayo a los 10 minutos por la fluorescencia normalizada de la reacción sin ADNzima en 10 minutos. Este cálculo de la relación señal-ruido se realizó para cada combinación de ADNzima y sustrato y a cada temperatura ensayada. El valor de la relación señal-ruido se representó entonces en un gráfico de barras para comparar la eficiencia de la escisión de cada sustrato por su ADNzima correspondiente a las distintas temperaturas (**Figura 8, (i)**). La desviación estándar de la relación señal-

ruido para cada sustrato en el intervalo de temperatura también se calculó y se representó para determinar los sustratos con una relación señal-ruido constante en el intervalo de temperaturas ensayado (**Figura 8, (ii)**). Esto sugiere que estos sustratos son robustos con respecto a la temperatura.

Debido a un error experimental, no hay datos para Sub2 a 54 °C ni para Sub79 a 58 °C, sin embargo, esto tiene un impacto mínimo en la interpretación general de los datos.

El análisis de la relación señal-ruido para cada sustrato (**Figura 8, (i)**) muestra que los sustratos de la serie 1 (Sub2, Sub3 y Sub6) tenían una alta relación señal-ruido a las temperaturas más bajas medidas. Sin embargo, la eficiencia de escisión de estos sustratos disminuyó drásticamente a medida que aumentó la temperatura de reacción. Se observó un patrón similar para un subconjunto de los sustratos de la serie 2 (Sub44, Sub45, Sub49 y Sub60T). El otro sustrato de la serie 2 (Sub55), y la mayoría de los sustratos de la serie 3 ensayados (Sub61, Sub72, Sub74, Sub75, Sub79, Sub80, Sub84, Sub85, Sub86, Sub87, Sub88 y Sub89) mostraron una relación señal-ruido alta en todas las temperaturas ensayadas. Los sustratos de la serie 3 Sub73 y Sub77 tenían una relación señal-ruido uniformemente baja a todas las temperaturas ensayadas, lo que indica que, aunque las nuevas directrices de diseño ofrecen una buena probabilidad de diseño de sustratos robustos (83% de tasa de éxito para esta aplicación), todavía habrá algunas secuencias que cumplan estas directrices pero que no sean adecuadas para un subconjunto de aplicaciones de diagnóstico de MNAzima y/o ADNzima. Los resultados para Sub73 y Sub77 también demuestran que los métodos que utilizan ADNzimas para el cribado en masa de posibles secuencias de sustratos para encontrar las que son adecuadas para las aplicaciones de diagnóstico de MNAzima pueden pasar por alto la detección de sustratos que serían robustos y eficientemente escindidos por las MNAzimas en aplicaciones de qPCR y viceversa (véase el Ejemplo 2 para la utilización exitosa de Sub73 y Sub77 en qPCR de MNAzimas, **Figura 5**).

En general, la mayor parte de los sustratos que cumplen cada una de las directrices de diseño (**Tabla 9**) mostraron una mayor relación señal-ruido en todo el intervalo de temperatura ensayado que los sustratos que quedaron fuera de una o más de estas directrices (**Figura 8, (i)**). Más específicamente, las reacciones con Sub55, Sub61, Sub72, Sub74, Sub75, Sub79, Sub80, Sub84, Sub85, Sub86, Sub87, Sub88 y Sub89 mostraron valores altos de la relación señal-ruido a cada temperatura ensayada, lo que demuestra que son sustratos robustos en un intervalo de temperaturas. Esta mejora fue más evidente cuando se calculó la desviación estándar de la relación señal-ruido a través de las temperaturas para cada sustrato **(Figura 8, (ii)).** Esta medida de variabilidad indicó que, en el intervalo de temperatura ensayado, el sustrato de la serie 2, Sub55 y los sustratos de la serie 3 Sub61, Sub72 Sub74, Sub75, Sub79, Sub80, Sub82, Sub83, Sub85, Sub86, Sub87, Sub88 y Sub89, tenían una relación señal-ruido similar en las temperaturas ensayadas, lo que demuestra que son sustratos robustos en un amplio intervalo de temperaturas. Se ha de tener en cuenta que aunque Sub60T, Sub73 y Sub77 demuestran una baja desviación estándar en la relación señal-ruido en el intervalo de temperatura, la relación señal-ruido absoluta es muy baja a todas las temperaturas, excluyendo estos sustratos de ser un sustrato robusto en esta aplicación.

Ejemplo 6: Prueba de escisión no específica de sustratos universales con qPCR de MNAzimas.

Las MNAzimas se pueden usar para controlar la amplificación de ácidos nucleicos diana en tiempo real usando métodos de amplificación de dianas *in vitro* tal como PCR. La amplificación y la detección se realizan en un proceso de una sola etapa, en el que la amplificación por PCR y la detección mediada por MNAzima ocurren simultáneamente en un solo tubo. Se pueden amplificar y detectar múltiples dianas en un solo recipiente de reacción utilizando partzimas con brazos sensores específicos para las dianas individuales. Las partzimas para la detección de una primera diana se unirán a y escindirán un primer sustrato, las partzimas para la detección de una segunda diana se unirán a y escindirán un segundo sustrato, etc. Para que la detección de dianas sea específica, no puede haber escisión no específica de un sustrato por partzimas diseñadas para escindir cualquier otro sustrato en la mezcla de reacción.

El grado de complementariedad de los brazos sensores de sustrato de las partzimas de MNAzima con otros sustratos presentes en la reacción influye en la especificidad de la unión. La complementariedad completa de las bases más cercanas a los ribonucleótidos es más crucial para la escisión específica. Las directrices de diseño para la creación de sustratos universales eficientemente escindido incluyen restricciones en torno a la composición de la secuencia de los sustratos universales, es decir, siete o más nucleótidos de citosina en las diez bases que rodean los ribonucleótidos (N_4-N_{13}); las bases inmediatamente adyacentes a los ribonucleótidos son citosinas (N_8 y N_9); el contenido total de sustrato tiene >64% de pirimidinas. Estas restricciones pueden conducir a similitudes en la secuencia del sustrato cerca de los ribonucleótidos, y posiblemente dar como resultado una escisión no específica de un sustrato universal por partzimas parcialmente emparejadas, especialmente en un formato múltiplex donde una gama de sustratos universales están presentes con sus partzimas asociadas en una sola mezcla de reacción. Si un

sustrato se escinde de una manera no específica mediante partzimas parcialmente emparejadas diseñadas para escindir específicamente un segundo sustrato, entonces esa combinación particular de sustratos puede no ser adecuada para su uso en formato múltiplex.

En este ejemplo, los sustratos universales Sub44, Sub55, Sub61, Sub65, Sub72 y Sub74 se ensayaron para determinar la actividad de escisión no específica por las partzimas asociadas con Sub44, Sub55, Sub72 y Sub74. Esto implicó probar cada sustrato universal individualmente con pares de partzimas diseñados para unirse con complementariedad total a los otros sustratos para ver si se detectó una señal en un formato de qPCR de MNAzimas. Las partzimas de Sub72 y Sub74 se eligieron para este ensayo ya que sus sustratos respectivos difieren solo en 3 bases (**Figura 9**, **(i)a** y **(ii)a**). Las partzimas de Sub55 se eligieron para ensayarse con Sub61 y Sub65 ya que son muy similares en la región central alrededor de los ribonucleótidos (N_4-N_{13}) (**Figura 9**, **(iii)a**). Las partzimas de Sub44 se eligieron como control ya que son menos similares a los otros sustratos (**Figura 9, (iv)a**).

6.1. Oligonucleótidos de partzima

En los experimentos realizados para ensayar la escisión inespecífica por partzimas no complementarias, los oligonucleótidos de partzimas A y B se diseñaron con brazos sensores diana complementarios al gen RPL13a humano y brazos sensores de sustrato complementarios a cada uno de los sustratos universales como se ha analizado anteriormente. Las secuencias de las partzimas A y B se enumeran a continuación de 5' a 3', donde las bases subrayadas se hibridan con el sustrato. "-P" indica la fosforilación en 3' del oligonuleótido.

SEQ ID NO: 155 partzima A RPL13aA/44-P:
AATTGACAAATACACAGAGGTCACAACGAGAGGAGACCTG
SEQ ID NO: 156 partzima B RPL13aB/44-P:
TCACTATAGGGAGGCTAGCTCTCAAGACCCACGGACTCCT
SEQ ID NO: 118 partzima A RPL13aA/55-P
TTGACAAATACACAGAGGTCACAACGAGAGGTGCGGT
SEQ ID NO: 119 partzima B RPL13aB/55-P
GAGCTGGGGAGGCTAGCTCTCAAGACCCACGGACTCCT
SEQ ID NO: 157 partzima A RPL13aA/72-P:
AATTGACAAATACACAGAGGTCACAACGAGAGGCGTGAT
SEQ ID NO: 158 partzima B RPL13aB/72-P:
CTGGGAGGAGAGGCTAGCTCTCAAGACCCACGGACTCCT
SEQ ID NO: 159 partzima A RPL13aA/74-P:
AATTGACAAATACACAGAGGTCACAACGAGGGGAGTGAT
SEQ ID NO: 160. partzima B RPL13aB/74-P:
CTGGGAGGGGAGGCTAGCTCTCAAGACCCACGGACTCCT

6.2. Sustratos indicadores

En el ejemplo actual, los sustratos se marcaron en sus extremos con un resto 6-FAM en el extremo 5' (indicado por "F" en el nombre de los sustratos a continuación) y un resto inactivador Iowa Black® FQ en el extremo 3' (indicado por "IB" en el nombre de los sustratos a continuación). La escisión de los sustratos se controló a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con una excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación de FAM). Los sustratos indicadores para este ejemplo se muestran a continuación con la secuencia, de 5' a 3'. Las bases en minúsculas representan ARN y las bases en mayúsculas representan ADN.

SEQ ID NO: 25 Sub44-FB:
CAGGTCTCCTCguCCCTATAGTGA
SEQ ID NO: 29 Sub55-FB:
ACCGCACCTCguCCCCAGCTC
SEQ ID NO: 73 Sub61-FB:
CTCGACCCCguCTCCACGCCA
SEQ ID NO: 74 Sub65-FB:
TCTCGACCTCguCTCCACGCCA
SEQ ID NO: 75 Sub72-FB:
ATCACGCCTCguCTCCTCCCAG
SEQ ID NO: 77 Sub74-FB:
ATCACTCCCCguCCCCTCCCAG

6.3. Secuencia diana y cebadores de PCR para la amplificación de RPL13a

La secuencia diana para este ejemplo era un amplicón de PCR a partir del gen RPL13a generado por la amplificación PCR *in vitro* de ADN genómico humano, extraído de la línea celular IM9 (Promega), usando los cebadores de PCR de oligonucleótidos enumerados a continuación. Los sustratos indicadores para este ejemplo se muestran a continuación con la secuencia, de 5' a 3'.

SEQ ID NO: 161 Cebador directo 5RPL13a:
ACCGGAAGAAGAAACAGCTCA
SEQ ID NO: 162 Cebador inverso 3RPL13a:
GAGGAATTAACAGTCTTTATTGG

6.4. Componentes de reacción: Amplificación y medición de la escisión específica y no específica de sustratos universales

La amplificación por PCR en tiempo real y la detección de la secuencia diana se realizó en un volumen de reacción total de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron en un sistema Mx3005P QPCR (Stratagene). Los parámetros de ciclado fueron 95 °C durante 2 minutos, 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 52 °C durante 60 segundos (datos recogidos a 52 °C). Las reacciones se llevaron a cabo con sustratos y partzimas como en la **Tabla 16.** Cada conjunto de condiciones de reacción se ensayó por duplicado y contenía 40 nM de 5RPL13a y 200 nM de 3RPL13a, 200 nM de partzima A, 200 nM de partzima B, 200 nM de sustrato, 8 mM de $MgCl_2$, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de RNasin (Promega), 1 x Inmunotampón (Bioline), 2 unidades de ADN polimerasa MyTaqHS™ (Bioline) y plantilla de ADN genómico (50 ng) o (NF-H_2O) no diana.

Tabla 16: Combinaciones de partzimas usadas para cada sustrato universal

Partzimas	Sustrato	Prueba:
RPL13aA/44-P SEQ ID NO: 155 y RPL13aB/44-P SEQ ID NO: 156	Sub44 SEQ ID NO: 25	Escisión específica
	Sub55 SEQ ID NO: 29	Escisión no específica
	Sub61 SEQ ID NO: 73	Escisión no específica
	Sub65 SEQ ID NO: 74	Escisión no específica
	Sub72 SEQ ID NO: 75	Escisión no específica
	Sub74 SEQ ID NO: 77	Escisión no específica
RPL13aA/55-P SEQ ID NO: 118 y RPL13aB/55-P SEQ ID NO: 119	Sub44 SEQ ID NO: 25	Escisión no específica
	Sub55 SEQ ID NO: 29	Escisión específica
	Sub61 SEQ ID NO: 73	Escisión no específica
	Sub65 SEQ ID NO: 74	Escisión no específica
	Sub72 SEQ ID NO: 75	Escisión no específica
	Sub74 SEQ ID NO: 77	Escisión no específica
RPL13aA/72-P SEQ ID NO: 157 y RPL 13aB/72-P SEQ ID NO: 158	Sub44 SEQ ID NO: 25	Escisión no específica
	Sub55 SEQ ID NO: 29	Escisión no específica
	Sub61 SEQ ID NO: 73	Escisión no específica

	Sub65 SEQ ID NO: 74	Escisión no específica
	Sub72 SEQ ID NO: 75	Escisión específica
	Sub74 SEQ ID NO: 77	Escisión no específica
RPL13aA/74-P SEQ ID NO: 159 y RPL13aB/74-P SEQ ID NO: 160	Sub44 SEQ ID NO: 25	Escisión no específica
	Sub55 SEQ ID NO: 29	Escisión no específica
	Sub61 SEQ ID NO: 73	Escisión no específica
	Sub65 SEQ ID NO: 74	Escisión no específica
	Sub72 SEQ ID NO: 75	Escisión no específica
	Sub74 SEQ ID NO: 77	Escisión específica

6.5. Resultados: Medición de la escisión específica y no específica potencial por una MNAzima

Hubo un aumento en la fluorescencia en todas las reacciones que contenían ADN genómico y un sustrato universal con partzimas con brazos sensores de sustrato que eran completamente complementarios con el sustrato universal (es decir, pruebas de reacciones para escisión específica). La fluorescencia de los controles diana sin ADN fue menor que la fluorescencia en las pruebas de reacción para la escisión específica, lo que demuestra que el aumento de la fluorescencia en las pruebas de reacción para la escisión específica se debió al ensamblaje dependiente de la diana de MNAzimas catalíticamente activas que luego escindieron completamente los sustratos indicadores universales completamente complementarios.

No hubo aumento de la fluorescencia en ninguna reacción de prueba de reactividad cruzada (**Figura 9, (i)b** - **(iv)b**). Esto demuestra que las partzimas diseñadas para escindir estos sustratos universales estrechamente relacionados solo escindieron los sustratos con los que tenían total complementariedad. Estos datos muestran que estos sustratos universales son compatibles en los ensayos múltiplex por qPCR de MNAzimas.

Ejemplo 7: Prueba de escisión no específica de sustratos universales con ADNzimas

La ADNzima 10-23 es una estructura unimolecular que puede unirse directamente, y modificar, una secuencia de sustrato. A diferencia de la MNAzima, la ADNzima 10-23 no necesita una secuencia diana para formar el núcleo activo, por lo tanto, la unión y la escisión posterior del sustrato por la ADNzima 10-23 no se ve influenciada por la secuencia diana o por tener un núcleo catalítico dividido.

