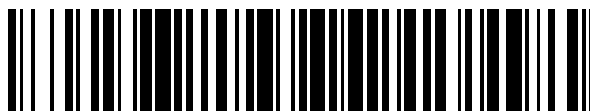


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 903**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2012 PCT/EP2012/072402**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2013 WO13079307**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2012 E 12798176 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2776585**

54 Título: **Oligonucleótido bifuncional para la detección de multianalitos universal en tiempo real**

30 Prioridad:

10.11.2011 DE 102011055247

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

06.02.2019

73 Titular/es:

**ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG
(100.0%)**

**Fahnenbergplatz 1
79085 Freiburg, DE**

72 Inventor/es:

**ROTH, GÜNTER;
FALTIN, BERND;
STETTEN, FELIX y
WALDE, SIMON**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 698 903 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

Oligonucleótido bifuncional para la detección de multianálitos universal en tiempo real

La invención se refiere a un procedimiento para la detección de al menos una molécula objetivo que comprende los siguientes pasos: a) puesta a disposición de una sonda mediadora para la detección de al menos una molécula objetivo que comprende una región de sonda y una región mediadora, siendo la sonda mediadora un oligonucleótido y estando dispuesta la región de sonda en el extremo 3' y la región mediadora en el extremo 5' del oligonucleótido, presentándose entre las regiones un punto de disociación químico, biológico y/o físico, y presentando la región de sonda una afinidad con una molécula patrón y la región mediadora una afinidad adicional con una molécula de prueba; b) puesta a disposición de una molécula de prueba, siendo la molécula de prueba un oligonucleótido, y presentando la misma al menos las siguientes regiones: (i) una primera región en un extremo 5' de la molécula de prueba, que presenta un aceptor de fluorescencia o un donador de fluorescencia y/o un grupo químico para el enlace a una fase sólida y/o un grupo protector químico, (ii) una segunda región que interacciona con la región mediadora, y (iii) una tercera región, que presenta un donador de fluorescencia o un aceptor de fluorescencia y/o un grupo protector químico; c) enlace de la región de sonda de la sonda mediadora a una secuencia de la molécula patrón y/o de la molécula objetivo; d) amplificación de la molécula patrón y/o de la molécula objetivo con ayuda de una molécula auxiliar, preferentemente mediante un proceso de amplificación que comprende un procedimiento isotérmico y/o un procedimiento basado en la ciclación térmica y/o a través de una PCR, de modo especialmente preferente una PCR en tiempo real; e) disociación de la sonda mediadora en el punto de disociación durante el paso d) mediante al menos la molécula auxiliar del paso d) u otras moléculas auxiliares; y f) enlace de la región mediadora disociada de la sonda mediadora a la molécula de prueba; g) detección de señales.

Estado de la técnica

En el estado de la técnica se describen numerosos métodos de investigación de biología molecular, que posibilitan la detección, y en caso dado el análisis de una muestra. Uno de estos métodos es la detección y el análisis paralelo de varios cientos de pruebas individuales en una pequeña cantidad de material de muestra biológico por medio de una micromatriz. Existen diversas formas de micromatrices, que también se denominan "chips génicos" or "biochips", ya que pueden contener mucha información en un espacio mínimo, como un chip informático.

Las micromatrices permiten la detección altamente paralela de diversos analitos en un sustrato típicamente plano. Las moléculas de sonda inmovilizadas de una micromatriz se inmovilizan, o bien se sintetizan en un sustrato apropiado en el transcurso del proceso de producción en un punto definido (lugar) de una trama (ensayo) mediante transmisión de pequeños volúmenes de líquido. Esta inmovilización bidimensional, disuelta localmente, de moléculas de captura se puede configurar de modo que se puedan detectar ácidos nucleicos o péptidos, o bien proteínas. Por regla general, los procedimientos de litografía *in situ* permiten solo la síntesis de oligonucleótidos cortos, o bien cadenas de aminoácidos cortas. Las micromatrices de ADN producidas se pueden almacenar durante meses bajo condiciones apropiadas, mientras que las matrices proteicas se pueden almacenar de manera funcional solo durante un tiempo breve.

Para un análisis de micromatrices, la muestra a analizar se mezcla con un tampón apropiado y se incuba con la micromatriz de modo correspondiente, teniendo lugar típicamente un proceso de hibridación en el caso de secciones de secuencia complementarias. Debido a la baja sensibilidad de sistemas de micromatriz, en el caso de ácido nucleico a identificar, la muestra se amplifica en un paso de reacción previo (por ejemplo por medio de reacción en cadena de polimerasa (PCR), RT-PCR o amplificación de genoma completo (WGA)), y se marca, por ejemplo con un colorante fluorescente, para una detección, o se incuba en la micromatriz con una sonda de detección adicional. Péptidos y proteínas no se pueden amplificar por vía enzimática, y se concentran mediante purificaciones de la muestra a investigar. Frente a éstos existen cargas que llevan a cabo una intensificación de señal sobre la micromatriz una vez efectuada la hibridación, por ejemplo por medio de amplificación en círculo rodante (RCA). Este modo de proceder comprende varios pasos de trabajo largos, y aumenta el peligro de imprecisiones y contaminaciones. Las aplicaciones típicas encuentran micromatrices en análisis de expresión, así como la identificación de patógenos o marcadores de resistencia. Por el estado de la técnica, para el especialista es conocida una visión general sobre diversas técnicas de producción y aplicaciones.

En el estado de la técnica se describe la hibridación de fragmentos de ADN amplificados en oligonucleótidos inmovilizados, específicos de alelo, que pertenecen a los procedimientos rutinarios de un especialista. Un paso de amplificación previo con moléculas de cebador en diferentes concentraciones permite la generación de ADN de hebra simple, marcado, que interacciona preferentemente con las moléculas de captura de la micromatriz. Después de trasladar el medio a una micromatriz, una vez efectuada la hibridación se puede efectuar la detección por medio de fluorescencia o mediante empleo de cebadores marcados con biotina, efectuándose tras el paso de hibridación una incubación, en especial con una peroxidasa de rábano picante modificada con estreptavidina, que transforma un sustrato soluble en un producto de reacción insoluble. Mediante la detección del precipitado cromógeno se puede identificar un fenómeno de enlace entre molécula objetivo y de captura. En caso dado, tras la hibridación de la(s) secuencia(s) objetivo amplificada(s) previamente se puede llevar a cabo una reacción de prolongación de un

cebador inmovilizado, en el que se incorporan nucleótidos marcados con biotina. Tras incubación con una fosfatasa alcalina modificada con estreptavidina y adición de un sustrato apropiado se puede identificar la presencia de la secuencia objetivo mediante formación de un producto de reacción cromógeno.

En una realización ulterior (PCR múltiplex cuantitativa basada en matriz de ADN, MQDA-PCR), el ácido nucleico a identificar se amplifica paralelamente, en primer lugar con cebadores bifuncionales para pocos ciclos de PCR, en un proceso de varias etapas. En este caso se producen amplificadores con extremo 5' universal, que posibilita a continuación la amplificación competitiva casi monoplex con cebadores universales. Seguidamente, en un paso de trabajo aislado se marca una sonda específica para la secuencia objetivo mediante adición de un nucleótido modificado, y se hibrida en una micromatriz. Mediante el empleo de cebadores bifuncionales se puede llevar a cabo una reacción PCR de dos etapas con grado de multiplexación elevado, sin que se influya negativamente de manera significativa sobre la eficiencia de reacción a través de diferentes secuencias. El protocolo de realización complejo influye negativamente sobre la integración en el proceso de trabajo. La adición y extracción múltiple de reactivos, o bien productos de reacción, así como la transferencia de la carga de reacción entre varios recipientes, implican un gasto de trabajo elevado ("tiempo práctico"), tiempos de mantenimiento largos ("tiempo necesario para resultado"), y el peligro de fallos de realización. Además de la preparación de reacciones PCR individuales, la realización implica varios pasos de incubación, en los que se digiere, a modo de ejemplo, el cebador bifuncional, se marcan sondas y se incuban las mismas en la micromatriz. En este método existe una correlación directa entre secuencia objetivo a identificar y molécula de captura inmovilizada en la superficie del chip. De este modo, el procedimiento no se puede adaptar a secuencias objetivo divergentes, sin producir una nueva micromatriz. Los citados procedimientos poseen adicionalmente la ventaja de que el material de muestra se debe transferir entre dos recipientes de reacción tras la amplificación, pudiéndose producir fallos de realización y contaminaciones.

Una posibilidad de minimizar el peligro de contaminación consiste en llevar a cabo amplificación e hibridación en un recipiente de reacción. Mediante separación espacial de dos compartimentos de reacción se pueden desarrollar diversas reacciones en diferentes etapas en un recipiente. En el estado de la técnica se describe un sistema de "micromatriz en un tubo", en el que dos compartimentos y una reserva de tampón están integrados en un recipiente de reacción (Liu, Q. et al, 2007, Microarray-in-a-tube for detection of multiple viruses. Clin Chem, 53, 188-194). Mediante inversión del recipiente se traslada el líquido de la sección inferior a la sección superior, y se mezcla con un tampón de reacción almacenado previamente, no debiéndose abrir el recipiente de reacción. De este modo se puede llevar a cabo un paso de amplificación con una hibridación subsiguiente sin que el medio de reacción se deba transferir entre dos recipientes o activar con ayuda de elementos activos. Ya que las moléculas de captura inmovilizadas dependen de la secuencia de la secuencia objetivo a identificar, con un diseño de matriz específico se pueden detectar solo secuencias seleccionadas. Por lo tanto, la micromatriz producida no se puede adaptar a secuencias objetivo recién seleccionadas y, en caso dado, se debe producir e integrar en el sistema en un nuevo proceso de trabajo.

Además, en el estado de la técnica se describe que la identificación de ácidos nucleicos específicos en una carga de reacción se puede efectuar por medio de prolongación de hebra de una sonda inmovilizada. A tal efecto, la secuencia objetivo se amplifica en presencia de dUTP y, en un paso previo, se fragmenta en tramos de aproximadamente 20 a 50 pares de bases de longitud por vía enzimática a través de uracil-N-glicosilasa. A continuación se incuba la carga en una micromatriz, que está constituida por sondas complementarias a la secuencia objetivo, que están inmovilizadas en el extremo 5'. Tras hibridación se produce típicamente un dúplex, en el que la zona 5' de la molécula objetivo solapa la zona 3' de la sonda. Tras eliminación de los fragmentos no enlazados se incuba la matriz con una mezcla de reacción que contiene, entre otros, una polimerasa y ddNTPs marcados. El marcaje (colorante fluorescente) es diferente para cada uno de los cuatro nucleótidos. El empleo de ddNTPs permite la adición específica exactamente de un nucleótido a la sonda de fase sólida en presencia de la secuencia objetivo complementaria, ya que a ddNTPs no se puede unir ningún otro nucleótido. Por lo tanto, con procedimientos de detección apropiados se puede determinar qué nucleótido se adicionó a qué tramo de sonda. Por lo tanto, el método sirve para la detección de la secuencia objetivo y la secuenciación, en tanto se empleen tramos de sonda apropiados. En una realización especial, el procedimiento permite un grado de multiplexación elevado y la identificación SNP paralela de hasta 640 secuencias objetivo. Como en otros procedimientos del estado de la técnica, en los que se debe transferir una carga de reacción una vez llevada a cabo la amplificación, también en esta carga existe el peligro de contaminación y fallos de realización. Típicamente, las sondas de fase sólida deben cubrir el locus completo a identificar, para lo cual se requieren varias sondas por tramo de secuencia.

En los documentos US 5,641,658 y US 6,300,070 B1 se describe un método de amplificación basado en PCR, en el que la molécula de cebador requerida está inmovilizada en una fase sólida. Esto tiene por consecuencia que las moléculas de ácido nucleico amplificadas se presentan asimismo exclusivamente en la fase sólida. En el caso de presencia de la secuencia objetivo en la muestra a investigar, el ácido nucleico se puede unir al "cebador 1" y prolongar éste por vía enzimática. En el paso de desnaturalización recurrente, el patrón de ácido nucleico se disocia de la hebra de ácido nucleico recién formada y, por consiguiente, se encuentra disponible en el siguiente ciclo de anelación. El producto de amplificación formado se puede hibridar en el siguiente ciclo con un "cebador 2" inmovilizado, que se puede prolongar, y forma igualmente una hebra de ácido nucleico inmovilizada. Las hebras de ácido nucleico formadas mediante este proceso pueden interaccionar con otras moléculas de cebador y servir como

patrón de ácido nucleico. Este procedimiento para la identificación de ácidos nucleicos se denomina "BridgeTM-PCR".

Mediante inmovilización de diversos pares de cebadores en una matriz definida se pueden identificar paralelamente varias secuencias parciales mediante el grado de multiplexación obtenido de este modo. Una identificación de este procedimiento consiste en la necesidad de que las diferentes moléculas de cebador se presenten distribuidas de manera homogénea y con suficiente densidad en el lugar respectivo para que la hebra de ácido nucleico producida mediante prolongación de cebador posea un número suficiente de componentes de interacción para los siguientes ciclos. La eficiencia de reacción de esta PCR en fase sólida se sitúa en aproximadamente un 30 %, siendo la proporción de la amplificación lineal interfásica aproximadamente diez veces más elevada que la de la amplificación de superficie. Pemov et al. (Pemov, A. et al, 2005, DNA analysis with multiplex microarray-enhanced PCR. Nucleic Acids Res., 33, e11.) obtienen eficiencias de reacción comparables (-34 %), empleándose para estos estudios cebador inmovilizado en hidrogel y cebador adicional en la fase líquida. Los cebadores 5'-inmovilizados están constituidos por dos tramos funcionales, y se componen de una zona 5' universal y una zona 3' específica de la secuencia objetivo. Los cebadores universales presentes libremente en la disolución de reacción poseen la misma secuencia que los tramos universales del cebador de fase sólida. En una secuencia de amplificación interfásica y de fase sólida se forma una copia modificada de la secuencia objetivo, que se puede amplificar por medio de cebador de fase líquida universal en una PCR "casi mónoplex". Este procedimiento de multiplexación apoyado por fase sólida tiene el inconveniente de que a continuación se deben llevar a cabo pasos de PCR (por ejemplo incubación con oligonucleótidos de detección modificados, o bien pasos de lavado e incubación tras incorporación de nucleótidos modificados.

Otro procedimiento descrito en el estado de la técnica para inmovilizar productos de amplificación sobre una fase sólida durante un paso de amplificación es la PCR en fase sólida entrelazada (nested on-chip PCR (NOC PCR)). El método utiliza al menos tres diferentes moléculas de cebador, de las cuales dos cebadores forman el par de cebadores externo (P1 y P2), y la tercera molécula (P3) se enlaza dentro de un tramo limitado por P1 y P2, y P3 se presenta inmovilizado en una fase sólida. P1 y P2 se presentan en exceso en comparación con P3. El método representa un sistema combinado de amplificación en fases líquidas/fases sólidas. Las ventajas de este procedimiento, análogamente a la PCR entrelazada (nested PCR) consisten en la elevada sensibilidad y especificidad. Mediante procedimientos de inmovilización apropiados y selección del sustrato se puede efectuar una identificación altamente paralela de varias secuencias objetivo. El análisis se puede efectuar por medio de sondas específicas de la secuencia o nucleótidos marcados, siendo posible una detección en tiempo real en la última variante. Una desventaja de este método es el empleo de moléculas de cebador P3 específicas de la secuencia objetivo, cuya secuencia se correlaciona directamente con la molécula objetivo.

El empleo de moléculas de cebador inmovilizadas para la identificación específica de ácidos nucleicos no está limitado solo a métodos basados en PCR. En el estado de la técnica se describe que, por medio de amplificación dependiente de helicasa ("Helicase Dependent Amplification", HDA), se lleva a cabo con éxito la identificación isotérmica de patógenos en el intervalo de 120 minutos. El marcaje del producto de amplificación se efectúa por medio de cebador inverso con marca fluorescente. Tras realización de la reacción se lava el chip y se evalúa la señal de fluorescencia. Para llevar a cabo una reacción específica y sensible, la carga de reacción se debe calentar a 65°C. Adicionalmente, el chip se debe conectar a un elemento de bombeo, para entremezclar suficientemente el volumen de muestra relativamente elevado, de 50 µL. La conexión de actuadores activos en un biochip se considera desfavorable generalmente y aumenta el gasto de trabajo. La sensibilidad obtenida es demasiado reducida para el diagnóstico clínico. A modo de ejemplo, se describieron como límite de detección 5×10^4 equivalentes genómicos de *Staphylococcus aureus* y $1,3 \times 10^5$ equivalentes genómicos de *Neisseria gonorrhoeae* (Andresen, D., von Nickisch-Rosenegk, M. and Bier, F.F., 2009, Helicase dependent OnChip amplification and its use in multiplex pathogen detection, Clin. Chim. Acta, 403, 244-248). El biochip producido mediante este método se puede emplear exclusivamente para la detección de secuencias objetivo determinadas, ya que los oligonucleótidos específicos del analito se presentan inmovilizados.

Además, en el estado de la técnica se dan a conocer métodos en los que la identificación de la secuencia objetivo se efectúa en tiempo real, o bien sin otros pasos de procesado. Estos métodos se realizan mediante un sistema combinado de amplificación y detección. A modo de ejemplo, se describe que es posible la detección y cuantificación paralela de tres virus diferentes en muestras de plasma del donante. Se requiere un par de cebadores externo e interno, empleándose el par externo en una transcripción inversa. El par interno, en el que el cebador directo se presenta inmovilizado en una almohadilla de hidrogel, mientras que el cebador inverso se presenta libre en la fase líquida, se emplea para la on-chip PCR. Bajo empleo de un colorante apropiado se marcan y se detectan productos de amplificación de hebra doble en los lugares durante el paso de anelación. El procedimiento posee un intervalo dinámico de 6 Log (10^0 a 10^6 copias). El empleo de un colorante inespecífico de la secuencia permite la detección universal de cualquier producto de amplificación de hebra doble. Sin embargo, es desfavorable que no se garantice una especificidad, de modo que no se pueden diferenciar productos de amplificación inespecíficos.

En el documento DE 103 16 159 A1 se describe un procedimiento en el que las moléculas de cebador específicas de la secuencia objetivo se presentan inmovilizadas en una pila de flujo temperable. La pila de flujo posee además la

propiedad de conducir la luz de excitación a través de una superficie generalmente plana por medio de fluorescencia de resonancia interna total (Total internal resonance fluorescence, TIRF). Tras adición de la secuencia objetivo y reactivos de PCR típicos, así como nucleótidos con marca fluorescente (por ejemplo Cy5-dUTP), se puede detectar la prolongación de cebadores de fase sólida dependiente de ADN mediante procedimientos apropiados.

5 Liu et al. desarrollaron un análisis múltiplex para ácidos nucleicos, que combina la amplificación mediante PCR y detección por medio de análisis de micromatriz en una reacción (Liu, H.P. et al, 2006, TaqMan probe array for quantitative detection of DNA targets, *Nucleic Acids Research*, 34.). Esto se efectúa por medio de moléculas de cebador en la fase líquida y de una matriz de sondas TaqMan específicas de la secuencia objetivo, 3'-inmovilizadas. En presencia de la secuencia objetivo complementaria se disocia una sonda TaqMan mediante una polimerasa, con lo cual se recupera una señal de fluorescencia suprimida. La señal disuelta localmente se puede detectar por medio de dispositivos ópticos. Bajo empleo de esta plataforma se efectuó la identificación de cinco secuencias objetivo diferentes en una muestra. Este método es potencialmente apropiado también para una valoración en tiempo real. Ya que los cebadores se presentan libremente en la disolución de reacción, la amplificación enzimática de la secuencia objetivo se puede efectuar también exclusivamente en la fase líquida. Por lo tanto, la sonda no representa un componente de interacción necesario y, por lo tanto, en caso dado la reacción de amplificación no se visualiza mediante una señal de fluorescencia en la fase sólida. Para la identificación específica de secuencias objetivo se emplean otras sondas de oligonucleótidos marcadas con fluoróforo. El empleo de Molecular Beacons como biosensores para la detección sensible y específica de ácidos nucleicos se describe en el estado de la técnica. El empleo de sondas Molecular Beacon o TaqMan para análisis de micromatrices tiene la ventaja de que la secuencia objetivo, como en micromatrices de oligonucleótidos, no se debe marcar típicamente con colorantes fluorescentes en un paso de reacción separado, que se lleva a cabo antes o después de que suceda la hibridación. Si se requiere un paso de amplificación previa fuera de la micromatriz se produce un gasto de trabajo elevado y peligro de contaminación. Ya que las sondas Molecular Beacon o TaqMan inmovilizadas poseen típicamente al menos tres modificaciones (grupo para la inmovilización, donador y aceptor de fluorescencia), en el caso de variaciones de la secuencia objetivo o del diseño de matriz se producen inmediatamente costes derivados adicionales para la producción e inmovilización de sondas nuevas.

Lockett et al (*Anal. Chem.* 2007, 79, 6031-6036; *Molecular beacon-style hybridization assay for quantitative analysis of surface invasive cleavage reactions*) describen un ensayo para el análisis SNP cuantitativo, que aplica la hibridación de una sonda Molecular Beacon. Lu et al (*Hum. Mutat.*, 2002, 19, 416-422; *A surface invasive cleavage assay for highly parallel SNP analysis*) describen la paralelización del análisis SNP con ayuda de *escisión invasiva* específica de la estructura.

Li et al (*Analytical Chemistry*, tomo 78, nº. 22, (2006-11-15), páginas 7886-7890), describen además un procedimiento de identificación similar a la presente invención, en el que se emplea, no obstante, una sonda mediadora (cebador 5'-UT) que no contiene ningún punto de disociación.

Un artículo de Nuovo et al (*Journal of histochemistry and cytochemistry*, tomo 47, nº 3, (1999-03-01), páginas 273-279) describe el empleo de una sonda de identificación marcada con FRET en combinación con una polimerasa y dNTPs en una PCR en tiempo real.

Además, en el estado de la técnica se describe un denominado "ensayo invasivo", que se desarrolló por la firma Hologic (antes: Third Wave Technology). El ensayo puede identificar la presencia de una secuencia objetivo bajo condiciones isotérmicas. En el más sencillo de los casos, el procedimiento requiere una nucleasa específica de la estructura, dos oligonucleótidos específicos de la estructura – un oligonucleótido "invasor" y una sonda, que dispone de un donador y un aceptor de fluorescencia. Durante la reacción de identificación, ambos oligonucleótidos se hibridan en una hebra de la secuencia objetivo, superando el extremo 3' del oligonucleótido "invasor" y el extremo 5' de la sonda, y formando éstos una estructura tríplex (complejo ternario). La estructura tríplex formada representa el sustrato de una nucleasa específica de la estructura que disocia la sonda (reacción primaria), y recupera en este caso una señal de fluorescencia suprimida anteriormente. En otra realización del "ensayo invasivo", la sonda no posee modificaciones de fluorescencia, aunque la región 5' liberada de la sonda puede activar una reacción de detección subsiguiente (reacción secundaria) interaccionando con una molécula de detección FRET y formando una estructura tríplex local. Tras disociación de este complejo se produce una señal de fluorescencia. En la reacción descrita tiene lugar una amplificación de señal pero no una amplificación de secuencia objetivo. El "ensayo invasivo" se puede emplear, entre otros, para la detección de polimorfismos de nucleótidos individuales (SNP).

Un artículo de Hall et al (*PNAS*, tomo 97, nº 15, (2000-07-18), páginas 8272-8277) describe el empleo de una sonda de oligonucleótidos constituida por una región 3', que se puede unir de manera complementaria a la secuencia objetivo, un punto de disociación, seguido de una región 5', que es complementaria a una sonda de identificación e independiente de la secuencia objetivo, así como una sonda de identificación en un "ensayo invasivo".

El sistema InPlex® derivado del "ensayo invasivo" combina una amplificación previa de las secuencias objetivo con el Invader® Assay. En este caso, las secuencias objetivo se amplifican en primer lugar por medio de PCR, y a continuación se trasladan a un cartucho de reacción y se incuban varias horas (reacción de detección). La reacción

InvaderPlus®-Reaktion combina una PCR con la reacción del "invasor" en un recipiente de reacción, empleándose una polimerasa de *Thermus aquaticus* y la enzima Cleavase®. En este caso se amplifica en primer lugar la secuencia objetivo por medio de PCR, y a continuación se desactiva la polimerasa a 99°C. En el siguiente paso se enfría la mezcla de reacción a una temperatura a la que un oligonucleótido invasor y una sonda se adicionan a la secuencia objetivo. Esta estructura es reconocida por Cleavase®, según lo cual puede transcurrir una reacción de disociación con generación de señal. Esta reacción de punto final dura típicamente dos horas. Es desventajoso que se deba presentar un número elevado de moléculas objetivo para poder identificar éstas. No es posible una realización paralela del método de identificación y una amplificación. Por lo tanto, la sensibilidad de este ensayo no es suficiente para muchas cuestiones.

En el estado de la técnica son conocidos varios métodos basados en fase sólida, en los que la sonda específica de la secuencia objetivo, disuelta localmente, está inmovilizada en una superficie apropiada y se puede emplear para la detección de SNPs en ADN genómico. En este caso, la detección se efectúa directamente a través de una variación de fluorescencia, o bien indirectamente una vez efectuado el ligado de un producto de disociación con un cebador y amplificación en círculo rodante, así como marcaje con un colorante fluorescente específico de la secuencia, o bien oligonucleótido marcado con biotina, y subsiguiente incubación con partículas de oro revestidas con estreptavidina. Ya que en este procedimiento isotérmico no se efectúa una amplificación de la secuencia objetivo, el tiempo de incubación típico de un análisis se sitúa hasta en 24 horas, seguidas de una medida de fluorescencia.