El grado de complementariedad de los brazos sensores de las ADNzimas con el sustrato influye en la especificidad de unión. La complementariedad completa de las bases más cercanas a los ribonucleótidos es más crucial para la escisión específica. Las directrices de diseño para la creación de sustratos universales eficientemente escindido incluyen restricciones en torno a la composición de la secuencia de los sustratos universales, es decir, siete o más nucleótidos de citosina en las diez bases que rodean los ribonucleótidos (N_4-N_{13}); las bases inmediatamente adyacentes a los ribonucleótidos son citosinas (N_8 y N_9); el contenido total de sustrato tiene >64% de pirimidinas. Estas restricciones pueden conducir a similitudes en la secuencia del sustrato cerca de los ribonucleótidos, y posiblemente dar como resultado una escisión no específica de un sustrato universal por ADNzimas parcialmente emparejadas, especialmente en un formato múltiplex donde una gama de sustratos universales están presentes con sus ADNzimas asociadas en una sola mezcla de reacción. Si un sustrato se escinde de una manera no específica mediante ADNzimas parcialmente emparejadas diseñadas para escindir específicamente un segundo sustrato, entonces esa combinación particular de sustratos puede no ser adecuada para su uso en formato múltiplex.

En este ejemplo, los sustratos universales Sub55, Sub61, Sub72, Sub74, Sub75, Sub79, Sub80 y Sub85 y sus ADNzimas 10-23 asociadas se ensayaron para determinar su actividad de escisión no específica. Esto implicó ensayar cada sustrato universal individualmente con las ADNzimas diseñadas para unirse con total complementariedad a todos los demás sustratos para ver si una señal podría detectarse en un formato de detección

isotérmica. Estos sustratos se eligieron para ensayarse ya que tienen secuencias similares en diferentes áreas del sustrato.

7.1. Oligonucleótidos de ADNzimas 10-23

Las ADNzimas 10-23 utilizadas en los experimentos realizados para ensayar la escisión no específica por ADNzimas no complementarias se enumeran a continuación de 5' a 3', donde las bases subrayadas hibridan con el sustrato y las bases en cursiva forman el núcleo catalítico. Algunas de las secuencias de ADNzima a continuación contienen una G extra en los extremos 5' y 3'. Estas bases añadidas no se hibridan con la secuencia de sustratos y no afectan a la eficiencia con la que la ADNzima escindió el sustrato.

SEQ ID NO: 139 ADNzima Dz55
G<u>GAGCTGGGGA</u>*GGCTAGCTACAACGA*<u>GAGGTGCGGTG</u>
SEQ ID NO: 141 ADNzima Dz61
G<u>TGGCGTGGAGA</u>*GGCTAGCTACAACGA*<u>GGGGTCGAG</u>G
SEQ ID NO: 142 ADNzima Dz72
G<u>CTGGGAGGAGA</u>*GGCTAGCTACAACGA*<u>GAGGCGTGAT</u>G
SEQ ID NO: 144 ADNzima Dz74
G<u>CTGGGAGGGGA</u>*GGCTAGCTACAACGA*<u>GGGGAGTGAT</u>G
SEQ ID NO: 145 ADNzima Dz75
G<u>TAGTGGGGAGA</u>*GGCTAGCTACAACGA*<u>GAGGAGGGTCA</u>G
SEQ ID NO: 147 ADNzima Dz79
G<u>GGTTGAAGGGGA</u>*GGCTAGCTACAACGA*<u>GGGGAGAGGA</u>G
SEQ ID NO: 148 ADNzima Dz80
G<u>GGTTCACGGGA</u>*GGCTAGCTACAACGAGA*<u>GGGCGGTTG</u>G
SEQ ID NO: 150 ADNzima Dz85
G<u>CTGGGAGGGGA</u>*GGCTAGCTACAACGA*<u>GAGGTGCGGT</u>G

7.2. Sustratos indicadores

En el ejemplo actual, los sustratos se marcaron en sus extremos con un resto 6-FAM en el extremo 5' (indicado por "F" en el nombre de los sustratos a continuación) y un resto inactivador Iowa Black® FQ en el extremo 3' (indicado por "IB" en el nombre de los sustratos a continuación). La escisión de los sustratos se controló entre 510-530 nm (rango de longitud de onda de emisión de FAM en CFX96 (BioRad)) con excitación entre 450-490 nm (rango de longitud de onda de excitación de FAM en CFX96 (BioRad)). Los sustratos indicadores para este ejemplo se muestran a continuación con la secuencia, de 5' a 3'. Las bases en minúsculas representan ARN y las bases en mayúsculas representan ADN.

SEQ ID NO: 29 Sub55-FIB:
ACCGCACCTCguCCCCAGCTC
SEQ ID NO: 73 Sub61-FIB:
CTCGACCCCguCTCCACGCCA
SEQ ID NO: 75 Sub72-FIB:
ATCACGCCTCguCTCCTCCCAG
SEQ ID NO: 77 Sub74-FIB:
ATCACTCCCCguCCCCTCCCAG
SEQ ID NO: 78 Sub75-FIB:
TGACCCTCCTCguCTCCCCACTA
SEQ ID NO: 80 Sub79-FIB:
TCCTCTCCCCguCCCCTTCAACC
SEQ ID NO: 81 Sub80-FIB:
AACCGCCCTCguCCCGTGAACC
SEQ ID NO: 85 Sub85-FIB:
ACCGCACCTCguCCCCTCCCAG

7.3. Componentes de reacción: Medición de la escisión específica y potencial no específica de sustratos universales mediante una ADNzima a 52 °C y 58 °C

La escisión de sustratos universales se midió controlando la señal fluorescente causada por la unión y posterior

modificación de un sustrato por una ADNzima. La escisión de un sustrato universal por una ADNzima dará como resultado la separación del fluoróforo y el inactivador, produciendo un aumento de la fluorescencia. Todas las reacciones, como se describe en la **Tabla 17**, contenían 1 x Tampón PCR II (Applied Biosystems), $MgCl_2$ 10 mM, sustrato 200 nM y NF-H_2O en un volumen total de 25 µl. Cada reacción se realizó por duplicado como una reacción de "prueba" (adición de ADNzima 10 nM) o "control" (adición de NF-H_2O). Las reacciones se realizaron en un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96™ (BioRad) a 52 y 58 °C. La fluorescencia para cada reacción se programó para leerse después de 1 segundo durante los primeros 50 ciclos y luego se programó para que se leyera después de 25 segundos para los siguientes 50 ciclos.

Tabla 17: Combinaciones de ADNzima-sustrato ensayadas para escisión específica y no específica

	Dz55	**Dz61**	**Dz72**	**Dz74**	**Dz75**	**Dz79**	**Dz780**	**Dz85**
Sub55	ensayo	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve
Sub61	-ve	ensayo	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve
Sub72	-ve	-ve	ensayo	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve
Sub74	-ve	-ve	-ve	ensayo	-ve	-ve	-ve	-ve
Sub75	-ve	-ve	-ve	-ve	ensayo	-ve	-ve	-ve
Sub79	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	ensayo	-ve	-ve
Sub80	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	ensayo	-ve
Sub85	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	ensayo
ensayo; brazos de sustrato y ADNzima completamente complementarios (prueba de escisión específica) -ve; reacciones de control, brazos de sustrato y ADNzima no completamente complementarios (prueba de escisión no específica)								

7.5. Resultados: Medición de la escisión específica y potencial no específica de sustratos universales mediante una ADNzima

Hubo un aumento de la fluorescencia en cada reacción de "ensayo" que contenía ADNzimas y sus sustratos completamente complementarios. No hubo aumento en la fluorescencia en ninguna reacción que no contenía ADNzima (no se añadió ADNzima). Esto demuestra que el aumento en la fluorescencia producida en las reacciones de "ensayo" que contenían ADNzima se debió a la unión y posterior escisión catalítica del sustrato indicador por la ADNzima.

Para cada conjunto de datos de sustrato (reacciones de ensayo y control), los puntos de datos de fluorescencia sin procesar se exportaron a Excel (Microsoft), los valores duplicados se promediaron y luego se normalizaron. La normalización se realizó dividiendo cada punto de datos promedio por el valor promedio de la reacción sin ADNzima después de la primera lectura de reacciones que contenían el mismo sustrato (por ejemplo, la fluorescencia promediada para la reacción de ensayo para Sub61 se dividió por la fluorescencia de ciclo 1 promediada (después de los primeros 8 segundos) para la reacción sin ADNzima Sub61; la fluorescencia promediada para la reacción de control sin ADNzima para Sub61 se dividió por la fluorescencia de ciclo 1 promediada para la reacción de control sin ADNzima Sub61). Estos datos normalizados se usaron entonces para calcular la relación señal-ruido a los 10 minutos, dividiendo la fluorescencia normalizada de ensayo a los 10 minutos, por la fluorescencia normalizada sin ADNzima en 10 minutos. Este cálculo de la relación señal-ruido se realizó para cada temperatura. La relación señal-ruido se representó entonces en un gráfico de barras para comparar la eficiencia de la escisión de cada sustrato universal con cada ADNzima a las diversas temperaturas ensayadas (**Figura 10**, **(i)** y **(ii)**).

Algunas reacciones con diversas combinaciones de sustratos y ADNzimas no complementarias mostraron un nivel de fluorescencia ligeramente elevado en comparación con la reacción de control sin ADNzima emparejada. Esta señal no aumentó con el tiempo y, por lo tanto, no es indicativa de la escisión del sustrato universal por la ADNzima no complementaria. Los gráficos de detección que muestran esta fluorescencia de fondo horizontal tenían una relación señal-ruido de menos de 1,2. Por lo tanto, cualquier reacción que muestre una relación señal-ruido por encima de 1,2 se considera que (i) indica la escisión de un sustrato universal (ya sea específico o no específico), o (ii) indica que una combinación particular de sustrato y ADNzima no complementaria produce un nivel de ruido de fondo que no se distinguiría de la escisión específica en un formato múltiplex.

Todas las combinaciones de sustratos universales con sus ADNzimas completamente emparejadas mostraron altas relaciones señal-ruido (por encima del umbral de 1,2) a ambas temperaturas ensayadas (**Figura 10**, **(i)** y **(ii)**).

No hubo escisión no específica de los sustratos universales Sub61, Sub74, Sub75, Sub79 y Sub80 por cualquier

ADNzima no complementaria a cualquier temperatura (**Figura 10**, **(i)** y **(ii)**).

A 52 °C, algunos sustratos universales se escindieron por ADNzimas que no estaban completamente emparejadas con el sustrato (donde la escisión se define como una relación señal-ruido por encima del umbral de 1,2 como se ha descrito anteriormente). Las combinaciones que muestran la escisión no específica fueron: Sub85 escindido no específicamente por Dz55, Sub72 escindido no específicamente por Dz74 y Dz85, y Sub55 escindido no específicamente por Dz85 **(Figura 10, (i)).**

Podría esperarse la escisión no específica de Sub55 por Dz85, ya que Sub55 y Dz85 difieren solo en cuatro bases. El alineamiento de Sub55 con Dz85 muestra que la disparidad de cuatro bases se encuentra en el extremo distal del brazo de sustrato 3' lejos de la región crítica adyacente a los ribonucleótidos (**Tabla 18**). Además, una de las 4 bases es una disparidad G/T que se sabe en la técnica que se une con cierta afinidad, aunque más débil que para los emparejamientos A/T y G/C. La escisión no específica de Sub85 por Dz55 también se puede esperar, ya que Sub85 y Dz55 difieren en solo cinco bases y esta disparidad de cinco bases se encuentra en el extremo distal del brazo de sustrato 3' lejos de la región crítica adyacente a los ribonucleótidos (**Tabla 18**). Sin embargo, a diferencia del escenario inverso anterior, no hay disparidades G/T presentes y, por lo tanto, parece que el Sub85 no se escinde tan eficientemente como la combinación inversa de Sub55 y Dz85. La escisión no específica de Sub72 por Dz74 podría esperarse, ya que Sub72 y Sub74 difieren solo en 3 bases. El alineamiento de Sub72 con Dz74 muestra que las dos disparidades más cercanas a los ribonucleótidos son disparidades G/T (**Tabla 18**). Esto también explica por qué Sub74 no está escindido por Dz72 ya que las dos disparidades son C/A y tienen lugar muy cerca de los ribonucleótidos, y esto es suficiente para inhabilitar la escisión del sustrato por la ADNzima (**Tabla 18**). La división no específica de Sub72 por Dz85 se puede explicar por el alineamiento de las secuencias en la **Tabla 18**, que muestra que las bases en disparidad son principalmente G/T y esto, por lo tanto, conducirá a Dz85 a unirse y escindir Sub72. De nuevo, no se esperará que la situación inversa de Dz72 escinda de forma no específica Sub85, ya que las disparidades relevantes se convierten en disparidades C/A más desestabilizantes que es poco probable que conduzcan a una unión lo suficientemente fuerte entre la ADNzima y el sustrato para provocar la escisión.

Tabla 18. Alineación de sustratos y ADNzimas donde se observó escisión no específica.

	Nombre del oligonucleótido	**Secuencia^**
Sustrato	Sub55 (Seq ID: 29)	ACCGCACCTCguCCCC**AG**C**TC**
ADNzima	Dz85 (Seq ID: 150)	GTGGCGTGGAG AGGGG**AG**G**GT**CG *GA GG* *AC CT* *ACATCGA*
Sustrato	Sub85 (Seq ID: 85)	ACCGCACCTCguCCCC**TC**C**CAG**
ADNzima	Dz55 (Seq ID: 139)	GTGGCGTGGAG AGGGG**TC**G**AGG** *GA GG* *AC CT* *ACATCGA*
Sustrato	Sub72 (Seq ID: 75)	ATCAC**G**CC**T**CguC**T**CCTCCCA
ADNzima	Dz74 (Seq ID: 144)	GTAGTG**A**GG**G**G AG**G**GGAGGGTCG *GA GG* *AC CT* *ACATCGA*
Sustrato	Sub72 (Seq ID: 75)	A**T**C**A**C**G**CCTCguC**T**CCTCCCAG
ADNzima	Dz85 (Seq ID: 150)	

		GT**G**G**C**G**T**GGAG AG**G**GGAGGGTCG *GA GG* *AC CT* *ACATCGA*
Sustrato	Sub74 (Seq ID: 77)	ATCAC**T**CC**C**CguC**C**CCTCCCAG
ADNzima	Dz72 (Seq ID: 142)	GTAGTG**C**GG**A**G AG**A**GGAGGGTCG *GA GG* *AC CT* *ACATCGA*
^ Secuencia de sustrato escrita de 5' a 3' y secuencia de ADNzima escrita de 3' a 5'. Las bases no emparejadas están en negrita y subrayadas, y las bases no emparejadas que son G/T están solo en negrita. Las secuencias de núcleo de ADNzima están en cursiva.		

El aumento de la temperatura de reacción a 58 °C creó condiciones más rigurosas para la hibridación de oligonucleótidos y dio lugar a la pérdida de casi toda la escisión no específica observada a 52 °C (**Figura 10**, **(ii)**). La única combinación de sustrato universal y ADNzima que mostró escisión no específica a 58 °C fue Sub55 que se escindió de forma no específica por Dz85. Esta no especificidad es de esperar, ya que Sub55 y Dz85 difieren en solo cuatro bases y esta disparidad de cuatro bases se encuentra en el extremo distal del brazo de sustrato lejos de la región crítica adyacente a los ribonucleótidos y una de las disparidades es un G/T (**Tabla 18**). Aunque solo hay tres bases diferentes entre Sub72 y Sub74, esta disparidad de tres bases se produce en la región crítica cercana a los ribonucleótidos y, por lo tanto, es más crítica para la especificidad y será más desestabilizadora a temperaturas más altas que crean condiciones más rigurosas para la unión de oligonucleótidos.

Estos resultados demuestran que las directrices de diseño producen sustratos universales que pueden multiplexarse de manera eficaz a un intervalo de temperaturas para aplicaciones que implican ADNzimas 10-23. Existe la necesidad de alguna optimización de la temperatura de reacción para proporcionar una rigurosidad suficiente para la unión de algunas combinaciones de sustratos, pero en general las directrices producen conjuntos de sustratos que pueden multiplexarse. Un experto en la técnica puede apreciar que la longitud del sustrato y los brazos de unión a la ADNzima se pueden ajustar para crear una unión más rigurosa a temperaturas más bajas y más altas.

Ejemplo 8: Uso de sustratos universales con qPCR de MNAzimas múltiplex para la cuantificación de cinco dianas de ácidos nucleicos diferentes en una reacción múltiplex con temperaturas de hibridación de 52 °C o 58 °C.

Múltiples dianas pueden amplificarse y detectarse simultáneamente en tiempo real usando métodos de amplificación de dianas *in vitro* tal como qPCR. Además, la amplificación de las dianas puede controlarse simultáneamente en tiempo real en una reacción multiplexada que comprende múltiples MNAzimas únicas. Cada MNAzima se puede diseñar con brazos sensores específicos para una diana y brazos de sustrato específicos para un miembro único de una serie de sustratos universales. Cada diana puede detectarse individualmente si cada una de las series de sustratos universales está etiquetada con un fluoróforo diferente. La amplificación y la detección de las múltiples dianas se realizan en un proceso de una sola etapa, en donde la amplificación por PCR y la detección mediada por MNAzima se producen simultáneamente en un solo tubo. El control en tiempo real genera una curva de amplificación que puede indicar la eficiencia de una reacción por la forma de la curva (inclinación y velocidad hasta alcanzar la meseta).

La temperatura de hibridación/detección para qPCR de MNAzimas usadas en la técnica está entre 50 y 54 °C. Esta temperatura fue dictada por el hecho de que los sustratos universales conocidos en la técnica tenían una limitación de la temperatura a la que se escindieron eficientemente con 54 °C, siendo el límite superior para la escisión eficiente de los sustratos universales de la serie 1. Existe la necesidad de un panel de sustratos universales que puedan combinarse en una reacción múltiplex y escindirse eficientemente a temperaturas más altas. Esto no solo permite una mayor flexibilidad en el diseño de cebadores y partzimas que se hibridan a temperaturas más altas y el direccionamiento de plantillas ricas en G/C, sino que también permite la detección por qPCR de MNAzimas a multiplexar con otras químicas en tiempo real ya conocidas en la técnica, tal como TaqMan®, en la que la temperatura estándar de hibridación/detección varía de 60 - 65 °C. La utilidad de los sustratos universales

aumentaría considerablemente si existieran sustratos que funcionen bien juntos en un intervalo de temperaturas mayor.

En este ejemplo, se realizaron dos reacciones múltiplex que comprendían ambas MNAzimas diseñadas para detectar cinco dianas diferentes, concretamente, los genes TFRC, HPRT, TP53, RPL13a y CYP2C9 humanos. En el Múltiplex 1, cada MNAzima diana se diseñó para escindir uno de los sustratos universales de la serie 1, Sub2, Sub3, Sub4, Sub6 y Sub7, y en el Múltiplex 2, cada MNAzima diana se diseñó para escindir uno de los sustratos universales mejorados de la serie 2 o 3, Sub55, Sub61, Sub74, Sub79 y Sub80. Se apreciará que se puede usar cualquier número de dianas de acuerdo con el método y que los expertos en la técnica pueden diseñar partzimas apropiadas para detectar cualquier diana.

Las dos reacciones múltiplex se compararon para determinar la eficiencia de escisión de cada conjunto de sustratos universales observando la forma de la curva (inclinación y velocidad hasta alcanzar la meseta). En este ejemplo, la amplificación y la detección se comparan a una temperatura favorable para todos los sustratos, 52 °C, y una temperatura fuera del intervalo eficiente para los sustratos de la serie 1, 58 °C.

8.1. Oligonucleótidos de partzima

Las secuencias de las partzimas A y B para cada diana se enumeran a continuación de 5' a 3'. Para cada diana, las partzimas se diseñaron para usarse con uno de los sustratos universales originales de la serie 1 y uno de los nuevos sustratos mejorados de la serie 3. En las siguientes secuencias, las bases subrayadas se hibridan con el sustrato. "-P" indica la fosforilación en 3' del oligonuleótido.

SEQ ID NO: 157 partzima A RPL13aA/6-P
AATTGACAAATACACAGAGGTCACAACGAGAGGCGTGAT
SEQ ID NO: 163 partzima B RPL13aB/6-P
CTGGGAGGAAGGCTAGCTCTCAAGACCCACGGACTCCT
SEQ ID NO: 120 partzima A RPL13aA/80-P
AATTGACAAATACACAGAGGTCACAACGAGAGGGCGGTT
SEQ ID NO: 121 partzima B RPL13aB/80-P
GGTTCACGGGAGGCTAGCTCTCAAGACCCACGGACTCCT
SEQ ID NO: 96 partzima A CYP2C9A/3-P
GGGAAGAGGAGCATTGAGGAACAACGAGGTTGTGCTG
SEQ ID NO: 97 partzima B CYP2C9B/3-P
CGGTTGGTGAGGCTAGCTCCGTGTTCAAGAGGAAGC
SEQ ID NO: 98 partzima A CYP2C9A/61-P
GGGAAGAGGAGCATTGAGGAACAACGAGGGGTCGAG
SEQ ID NO: 99 partzima B CYP2C9B/61-P
TGGCGTGGAGAGGCTAGCTCCGTGTTCAAGAGGAAGC
SEQ ID NO: 164 partzima A TP53A/4-P
GACGGAACAGCTTTGAGGTGACAACGAGTGCGCCATG
SEQ ID NO: 165 partzima B TP53B/4-P
TACTTCTCCCAAGGCTAGCTCGTGTTTGTGCCTGTCCTGG
SEQ ID NO: 106 partzima A TP53A/79-P:
GACGGAACAGCTTTGAGGTGACAACGAGGGGAGAGGA
SEQ ID NO: 107 partzima B TP53B/79-P:
GGTTGAAGGGGAGGCTAGCTCGTGTTTGTGCCTGTCCTGG
SEQ ID NO: 34 partzima A TFRCA/2-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTGACAACGAGAGGAAACCTT
SEQ ID NO: 35 partzima B TFRCB/2-P:
TGCCCAGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 58 partzima A TFRCA/74-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGGGGAGTGAT
SEQ ID NO: 59 partzima B TFRCB/74-P:
CTGGGAGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 166 partzima A HPRTA/7-P
CTGAATAGAAATAGTGATAGATCACAACGAGTGCCATGTTAA
SEQ ID NO: 167 partzima B HPRTB/7-P
TATCACAGCCAAGGCTAGCTCATTCCTATGACTGTAGATTTTA

SEQ ID NO: 168 partzima A HPRTA/55-P
CTGAATAGAAATAGTGATAGATCACAACGAGAGGTGCGGT
SEQ ID NO: 169 partzima B HPRTB/55-P
GAGCTGGGGAGGCTAGCTCATTCCTATGACTGTAGATTTTA

8.2. Sustratos indicadores

Para este ejemplo, en cada múltiplex se usaron cinco sustratos universales diferentes juntos en la única cámara de reacción. Cada sustrato universal en cada múltiplex se marcó con uno de cinco fluoróforos diferentes. En el ejemplo actual, los sustratos se marcaron en el extremo 5' con un fluoróforo y se marcaron en el extremo 3' con un resto de inactivador (**Tabla 19**). La escisión de los sustratos se control a diversas longitudes de onda de emisión y excitación (**Tabla 19**).

Tabla 19. Sustratos y su etiquetado fluorescente

Sustrato	Nombre	Fluoróforo	Inactivador^	Excitación*	Emisión*
Múltiplex 1					
Sub2	Sub2-Q705B2	Quasar 705	BHQ2	672-684	705-730
Sub6	Sub6-Q670B2	Quasar 670	BHQ2	620-650	675-690
Sub4	Sub4-TRB2	Texas Red	BHQ2	560-590	610-650
Sub7	Sub7-JB	JOE	BHQ1	515-535	560-580
Sub3	Sub3-FIB	6-FAM	IB	450-490	510-530
Múltiplex 2					
Sub74	Sub74-Q705B2	Quasar 705	BHQ2	672-684	705-730
Sub80	Sub80-Q670B2	Quasar 670	BHQ2	620-650	675-690
Sub79	Sub79-TRIBR	Texas Red	IBR	560-590	610-650
Sub55	Sub55-HIB	HEX	IB	515-535	560-580
Sub61	Sub61-FIB	6-FAM	IB	450-490	510-530
^ BHQ1; black hole quencher 1, BHQ2; black hole quencher 2, IB; Iowa black® FQ, IBR; Iowa black® RQ *El sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 (Biorad) excita y mide la emisión de cada fluoróforo en un intervalo de longitudes de onda para cada canal.					

Los sustratos indicadores ensayados en este ejemplo se muestran a continuación con la secuencia, 5' a 3'. Las bases en minúsculas representan ARN y las bases en mayúsculas representan ADN.

SEQ ID NO: 21 Sub2-Q705B2:
AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA
SEQ ID NO: 22 Sub3-FIB:
CAGCACAACCguCACCAACCG
SEQ ID NO: 23 Sub6-Q670B2:
ATCACGCCTCguTCCTCCCAG
SEQ ID NO: 24 Sub7-JB:
TTAACATGGCACguTGGCTGTGATA
SEQ ID NO: 171 Sub4-TRB2:
CATGGCGCACguTGGGAGAAGTA
SEQ ID NO: 73 Sub61-FIB:
CTCGACCCCguCTCCACGCCA
SEQ ID NO: 77 Sub74-Q705B2:
ATCACTCCCCguCCCCTCCCAG
SEQ ID NO: 80 Sub79-TRIBR:
TCCTCTCCCCguCCCCTTCAACC
SEQ ID NO: 81 Sub80-Q670B2:
AACCGCCCTCguCCCGTGAACC
SEQ ID NO: 29 Sub55-HIB:
ACCGCACCTCguCCCCAGCTC

8.3 Secuencias diana y cebadores PCR para la amplificación de los genes CYP2C9, TP53, HPRT, TFRC y RPL13a

Los amplicones de PCR diana para los cinco genes se generaron mediante amplificación *in vitro* de ADN humano

extraído de la línea celular IM9 (Promega). Los amplicones se generaron utilizando los cebadores de la PCR del oligonucleótido enumerados de 5' a 3' a continuación. La secuencia en negrita corresponde a un marcador universal (U1, U2 o U3) que aumenta la Tm del cebador sin afectar a la especificidad del cebador con respecto a la diana génica. Este marcador mejora la eficiencia de amplificación en las reacciones de PCR.

SEQ ID NO: 91 Cebador directo 5TFRC_U1
GCTAAAACAATAACTCAGAACTTACG
SEQ ID NO: 92 Cebador inverso 3TFRC_U2
CAGCTTTCTGAGGTTACCATCCTA
SEQ ID NO: 125 Cebador directo 5TP53_U3
CTAACTTACTGCCTCTTGCTTCTC
SEQ ID NO: 126 Cebador inverso 3TP53_U2
CAGCTCTGTGCGCCGGTCTCTC
SEQ ID NO: 127 Cebador directo 5RPL13a_U3
CTAAACCGGAAGAAGAAACAGCTCA
SEQ ID NO: 128 Cebador inverso 3RPL13a_U2
CAGGAGGAATTAACAGTCTTTATTGG
SEQ ID NO: 129 Cebador directo 5CYP2C9_U3
CTAACCTCATGACGCTGCGGAA
SEQ ID NO: 130 Cebador inverso 3CYP2C9_U2
CAGATATGGAGTAGGGTCACCCA
SEQ ID NO: 176 Cebador directo 5HPRT_U3
CTAACTTTGCTGACCTGCTGGATTA
SEQ ID NO: 177 Cebador inverso 3HPRT_U2
CAGCAATAGCTCTTCAGTCTGATAA

8.4. Componentes de reacción: Amplificación y detección de secuencias diana en un formato de qPCR de MNAzimas múltiplex

La amplificación en tiempo real y la detección de las secuencias diana se realizó en un volumen de reacción total de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron en un sistema de detección por PCR en tiempo real CFX96 (Bio-Rad). Los parámetros de ciclado fueron, 1) 95 °C durante 2 minutos, 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, y 52 °C durante 60 segundos, o 2) 95 °C durante 2 minutos, 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 58 °C durante 60 segundos. Los datos fluorescentes se recogieron en las etapas de 52 °C o 58 °C. Cada reacción múltiplex se realizó por duplicado y contenía 10 mM de $MgCl_2$, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de inhibidor Ribosafe RNase (Bioline), 1 x Inmunotampón (Bioline), 2 unidades de MyTaqHS (Bioline). La identidad de las partzimas, los cebadores y los sustratos y sus concentraciones respectivas fueron las enumeradas en la **Tabla 20**. Las reacciones contenían una plantilla de ADN (100 ng o 391 pg) o un control sin diana (NF-H_2O).

Las reacciones múltiplex se establecieron con cebadores, sustratos y sus partzimas asociadas como en la **Tabla 20** (Múltiplex 1 o Múltiplex 2). Se usaron los mismos cebadores de PCR para ambas reacciones múltiplex y todas las partzimas tenían las mismas porciones de detección de dianas. Cualquier diferencia en la eficiencia de las reacciones que detectan la misma diana será, por lo tanto, atribuible a las diferencias en la eficiencia de la escisión de los sustratos.

Tabla 20. Combinaciones de oligonucleótidos usadas para cada reacción múltiplex

Diana	Cebador 5' (20 nM excepto * = 80 nM)	Cebador 3' (400 nM excepto * = 200 nM)	PzA y PzB (200 nM cada una)		Sustrato (200 nM cada uno)
Múltiplex 1					
TFRC	5TFRC_U3	3TFRC_U2	TFRCA/2-P SEQ ID NO: 34	TFRCB5/2-P SEQ ID NO: 35	Sub2-Q705B2 SEQ ID NO: 21
HPRT	5HPRT_U3*	3HPRT_U2	HPRTA/7-P SEQ ID NO: 166	HPRTB5/7-P SEQ ID NO: 167	Sub7-JB SEQ ID NO: 24
TP53	5TP53_U1	3TP53_U2*	TP53A/4-P SEQ ID NO: 164	TP53B5/4-P SEQ ID NO: 165	Sub4-TRB2 SEQ ID NO: 171
RPL13a	5RPL13a_U1	3RPL13a_U2	RPL13aA/6-P SEQ ID NO: 157	RPL13aB/6-P SEQ ID NO: 163	Sub6Q670B2 SEQ ID NO: 23

CYP2C9	5CYP2C9_U1	3CYP2C9_U2	CYP2C9A/3-P SEQ ID NO: 96	CYP2C9B/3-P SEQ ID NO: 97	Sub3-FIB SEQ ID NO: 22
Múltiplex 2					
TFRC	5TFRC_U3	3TFRC_U2	TFRCA/74-P SEQ ID NO: 58	TFRCB/74-P SEQ ID NO: 59	Sub74-Q705B2 SEQ ID NO: 77
HPRT	5HPRT_U3*	3HPRT_U2	HPRTA/55-P SEQ ID NO: 168	HPRTB/55-P SEQ ID NO: 169	Sub55-HIB SEQ ID NO: 29
TP53	5TP53_U1	3TP53_U2*	TP53A/79-P SEQ ID NO: 106	TP53B/79-P SEQ ID NO: 107	Sub79-TRIBR SEQ ID NO: 80
RPL13a	5RPL13a_U1	3RPL13a _U2	RPL13aA/80-P SEQ ID NO: 120	RPL13aB/80-P SEQ ID NO: 121	Sub80-Q670B2 SEQ ID NO: 81
CYP2C9	5CYP2C9_U1	3CYP2C9_U2	CYP2C9A/61-P SEQ ID NO: 98	CYP2C9B/61-P SEQ ID NO: 99	Sub61-FIB SEQ ID NO: 73

8.5. Resultados: Amplificación de la diana y escisión del sustrato indicador en formato qPCR de MNAzimas múltiplex

Cada reacción múltiplex que contenía ADN genómico humano mostró un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo para la detección en tiempo real de los genes CYP2C9, TP53, HPRT, RPL13a y TFRC. Para todas las reacciones, la fluorescencia del control de diana sin ADN fue menor que en las reacciones que contenían diana de ADN. Esto demuestra que el aumento de la fluorescencia producida en las reacciones que contienen la diana se debe al ensamblaje dependiente de la diana de las MNAzimas catalíticamente activas que después escindió uno de los sustratos universales.