Los análisis de micromatrices comprenden varios pasos de trabajo, típicamente selección de la secuencia de la molécula de captura inmovilizada, preparación de muestras y amplificación, hibridación, o bien incubación, seguidas de pasos de lavado subsiguientes, así como medición de señal y procesamiento de datos. Las micromatrices descritas hasta la fecha en el estado de la técnica se basan en el principio de interacción directa entre molécula objetivo y molécula de captura inmovilizada, por lo que se debe emplear una molécula de captura modificada en tanto se deba detectar una molécula objetivo diferente. Esto ocasiona en principio la producción de una matriz modificada, y es un factor de tiempo y costes esencial. Debido al costoso proceso de producción, por motivos económicos se fabrican mayores números de piezas de un modelo de secuencia. Por consiguiente, el trabajo con micromatrices ofrece poca flexibilidad respecto a la molécula objetivo a identificar, ya que un modelo de secuencia modificado trae consigo costes derivados elevados y un gasto de procesamiento. Además, en el estado de la técnica se dan a conocer micromatrices universales. Las micromatrices de ácido nucleico universales, en las que la secuencia de la molécula de captura inmovilizada es independiente de la secuencia objetivo, se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo Affymetrix "GeneChip Universal Tag Arrays". Estos procedimientos se basan en un modelo de secuencia de micromatriz universal, en el que los oligonucleótidos inmovilizados (código ZIP, o bien marca universal) son independientes de la secuencia a identificar y no interfieren con ésta. En una reacción de identificación típica, la secuencia objetivo se amplifica generalmente en un recipiente de reacción separado, y en caso dado se purifica. A continuación se efectúa un paso de ligado, en el que una sonda de detección específica y una sonda de fluorescencia se hibridan directamente en yuxtaposición en la secuencia de bases en presencia de la secuencia objetivo. La sonda de detección posee una rama inespecífica respecto a la secuencia objetivo (código ZIP complementario, código cZIP), que sirve como secuencia de direccionamiento y es complementaria a una sonda de código ZIP de la micromatriz. Mediante el ligado se produce un producto a partir de sonda de detección y de fluorescencia, que se emplea para una hibridación en una micromatriz de código ZIP. Una señal de fluorescencia en un lugar de código ZIP específico es una indicación indirecta de la presencia de la secuencia objetivo en la mezcla de reacción. Como fase sólida se pueden emplear también microbolas codificadas (perlas). En este caso, a cada molécula de captura se asigna una perla identificable claramente, que se obtiene mediante una secuencia de nucleótidos definida o coloración, o bien intensidad. Mediante esta disposición, en un paso de trabajo posterior se puede llevar a cabo una detección automatizada de la perla, así como el análisis paralelo. Este método posee la ventaja de que las perlas se presentan homogeneizadas en la fase líquida, y las cinéticas de reacción resultantes del mismo son más elevadas que en interacciones fase líquida/sólida comparables.

En el estado de la técnica se describe igualmente un procedimiento titulado "anelación, selección, extensión y ligado a través de cDNA" (DASL) para el análisis de la expresión por medio de micromatrices universales. En este caso, en primer lugar se transcribe ARN en cADN por medio de oligo-d(T)18 marcado con biotina y moléculas de cebador de secuencia casual. A continuación se efectúa un paso de hibridación de dos oligonucleótidos específicos del locus, poseyendo ambos oligonucleótidos ramas de secuencia universales, inespecíficas para el locus. El oligonucleótido 3'-terminal dispone de una secuencia de direccionamiento, que está integrada entre la zona específica de la secuencia y la rama de secuencia inespecífica. La secuencia de direccionamiento es complementaria a una secuencia definida en la micromatriz universal. La zona entre los oligonucleótidos se completa de manera complementaria en una reacción de prolongación y se liga en el siguiente paso. Bajo empleo de oligonucleótidos especiales, a continuación se puede efectuar una reproducción del producto de ligado por medio de PCR, efectuándose un marcaje del producto de ligación mediante cebadores con marca fluorescente. En el siguiente paso se lleva a cabo una hibridación en una matriz universal, o bien perla. En comparación con las micromatrices universales descritas anteriormente, el procedimiento DASL ofrece la ventaja de que existen más posibilidades de selección de secuencia de los oligonucleótidos a ligar, ya que una reacción de prolongación completa los nucleótidos ausentes. Sin embargo, mediante esta reacción se debe integrar en el proceso otro paso de trabajo propenso a fallos. Mediante los numerosos pasos de procesamiento y análisis, éstos métodos requieren mucho tiempo,

adicionalmente existe el peligro de contaminación, ya que los fragmentos de ácido nucleico amplificados se deben transferir entre recipientes de reacción. Por lo demás, el método está diseñado solo para mediciones de punto final.

En los documentos US 5,653,939yUS 6,099,803se describe un procedimiento que posibilita el transporte electroforético de (bio)moléculas cargadas a microlocalizaciones definidas (lugares) en un chip microelectrónico mediante manipulación local de un campo eléctrico. Esta "matriz microelectrónica activa", que se comercializó bajo la denominación NanoChip®, está constituida por una estructura ordenada de electrodos direccionables individualmente. Mediante aplicación de una tensión en uno o varios electrodos, los analitos cargados se pueden mover y concentrar específicamente en lugares definidos en el chip semiconductor. Si los lugares se dotan de molécula de captura complementaria o afin, mediante transporte electroforético puede tener lugar un proceso de hibridación o afinidad en intervalos de tiempo cortos. Ya que la polaridad y la tensión aplicada de los electrodos se puede modificar a voluntad, esto posibilita la manipulación de partículas con carga neta negativa (por ejemplo ácidos nucleicos, proteínas parciales) y positiva (por ejemplo proteínas parciales). Mediante dotación de varios lugares con diferentes moléculas de captura se puede llevar a cabo un análisis múltiplex con una muestra aplicada. Mediante inversión de polos de los electrodos se efectúa una repulsión de las moléculas objetivo por la molécula de captura, mediante lo cual se determina la fortaleza de interacción (selectividad) y se minimizan enlaces inespecíficos ("estringencia eléctrica"). La inmovilización de moléculas de captura se efectúa típicamente a través de modificaciones de biotina, que se unen selectivamente al gel polimérico modificado con estreptavidina de la superficie del chip. La plataforma para aparato de nanochip es apropiada en principio para hibridaciones de ADN, análisis SNP o STR, así como determinaciones de tipo de célula y reacciones on-chip SDA. La detección se puede efectuar mediante hibridación pasiva de sondas marcadas o mediante técnicas de anticuerpo comunes. Mediante la tensión aplicada, en la zona de los electrodos se forman productos de hidrólisis (H^+ , OH^- , H_2 , O_2 y radicales libres), que pueden dañar la molécula objetivo. Para minimizar este efecto es necesaria la aplicación de una capa intermedia de separación en forma de un gel polimérico. Ya que esta plataforma puede detectar exclusivamente interacciones moleculares, el material de muestra se debe concentrar generalmente en un paso previo. Esto es necesario sobre todo para ácidos nucleicos que se reproducen típicamente por medio de PCR asimétrica. La plataforma del aparato está constituida por una unidad de control de sistema y microchip, que regulan, a modo de ejemplo, el control de la tensión aplicada y la fluídica.

Otro método universal para la detección de moléculas objetivo se comercializó por High-Throughput Genomics (HTG) (por ejemploUS 2001/0034025 A1 oUS 6,238,869 B1). Constituye la base de este método una matriz universal de diversos oligonucleótidos de anclaje, que están inmovilizados en el extremo 3' en una fase sólida (placa de microtitración). Las moléculas de engarce, que presentan un tramo 5' complementario a los oligonucleótidos de anclaje descritos y un tramo 3' específico de la molécula objetivo, modifican la especificidad de enlace a esta posición de matriz una vez efectuada la hibridación. Si se deben detectar ácidos nucleicos de matriz recién configurados, la molécula de engarce está constituida por un oligonucleótido, para la identificación de proteínas, la molécula está constituida típicamente por un conjugado de anticuerpo de oligonucleótido. Una realización presentada por HTG para la detección de mRNA para análisis de expresión posibilita la identificación paralela de 16 loci diferentes por cavidad de una placa de microtitración comercial. A tal efecto, a modo de ejemplo se someten a lisis y se desnaturalizan células en un recipiente separado en presencia de sondas de ADN complementarias a mRNA. Una vez efectuada la hibridación, mediante adición de una S1 nucleasa se digieren ácidos nucleicos de hebra simple (mRNA y exceso de sondas de ADN). Mediante hidrólisis alcalina se degrada la proporción de ARN del dúplex, de modo que en la carga están presentes cantidades estequiométricas de sondas de ADN tras la neutralización. A continuación se transfiere la carga a la matriz, tras lo cual se llevan a cabo hibridaciones secuenciales de una sonda de detección complementaria parcialmente a una sonda de ADN y un conjugado de detección complementario a la misma, que está provisto de una modificación de peroxidasa. Tras adición de sustratos apropiados se produce una señal de quimioluminiscencia local en la posición de la matriz en la que se pudo formar con éxito el complejo de hibridación descrito. Mediante los numerosos pasos de procesamiento, el procedimiento requiere mucho trabajo. Otro inconveniente consiste en la baja sensibilidad del ensayo ya que en el protocolo de ensayo no está integrada ninguna reacción de amplificación. Por consiguiente, a modo de ejemplo no se pueden identificar con suficiente sensibilidad concentraciones de ácidos nucleicos muy bajas. Adicionalmente, los numerosos pasos de hibridación pueden conducir a interferencias y, por consiguiente, a reacciones inespecíficas no deseadas o señales falsas positivas.

En el estado de la técnica se dan a conocer procedimientos para la identificación de proteínas por medio de métodos basados en ácidos nucleicos. En este caso, el analito interacciona con una proteína inmovilizada (por ejemplo un anticuerpo) y se incubaba a continuación con un conjugado de proteína-ácido nucleico. En un paso de lavado siguiente se eliminan moléculas no enlazadas. El conjugado contiene una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una molécula de ADN circular, que se añade a continuación. Mediante procesamiento con una polimerasa apropiada se prolonga el cebador y se generan concatámeros de la molécula de ADN por medio de RCA. Tras incubación con sondas modificadas con oro o colorantes fluorescentes inespecíficos respecto a la secuencia se marcan específicamente las zonas de una micromatriz, a las que se han unido molécula de captura y conjugado de detección en los analitos. Por lo tanto, por medio de procedimientos de detección apropiados se pueden identificar procesos de enlace del analito desencadenados localmente. Es desventajoso que se empleen dos proteínas diferentes, o bien conjugados de proteína-ácido nucleico, que se correlacionan directamente con el respectivo

analito. El empleo de proteínas y los procedimientos derivados del mismo es un gran factor de costes debido a la síntesis. Sigue un método similar en principio la firma Chimera Biotec con la tecnología Imperacer® desarrollada, empleándose ADN quimérico de anticuerpos, es decir, fragmentos de ADN sintéticos, a los que se acopló un anticuerpo. Si este anticuerpo se enlaza al antígeno apropiado, tras pasos de lavado subsiguientes se puede amplificar y detectar el fragmento de ADN acoplado por medio de PCR en tiempo real.

El diagnóstico médico de laboratorio se lleva a cabo en laboratorios centrales con ayuda de máquinas automáticas de análisis, y comprende campos de química clínica, microbiología médica e inmunobiología médica, así como medicina de transfusión. Además de estos sistemas de alto rendimiento existen aparatos claramente más reducidos, que posibilitan un análisis multianalito próximo al paciente ("punto de cuidado"), por ejemplo de valores sanguíneos importantes o proteínas de marcaje. Éstos utilizan diversos principios de detección, como medición de absorción de una reacción cromógena de la muestra con los reactivos almacenados previamente en el cartucho de reacción (por ejemplo Abaxis Piccolo® Xpress), inmunoensayo de flujo por medio de una membrana marcada con anticuerpos y subsiguiente marcaje del analito con anticuerpos de detección modificados con oro (por ejemplo Axis-Shield Afinion) o de una tira de ensayo lineal (por ejemplo Abbott Point-of-Care i-STAT®, Roche Cobas h232, sistema BioSite® Triage®). En estos procedimientos se aplica el líquido de ensayo en un cartucho de reacción especial, en el que un material absorbente absorbe, transporta, y en caso dado separa la muestra mediante fuerzas capilares. Típicamente, los kits de ensayo ofrecidos se basan en tecnología de inmunofluorescencia. En zonas definidas, los reactivos están almacenados previamente (anticuerpos de detección), o bien inmovilizados (anticuerpos de captura) en el material. La puesta en práctica no requiere típicamente una preparación de muestras, de modo que los ensayos se pueden llevar a cabo con sangre completa, plasma sanguíneo u orina (en caso dado con filtro interno para células de sangre y partículas), y detectan varios analitos dentro de una reacción en la mayor parte de los casos. Los resultados se encuentran disponibles en el intervalo de aproximadamente 15 minutos. Los kits de ensayo disponibles comprenden marcadores para enfermedades cardíacas, patógenos, así como productos metabólicos de diversos medicamentos. Las ventajas de las realizaciones descritas consisten en la elevada facilidad de uso (protocolo de realización sencillo, sin preparación de muestras) y un tiempo de procesamiento corto. Es desfavorable que estos aparatos, sobre todo empleados en el diagnóstico clínico, son compatibles solo con material de material fungible patentado, y el empleo está limitado a marcadores y parámetros relevantes clínicamente (por ejemplo enfermedades cardiovasculares). Además, el empleo está limitado en gran medida por el fabricante, ya que se pueden llevar a cabo identificaciones, para las que el fabricante ofrece kits de ensayo autorizados solo para determinadas moléculas objetivo.

El principio de tiras de ensayo descrito se aplica igualmente en la analítica de ácidos nucleicos. En este caso, el ácido nucleico a identificar se amplifica y se aplica en una tira de ensayo, sobre la que se encuentran moléculas de captura e identificación específicas de la secuencia objetivo. La secuencia objetivo pasa diversas zonas en las tiras de ensayo mediante fuerzas capilares, e interacciona con las diferentes moléculas complementarias, o bien afines. Mediante determinación de una banda de identificación (por ejemplo por medio de moléculas de identificación marcadas con oro) en un punto definido de la tira de ensayo se puede determinar la presencia de la secuencia objetivo en la disolución de muestra a investigar. En el estado de la técnica se describe un método universal para la detección de cualquier secuencia de ácido nucleico (por ejemplo Baeumner, A.J. et al, 2004, A universal nucleic acid sequence biosensor with nanomolar detection limits, Anal. Chem., 76, 888-894.). En este caso se amplifica la disolución de muestra y se incuba con sondas reporteras bifuncionales. Un tramo de la sonda se hibrida en la secuencia objetivo, mientras que otro tramo se une a la vesícula con oligonucleótidos inmovilizados de secuencia complementaria. Otro tramo de la secuencia objetivo amplificada se une al oligonucleótido modificado con biotina. Tras aplicación de la tira de ensayo en la disolución se efectúa un transporte orientado del complejo de hibridación, que se puede acumular y detectar en una zona modificada con estreptavidina. La analítica de ácido nucleico basada en tiras de ensayo requiere un paso de amplificación previo y el manejo de productos post-PCR vinculado al mismo. Adicionalmente, los sistemas están limitados por un bajo grado de multiparámetros, baja sensibilidad y cuantificación limitada.

En diversos campos de analítica clínica y en el diagnóstico *in vitro*, las identificaciones de multianalitos poseen un gran significado, por lo que a continuación se indican algunos ejemplos (pero sin limitarse a los mismos): a modo de ejemplo, para la determinación de grupos sanguíneos es relevante no solo la genotipificación AB0, sino también la elaboración del perfil de antígenos humano neutrófilo (HNA), que se debe determinar para transfusiones de sangre y tejidos. También el control paralelo de muestras de donantes de sangre sobre variantes de VIH y virus de hepatitis B, o bien C, se lleva a cabo con inmunoensayos o técnicas basadas en ácidos nucleicos. La identificación específica de patógenos ocasiona la determinación de varios loci genómicos para posibilitar un diagnóstico derivado de los mismos tras tiempos cortos de análisis.

La determinación de actividad de diversos genes marcadores y de control permite la elaboración de un perfil de expresión. A modo de ejemplo, éste se puede emplear para identificar oncógenos que influyen sobre división y diferenciación celular y, por lo tanto, están en una estrecha correlación con enfermedades cancerosas, o para realizar pronósticos sobre la eficacia de determinados medicamentos dependiendo del genotipo del paciente (medicina personalizada). En el diagnóstico prenatal biológico molecular se pueden identificar también enfermedades hereditarias que se presentan frecuentemente, entre éstas cuentan, entre otras, fibrosis quística

(mucoviscidosis), fenilcetonuria (trastorno metabólico) y talasemia (degradación de eritrocitos). Por lo demás, la detección común de marcadores de inflamación, como procalcitonina o citoquinas, permite concluir la gravedad de una infección.

Numerosas cuestiones diagnósticas requieren el análisis de varias moléculas objetivo, loci genéticos u otros marcadores, así como controles internos, o bien referencias, de modo que los métodos que permiten solo la determinación de un único parámetro por análisis son menos concluyentes por regla general. Si para el registro de varios parámetros se llevan a cabo paralelamente diferentes análisis separados, esto es poco rentable por otra parte: la disolución de muestra se debe dividir en varias cargas de reacción homogéneas, en las que se identifican diferentes moléculas objetivo. En este caso, es un inconveniente que la cantidad de sustancia en la reacción separada se reduzca en el factor $1/n$ debido a la división de las disoluciones de muestra en "n" alícuotas, reduciéndose correspondientemente la sensibilidad de la reacción de identificación.

Otro inconveniente consiste en que la analítica de muestras con baja concentración de ácido nucleico o proteína no es posible sin un paso previo de concentración, o bien amplificación, dependiente del analito, debido a la baja sensibilidad de tales procedimientos de detección. En el análisis paralelo basado en micromatrices de ácidos nucleicos concentrados, la amplificación previa representa por una parte un paso de trabajo adicional, y además acarrea el problema de que, en función de la cantidad de sustancia inicial y la eficiencia de reacción, no tiene lugar una amplificación homogénea, y solo de manera limitada son posibles afirmaciones cuantitativas. Además se debe considerar desfavorable la transferencia de productos amplificados entre diversos recipientes de reacción y aparatos, ya que éste no solo va vinculado a un paso de trabajo adicional, sino que representa adicionalmente un riesgo de contaminación.

Los análisis de micromatrices se basan en la interacción directa entre una molécula de captura inmovilizada, típicamente disuelta de manera local (componente de enlace o sonda) sobre un sustrato plano y una molécula objetivo, que se presenta en difusión libre en la fase líquida. Un inconveniente de estos métodos consiste en que comprenden varios pasos de trabajo: una amplificación, o bien concentración previa, el marcaje de las moléculas objetivo para identificar la interacción de moléculas objetivo con la molécula de captura, así como reiterados pasos de hibridación y lavado. Por lo demás, en la dependencia directa entre molécula de captura y objetivo descrita se presenta el problema de que la inmovilización de otra sonda es necesaria si se produce una nueva cuestión experimental, a modo de ejemplo si se debe identificar un genotipo diferente de un virus.

Otro inconveniente consiste en que, debido al costoso proceso de producción y a los elevados costes de preparación (configuración de la matriz, purificación de los elementos de procesamiento), la producción de un modelo de secuencia es rentable solo en mayores cantidades (efecto de escala). Esta flexibilidad limitada reduce la ventaja de procesamientos altamente paralelos y automatizables. Las identificaciones con micromatrices de ácido nucleico universales, cuyas sondas son independientes de la molécula objetivo a identificar, pueden evitar este inconveniente, aunque el gasto de trabajo de estos métodos es muy elevado, por lo que éstos no se han impuesto. Además, junto a los inconvenientes técnicos de las micromatrices universales descritos, hasta el momento no se conoce un sistema bioquímico del estado de la técnica que permita análisis multiplex combinados en diversas clases de sustancias, como por ejemplo ácidos nucleicos y proteínas, de modo que para diferentes identificaciones se deben emplear diferentes procedimientos o aparatos.

El documento US 20020110826 se refiere al empleo de oligonucleótidos de horquilla en fase sólida. Mediante una reacción de hibridación de una secuencia objetivo en un oligonucleótido de horquilla se favorece una reacción enzimática, que conduce a la disociación de la parte complementaria a la secuencia objetivo. De este modo, una etiqueta se puede unir al oligonucleótido de horquilla. Es desfavorable que la secuencia objetivo se deba difundir hacia los oligonucleótidos de horquilla en fase sólida. En este caso, la velocidad de difusión se retarda debido al tamaño de la secuencia objetivo.

Por consiguiente, era tarea de la invención poner a disposición un sistema, un agente o un procedimiento que posibilitara la detección de diferentes biomoléculas, siendo éste empleable universalmente y no presentando los inconvenientes o deficiencias del estado de la técnica.

Descripción

El problema se soluciona mediante la reivindicación 1. De las reivindicaciones subordinadas resultan formas de realización ventajosas.

La invención se refiere a un procedimiento para la detección de al menos una molécula objetivo, que comprende los siguientes pasos:

- a) puesta a disposición de una sonda mediadora para la detección de al menos una molécula objetivo, que comprende una región de sonda y una región mediadora, siendo la sonda mediadora un

- oligonucleótido y estando dispuesta la región de sonda en el extremo 3' y la región mediadora en el extremo 5' del oligonucleótido, presentándose entre las regiones un punto de disociación químico, biológico y/o físico, y presentando la región de sonda una afinidad con una molécula modelo y la región mediadora una afinidad adicional con una molécula de identificación,
- 5 b) puesta a disposición de una molécula de identificación, siendo la molécula de identificación un oligonucleótido y presentando al menos las siguientes regiones:
- una primera región en un extremo 5' de la molécula de identificación, que presenta un aceptor de fluorescencia o un donador de fluorescencia y/o un grupo químico para el enlace con una fase sólida y/o un grupo protector químico,
 - 10 • una segunda región que interacciona con la región mediadora, y
 - una tercera región que presenta un donador de fluorescencia o un aceptor de fluorescencia y/o un grupo protector químico,
- c) unión de la región de sonda de la sonda mediadora a una secuencia de la molécula modelo y/o de la molécula objetivo,
- 15 d) amplificación de la molécula modelo y/o de la molécula objetivo con ayuda de una molécula auxiliar, preferentemente mediante un proceso de amplificación que incluye un procedimiento isotérmico y/o procedimiento basado en termociclaje y/o mediante una PCR, de modo especialmente preferente una PCR en tiempo real,
- 20 e) disociación de la sonda mediadora en el punto de disociación durante el paso d) mediante al menos la molécula auxiliar del paso d) u otras moléculas auxiliares, y
- f) unión de la región mediadora disociada de la sonda mediadora a la molécula de identificación,
- g) detección de señal.

En el procedimiento según la invención se emplea una sonda mediadora para la detección de al menos una molécula objetivo, comprendiendo la sonda mediadora una región de sonda y una región mediadora, caracterizada por que la sonda mediadora es un oligonucleótido y la región de sonda está dispuesta en el extremo 3' y la región mediadora está dispuesta en el extremo 5' del oligonucleótido, presentándose un punto de disociación químico, biológico y/o físico entre las regiones, y presentando la región de sonda una afinidad con una molécula modelo y la región mediadora una afinidad adicional con una molécula de identificación, y disociándose la sonda mediadora en el punto de disociación durante un proceso de amplificación de la molécula modelo, y desencadenando una interacción de la región mediadora disociada con la molécula de identificación una señal detectable.

Era completamente sorprendente que se pudiera poner a disposición una sonda mediadora para la detección en una molécula objetivo y/o una molécula de identificación que no presentara los inconvenientes o deficiencias de las sondas o sistemas dados a conocer en el estado de la técnica. Es especialmente ventajoso que la presencia de la región mediadora liberada desencadene una reacción de identificación. En este caso, el acoplamiento entre la presencia de una molécula objetivo y la reacción de identificación depende solo de las propiedades de la región mediadora, o bien de la sonda mediadora, y permite, por consiguiente, un acoplamiento libre entre cualquier molécula objetivo y cualquier reacción de identificación, o bien molécula de identificación.

Por lo tanto, la sonda mediadora caracteriza en especial una molécula que posee al menos dos regiones funcionales, que pueden interaccionar con la molécula objetivo y/o la molécula modelo, o bien la molécula de identificación. La sonda mediadora se desencadena ventajosamente una reacción de identificación en presencia de una molécula objetivo – en caso dado bajo interacción con moléculas auxiliares –.

La región de sonda es preferentemente complementaria a un tramo de la molécula modelo y/o objetivo. La región de sonda de la sonda mediadora se une en este caso a una molécula modelo, que se amplifica. La unión se efectúa solo con la región de sonda de la sonda mediadora, ya que ésta presenta una afinidad con la molécula modelo. La región mediadora no presenta afinidad con la molécula modelo, y tampoco dispone de un tramo de secuencia complementario. Por lo tanto, esta parte de la sonda mediadora no se une a la molécula modelo, de modo que se produce una estructura plegada. Durante la reacción de amplificación, la sonda mediadora se disocia en el punto de disociación, de modo que la región mediadora se libera. La región mediadora dispone preferentemente de una región complementaria a un tramo de una molécula de identificación. La región mediadora se une a una molécula de identificación, con lo cual se desencadena una señal detectable. Mediante la señal detectable se puede concluir sobre la presencia de la molécula modelo. En este caso, la propia molécula modelo puede ser la molécula objetivo a detectar, o bien estar asociada a ésta, de modo que a través de la molécula modelo se pueden generar informaciones debido a la presencia de la molécula objetivo.

Mediante la disociación de la sonda mediadora se libera una molécula mediadora que no posee ningún componente de interacción, aparte de la molécula de identificación. Por consiguiente, en comparación con métodos convencionales basados en ácidos nucleicos, no existe una necesidad de impedir una nueva adición (reanelación) de la hebra a identificar mediante optimización de las proporciones de cebador, como en el caso de PCR asimétrica o LATE-PCR. El gasto se reduce en gran medida de esta manera. Mediante una longitud típicamente de 20 a 25 nucleótidos, la molécula mediadora posee una constante de difusión más elevada que los fragmentos de ácido

nucleico generados mediante mecanismos de amplificación, que se generan, por ejemplo, para una reacción de hibridación.