Los gráficos de amplificación de los genes CYP2C9, TP53, HPRT, RPL13a y TFRC a 52 °C demostraron que el Múltiplex 2 (**Figura 11, (i)**), que usó los nuevos sustratos universales mejorados de la serie 2 y 3, tenía curvas más pronunciadas que alcanzaron la meseta más rápido que las observados para el Múltiplex 1 (**Figura 11**, **(i)**), que uso sustratos universales de la serie 1. Solo hubo una pequeña diferencia en los gráficos de amplificación para la detección de TFRC con Sub2 frente a Sub74 a 52 °C. Un experto en la técnica apreciará que todas las gráficas de amplificación del Múltiplex 1, que usan los sustratos de la serie 1 frente a las series 2 y 3, son de una calidad suficientemente buena para ser fácilmente aceptables en el campo para la detección de estas dianas.

Los gráficos de amplificación de los genes CYP2C9, TP53, HPRT, RPL13a y TFRC a 58 °C demostraron que el Múltiplex 2 (**Figura 11**, **(ii)**), que usó los nuevos sustratos universales mejorados de las series 2 y 3, tenía curvas considerablemente más pronunciadas y alcanzó la meseta sustancialmente más rápido que el Múltiplex 1 (**Figura 11**, **(ii)**), que usó sustratos universales de la serie 1. Además, un experto en la técnica reconocerá que las curvas de amplificación producidas por el uso de Sub2, Sub3, Sub6 y Sub7 en el Múltiplex 1 pueden no ser de calidad suficiente para una detección robusta de la diana y, por lo tanto, pueden no ser generalmente aceptables en el campo.

En general, los nuevos sustratos de las series 2 y 3 muestran una calidad mejorada y, por lo tanto, robustez de los datos multiplexados a las temperaturas actualmente en uso con las reacciones de qPCR de MNAzimas, y permiten la detección múltiplex a una temperatura mucho más alta de lo que eran capaces previamente. Las nuevas directrices de diseño aumentan la probabilidad de diseñar sustratos universales que amplíen la capacidad de multiplexar a las temperaturas utilizadas actualmente para la qPCR de MNAzimas y que produzcan datos sólidos a temperaturas de reacción más altas.

Ejemplo 9: Uso de sustratos universales, diseñados para ser funcionales a varias temperaturas, con MNAzimas en PCR en tiempo real.

Se ha inventado una nueva serie de sustratos altamente activos, utilizando un nuevo conjunto de directrices de diseño, para su uso con la ADNzima 10-23 o MNAzima basándose en la ADNzima 10-23.

Las MNAzimas pueden adaptarse para producir un efecto detectable, a través de la escisión o ligación de un sustrato, a diversas temperaturas. La eficiencia y la rigurosidad de la actividad catalítica de una MNAzima o ADNzima se pueden manipular cambiando la temperatura de reacción. Otra forma de optimizar la eficiencia y la rigurosidad de la actividad catalítica es modificar la Tm y/o la longitud del sustrato o los sustratos y las partzimas correspondientes o la ADNzima correspondiente. La Tm de un sustrato se puede aumentar añadiendo nucleótidos

en los extremos 5' y/o 3' de la secuencia del sustrato. Estos cambios pueden hacerse dentro de las directrices de diseño. Los nucleótidos elegidos para esta extensión también pueden tener un efecto en la Tm. La adición de bases G o C adicionales al extremo 3' o 5' tendrá un mayor impacto en la Tm que la adición de bases A o T adicionales. De manera similar, la Tm de los sustratos se puede reducir eliminando los nucleótidos del extremo 3' o 5'. Las partzimas de MNAzima y las ADNzimas se pueden truncar o extender para que coincidan con la secuencia de sustrato ajustada.

En este ejemplo, la longitud y la composición de la base del sustrato de la serie 2, Sub55, se modificó para producir una gama de sustratos derivados con una diversidad de Tm (**Tabla 21**). Las modificaciones incluyeron el truncamiento del sustrato mediante la eliminación de uno a tres nucleótidos de cada uno de los extremos 5' y 3'; extendiendo el sustrato mediante la adición de nucleótidos en ambos extremos 5' y 3'. El efecto de la adición de diferentes nucleótidos para producir esta extensión también se ensayó diseñando sustratos con nucleótidos A o C adicionales en los extremos 5' y 3'. Los sustratos resultantes se ensayaron entonces en una reacción por qPCR de MNAzimas para evaluar la flexibilidad del diseño de derivados de sustratos y su utilidad en un intervalo de temperaturas. La amplificación por PCR y la detección mediada por MNAzimas se realizaron en un proceso de una sola etapa, en el que la amplificación por PCR y la detección mediada por MNAzima tuvieron lugar simultáneamente en un solo tubo. La eficiencia de la escisión de sustratos se puede medir por el valor de Ct generado a varias temperaturas de hibridación. Las reacciones que producen un valor de Ct inferior son indicativas de una escisión más eficiente de un sustrato específico, ya que dichas reacciones alcanzan el ciclo umbral más rápido.

Tabla 21: Sub55 y derivados

Nombre	Secuencia^	Longitud (pb)	Tm*
Sub55(16)	GCACCTCguCCCCAGC	16	52
	SEQ ID NO: 172		
Sub55(18)	CGCACCTCguCCCCAGCT	18	58
	SEQ ID NO: 173		
Sub55	ACCGCACCTCguCCCCAGCTC	21	68
	SEQ ID NO: 29		
Sub55(23A)	AACCGCACCTCguCCCCAGCTCA	23	72
	SEQ ID NO: 174		
Sub55(23C)	CACCGCACCTCguCCCCAGCTCC	23	76
	SEQ ID NO: 175		
^ Todas las secuencias escritas de 5' a 3'; las mayúsculas representan ADN y las minúsculas representan ARN * La Tm dada aquí equivale a la temperatura de fusión de las bases unidas a las dos partzimas calculadas usando la regla de Wallace. Cuando el sustrato se une a la MNAzima basándose en la ADNzima 10-23, o la propia ADNzima 10-23, el ribonucleótido "g" permanece sin unir, por lo tanto, no contribuye a la Tm unida global.			

9.1. Oligonucleótidos de partzima

En los experimentos realizados para medir la velocidad de la actividad catalítica de Sub55 y sus derivados descritos en la **Tabla 21**, los oligonucleótidos de partzima A y B se diseñaron con brazos sensores diana complementarios al gen TFRC humano. Las secuencias de las partzimas A y B se enumeran a continuación de 5' a 3', donde las bases subrayadas se hibridan con el sustrato. "-P" indica la fosforilación en 3' del oligonuleótido.

SEQ ID NO: 179 partzima A TFRCA/55(18)-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGTGCG
SEQ ID NO: 180 partzima B TFRCB/55(18)-P:
AGCTGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 181 partzima A TFRCA/55(16)-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGTGC
SEQ ID NO: 182 partzima B TFRCB/55(16)-P:
GCTGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 183 partzima A TFRCA/55(23A)-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGTGCGGTT
SEQ ID NO: 184 partzima B TFRCB/55(23A)-P:
TGAGCTGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 185 partzima B TFRCA/55(23C)-P:
GACTGTCACAACGAGAGGTGCGGTG

SEQ ID NO: 186 partzima B TFRCB/55(23C)-P:
GGAGCTGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT
SEQ ID NO: 46 partzima A TFRCA/55-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGAGAGGTGCGGT
SEQ ID NO: 45 partzima B TFRCB/55-P:
GAGCTGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT

9.2. Sustratos indicadores

En el ejemplo actual, los sustratos se marcaron en el extremo con un resto Quasar 670 en el extremo 5' y un resto BHQ2 en el extremo 3'. La escisión de los sustratos se controló a 665 nm (longitud de onda de emisión de Quasar 670) con excitación a 635 nm (longitud de onda de excitación de Quasar 670). Los sustratos indicadores ensayados en este ejemplo se muestran a continuación con la secuencia, 5' a 3'. Las bases en minúsculas representan ARN y las bases en mayúsculas representan ADN.

SEQ ID NO: 29 Sub55-Q670B2:
ACCGCACCTCguCCCCAGCTC
SEQ ID NO: 172 Sub55(16)-Q670B2:
GCACCTCguCCCCAGC
SEQ ID NO: 173 Sub55(18)-Q670B2:
CGCACCTCguCCCCAGCT
SEQ ID NO: 174 Sub55(23A)-Q670B2:
AACCGCACCTCguCCCCAGCTCA
SEQ ID NO: 175 Sub55(23C)-Q670B2:
CACCGCACCTCguCCCCAGCTCC

9.3. Secuencia diana y cebadores de PCR para la amplificación de TFRC

La secuencia diana para este ejemplo fue un amplicón de PCR generado por la amplificación *in vitro* de ADN genómico humano, extraído de la línea celular IM9 (Promega), usando los cebadores de PCR de oligonucleótidos enumerados a continuación. Las secuencias de cebador se enumeran de 5' a 3'.

SEQ ID NO: 187 Cebador directo 5TFRC:
AACAATAACTCAGAACTTACG
SEQ ID NO: 188 Cebador inverso 3TFRC:
CTTTCTGAGGTTACCATCCTA

9.4. Componentes de reacción: Amplificación y detección de la secuencia diana

La amplificación en tiempo real y la detección de la secuencia diana se realizó en un volumen de reacción total de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron en un sistema Mx3005P QPCR (Stratagene/Agilent). Los parámetros de ciclado se variaron según la temperatura de hibridación, (subrayada como se indica a continuación), y fueron:

1) 95 °C durante 10 minutos, 5 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 55 °C durante 30 segundos, 50 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 50 °C durante 60 segundos, o
2) 95 °C durante 10 minutos, 5 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 55 °C durante 30 segundos, 50 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 52 °C durante 60 segundos, o
3) 95 °C durante 10 minutos, 5 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 55 °C durante 30 segundos, 50 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 55 °C durante 60 segundos, o
4) 95 °C durante 10 minutos, 5 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 55 °C durante 30 segundos, 50 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 60 segundos.

Todos los datos de fluorescencia se recogieron a la temperatura de hibridación. Las reacciones se configuraron con sustratos y sus partzimas asociadas como se muestra en la **Tabla 22**. Cada conjunto de condiciones de reacción se realizó por duplicado y contenía 40 nM de 5TFRC, 200 nM de 3TFRC, 200 nM de cada una de la partzima A y la partzima B, 200 nM de sustrato, 8 mM de $MgCl_2$, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de Rnasin (Promega), 1 x Inmunotampón (Bioline), 1 unidad de Immolase (Bioline) y una plantilla de ADN genómico (100 ng) o (NF-H_2O) no diana. Se establecieron reacciones separadas para ensayar cada sustrato con sus partzimas emparejadas. Se

usaron los mismos cebadores de PCR para todas las reacciones y todas las partzimas tenían las mismas porciones de detección de dianas. Por lo tanto, cualquier diferencia en la eficiencia de las reacciones será atribuible a diferencias en la eficiencia de la escisión de los sustratos a diversas temperaturas.

Tabla 22: Combinaciones de partzimas usadas para cada sustrato universal

Sustrato	Partzima A	Partzima B
Sub55	TFRCA/55-P	TFRCB/55-P
SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 45
Sub55(16)	TFRCA/55(16)-P	TFRCB/55(16)-P
SEQ ID NO: 172	SEQ ID NO: 181	SEQ ID NO: 182
Sub55(18)	TFRCA/55(18)-P	TFRCB/55(18)-P
SEQ ID NO: 173	SEQ ID NO: 179	SEQ ID NO: 180
Sub55(23A)	TFRCA/55(23A)-P	TFRCB/55(23A)-P
SEQ ID NO: 174	SEQ ID NO: 183	SEQ ID NO: 184
Sub55(23C)	TFRCA/55(23C)-P	TFRCB/55(23C)-P
SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 185	SEQ ID NO: 186

9.5. Resultados: Amplificación de diana y escisión del sustrato indicador

Cada reacción que contenía ADN genómico humano mostró un aumento en la fluorescencia con el tiempo para la detección en tiempo real del gen TFRC utilizando Sub55 y diversos derivados. La fluorescencia del control diana sin ADN fue menor que la de las reacciones que contenían la diana de ADN. Esto demuestra que el aumento de la fluorescencia producida en las reacciones que contienen la diana se debe al ensamblaje dependiente de la diana de las MNAzimas catalíticamente activas que después escindió uno de los sustratos universales.

La eficiencia de las reacciones, medida por el Ct, dependía de la compatibilidad de la temperatura de reacción (temperatura de hibridación/escisión) y la Tm del sustrato utilizado en la reacción. Los diversos derivados de Sub55 tienen diferentes longitudes y composiciones de nucleótidos y, por lo tanto, diferentes temperaturas de fusión (Tm) y, por lo tanto, se espera que funcionen de manera diferente a las diversas temperaturas de hibridación ensayadas (50, 52, 55 y 60 °C). Los resultados, en la Tabla 23, muestran el Ct para cada sustrato a las diferentes temperaturas de reacción. Los valores de Ct en negrita indican el sustrato o sustratos que se realizaron más eficientemente a las temperaturas indicadas.

A temperaturas más bajas, el sustrato más corto (Sub55(18)) tuvo un rendimiento mejor (tenía el valor de Ct más bajo). A medida que aumentó la temperatura de hibridación, los sustratos con mayor longitud y, por lo tanto, Tm, tuvieron un rendimiento óptimo. Un experto en la técnica podría producir derivados de sustratos que podrían escindirse eficazmente a una temperatura de reacción elegida alargando o acortando los brazos de sustrato de los extremos 5' y/o 3', y/o cambiando la composición de nucleótidos en los extremos 5' y 3' del sustrato.

Tabla 23: Valores de Ct para qPCR de MNAzimas realizada usando Sub55 y derivados a diversas temperaturas de hibridación

Nombre	50 °C	52 °C	55 °C	60 °C
Sub55(16)	26,1	26,7	31,2	n/a
Sub55(18)	**23,9**	23	24,8	n/a
Sub55	24,4	**22,8**	**23,0**	26,8
Sub55(23A)	25,3	23,9	**23,0**	**25,8**
Sub55(23C)	25,8	24,1	23,9	26,2

Ejemplo 10: Uso de sustratos universales con qPCR de MNAzimas a una temperatura de hibridación de 58 °C.

Las MNAzimas se pueden usar para controlar la amplificación de ácidos nucleicos diana en tiempo real usando métodos de amplificación de dianas *in vitro* tal como PCR. Además, el control en tiempo real durante la qPCR usando sustratos de MNAzima marcados con pares de fluoróforo e inactivador genera una curva en la que se puede colocar una línea de umbral, de un nivel arbitrario de fluorescencia, sobre la fase exponencial de las reacciones, produciendo un valor que puede ser conocido como Ct (ciclo umbral). Las reacciones que producen un valor de Ct inferior son indicativas de una escisión más eficiente de un sustrato específico, ya que dichas reacciones alcanzan el ciclo umbral más rápido. En este ejemplo, la amplificación y la detección se realizan en un proceso de una sola

etapa, en el que la amplificación por PCR y la detección mediada por MNAzima ocurren simultáneamente en un solo tubo. Cuando todas las demás condiciones de reacción son las mismas, el valor de Ct puede verse influenciado por la secuencia del sustrato universal. La temperatura de hibridación/detección para qPCR de MNAzimas usadas en la técnica está entre 50 y 54 °C. Esta temperatura fue dictada por el hecho de que los sustratos universales conocidos en la técnica tenían una limitación de la temperatura a la que se escindieron eficientemente con 54 °C, siendo el límite superior para los sustratos universales de la serie 1. Existe la necesidad de sustratos universales que se escindan a temperaturas más altas para permitir una mayor flexibilidad en el diseño de cebadores y partzimas que hibriden a temperaturas más altas. Esta flexibilidad de diseño para cebadores y partzimas podría ser de gran beneficio para muchas aplicaciones tales como dianas genéticas de interés que tienen altos porcentajes de bases G y C en su secuencia, requiriendo temperaturas de reacción más altas y, por lo tanto, partzimas y cebadores con Tm más altas para la detección específica.

La investigación sobre la eficiencia de la escisión de sustratos basándose en el rendimiento de los sustratos de las series 1 y 2, condujo al desarrollo de directrices para ayudar en una tercera ronda de diseños de sustratos, lo que dio como resultado los sustratos de la serie 3. Estas directrices incluían, pero sin limitación, (i) siete o más nucleótidos de citosina en las diez bases que rodean los ribonucleótidos (N_4-N_{13}), (ii) las bases inmediatamente adyacentes a los ribonucleótidos son citosinas (N_8 y N_9), (iii) el contenido total de sustrato tiene >64% de pirimidinas y (iv) la Tm total del oligonucleótido es de 66 °C o más (donde esta última directriz solo es aplicable si la temperatura de reacción para la escisión de sustrato es superior a 50 °C).

En este ejemplo, el sustrato universal de la serie 2, Sub59, se compara con el sustrato de la serie 3, Sub77, para comparar la eficiencia de escisión en la PCR en tiempo real a 58 °C para garantizar que las directrices de diseño produzcan sustratos universales con una alta probabilidad de aplicabilidad a qPCR de MNAzimas a una temperatura elevada. El nivel de eficiencia de escisión se determinó midiendo el valor de Ct para reacciones que contienen diferentes sustratos universales.

10.1. Oligonucleótidos de partzima

En los experimentos realizados para medir la eficacia de la escisión de los sustratos universales de la serie 2 y la serie 3 en la PCR en tiempo real, todos los oligonucleótidos de partzima A y B se diseñaron con brazos sensores complementarios con la misma secuencia del gen TFRC humano. Las secuencias de las partzimas A y B se enumeran a continuación de 5' a 3', donde las bases <u>subrayadas</u> se hibridan con su sustrato universal emparejado. "-P" indica la fosforilación en 3' del oligonuleótido.

SEQ ID NO: 47 partzima A TFRCA/59-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGA<u>AGGGAGGAGG</u>
SEQ ID NO: 62 partzima A TFRCA/77-P:
GGAATATGGAAGGAGACTGTCACAACGA<u>GAGGGAGGAG</u>
SEQ ID NO: 63 partzima B TFRCB/77-P:
<u>AGGAGGAGGGA</u>GGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT

10.2. Sustratos indicadores

Los sustratos indicadores para este ejemplo se muestran a continuación con la secuencia, de 5' a 3'. Las bases en minúsculas representan ARN y las bases en mayúsculas representan ADN. En el ejemplo actual, los sustratos se marcaron en sus extremos con un resto 6-FAM en el extremo 5' (indicado por "F" en el nombre de los sustratos a continuación) y un resto inactivador Iowa Black® FQ en el extremo 3' (indicado por "IB" en el nombre de los sustratos a continuación). La escisión de los sustratos se controló a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM en Mx3005P (Stratagene)) con excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación de FAM en Mx3005P (Stratagene)).

SEQ ID NO: 33 Sub59-FIB:
CCTCCTCCCTguCCCTCCTCCT
SEQ ID NO: 79 Sub77-FIB:
CTCCTCCCTCguCCCTCCTCCT

10.3. Secuencia diana y cebadores de PCR para la amplificación de TFRC

La secuencia diana para este ejemplo fue un amplicón de PCR a partir del gen TFRC generado por la amplificación *in vitro* de ADN genómico humano, extraído de la línea celular IM9 (Promega), usando los cebadores de PCR de

oligonucleótidos enumerados a continuación. Las secuencias de cebador se enumeran de 5' a 3'.

SEQ ID NO: 187 Cebador directo 5TFRC:
AACAATAACTCAGAACTTACG
SEQ ID NO: 188 Cebador inverso 3TFRC:
CTTTCTGAGGTTACCATCCTA

10.4. Componentes de reacción: Amplificación y cuantificación de la secuencia diana

La amplificación por PCR en tiempo real y la detección de la secuencia diana se realizó en un volumen de reacción total de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron en un sistema Mx3005P QPCR (Stratagene). Las reacciones se configuraron con sustratos y sus partzimas asociadas como se muestra en la **Tabla 24**. Los parámetros de ciclado fueron 95 °C durante 2 minutos, 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 58 °C durante 60 segundos (datos recogidos en la etapa de 58 °C). Cada conjunto de condiciones de reacción se realizó por duplicado y contenía 40 nM de 5TFRC, 200 nM de 3TFRC, 200 nM de cada una de la partzima A y la partzima B, 200 nM de sustrato, 8 mM de $MgCl_2$, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de RNasin (Promega), 1 x Inmunotampón (Bioline), 2 unidades de ADN polimerasa MyTaqHS™ (Bioline) y plantilla de ADN genómico (50 ng) o (NF-H_2O) no diana.

Tabla 24: Combinaciones de partzimas usadas para cada sustrato universal

Sustrato	Partzima A	Partzima B
Sub59	TFRCA/59-P	TFRCB/77-P
SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 63
Sub77	TFRCA/77-P	TFRCB/77-P
SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 63

10.5. Resultados: Amplificación de diana y escisión del sustrato indicador

Cada reacción por qPCR de MNAzimas que contenía ADN genómico humano mostró un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo para la detección en tiempo real de TFRC de ADN genómico humano. Para todas las reacciones, la fluorescencia del control de diana sin ADN fue menor que en las reacciones que contenían diana de ADN. Esto demuestra que el aumento de la fluorescencia producida en las reacciones que contienen la diana se debe al ensamblaje dependiente de la diana de las MNAzimas catalíticamente activas que después escindió uno de los sustratos indicadores universales.

Las reacciones con el sustrato de la serie 2, Sub59, mostraron un valor de Ct promedio de 28,5, mientras que las reacciones con el sustrato de la serie 3, Sub77, mostraron un valor de Ct promedio de 26,5.

Cabe apreciar que Sub59 y Sub77 tienen la misma Tm y % de C/T, pero difieren en el número de citosinas en la región central N_4-N_{13} y la composición de N_8. En la región central que rodea a los ribonucleótidos, Sub77 tiene una citosina en la posición N_8 que parece haber conducido a una mejor eficiencia de escisión con respecto a Sub59 indicada por un valor de Ct más bajo (26,5). Sub59 contiene una timina en la posición N_8 y una citosina añadida en el extremo distal del brazo 5' que ha dado conducido a una reacción de escisión reducida y, por lo tanto, un valor de Ct más alto (28,5).

Cabe destacar la importancia de la naturaleza de la secuencia de nucleótidos del sustrato eficientemente escindido y la proximidad de nucleótidos específicos a los ribonucleótidos de los sustratos. Estas características forman la base de un conjunto de directrices que dan como resultado sustratos universales con una mayor probabilidad de ser escindidos eficientemente a temperaturas elevadas. Estas directrices de diseño incluyen, pero sin limitación (no todas pueden ser necesarias): (i) siete o más nucleótidos de citosina en las diez bases que rodean los ribonucleótidos (N_4-N_{13}); (ii) las bases inmediatamente adyacentes a los ribonucleótidos son citosinas (N_8 y N_9); (iii) el contenido total de sustrato tiene >64% de pirimidinas; y (iv) la Tm total del oligonucleótido es de 66 °C o más (donde esta última directriz solo es aplicable si la temperatura de reacción para la escisión de sustrato es superior a 50 °C) (**Tabla 25**). Se espera el valor de Ct anterior para el sustrato de la serie 3, Sub77, ya que este sustrato cumple todas estas directrices de diseño, mientras que Sub59 solo cumple dos de estas directrices de diseño (**Tabla 25**).

Tabla 25: Eficiencia de la escisión de sustratos universales (enumerados en orden de eficiencia de escisión basada en Ct)

Nombre	Secuencia^	N.º de C N_4-N_{13}	CguC	% de C/T+	Tm*	Ct	N.º (i-iv)-
Sub77	CTCCTCCCTCguCCCTCCTCCT SEQ ID NO: 79	8	Sí	100	70	26,5	4
Sub59	CCTCCTCCCTguCCCTCCTCCT SEQ ID NO: 33	6	No	100	70	28,5	2

^ Las bases en mayúsculas representan ADN y las bases en minúsculas representan ARN y la posición de la base en un sustrato se representa por (N_x)-N_1-N_2-N_3-N_4-N_5-N_6-N_7-N_8-rR-rY-N_9-N_{10}-N_{11}-N_{12}-N_{13}-N_{14}-N_{15}-(N_x)

+ % de C/T (pirimidinas) de la longitud de secuencia mostrada anteriormente para cada sustrato, no incluye ribonucleótidos

* La Tm dada aquí equivale a la temperatura de fusión de las bases unidas calculada usando la regla de Wallace; solo calculada para las bases que se hibridan con su complemento. Cuando el sustrato se une a la MNAzima basándose en la ADNzima 10-23, el ribonucleótido "g" permanece sin unir, por lo tanto, no contribuye a la Tm unida global.

~ El número de las directrices de diseño (i), (ii), (iii) y/o (iv) que ha cumplido la secuencia de sustrato.

REFERENCIAS

Publicación Internacional PCT N.º WO/2007/041774
Publicación Internacional PCT N.º WO/2008/040095
Publicación Internacional PCT N.º WO/2008/122084
Patente de Estados Unidos N.º 4.683.202
Patente de Estados Unidos N.º 4.683.195
Patente de Estados Unidos N.º 4.800.159
Patente de Estados Unidos N.º 4.965.188
Patente de Estados Unidos N.º 5.176.995
Publicación de Estados Unidos número 2007-0231810
Publicación de Estados Unidos número 2010-0136536
Publicación de Estados Unidos número 2011-0143338
Cairns, M.J, Hopkins, T.M., Witherington, G., Wang, L. and Sun, L (1999) Target site selection for an RNA-cleaving catalytic DNA. Nat. Biotech. 17: 480-486.
Cruz, R.P., Withers, J.B. and Li, Y. (2004) Dinucleotide junction cleavage versatility of 8-17 deoxyribozyme. Chem Biol. Jan;11(1): 57-67.
Perreault, J., Labuda, D., Usman, N., Yang, J. and Cedergren, R. (1991) Relationship between 2'-hydroxyls and magnesium binding in the hammerhead RNA domain: a model for ribozyme catalysis. Biochemistry 30(16): 4020-5.
Perreault, J., Wu, T., Cousineau, B., Ogilvie, K. and Cedergren, R. (1990) Mixed deoxyribo- and ribo-oligonucleotides with catalytic activity. Nature 344(6266): 565-7.
Silverman, S. (2004) Breaking up is easy to do (if you're a DNA enzyme that cleaves RNA). Chem Biol. Jan;11(1): 7-8.Wallace, R.B., Shaffer, J., Murphy, R.F., Bonner, J., Hirose, T. and Itakura K. (1979) Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to φx174 DNA: the effect of single base pair mismatch. Nucl. Acids Res. 6(11): 3543- 3558.
Zaborowska, Z., Furste, J., Erdmann, V. and Kurreck, J. (2002) Sequence requirements in the catalytic core of the "10-23" DNA enzyme. J Biol Chem. 277(43): 240617-22.

REIVINDICACIONES

1. Un sustrato de polinucleótido aislado para una enzima de ácido nucleico catalítica, comprendiendo dicho sustrato de polinucleótido una secuencia N_1-N_2-N_3-N_4-N_5-N_6-N_7-N_8-rR-rY-N_9-N_{10}-N_{11}-N_{12}-N_{13}-N_{14}-N_{15}, en el que:

rR es un ribonucleótido de purina;
rY es un ribonucleótido de pirimidina;
cada uno de N_1-N_{15} son nucleótidos;
seis o más de N_5-N_{13} son nucleótidos de citosina;
N_9 es un nucleótido de citosina;
el ribonucleótido de pirimidina comprende uracilo; y
menos de tres de N_9-N_{15} son nucleótidos de guanina;
y en el que dicho sustrato de polinucleótido no consiste en:
(i) una secuencia definida en la SEQ ID NO: 75 o SEQ ID NO: 86, o
(ii) una cualquiera de las siguientes secuencias:
AGCCTCCCTGGGCACGGGTCCCguCTCCTTTGAAGGTTTCCTCTCG;
TAGCCTCCCTGGGCGGGTCCCguCTCCTTTGTCACGCCTCTCGTT;
TAGCCTTCCTCCCGGGTCCCguCTCCTTTGGTTTCCTCguCCCTGGGCAC
GCCTCTCGT;
CTAGCCTCCCTGGTCGGGTCCCguCTCCTTTGTCACGCCTCguTCCTCCC
AGTTTCCTCTCGTT;
y
AGCCTCCCTGGGCATCGGGTCCCguCTCCTTTGTAAGGTTTCCTCTCG.

2. El sustrato de polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sustrato de polinucleótido comprende o consiste en una secuencia definida por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 25-27, 29-30, 33, 72-74, 76-85, 87-90, o 172-175.

3. El sustrato de polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que siete o más de N_5-N_{13} son nucleótidos de citosina.

4. El sustrato de polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 3, en el que siete o más de N_5-N_{13} son nucleótidos de citosina y el sustrato de polinucleótido comprende o consiste en una secuencia definida por cualquiera de las SEQ ID NOs: 29, 73, 76-80, 82-83, 85, 87-90, o 172-175.

5. El sustrato de polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que siete o más de N_4-N_{13} son nucleótidos de citosina.

6. El sustrato de polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 5, en el que siete o más de N_4-N_{13} son nucleótidos de citosina y el sustrato de polinucleótido comprende o consiste en una secuencia definida por cualquiera de las SEQ ID NOs: 27, 73, 76-83, 85, 87-90, o 172-175.

7. El sustrato de polinucleótido aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que N_8 es un nucleótido de citosina.

8. El sustrato de polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 7, en el que N_8 y N_9 son nucleótidos de citosina, y el sustrato de polinucleótido comprende o consiste en una secuencia definida por cualquiera de las SEQ ID NOs: 25-26, 29-30, 72-74, 76-85, 87-90, o 172-175.