5 En el sentido de la invención, el concepto molécula de identificación caracteriza en especial una molécula con la que la región mediadora puede interaccionar directa o indirectamente, y que puede ocasionar una reacción de identificación (por ejemplo variación de una señal de fluorescencia), en caso dado mediante procesamiento.

El concepto amplificación designa en especial una reproducción de una molécula de ácido nucleico.

10 Una molécula auxiliar designa en especial una molécula que contribuye a la variación de estado de la sonda mediadora en presencia de la molécula objetivo y/o de la molécula modelo. Se pueden emplear diversas moléculas auxiliares constituidas por una o varias clases de sustancias, por ejemplo enzimas (polimerasas), ácidos nucleicos (oligonucleótidos). Es preferente que la región de sonda unida a la molécula objetivo o modelo se prolongue enzimáticamente por medio de una molécula auxiliar.

15 Es preferente que la sonda mediadora presente 1 a 70, preferentemente 15 a 60, de modo especialmente preferente 34 a 45 nucleótidos. Mediante estos tamaños se obtienen resultados especialmente preferentes, ya que la región mediadora se puede difundir hacia la molécula de identificación tras disociación, debido al pequeño tamaño con una velocidad de difusión elevada. De este modo, la invención es ventajosa frente a formas de realización en el estado de la técnica, en las que el propio objetivo debe llegar a una molécula de identificación.

Además, en este caso es especialmente ventajoso que la sonda mediadora esté constituida por un oligonucleótido, que se puede sintetizar económicamente sin modificaciones complejas técnicamente, como por ejemplo donadores y/o aceptores de fluorescencia.

20 Es preferente que la molécula objetivo y/o la molécula modelo sea una biomolécula seleccionada a partir del grupo que comprende ADN, ARN, proteína, aptámero y/o una combinación de los mismos. También puede ser preferente que se deban identificar y, por consiguiente, sean molécula objetivo en el sentido de la invención solo partes de una molécula, por ejemplo secuencias de detección o epítomos. La molécula objetivo o las moléculas objetivo se presentan preferentemente en una disolución de muestra en este caso. En el sentido de la invención, una
25 combinación de moléculas objetivo se puede denominar también mezcla. Sorprendentemente, en una carga se pueden detectar diversas clases de sustancias (por ejemplo proteína y ADN o ADN y ARN) por separado o paralelamente, de modo que se dispone de un agente empleable universalmente.

30 En el sentido de la invención, un aptámero describe en especial un oligonucleótido que puede interaccionar con moléculas de otras clases de sustancias (por ejemplo proteínas) en base a sus propiedades estructurales, o bien unirse a éstas. Un aptámero es preferentemente un ácido nucleico de hebra simple, que muestra una afinidad de enlace elevada para otras moléculas, por ejemplo proteínas. Un aptámero preferente posee adicionalmente las regiones terminales "región i" y "región ii", que pueden interaccionar entre sí (en el sentido de la invención denominada forma cerrada). Éstas limitan dos regiones, poseyendo la "región iii" la afinidad con la molécula objetivo y la "región iv" una secuencia de enlace para una molécula de cebador y una sonda de mediador. La "región iv"
35 permite solo un enlace del cebador y de la sonda de mediador, en tanto la región "región iii" interaccione con, o bien esté asociada a la molécula objetivo.

Es preferente que la molécula objetivo sea simultáneamente la molécula modelo. Esta forma de realización se emplea, por ejemplo, si la molécula objetivo es una secuencia de ADN. En este caso no se utiliza ninguna molécula modelo adicional para la reacción de amplificación, de modo que la propia molécula objetivo se amplifica.

40 Si la molécula objetivo no se puede amplificar en sí misma, es ventajoso emplear una molécula modelo para la reacción de amplificación, permitiendo la realización de la reacción de amplificación concluir sobre la presencia de la molécula objetivo, para poder efectuar una detección de la molécula objetivo. Según la invención, esto se puede efectuar de diferentes maneras. Puede ser preferente que la molécula modelo se forme solo mediante la presencia de la molécula objetivo, o bien que la molécula modelo interaccione con la molécula objetivo y modifique su
45 estructura de este modo.

50 Por ejemplo, es preferente que, si en el caso de la molécula objetivo se trata de una proteína, la molécula modelo correspondiente sea un aptámero. El aptámero presenta un punto de enlace para la región de sonda. En este caso es preferente que el aptámero se una a la proteína y que el punto de enlace sea accesible para la región de sonda solo durante esta unión. De este modo se impide detectar únicamente la presencia del aptámero sin tener que sacar conclusiones sobre la presencia de la molécula objetivo (proteína). Solo en el caso de presencia de la molécula objetivo el aptámero se puede unir a la misma, y su punto de enlace para la región de sonda se hace accesible preferentemente mediante una modificación de la estructura secundaria. La región de sonda de la sonda mediadora se puede unir solo al aptámero. Mediante la amplificación del aptámero la región de mediador se disocia de la región de sonda y se puede unir a la molécula de identificación de este modo. Por consiguiente, a través de la presencia

del aptámero se puede detectar la proteína.

Si en el caso de la molécula objetivo a detectar se trata de una secuencia de ARN, es preferente que la molécula modelo sea el correspondiente cADN. Ésta se genera preferentemente mediante una transcriptasa inversa. El cADN producido de este modo es entonces la molécula modelo para la amplificación. Para la transcripción inversa puede ser ventajoso el empleo de cebadores modificados con rama de secuencia 5'. Esta forma de realización es ventajosa sobre todo si además está presente también el ADN original. De este modo se asegura que la sonda mediadora se una solo al cADN y no al locus de ADN original del modelo para el ARN. Mediante esta forma de realización se posibilita también efectuar detecciones que permiten afirmaciones sobre la expresión génica de diversos genes. Se pueden detectar paralelamente ADN del gen y el ARN transcrito a partir del mismo (a través del cADN con rama de cebador). En tal procedimiento se emplean dos sondas mediadoras diferentes, uniéndose una de ambas regiones de sonda a una zona que comprende una parte de la rama de cebador. Por lo tanto, esta región de sonda se puede unir solo al cADN y no al ADN original.

También se puede emplear como molécula objetivo un complejo constituido por aptámero y molécula objetivo asociada, o un producto de interacción de dos o más clases de sustancias, como por ejemplo ácidos nucleicos y proteínas. En este caso se pueden identificar diversas moléculas objetivo en una carga de reacción por separado o paralelamente. Es preferente que la sonda mediadora esté constituida por un oligonucleótido o un correspondiente derivado, la molécula objetivo representa un ácido nucleico, un correspondiente derivado o una molécula que comprende ADN, ARN, proteína, aptámero y/o un complejo constituido por aptámero y ADN, ARN asociado o proteína, y la molécula de identificación es un oligonucleótido o un derivado procedente del mismo.

En otra forma preferente de realización del procedimiento según la invención, la región de sonda y la región de mediador solapan funcional y/o espacialmente, preferentemente con un nucleótido.

Es preferente que la región de mediador comprenda una región adicional, además de la región de sonda y la región mediadora. En el caso de esta región se trata preferentemente de una región bloqueada, que es complementaria o afin a la región mediadora. La región bloqueada está dispuesta ventajosamente en el extremo 3' de la región de sonda. En este caso, las tres regiones pueden ser solapantes tanto funcional como también espacialmente. Una interacción directa o indirecta de la región de sonda con la molécula modelo genera una alteración de la región mediadora y/o de la región bloqueada, y de este modo modifica la afinidad y/o la interacción entre la región mediadora y la región bloqueada, o bien la sonda mediadora completa. Es ventajosa una región mediadora que comprende una región bloqueada, ya que de este modo se crea una protección adicional que impide que la región mediadora se una o se adicione a la molécula modelo. Presentando la región mediadora y la región de bloqueo una afinidad entre sí, o siendo éstas complementarias, la sonda mediadora puede formar una estructura de horquilla en ausencia de moléculas modelo y/u objetivo.

Además es preferente que la sonda mediadora presente un grupo protector químico en su extremo 3'. Esta forma de realización es ventajosa, ya que de este modo se impide que tenga lugar una prolongación de secuencia de la sonda mediadora catalizada por vía enzimática. El grupo protector químico se puede seleccionar a partir del grupo que comprende grupo fosfato, biotina, nucleótido invertido, nucleótidos que no son complementarios a la secuencia objetivo. El especialista conoce otros grupos protectores químicos, que pueden impedir una prolongación de un oligonucleótido, en especial del extremo 3'.

Es preferente que la región de sonda y la región mediadora se puedan combinar libremente de modo independiente entre sí. De este modo, una molécula de identificación se puede correlacionar también con otra molécula objetivo enlazándose y sintetizándose la región mediadora apropiada con cualquier región de sonda. De este modo se obtiene una flexibilidad especialmente elevada en el empleo de la sonda mediadora en el procedimiento según la invención.

En otra forma de realización preferente, la invención se refiere a un procedimiento que comprende la puesta a disposición de un sistema que comprende una sonda mediadora y una molécula de identificación, caracterizado por que la molécula de identificación es un oligonucleótido y presenta al menos las siguientes regiones:

- a. una primera región en un extremo 5' de la molécula de identificación, que presenta un aceptor de fluorescencia o un donador de fluorescencia y/o un grupo químico para el enlace con una fase sólida y/o un grupo protector químico,
- b. una segunda región que interacciona con la región mediadora, y
- c. una tercera región, que presenta un donador de fluorescencia o un aceptor de fluorescencia y/o un grupo protector químico.

Era completamente sorprendente que se pudiera poner a disposición un sistema que fuera empleable universalmente y contribuyera en especial a la minimización de casos de contaminación en métodos de identificación biológico moleculares. Por medio de una reacción bioquímica se obtiene una detección de diversas

moléculas, preferentemente en un chip de detección universal con moléculas de identificación estandarizadas. Esto es posible especialmente suprimiéndose la interacción física entre molécula objetivo y molécula de identificación. Una sonda mediadora actúa como transmisor (soporte de información) entre molécula objetivo y de identificación. Mediante interacción con la molécula objetivo o la molécula modelo, la sonda mediadora (en presencia de otras moléculas auxiliares) se disocia preferentemente y libera una molécula mediadora activada, que inicia una reacción de identificación.

El procedimiento según la invención permite el acondicionamiento independiente de la molécula objetivo de la molécula de identificación. Por consiguiente, con un set estandarizado de moléculas de identificación se pueden identificar diferentes moléculas objetivo en una muestra, mediante lo cual la reacción se puede adaptar económicamente a la respectiva molécula objetivo mediante ajuste de la sonda mediadora y empleo de moléculas auxiliares apropiadas (por ejemplo cebadores) o moléculas modelo (por ejemplo aptámeros). Mediante esta propiedad ventajosa se soluciona el problema de la correlación típicamente directa entre molécula objetivo y molécula de captura inmovilizada, descrito en el estado de la técnica.

Tras la disociación, la región mediadora se presenta preferentemente difundida en la disolución de reacción, y puede interactuar con la región 2, la secuencia de hibridación mediadora, de la molécula de identificación. La molécula de identificación se puede presentar preferentemente unida a una fase sólida, o también libre en una disolución.

Las citadas moléculas de identificación no interactúan físicamente con las citadas moléculas objetivo. A través de las correspondientes sondas mediadoras se efectúa un acoplamiento entre molécula objetivo y molécula de identificación solo indirectamente. Mediante el empleo de la sonda mediadora se efectúa una asignabilidad libre de una molécula objetivo a cualquier molécula de identificación.

Si las moléculas de identificación están inmovilizadas en una fase sólida, se puede poner a disposición una micromatriz o matriz de detección universal. Las micromatrices universales producidas de este modo se pueden almacenar durante más tiempo bajo condiciones de almacenaje definidas, lo que es una clara ventaja, sobre todo a matrices proteicas del estado de la técnica. De este modo, independientemente de experimentos previstos, un almacenaje no es crítico.

Por consiguiente, mediante la invención se puede poner a disposición por primera vez una micromatriz independiente de la molécula objetivo, estandarizada, que se puede emplear para diversos análisis multianálisis, ya que la reacción en fase líquida específica se puede adaptar rápida y económicamente a la molécula objetivo.

Por lo tanto, mediante la producción de una micromatriz estandarizada se pueden llevar a cabo experimentos con un cartucho de reacción sin pasos de procesamiento previos, o bien posteriores, con lo cual se ahorran costes y se pueden producir números de unidades elevados (efecto de escala). Por consiguiente, con una carga de cartucho de reacción estandarizado se pueden llevar a cabo diversas reacciones de identificación (por ejemplo en el ámbito de investigaciones rutinarias).