9. El sustrato de polinucleótido aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dos, uno o ninguno de N_9-N_{15} son nucleótidos de guanina.

10. El sustrato de polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 9, en el que uno o ninguno de N_9-N_{15} son nucleótidos de guanina, y el sustrato de polinucleótido comprende o consiste en una secuencia definida por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 25-27, 29-30, 33, 72-74, 76-80, 82-85, 87-90, o 172-175.

11. El sustrato de polinucleótido aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que mas de diez, más de once, más de doce, o más de trece de N_1-N_{15} son nucleótidos de pirimidina.

12. El sustrato de polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 11, en el que once, doce o más de doce de N_1-N_{15} son nucleótidos de pirimidina, y el sustrato de polinucleótido comprende o consiste en una secuencia definida por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 25-27, 29, 33, 73, 74, 76-85, 87-90 o 173-175.

13. El sustrato de polinucleótido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además un marcador detectable para detectar el sustrato de polinucleótido.

14. El sustrato de polinucleótido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además una porción detectable y una porción de inactivador, en el que un efecto detectable proporcionado por la porción detectable aumenta o disminuye tras la modificación del sustrato de polinucleótido por dicha enzima catalítica de ácido nucleico.

15. El sustrato de polinucleótido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que:

(i) el ribonucleótido de purina comprende guanina; o
(ii) el ribonucleótido de purina comprende guanina y el ribonucleótido de pirimidina comprende uracilo.

16. El sustrato de polinucleótido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que dicha enzima catalítica de ácido nucleico es:

(a) una enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima) y dicha porción se une al menos a un brazo de sustrato de dicha MNAzima; o
(b) una ADNzima.

17. Un método para detectar la presencia de al menos una diana que comprende:

(a) proporcionar dos o más partzimas oligonucleotídicas, en las que al menos una primera partzima oligonucleotídica y una segunda partzima oligonucleotídica se autoensamblan en presencia de dicha diana para formar al menos una primera enzima de ácido nucleico multicomponente catalíticamente activa (MNAzima);
(b) proporcionar el sustrato de polinucleótido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que dicho sustrato de polinucleótido puede modificarse por dicha primera MNAzima, en el que dicha modificación de dicho sustrato de polinucleótido por dicha MNAzima proporciona un efecto detectable;
(c) poner en contacto dichas dos o más partzimas oligonucleotídicas con una muestra que supuestamente contiene dicha diana en condiciones que permiten:
(1) el autoensamblaje de dicha al menos la primera MNAzima, y
(2) la actividad catalítica de dicha al menos la primera MNAzima; y
(d) detectar dicho efecto detectable.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la primera y segunda partzimas oligonucleotídicas comprenden las secuencias respectivas definidas por: SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 63; SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 49; SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 51; SEQ ID NO: 52 y SEQ ID NO: 51; SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 57; SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 61; SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 63; SEQ ID NO: 64 y SEQ ID NO: 65; SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 67; SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 68; SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70; SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 63; SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 68; SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 99; SEQ ID NO: 100 y SEQ ID NO: 103; SEQ ID NO: 104 y SEQ ID NO: 105; SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 107; SEQ ID NO: 108 y SEQ ID NO: 109; SEQ ID NO: 110 y SEQ ID NO: 111; SEQ ID NO: 112 y SEQ ID NO: 113; SEQ ID NO: 116 y SEQ ID NO: 117; SEQ ID NO: 118 y SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 120 y SEQ ID NO: 121; SEQ ID NO: 122 y SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 155 y SEQ ID NO: 156; SEQ ID NO: 157 y SEQ ID NO: 158; SEQ ID NO: 159 y SEQ ID NO: 160; SEQ ID NO: 168 y SEQ ID NO: 169; SEQ ID NO: 179 y SEQ ID NO: 180; SEQ ID NO: 181 y SEQ ID NO: 182; SEQ ID NO: 183 y SEQ ID

NO: 184 o SEQ ID NO: 185 y SEQ ID NO: 186.

19. El método de la reivindicación 17 o la reivindicación 18, en el que dicha detección en parte (i) comprende el uso de espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de giro electrónico, espectroscopía por polarización de fluorescencia, dicroísmo circular, inmunoensayo, cromatografía, radiometría, electroquímica, fotometría, escintigrafía, métodos electrónicos, espectroscopía de UV, luz visible o infrarroja, métodos enzimáticos, o cualquier combinación de los mismos.

20. El sustrato de polinucleótido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que el sustrato de polinucleótido está en un kit que también comprende una enzima catalítica de ácido nucleico capaz de modificar catalíticamente dicho sustrato de polinucleótido.

21. El sustrato de polinucleótido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que el sustrato de polinucleótido está unido a un soporte sólido en un ensamblaje.

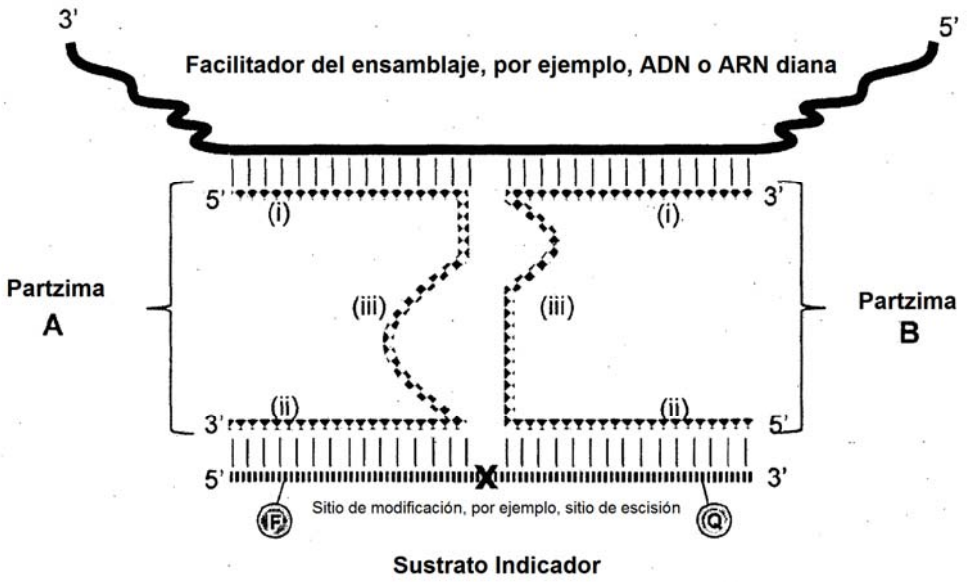

3'
5'
Facilitador del ensamblaje, por ejemplo, ADN o ARN diana
5'
(i)
(i)
3'
Partzima
A
(iii)
(iii)
Partzima
B
(ii)
(ii)
3'
5'
5'
X
3'
F
Sitio de modificación, por ejemplo, sitio de escisión
Q
Sustrato Indicador

FIGURA 1

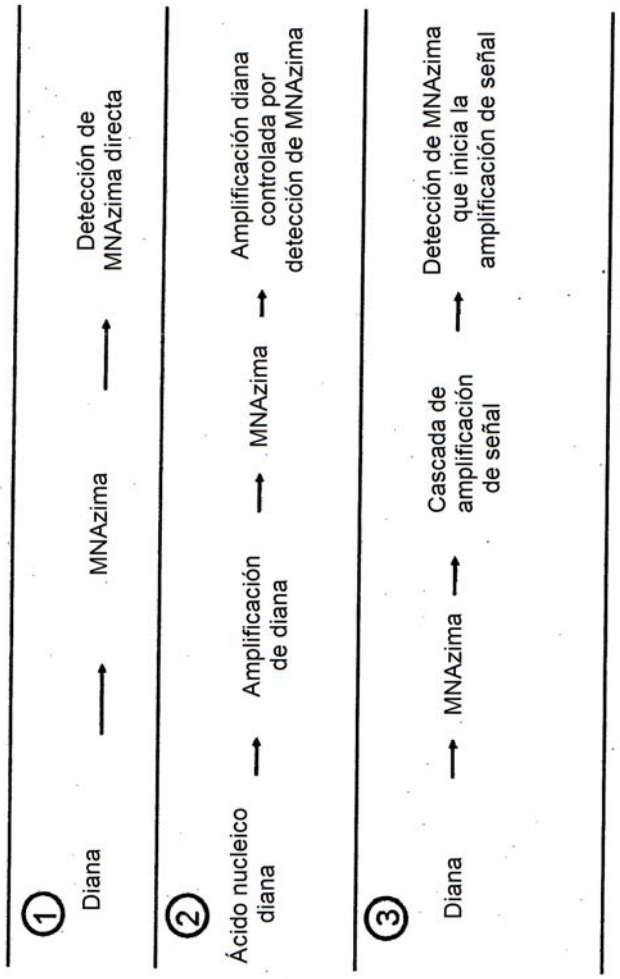

1
Diana
MNAzima
Detección de MNAzima directa
2
Ácido nucleico diana
Amplificación de diana
MNAzima
Amplificación diana controlada por detección de MNAzima
3
Diana
MNAzima
Cascada de amplificación de señal
Detección de MNAzima que inicia la amplificación de señal

FIGURA 2

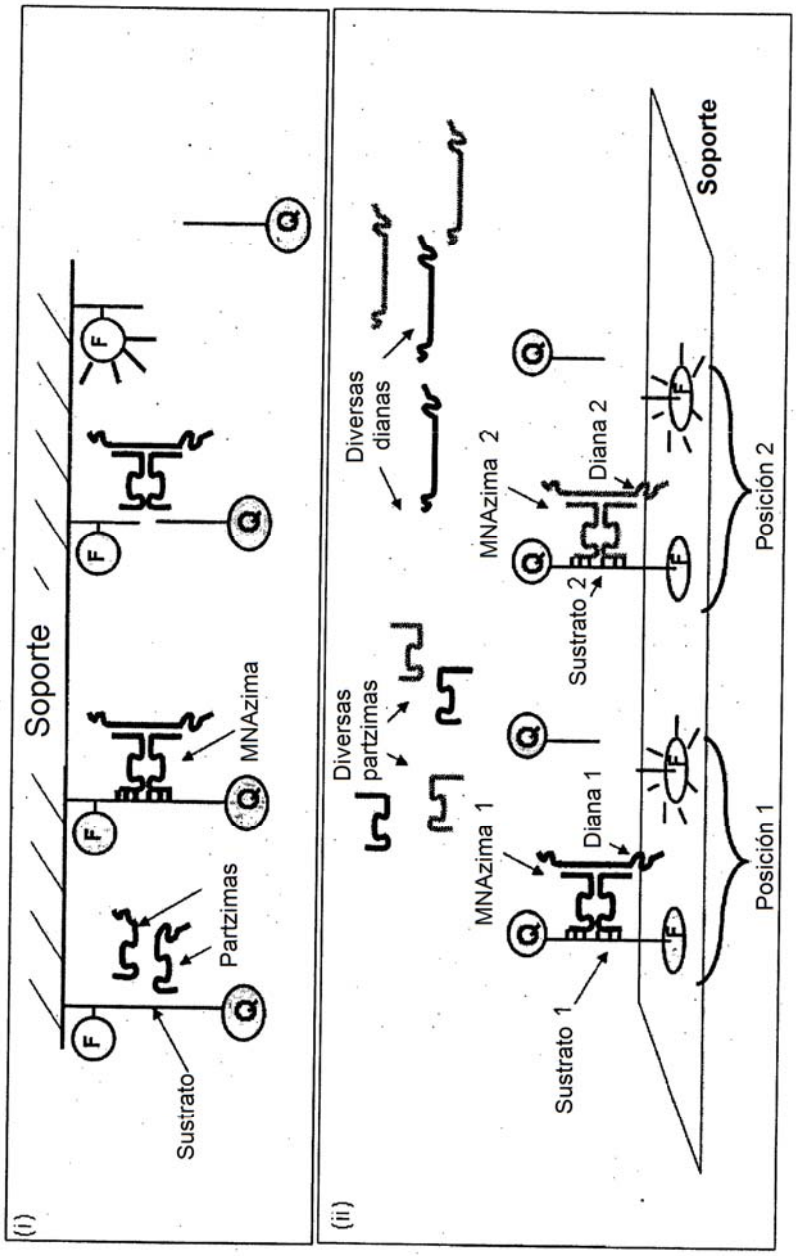

(i)
Soporte
F
Q
MNAzima
Partzimas
Sustrato
(ii)
Diversas dianas
Diversas partzimas
MNAzima 2
Diana 2
Sustrato 2
MNAzima 1
Diana 1
Sustrato 1
Soporte
Posición 2
Posición 1

FIGURA 3

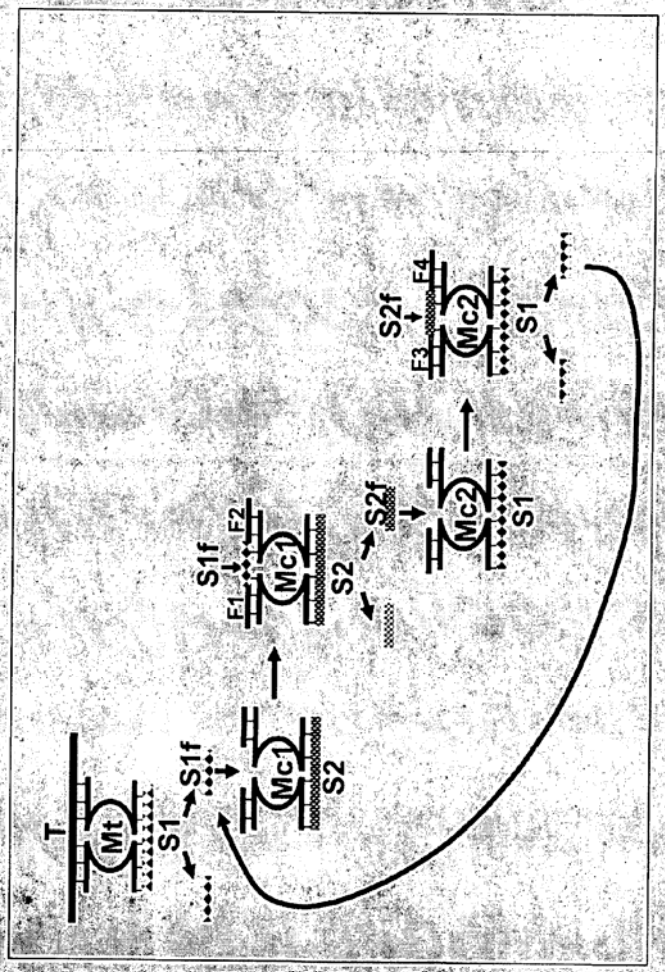


FIGURA 4

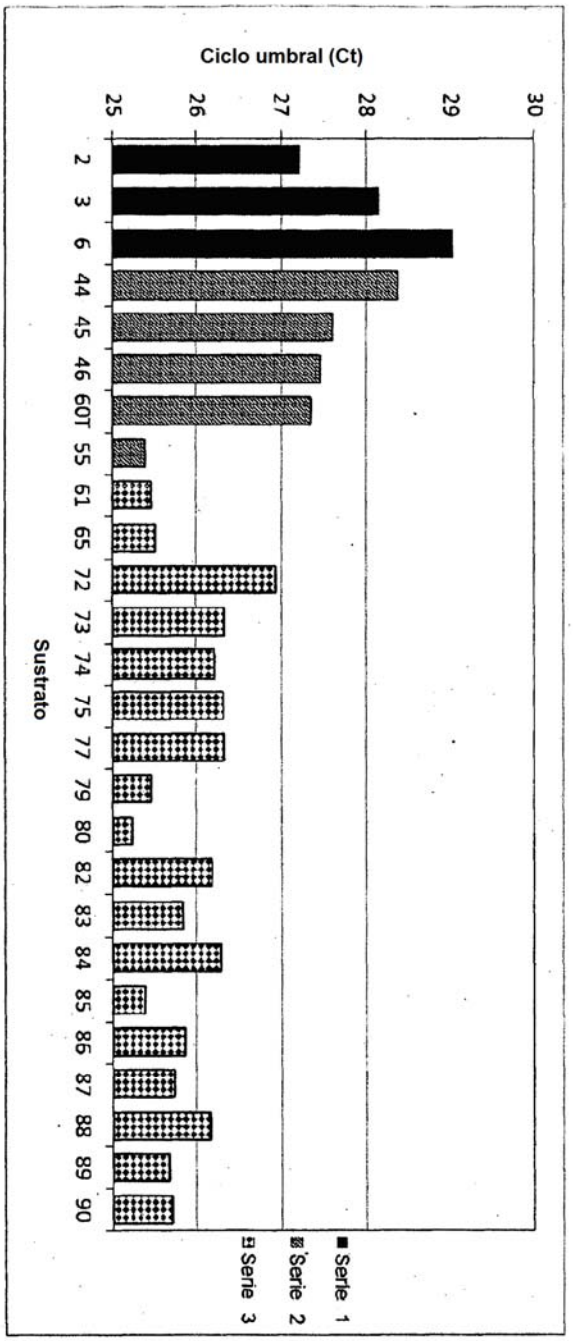

Ciclo umbral (Ct)
30
29
28
27
26
25
2
3
6
44
45
46
60T
55
61
65
72
73
74
75
77
79
80
82
83
84
85
86
87
88
89
90
Sustrato
Serie 1
Serie 2
Serie 3

FIGURA 5

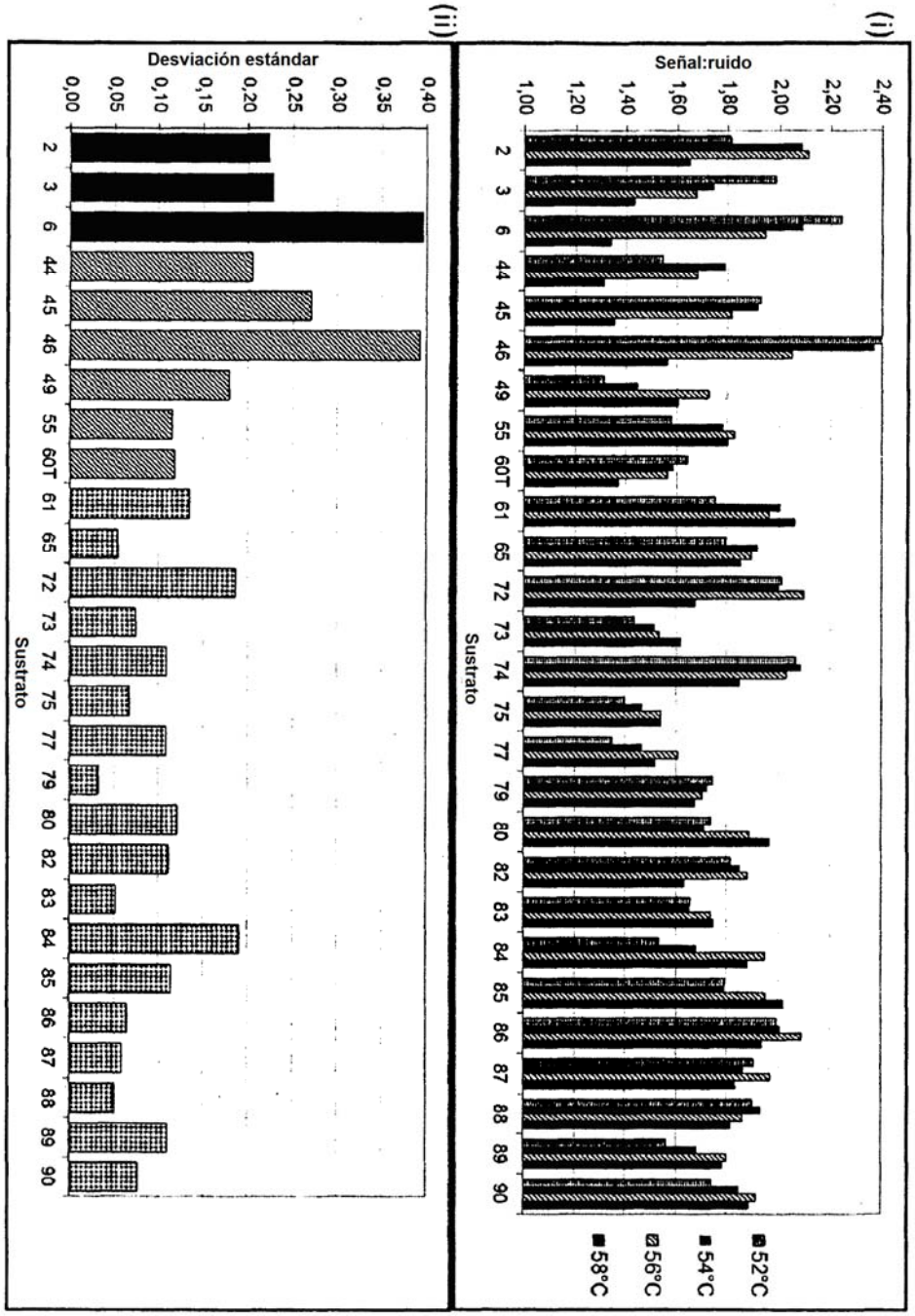

(i)
Señal:ruido
2,40
2,20
2,00
1,80
1,60
1,40
1,20
1,00
2 3 6 44 45 46 49 55 60T 61 65 72 73 74 75 77 79 80 82 83 84 85 86 87 88 89 90
Sustrato
52°C
54°C
56°C
58°C
(ii)
Desviación estándar
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
2 3 6 44 45 46 49 55 60T 61 65 72 73 74 75 77 79 80 82 83 84 85 86 87 88 89 90
Sustrato

FIGURA 6

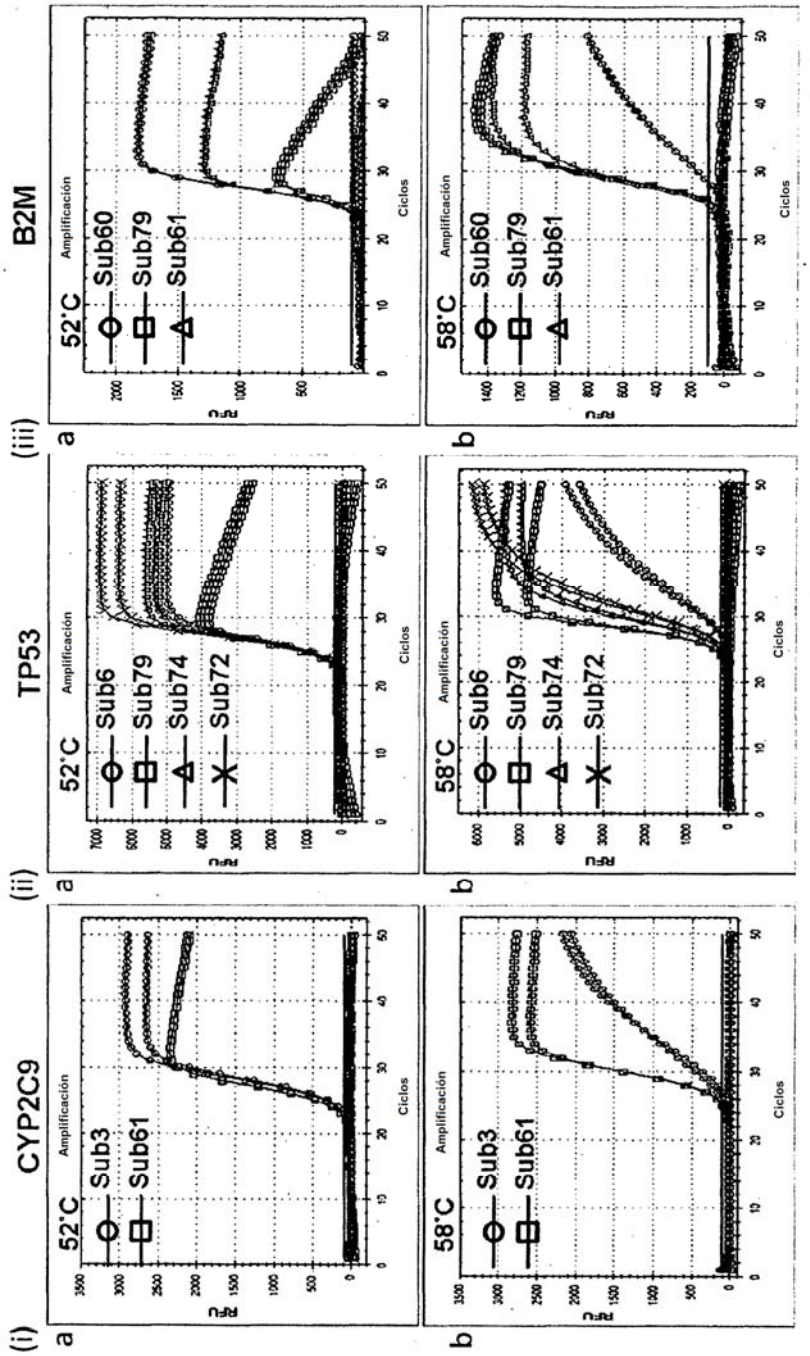

(i)
CYP2C9
a
52°C
Sub3
Sub61
b
58°C
Sub3
Sub61
(ii)
TP53
a
52°C
Sub6
Sub79
Sub74
Sub72
b
58°C
Sub6
Sub79
Sub74
Sub72
(iii)
B2M
a
52°C
Sub60
Sub79
Sub61
b
58°C
Sub60
Sub79
Sub61
Amplificación
Ciclos
RFU

FIGURA 7

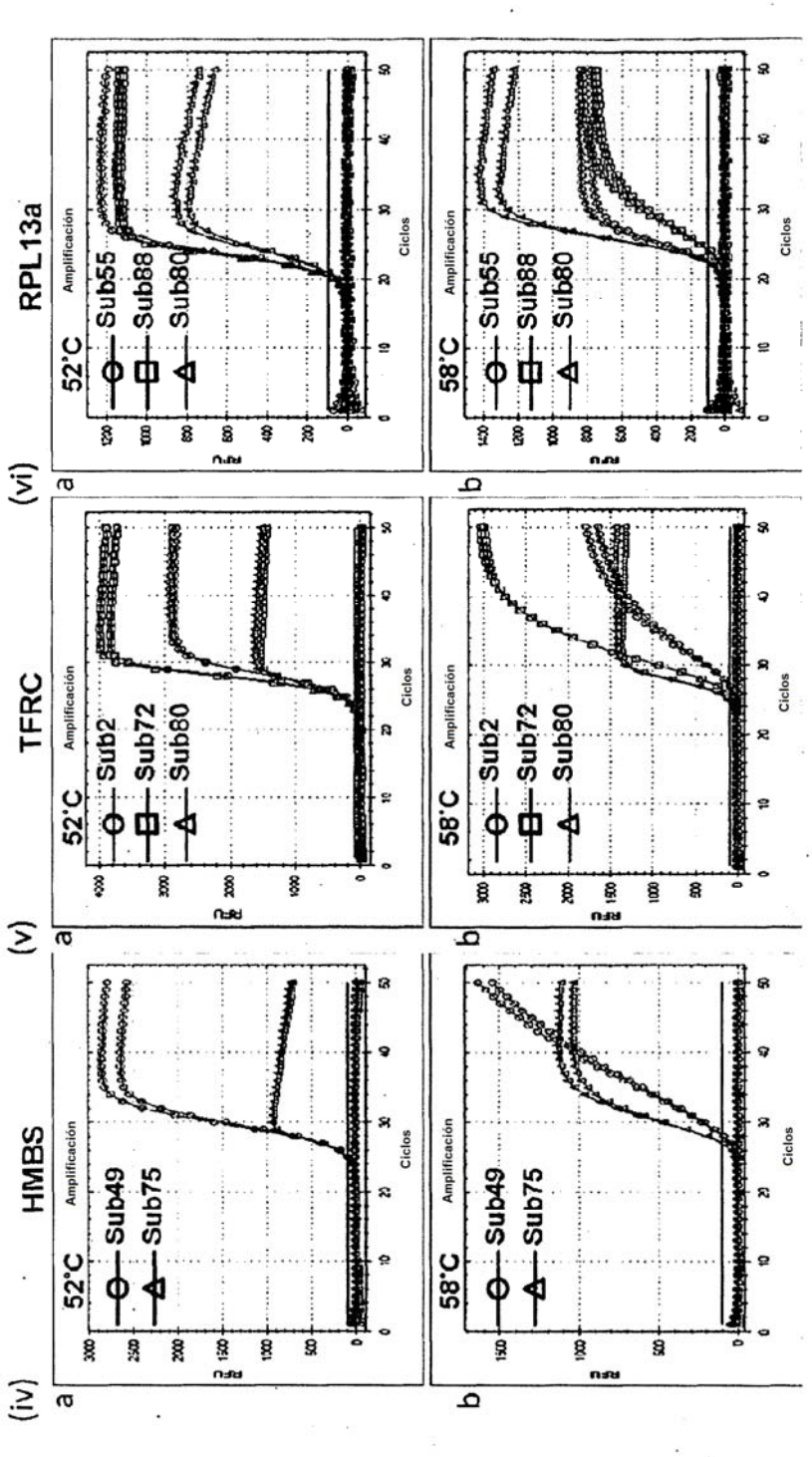


FIGURA 7 (Cont.)