Una micromatriz designa preferentemente una disposición disuelta localmente, al menos 1-dimensional, de moléculas de captura inmovilizadas en una fase sólida apropiada (típicamente plana). Métodos alternativos posibilitan un planteamiento apoyado en fase sólida bajo empleo de perlas, que permiten una discriminación clara, a modo de ejemplo mediante diferentes coloraciones. En una clase de perlas definida se puede inmovilizar una molécula de captura determinada.

Una perla designa preferentemente microesferas con un diámetro especialmente de 5 - 100 µm. Éstas se pueden presentar modificadas, o bien funcionalizadas en caso dado en la superficie, o bien en el interior. El empleo de perlas permite la puesta a disposición de grandes superficies en un volumen de reacción definido.

Mediante una molécula auxiliar apropiada, por ejemplo una enzima, en especial una polimerasa, se efectúa una elongación de la región mediadora, degradándose secuencialmente la región 1 de la molécula de identificación. En este caso, la molécula de identificación se modifica preferentemente mediante disociación del extremo 5' y el aceptor de fluorescencia Q asociado al mismo, y se recupera la señal de fluorescencia del donador de fluorescencia F, suprimida previamente. Si la interacción de la región 1 y la región 3 se suprime mediante la disociación, se inhibe la formación de la estructura secundaria. En este caso, la molécula mediadora se puede prolongar de manera complementaria bajo determinadas condiciones hasta el extremo 5' recién producido. Mediante esta elongación, la molécula mediadora prolongada posee un tramo de secuencia que es complementario a la región 1 y a la región 2.

El procedimiento según la invención permite la identificación de diversas moléculas objetivo en un recipiente de reacción cerrado, que se puede eliminar sin riesgo de contaminación tras el procesamiento. Esto representa una ventaja considerable en comparación con el estado de la técnica.

Además es ventajoso que la molécula de identificación

- d. presente una cuarta región en un extremo 3' de la molécula de identificación, comprendiendo la cuarta región un grupo químico para el enlace con una fase sólida y/o un grupo protector químico.

Esta variante es ventajosa, ya que la molécula de identificación se puede inmovilizar, y de este modo se puede producir una micromatriz. A modo de ejemplo se enumeran posibles grupos químicos para la inmovilización de un oligonucleótido. El grupo químico es dependiente de la química de superficie empleada y de moléculas de acoplamiento requeridas eventualmente: -OH (hidroxilo), -NH₂ (amino), -Ph (fosfato), -Acrydite o -silano. El especialista conoce métodos para inmovilizar oligonucleótidos en una superficie. Para posibilitar en especial una inmovilización putativa del extremo 5', la molécula de identificación presenta un grupo químico y/o un grupo protector químico.

- 5 Es preferente que la estructura de horquilla esté configurada hibridándose de manera complementaria el extremo 5' de la molécula de identificación con un tramo de secuencia interno, y comprendiendo el extremo 3' de la molécula de identificación un tramo de secuencia no apareado. Tras adición de la región mediadora a una zona de secuencia del tramo de secuencia 3' no apareado, la región mediadora se prolonga preferentemente mediante una polimerasa, eliminándose nucleótidos del extremo 5' de la estructura de horquilla de la molécula de identificación debido a la actividad de nucleasa de la polimerasa. Tras formación de esta estructura, el donador de fluorescencia F y el aceptor de fluorescencia Q interaccionan entre sí, suprimiéndose la señal de fluorescencia de F (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, FRET).

- 10 Es preferente que la sonda mediadora y/o la molécula de identificación presenten nucleótidos con marca fluorescente. En especial es preferente que la molécula de identificación presente al menos una modificación de fluorescencia en el extremo 5' y/o dentro de la estructura de horquilla. La molécula de identificación presenta una o varias modificaciones de fluorescencia, que son aptas para una transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, y que se pueden separar espacialmente tras la disociación, a partir de lo cual se puede detectar una modificación de la señal de fluorescencia.

- 15 Sondas o colorantes fluorescentes específicos o inespecíficos de la secuencia, fluorógenos y/o cromógenos, pueden interaccionar con al menos una región de la sonda mediadora y/o la molécula de identificación. Además puede ser ventajoso que la molécula de identificación disponga de al menos una modificación de fluorescencia en el extremo 5' y/o dentro de la estructura de horquilla y, tras la reacción con la región mediadora por medio de una molécula auxiliar, la modificación de fluorescencia se disocie de la molécula de identificación y/o se elimine el extremo 5' de la estructura de horquilla de la molécula de identificación, y se detecte una modificación de la señal de fluorescencia en la molécula de identificación.

Es preferente que la molécula de identificación se modifique debido a una interacción directa o indirecta con la región mediadora, comprendiendo modificación de la estructura secundaria, modificación en fluorescencia, fosforescencia, masa, absorción, dispersión de la luz, conductividad eléctrica, actividad enzimática y/o de la afinidad.

- 25 En este caso, mediante una interacción indirecta o directa de la región mediadora con la segunda región de la molécula de identificación se efectúa de modo preferente una modificación de la molécula de identificación mensurable física o químicamente.

Además, se ha mostrado ventajoso que la región mediadora unida a la segunda región de la molécula de identificación se prolonge por vía enzimática mediante al menos una molécula auxiliar, uniéndose la molécula auxiliar preferentemente al extremo 3' de la región mediadora enlazada.

- 30 La molécula auxiliar se selecciona a partir del grupo que comprende catalizadores, proteínas, ácidos nucleicos, sustancias naturales, enzimas, sistemas enzimáticos, lisados celulares, componentes celulares, derivados procedentes de componentes celulares y/o moléculas sintéticas.

Además es preferente que la molécula auxiliar sea una molécula constituida por un sistema de amplificación de ácido nucleico y/o un sistema de restricción.

- 35 En una forma de realización preferente, la molécula de identificación puede disponer de una o varias modificaciones de fluorescencia en la zona 5'-terminal y/o dentro de la estructura de horquilla, disociándose de ésta molécula de identificación los nucleótidos 5'-terminales con ayuda de una enzima apropiada tras el procesado de la región mediadora hibridada, y pudiéndose detectar una variación de la señal de fluorescencia en la molécula de identificación. La molécula mediadora liberada interacciona preferentemente con al menos un complejo molecular de identificación que se presenta libre en la disolución o inmovilizado en una fase sólida. El complejo molecular de identificación puede disponer de una o varias modificaciones químicas iguales o diferentes, y generar una señal detectable tras la interacción con la región mediadora. Es preferente que se efectúe una modificación de la molécula de identificación mensurable física o químicamente mediante una interacción indirecta o directa de la región mediadora con la segunda región de la molécula de identificación. Esta región puede desencadenar una señal solo

tras la disociación de la sonda mediadora. En tanto se presente aún asociada a la sonda mediadora, la región mediadora de la sonda mediadora no desencadena preferentemente ninguna señal, ni de manera directa (por ejemplo hibridación) ni de manera indirecta (por ejemplo procesamiento mediante polimerasa), ya que, en caso contrario, se efectúa una producción de señal independiente de la molécula objetivo. Esta modificación mensurable se puede poner de relieve también mediante la molécula auxiliar (por ejemplo polimerasa).

En el caso de una reacción directa de identificación de la región mediadora, ésta modifica directamente la molécula de identificación. En el caso de una reacción de identificación indirecta, la región mediadora induce la modificación de la molécula de identificación mediante interacción con moléculas auxiliares de identificación, en especial una polimerasa, que prolonga la región mediadora. Durante la reacción de identificación, la región mediadora provoca ventajosamente una modificación de la molécula de identificación y experimenta en sí misma una variación a través de moléculas auxiliares de identificación apropiadas. Esta forma de realización es ventajosa, ya que a través de la misma se puede diferenciar claramente una molécula mediadora, que se modificó en la reacción de identificación, de una molécula mediadora, que procede directamente de la disociación de sondas mediadoras.

Una molécula auxiliar de identificación describe en especial una molécula que interacciona ventajosamente con la región mediadora y la molécula de identificación, desencadenándose preferentemente una reacción de identificación. Se pueden emplear diversas moléculas auxiliares de identificación de una o varias clases de sustancias.

Las moléculas auxiliares de identificación se seleccionan preferentemente a partir de diversas clases de sustancias, como catalizadores, proteínas, ácidos nucleicos, sustancias naturales, enzimas, sistemas enzimáticos, lisados celulares, componentes celulares, derivados procedentes de los mismos o moléculas sintéticas, o una mezcla de diversas moléculas de estas clases de sustancias.

Además es preferente que la molécula auxiliar de identificación se disocie de manera específica para la estructura. En este caso es preferente que las moléculas auxiliares comprendan moléculas constituidas por un sistema de amplificación de ácidos nucleicos y/o un sistema enzimático de restricción. La región de sonda de la sonda mediadora puede interaccionar preferentemente con la molécula objetivo y/o la molécula modelo mediante apareamiento de bases, y una molécula auxiliar puede disociar la sonda mediadora, interaccionando la región mediadora con una molécula de identificación mediante apareamiento de bases, y una molécula auxiliar de identificación puede disociar componentes de la molécula de identificación, sirviendo esta reacción de disociación como prueba indirecta de la molécula objetivo. El componente disociado de la molécula de identificación puede representar preferentemente un donador de fluorescencia o un aceptor de fluorescencia.

No obstante, también puede ser preferente que la molécula auxiliar de identificación se disocie de manera específica para la secuencia. En este caso, las moléculas auxiliares son un sistema de amplificación de ácidos nucleicos, y la molécula auxiliar de identificación es un sistema enzimático de restricción o una mezcla de un sistema de amplificación de ácidos nucleicos y un sistema enzimático de restricción. La molécula de identificación es un oligonucleótido o un derivado, y contiene la correspondiente secuencia de detección para el sistema enzimático de restricción. En este caso, la región mediadora se une a la molécula de identificación en el tramo complementario y se prolonga mediante el sistema de amplificación de ácidos nucleicos. Por consiguiente, el dúplex de secuencia generado contiene al menos un motivo secuencial de detección del sistema enzimático de restricción, que disocia al mismo en al menos dos partes. Tras la disociación del dúplex de secuencia se puede detectar preferentemente una señal, por ejemplo la modificación de la fluorescencia o de la masa. No obstante, también puede ser ventajoso que, tras disociación de la secuencia dúplex, al menos un fragmento de disociación pueda iniciar una reacción de amplificación con secuencias de ácido nucleico complementarias o parcialmente complementarias presentes, pudiéndose presentar dichas secuencias de ácido nucleico libres en disolución o inmovilizadas en una fase sólida.

En una forma de realización preferente, la amplificación se puede detectar mediante incorporación de nucleótidos con marca fluorescente o de otro tipo, o mediante adición de sondas específicas para la secuencia, fluorógenas o cromógenas, o mediante adición de un colorante fluorescente inespecífico para la secuencia. Los productos de amplificación se pueden identificar ventajosamente de manera directa o indirecta, sirviendo la detección como prueba indirecta de la molécula objetivo.

La región mediadora liberada puede iniciar una reacción de amplificación o polimerización catalizada por vía enzimática, preferentemente en presencia de un ácido nucleico apropiado, mediante uno o varios enzimas diferentes, como por ejemplo polimerasas. En este caso, el ácido nucleico apropiado se puede presentar en forma de hebra simple o doble, y en la reacción de identificación se puede emplear un cebador opuesto (cebador inverso).

Es preferente que la molécula de identificación se presente unida a una fase sólida o libre en la disolución.

Además es ventajoso que la molécula de identificación sea una molécula de ácido nucleico o un derivado de ácido nucleico de hebra simple, que presenta preferentemente una estructura de horquilla. En este caso es ventajoso que

la estructura de horquilla esté configurada de modo que el extremo 5' de la molécula de identificación se hibride con un tramo de secuencia interno de manera complementaria, y que el extremo 3' de la molécula de identificación presente un tramo de secuencia no apareado.

La molécula de identificación dispone preferentemente de una o varias modificaciones iguales o diferentes (a modo de ejemplo nucleótidos no básicos y/o fosfotioatos y/o grupos funcionales, como colorantes fluorescentes). Una modificación de la molécula de identificación se efectúa ventajosamente mediante interacción directa o indirecta con el mediador, y se puede referir a una o varias modificaciones de fluorescencia, fosforescencia, masa, absorción, dispersión de la luz, conductividad eléctrica, actividad enzimática o afinidad, y registrar físicamente de este modo. En presencia del mediador, la molécula de identificación puede experimentar preferentemente una modificación química, como por ejemplo fosforilación, desfosforilación, amidación, enlace o disociación de un grupo químico, variación de fluorescencia, fosforescencia o luminiscencia.

En el sentido de la invención, un nucleótido no básico describe en especial un componente de ADN, cuya desoxirribosa no está enlazada con una base y, por consiguiente, representa solo un esqueleto sacárico de fosfato. En dúplex de ADN no se efectúa una formación de puentes de hidrógeno en esta posición. Esta modificación se puede sintetizar bajo empleo de tetrahidrofurano (THF). Además es preferente que la molécula de identificación presente al menos una modificación de fluorescencia en el extremo 5' y/o dentro de la estructura de horquilla.