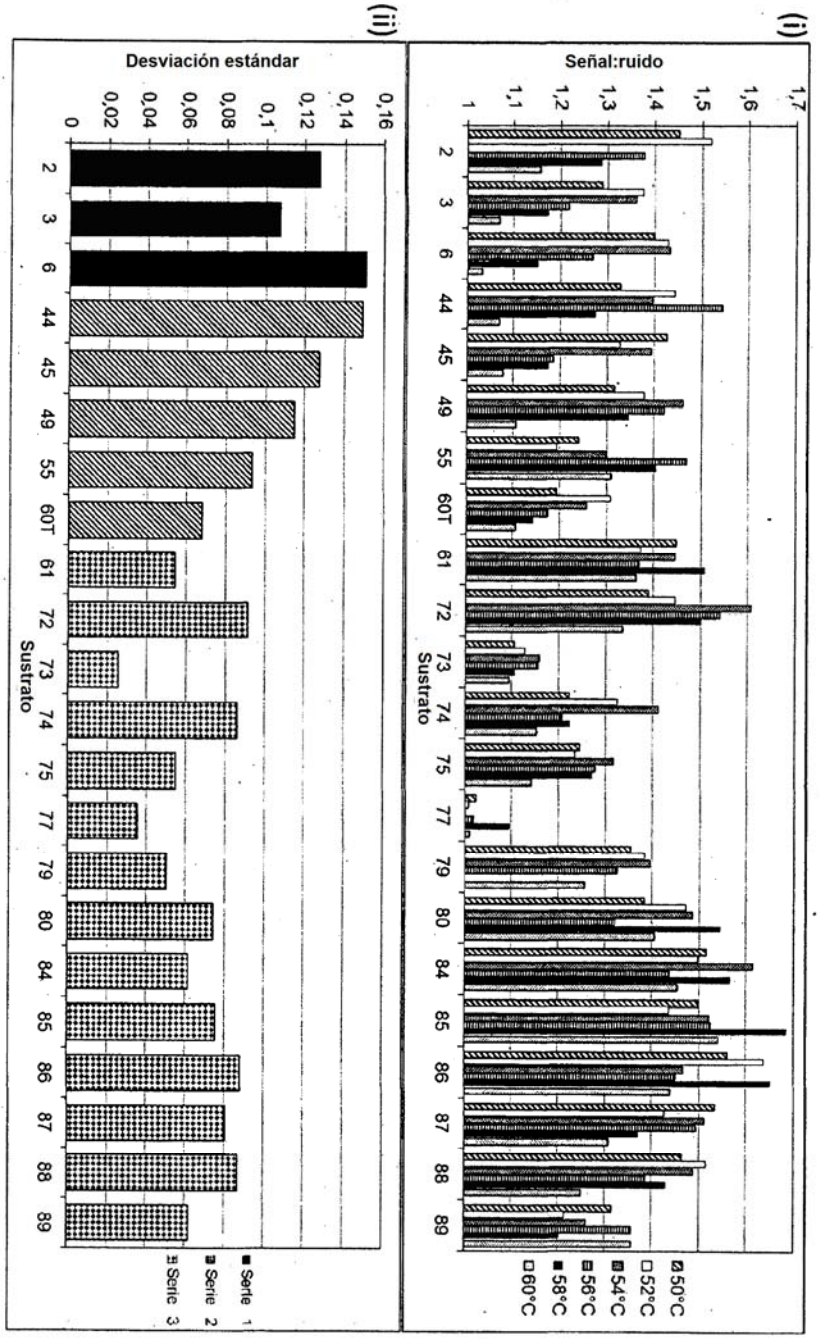

(i)
Señal:ruido
1,7
1,6
1,5
1,4
1,3
1,2
1,1
1
2 3 6 44 45 49 55 60T 61 72 73 74 75 77 79 80 84 85 86 87 88 89
Sustrato
50°C
52°C
54°C
56°C
58°C
60°C
(ii)
Desviación estándar
0,16
0,14
0,12
0,1
0,08
0,06
0,04
0,02
0
2 3 6 44 45 49 55 60T 61 72 73 74 75 77 79 80 84 85 86 87 88 89
Sustrato
Serie 1
Serie 2
Serie 3

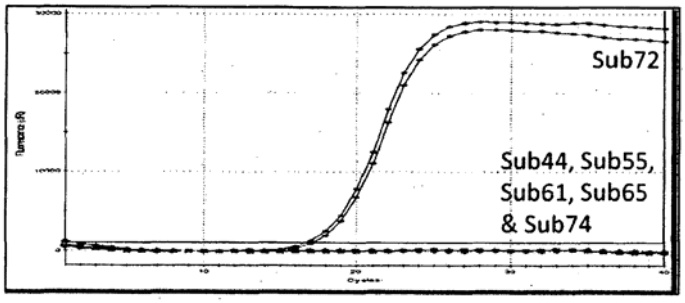
FIGURA 8

(i)

a

Sub44	C A G G T C T C C T C g u C C C T A T A G T G A	SEQ ID NO: 25
Sub55	A C C G C A C C T C g u C C C C A G C T C	SEQ ID NO: 29
Sub61	C T C G A C C C C C g u C T C C A C G C C A	SEQ ID NO: 73
Sub65	T C T C G A C C T C g u C T C C A C G C C A	SEQ ID NO: 74
Sub74	A T C A C T C C C C g u C C C C T C C C A G	SEQ ID NO: 77
Sub72	A T C A C G C C T C g u C T C C T C C C A G	SEQ ID NO: 75

b



(ii)

a

Sub44	C A G G T C T C C T C g u C C C T A T A G T G A	SEQ ID NO: 25
Sub55	A C C G C A C C T C g u C C C C A G C T C	SEQ ID NO: 29
Sub61	C T C G A C C C C C g u C T C C A C G C C A	SEQ ID NO: 73
Sub65	T C T C G A C C T C g u C T C C A C G C C A	SEQ ID NO: 74
Sub72	A T C A C G C C T C g u C T C C T C C C A G	SEQ ID NO: 77
Sub74	A T C A C T C C C C g u C C C C T C C C A G	SEQ ID NO: 75

b

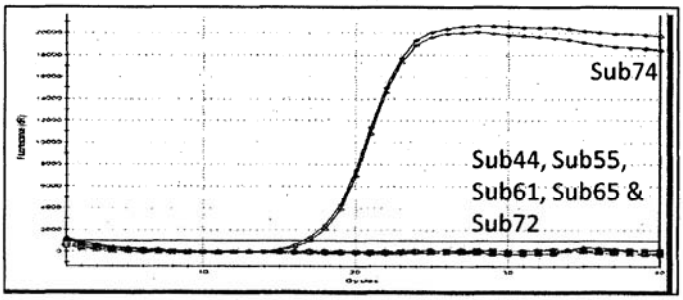


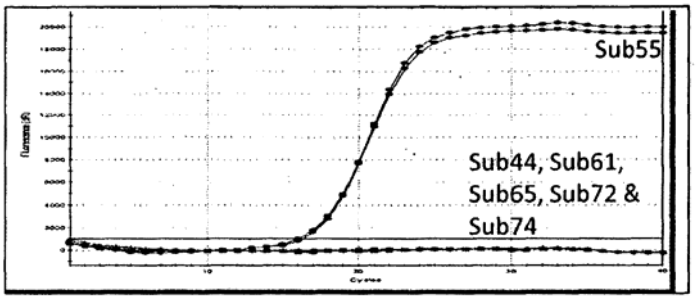
FIGURA 9

(iii)

a

Sub44	C A G G T C T C C T C g u C C C T A T A G T G A	SEQ ID NO: 25
Sub72	A T C A C G C C T C g u C T C C T C C C A G	SEQ ID NO: 75
Sub74	A T C A C T C C C C g u C C C C T C C C A G	SEQ ID NO: 77
Sub61	C T C G A C C C C g u C T C C A C G C C A	SEQ ID NO: 73
Sub65	T C T C G A C C T C g u C T C C A C G C C A	SEQ ID NO: 74
Sub55	A C C G C A C C T C g u C C C C A G C T C	SEQ ID NO: 29

b



(iv)

a

Sub55	A C C G C A C C T C g u C C C C A G C T C	SEQ ID NO: 29
Sub61	C T C G A C C C C g u C T C C A C G C C A	SEQ ID NO: 73
Sub65	T C T C G A C C T C g u C T C C A C G C C A	SEQ ID NO: 74
Sub72	A T C A C G C C T C g u C T C C T C C C A G	SEQ ID NO: 75
Sub74	A T C A C T C C C C g u C C C C T C C C A G	SEQ ID NO: 77
Sub44	C A G G T C T C C T C g u C C C T A T A G T G A	SEQ ID NO: 75

b

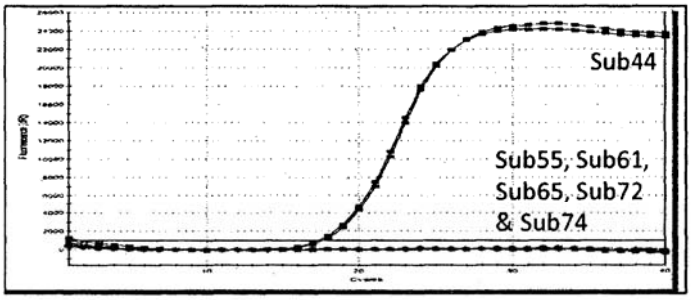


FIGURA 9 (Cont.)

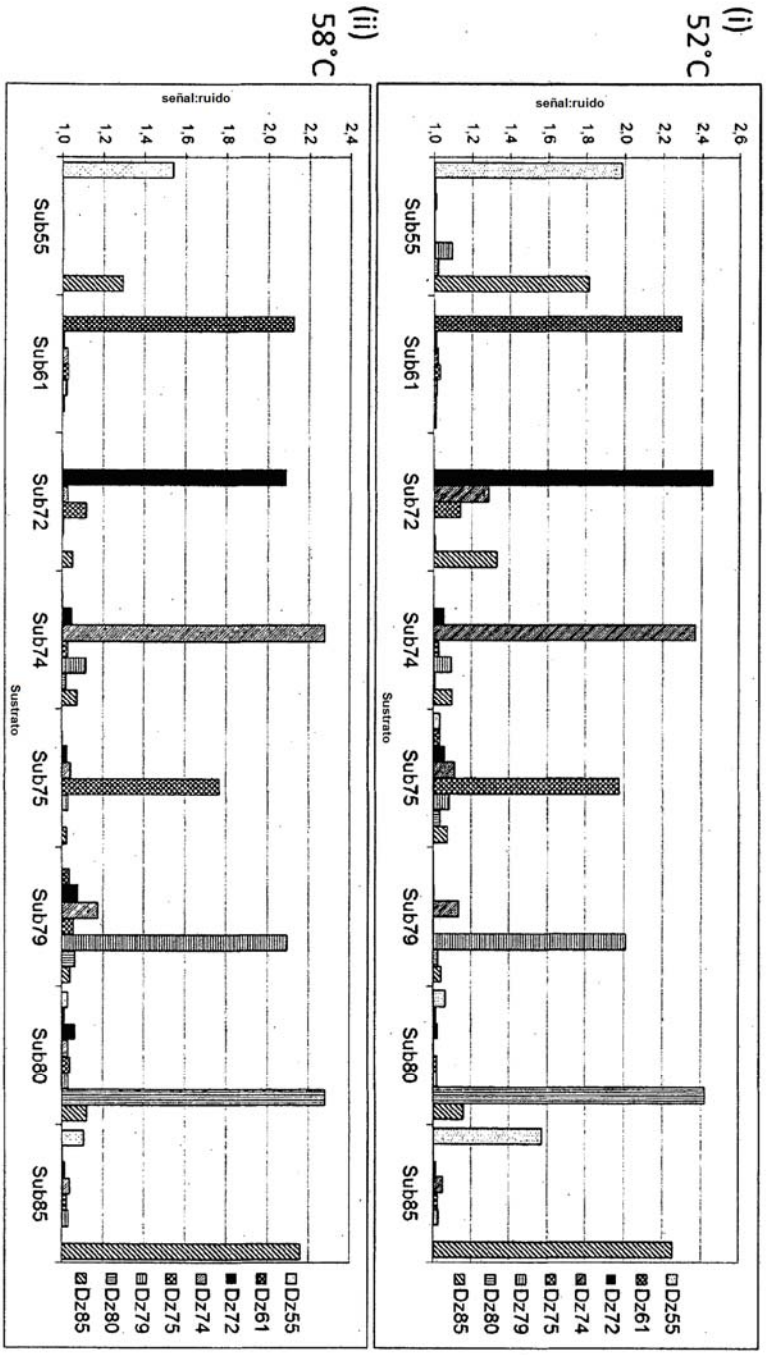

(i)
52°C
señal:ruido
2,6
2,4
2,2
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
Sub55
Sub61
Sub72
Sub74
Sub75
Sub79
Sub80
Sub85
Sustrato
Dz55
Dz61
Dz72
Dz74
Dz75
Dz79
Dz80
Dz85
(ii)
58°C
señal:ruido
2,4
2,2
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
Sub55
Sub61
Sub72
Sub74
Sub75
Sub79
Sub80
Sub85
Sustrato
Dz55
Dz61
Dz72
Dz74
Dz75
Dz79
Dz80
Dz85

FIGURA 10

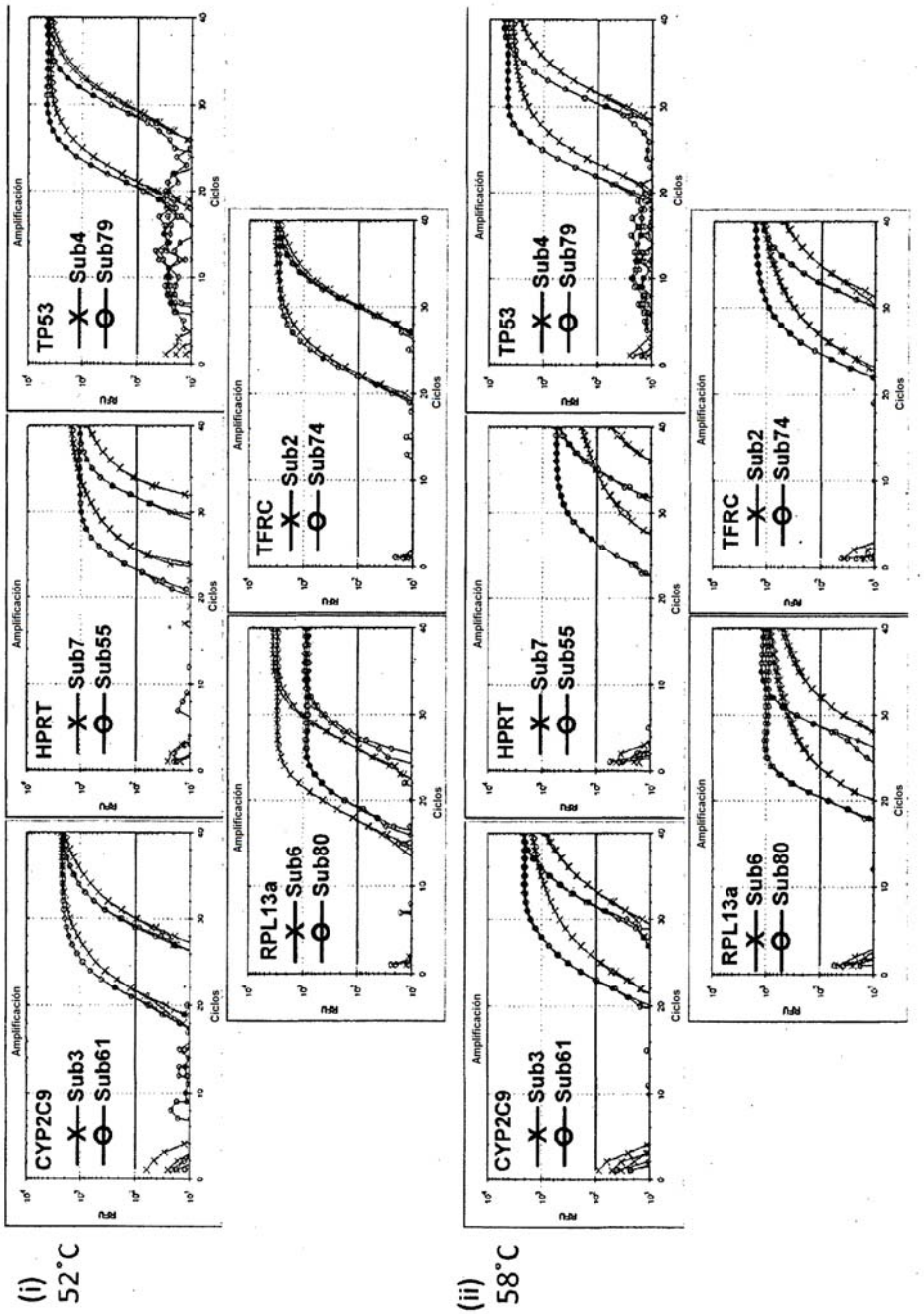

(i)
52°C
CYP2C9
Sub3
Sub61
HPRT
Sub7
Sub55
TP53
Sub4
Sub79
RPL13a
Sub6
Sub80
TFRC
Sub2
Sub74
(ii)
58°C
CYP2C9
Sub3
Sub61
HPRT
Sub7
Sub55
TP53
Sub4
Sub79
RPL13a
Sub6
Sub80
TFRC
Sub2
Sub74
Amplificación
Ciclos
RFU

FIGURA 11