La invención se refiere a un procedimiento para la detección de al menos una molécula objetivo, que comprende los siguientes pasos:

- a) puesta a disposición de una sonda mediadora para la detección de al menos una molécula objetivo, que comprende una región de sonda y una región mediadora, siendo la sonda mediadora un oligonucleótido y estando dispuesta la región de sonda en el extremo 3' y la región mediadora en el extremo 5' del oligonucleótido, presentándose entre las regiones un punto de disociación químico, biológico y/o físico, y presentando la región de sonda una afinidad con una molécula modelo y la región mediadora una afinidad adicional con una molécula de identificación,
- b) puesta a disposición de una molécula de identificación, siendo la molécula de identificación un oligonucleótido y presentando al menos las siguientes regiones:
 - una primera región en un extremo 5' de la molécula de identificación, que presenta un aceptor de fluorescencia o un donador de fluorescencia y/o un grupo químico para el enlace con una fase sólida y/o un grupo protector químico,
 - una segunda región que interacciona con la región mediadora, y
 - una tercera región que presenta un donador de fluorescencia o un aceptor de fluorescencia y/o un grupo protector químico,
- c) unión de la región de sonda de la sonda mediadora a una secuencia de la molécula modelo y/o de la molécula objetivo,
- d) amplificación de la molécula modelo y/o de la molécula objetivo con ayuda de una molécula auxiliar, preferentemente mediante un proceso de amplificación que incluye un procedimiento isotérmico y/o procedimiento basado en termociclaje y/o mediante una PCR, de modo especialmente preferente una PCR en tiempo real,
- e) disociación de la sonda mediadora en el punto de disociación durante el paso d) mediante al menos la molécula auxiliar del paso d) u otras moléculas auxiliares, y
- f) unión de la región mediadora disociada de la sonda mediadora a la molécula de identificación,
- g) detección de señal.

En este caso es preferente que la disociación de la sonda mediadora ocasione una modificación de las propiedades físicas y/o químicas de al menos una región de la sonda mediadora, seleccionadas a partir del grupo que comprende masa molecular, actividad enzimática, propiedades de enlace, que incluyen afinidad o actividad, avidez, reactividad química, presencia de grupos químicos, propiedad eléctrica, que comprende conductividad, polarizabilidad o carga y/o propiedad óptica, que incluye absorción y emisión de luz.

En una realización especialmente ventajosa, una amplificación basada en ácidos nucleicos puede amplificar directamente la molécula objetivo, o bien indirectamente una molécula modelo (por ejemplo aptámero), con lo cual se aumenta la sensibilidad. En este caso se pueden combinar y realizar paralelamente una reacción de amplificación y de identificación. De este modo, la invención se diferencia claramente de la reacción Invader® descrita en el estado de la técnica, en la que la detección se lleva a cabo con amplificación de señal lineal, o bien con una amplificación y detección consecutivas.

La interacción de la molécula objetivo y/o de la molécula modelo con la sonda mediadora conduce preferentemente a una disociación directa o indirecta de la sonda mediadora, generándose preferentemente los siguientes fragmentos de disociación:

- un fragmento de región mediadora y un fragmento de región de sonda, o
- región mediadora y un fragmento de región de sonda, o
- región mediadora y una zona de región de sonda como fragmento coherente y un fragmento de región de sonda, o
- 5 - un fragmento de región mediadora, región bloqueada, o bien un fragmento de región bloqueada y un fragmento de región de sonda,
- región mediadora, así como región bloqueada, o bien un fragmento de región bloqueada y un fragmento de región de sonda, o
- 10 - región mediadora y una zona de región de sonda como fragmento coherente, así como región bloqueada, o bien un fragmento de región bloqueada y un fragmento de región de sonda.

Es especialmente preferente que la región mediadora disociada, o un fragmento que contiene una parte de la región mediadora, se una a la segunda región de la molécula de identificación.

15 Con ayuda de una reacción de identificación se efectúa una detección de la molécula mediadora. El mecanismo de reacción se puede efectuar paralelamente a la amplificación de la molécula objetivo y/o de la molécula modelo descrita.

El procedimiento según la invención es ventajoso, ya que con el mismo se ha conseguido el desarrollo de una reacción en fase líquida novedosa, que desacopla la dependencia de molécula objetivo y de identificación y detecta casi cualquier molécula objetivo en combinación con una matriz estandarizada. Mediante la combinación de la reacción en fase líquida novedosa y una micromatriz universal se posibilita la identificación paralela de diversas moléculas objetivo. Es preferente que la amplificación de la molécula modelo y/o de la molécula objetivo se efectúe mediante una PCR, preferentemente una PCR en tiempo real.

PCR caracteriza en especial la reacción en cadena de polimerasa (Polymerase Chain Reaction), es decir, un procedimiento en el que se amplifica exponencialmente un tramo de ácido nucleico limitado por moléculas de cebador. En este caso se calienta y se enfría cíclicamente la carga de reacción.

25 En este caso, un cebador describe preferentemente un oligonucleótido que es típicamente complementario a un tramo del ácido nucleico a amplificar y limita con este tramo. Dos cebadores, que definen un amplicón, se denominan típicamente cebador directo y cebador inverso. Ya que la polimerización del extremo 5' se lleva a cabo en el extremo 3', un cebador requiere un extremo 3'-OH, en el que la polimerasa une los demás nucleótidos mediante enlace covalente.

30 Es especialmente preferente emplear la sonda mediadora durante una PCR en tiempo real en el sentido de la invención. La variedad de técnicas de control de reacciones PCR en tiempo real establecida hace uso de sondas individuales específicas del objetivo. De este modo se elevan los costes para la síntesis, lo que representa un gran inconveniente de estos sistemas. Por lo tanto, desde hace tiempo existe un interés en un método universal que se pueda emplear para el control de reacciones de amplificación, que una especificidad de secuencia y bajos costes. La invención pudo solucionar este problema con la sonda mediadora empleada en el procedimiento según la invención, que se puede emplear preferentemente durante una reacción de amplificación, de modo especialmente preferente una PCR en tiempo real. En este empleo, la molécula objetivo es un ácido nucleico de ADN, que se amplifica con cebadores de oligonucleótido habituales y una polimerasa. La detección específica para la secuencia, preferentemente detección en tiempo real, se realiza mediante la sonda mediadora bifuncional, que se disocia tras interacción con la secuencia objetivo durante la amplificación. La disociación se cataliza mediante la polimerasa. La región mediadora está configurada preferentemente de modo que no sea complementaria a la secuencia objetivo. La región mediadora se difunde a continuación hacia una molécula de identificación, que se presenta inmovilizada, o bien en disolución. La molécula de identificación es una unidad cerrada e independiente del objetivo. De este modo, la molécula de identificación se hace empleable universalmente y no está unida al objetivo concreto. Por consiguiente, los costes para este tipo de detección se pueden reducir considerablemente, ya que la molécula de identificación no se debe adaptar a cada reacción ni a cada molécula objetivo.

50 En este caso, la molécula de identificación presenta una estructura de horquilla y contiene un fluoróforo y un agente de extinción, que están dispuestos preferentemente a distancia. Mediante esta disposición se posibilita una identificación con FRET especialmente eficiente. En el extremo 3' no apareado, la molécula de identificación contiene además un punto de hibridación de mediador, que es complementario a la región mediadora.

FRET designa preferentemente una transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, en especial la transmisión de energía de una molécula donadora a una molécula aceptora.

55 Durante la PCR en tiempo real tienen lugar simultáneamente amplificación de objetivo y detección en una reacción adaptada. Durante el paso de desnaturalización de los modelos de ADN, éstos se dividen en dos hebras simples. Durante el enfriamiento hasta la consecución de la temperatura de anelación se hibridan tanto el cebador como

también la región de sonda de la sonda mediadora. La región 5' (la región mediadora) no se une al ADN objetivo. De este modo se produce una estructura plegada. Durante la prolongación de cebador se atrae la región mediadora al dominio de nucleasa de la polimerasa, y se disocia de este modo. La zona disociada (la región mediadora) presenta solo un grupo 3'-OH. La región de sonda se degrada a continuación durante la prolongación del cebador. En cada duplicación de un objetivo se libera una región mediadora de este modo. Las regiones mediadoras se difunden hacia las moléculas de identificación y se hibridan con su punto de hibridación mediador. Es preferente que la polimerasa prolongue el extremo 3' de la región mediadora, lo que conduce a la activación fluorescente. En este caso son preferentes diferentes vías de señal. Mediante la actividad de 5'-nucleasa de la polimerasa se degrada el extremo 5' de la molécula de identificación, y se disocia el resto de extinción. No obstante, es preferente que la polimerasa desestabilice el dúplex de partida de la molécula de identificación, y se desarrolle la estructura de horquilla sin que se degrade el extremo 5'. Ambas vías conducen en último término a una activación del fluoróforo. Ambas vías pueden tener lugar paralelamente, ya que, a modo de ejemplo, la Taq-polimerasa es conocida por diferentes actividades de exonucleasa. Una ventaja de la invención consiste en que la emisión de fluorescencia se acumula sucesivamente con cada ciclo de amplificación. De este modo se puede efectuar una identificación, también con cantidades de partida de moléculas objetivo especialmente reducidas.

La PCR en tiempo real con el empleo de la sonda mediadora como agente de detección es ventajosa frente a sistemas del estado de la técnica (por ejemplo SISAR o sistema invasor). Mediante el acoplamiento de la identificación con una reacción de amplificación se posibilita una detección sensible de la molécula objetivo, con lo cual los análisis ganan en precisión. El procedimiento según la invención requiere ambas, polimerización y actividad de Taq-polimerasa. Se excluyen resultados falsos positivos, ya que las amplificaciones erróneas debido a enlaces falsos del cebador no conducen a la disociación de la región de mediador, puesto que no se encuentra presente una región complementaria para la región de sonda, de modo que ésta tampoco se puede enlazar. Además, la sonda mediadora se puede emplear en un sistema PCR múltiplex y/o un sistema PCR dúplex, en el que se puede trabajar con varios fluoróforos diferentes a través de diversas moléculas de identificación. Esto es una gran ventaja en comparación con los sistemas en el estado de la técnica, ya que de este modo se puede identificar paralelamente una variedad de moléculas objetivo. De este modo, un procedimiento según la invención que comprende un sistema PCR múltiplex puede emplearse, por ejemplo, en el diagnóstico, y acelerar y simplificar en este caso los procesos de identificación, con lo cual se ahorran en último término gasto de trabajo, material y costes.

En el caso de métodos múltiplex se pueden detectar diferentes grupos de múltiples analitos con el mismo grupo de moléculas de identificación diferentes. En este caso es ventajoso que los métodos múltiplex se puedan llevar a cabo con el mismo grupo de moléculas de identificación diferentes. Hasta el momento, esto no ha sido posible en el estado de la técnica.

Otra gran ventaja de la invención es el desacoplamiento de la reacción de amplificación respecto a la detección. De este modo es posible emplear una molécula de identificación estandarizada, que se puede obtener, por consiguiente, en grandes cantidades, y minimiza, por lo tanto, los costes de producción.

Además es preferente que la molécula de identificación se modifique mediante una interacción con la región mediadora a través de al menos una molécula auxiliar de identificación, que comprende disociación, digestión, duplicación de hebra, hibridación interna, fosforilación, desfosforilación, amidación, enlace o disociación de un grupo químico, modificación de fluorescencia, fosforescencia o luminiscencia. En este caso es especialmente preferente que la molécula de identificación disponga de al menos una modificación de fluorescencia en la zona 5'-terminal y/o dentro de la estructura de horquilla, y la modificación de fluorescencia se disocie de la molécula de identificación tras la reacción con la región mediadora de una molécula auxiliar de identificación y/o se elimine el extremo 5' de la estructura de horquilla de la molécula de identificación se elimine y se detecte una modificación de la señal de fluorescencia en la molécula de identificación.

Además es preferente un procedimiento en el que al menos una molécula objetivo es un ARN. En este caso, el ARN se transcribe en primer lugar en cADN, preferentemente mediante una transcripción inversa. El cADN producido de este modo representa ahora la molécula modelo, a la que se une la región de sonda de la sonda mediadora, y que se amplifica. Es especialmente ventajoso que, mediante la transcripción en cADN, la molécula objetivo de ARN se pueda amplificar también, ya que, de este modo, se requieren cantidades de ARN apenas reducidas para posibilitar una detección.

Además es preferente que en la reacción de transcripción, preferentemente la transcripción inversa, se emplee un cebador con rama de secuencia. Esto posibilita el empleo de una sonda mediadora se puede unir al cADN, pero no al ADN original del gen. De este modo se emplea una sonda mediadora, cuya región de sonda se une a una zona que comprende cADN y secuencia de ramificación. Ya que el ADN original no presenta una secuencia de ramificación, la sonda mediadora puede diferenciar entre ADN y cADN de este modo. De esta manera se asegura que se detecte solo la presencia de ADN, y que el ADN no pueda desencadenar una señal correspondiente.

Además, este procedimiento se puede emplear para detectar paralelamente ARN (a través del correspondiente cADN con secuencia de ramificación) y ADN del mismo gen. A tal efecto se emplean preferentemente dos moléculas

de identificación diferentes y dos sondas mediadoras diferentes.

Si se investigan muestras de células eucarióticas, para la diferenciación entre ARN y ADN del mismo gen también se pueden emplear secuencias de intrón/exón. De este modo, la región de sonda para el enlace con el cADN se puede seleccionar de modo que ésta cubra una zona de dos exones transcritos. Ya que en el ADN del gen estas zonas se presentan separadas a través de un intrón, la región mediadora no puede unir al ADN, sino únicamente al cADN.

En otro procedimiento preferente, al menos una molécula objetivo es un péptido o una proteína. La molécula modelo es preferentemente un aptámero, y el aptámero se une al péptido o a la proteína, y haciéndose accesible en este caso el punto de enlace para la región de sonda de la sonda mediadora. Es preferente que el aptámero en sí mismo no presente puntos de enlace accesibles para la región de sonda. El punto de enlace se libera y se hace accesible solo cuando el aptámero ha interactuado con la molécula objetivo (péptido o proteína). Ésto se efectúa preferentemente mediante una modificación de la estructura secundaria. La región de sonda de la sonda mediadora se puede unir ahora al aptámero. Simultáneamente, el aptámero se encuentra disponible para la reacción de amplificación. Mediante la amplificación del aptámero se disocia la región mediadora de la región de sonda, y de este modo ésta se puede unir a la molécula de identificación. Por consiguiente, a través de la presencia de aptámero se puede detectar la proteína. Ya que el aptámero se amplifica, la señal se intensifica también, de modo que también se puede detectar un número reducido de péptidos y/o proteínas.

Además puede ser preferente detectar simultáneamente varias moléculas objetivo, a modo de ejemplo ADN y proteína, o proteína y ARN.

Dependiendo de las condiciones de reacción, a través de un análisis multianálisis la invención posibilita la detección paralela de diferentes moléculas y clases de moléculas, como por ejemplo proteínas y ácidos nucleicos en un paso de trabajo, pudiéndose elaborar un perfil de ADN-ARN-proteína de una muestra combinado.

Por lo tanto, el procedimiento según la invención se puede emplear también para la detección de una o varias biomoléculas iguales o diferentes en una mezcla.

Esto tiene lugar preferentemente bajo empleo de la actividad de una enzima de restricción, caracterizado por que la molécula de identificación dispone de un grupo protector químico en el extremo 3'-terminal, que se disocia de la molécula de identificación tras la reacción con la región mediadora por medio de una molécula auxiliar, y se genera un grupo OH 3'-terminal.

Además es preferente que el procedimiento según la invención se emplee para un análisis múltiple. Un análisis múltiple describe en especial una identificación paralela de varias moléculas objetivo en una carga de reacción.

Ventajosamente, con un modelo de matriz estandarizado y la adaptación de sondas mediadoras se puede detectar de modo especialmente económico una variedad de diferentes moléculas objetivo, que sobrepasa potencialmente en órdenes de magnitud el grado de multiplexación de una reacción PCR descrita en el estado de la técnica. El grado de multiplexación de este procedimiento no se agota en la práctica. Una región mediadora, a modo de ejemplo constituida por una molécula de ácido nucleico con una longitud de 20 nucleótidos, puede adoptar computacionalmente 4^{20} ($\sim 1 \cdot 10^{12}$) diferentes secuencias de nucleótido posibles.

En el caso de interacciones directas entre molécula objetivo y/o molécula modelo y sonda de mediador, la presencia de la molécula objetivo y/o de la molécula modelo genera la región mediadora activada a partir de la sonda mediadora. En el caso de interacciones indirectas, la molécula objetivo y/o la molécula modelo, en especial un ácido nucleico, induce una interacción con la sonda de mediador y una molécula auxiliar, en especial un oligonucleótido, que no interacciona estructuralmente con la sonda mediadora. La molécula auxiliar descrita actúa como cebador, y en este caso se prolonga mediante una molécula auxiliar de otro tipo, en especial una polimerasa apropiada, después de lo cual la sonda mediadora se disocia en región mediadora y región de sonda tras interacción estructural con la polimerasa. Por consiguiente, la región mediadora se produce a partir de la sonda mediadora en presencia de la molécula objetivo. Estas moléculas auxiliares se seleccionan preferentemente a partir del grupo que comprende catalizadores, proteínas, ácidos nucleicos, sustancias naturales, enzimas, sistemas enzimáticos, lisados celulares, componentes celulares, derivados procedentes de los mismos o moléculas sintéticas, o una mezcla de los mismos.

Era sorprendente que la disociación de la sonda mediadora ocasionara una modificación de las propiedades físicas y/o químicas de al menos una región de la sonda mediadora, seleccionadas a partir del grupo que comprende masa molecular (tras disociación de la sonda mediadora se diferencian los fragmentos de disociación de la sonda mediadora), actividad enzimática (la sonda mediadora modifica ventajosamente su propiedad de poder iniciar una reacción de identificación a través de la nueva presencia de un extremo 3' libre), propiedades de enlace, que comprenden afinidad o aidez, reactividad química (tras disociación de la sonda mediadora, el fragmento de disociación que contiene la región mediadora de la sonda mediadora posee un grupo hidroxilo en el extremo 3', que se puede prolongar mediante una molécula auxiliar (por ejemplo una polimerasa). Esto no es posible para la sonda

no disociada), presencia de grupos químicos, propiedad eléctrica que comprende conductividad, polarizabilidad o carga y/u propiedad óptica que comprende absorción y emisión de luz (en tanto la sonda mediadora esté marcada con al menos un colorante fluorescente, se puede detectar una señal de fluorescencia modificada preferentemente tras la disociación).

En una realización preferente se efectúa una interacción en serie de la región mediadora con varias moléculas de identificación similares, efectuándose una intensificación de señal. Esto aumenta la sensibilidad de la reacción de identificación. En esta realización se emplean ventajosamente nucleótidos modificados para la síntesis de la molécula de identificación, que permiten solo una degradación de extremo 5' limitada durante la reacción de identificación. Esto se puede efectuar mediante la incorporación de una o varias modificaciones de fosfotioato (PTO), a modo de ejemplo en el penúltimo nucleótido del extremo 5' durante la síntesis de la molécula. La posición de la modificación de PTO se encuentra preferentemente en la región 1, de modo especialmente preferente entre el donador de fluorescencia F y el aceptor de fluorescencia Q. En la Fig. 6 se representa una imagen de posiciones preferentes de nucleótidos modificados. Las moléculas auxiliares de identificación no pueden disociar compuestos de PTO, o solo con eficiencia reducida, tras lo cual el extremo 5' (región 1) no se degrada más allá de este nucleótido. Por consiguiente, tampoco la molécula mediadora se prolonga adicionalmente. Mediante ajuste apropiado de las condiciones de reacción, la molécula auxiliar de identificación y la molécula mediadora se pueden disociar de la molécula de identificación y encontrar disponibles de nuevo para la activación de otra molécula de identificación.

En una realización especialmente preferente, una molécula mediadora en cualquier ciclo de reacción, o bien tramo temporal de reacción, puede interactuar con varias moléculas de identificación idénticas específicas y desencadenar una reacción de identificación que genera una señal. Ya que se efectúa un efecto acumulativo mediante amplificación de la molécula objetivo, se evidencia la sensibilidad de la reacción.

Además es preferente que la detección se pueda efectuar bajo empleo de dispositivos apropiados en tiempo real, o bien que se pueda determinar una medición de punto final. En ambos casos, la realización según la invención no requiere ventajosamente un procesamiento posterior, como por ejemplo pasos de lavado o incubación.

En otra realización preferente, que es compatible con la modificación de PTO descrita anteriormente, pero no está limitada a una aplicación combinada, en la región c se incorpora un nucleótido no básico (modificación de tetrahidrofurano, THF), que puede formar puentes de hidrógeno con un nucleótido complementario. De este modo se suprime la reacción de prolongación de la región mediadora en la posición enfrentada del nucleótido no básico, tras lo cual la molécula auxiliar de identificación y la región mediadora prolongada se disocian de la molécula de identificación (véase la Fig. 7). El empleo de una de las modificaciones preferentes posibilita la interacción en serie de una molécula mediadora con varias moléculas de identificación, lo que se puede denominar en especial reutilización de mediador en el sentido de la invención. La región mediadora se prolonga por medio de una molécula auxiliar de identificación en la primera interacción con una molécula de identificación y una vez efectuado el procesamiento, y también en este estado prolongado puede interactuar con otras moléculas de identificación y posibilitar una degradación del extremo 5' y, por consiguiente, también del aceptor de fluorescencia Q – con ayuda de una molécula auxiliar de identificación apropiada (por ejemplo polimerasa con actividad de 5'-nucleasa). Este mecanismo de reacción permite una amplificación de señal, ya que, independientemente de una amplificación de la molécula objetivo, se genera y se intensifica una señal. Si la molécula objetivo se amplifica con ayuda de moléculas auxiliares apropiadas y este proceso se acopla a una disociación mediador-sonda, se produce una acumulación de mediador, que combina una amplificación de molécula objetivo con una intensificación de señal, y reduce el límite de identificación de la reacción de detección en varios órdenes de magnitud. Esto era completamente sorprendente, y no se describe en el estado de la técnica. Además, representa un abandono de lo habitual desde el punto de vista técnico. Las condiciones de reacción se pueden modificar ventajosamente una vez transcurrido este proceso, por ejemplo mediante aumento de la temperatura de reacción, de modo que la enzima, por ejemplo la polimerasa, disocie la región mediadora prolongada de la molécula de identificación. El especialista sabe que las condiciones de reacción se pueden modificar cíclicamente, de modo que, en un acondicionamiento especialmente preferente de la invención, una molécula mediadora puede interactuar con varias moléculas de identificación similares. De este modo se produce sorprendentemente una amplificación de señal, que aumenta claramente la sensibilidad de la reacción.

La reacción de identificación está diseñada preferentemente de modo que, en contrapartida a la región mediadora, la sonda mediadora no disociada no desencadena una reacción generadora de señal y, por consiguiente, no se generan resultados falsos positivos. La región mediadora, que procede de la disociación de la sonda mediadora, posee un extremo 3'-OH, que es especialmente ventajoso para una reacción de prolongación mediada por polimerasa. Si esta disociación no se produce, no es posible una prolongación de mediador, ya que la secuencia mediadora está unida mediante enlace covalente con la secuencia de hibridación de la sonda mediadora (véase la Fig. 8). Adicionalmente se puede impedir una prolongación inespecífica del extremo 3' de la sonda mediadora, a modo de ejemplo, con un grupo fosfato u otro grupo químico.

Mediante el fenómeno de interacción de la región mediadora con la molécula de identificación se produce preferentemente una señal local, detectable (de fluorescencia). Si se activan suficientes moléculas de identificación

mediante la prolongación de mediador preferente, con disociación resultante del extremo 5', la señal se intensifica y se puede identificar por medio de dispositivos de detección apropiados (en especial ópticos). Esto posibilita la detección en presencia de la mezcla de reacción y no requiere ningún paso de procesamiento. De este modo, la forma preferente de realización posee la propiedad ventajosa de permitir una detección dentro de un espacio de reacción apropiado, sin tener que abrir el mismo una vez llevada a cabo la reacción. Esto evita los problemas de análisis de micromatrices debidos a pasos de hibridación, tñido y/o lavado, descritos en el estado de la técnica, que representan un gasto de trabajo adicional y un elevado riesgo de contaminación. Por consiguiente, la forma de realización preferente se puede calificar de abandono de lo habitual desde el punto de vista técnico, ya que abre un nuevo campo técnico y soluciona un problema existente durante mucho tiempo en el estado de la técnica.

Adicionalmente a las ventajas descritas, la forma de realización preferente posibilita la lectura de las señales producidas en cualquier momento de la reacción. Por consiguiente, se puede efectuar un control en tiempo real de la reacción, que se requiere, por ejemplo, para la cuantificación de amplificaciones de ácido nucleico o la determinación de la cinética de enlace de interacciones proteicas. Por lo tanto, la forma preferente de realización se diferencia del estado de la técnica, en el que se efectúan típicamente solo determinaciones de punto final y, por lo tanto, no es realizable una detección de señal en cualquier momento.

Los análisis múltiplex ocasionan la detección de varios analitos diferentes en una mezcla de reacción. Para el aumento del grado de multiplexación de la reacción preferente es preferente el empleo de "n" sondas mediadoras diferentes para "n" moléculas diferentes. En una forma de realización preferente, a cada molécula objetivo a detectar se puede asignar una sonda mediadora, cuya región 1 interacciona específicamente con la molécula objetivo. La región 2 de la respectiva sonda mediadora, que representa el mediador una vez efecuada la disociación, no es afín, o bien complementaria a la molécula objetivo, pero representa un componente de interacción específico para una molécula de identificación definida. De este modo, a cada molécula objetivo se asigna indirectamente una molécula de identificación, cuya asignación se efectúa mediante la sonda mediadora. La detección de diferentes moléculas objetivo ocasiona moléculas de identificación diferentes. Debido a la estructura preferente es suficiente que estas moléculas se diferencien exclusivamente en la región 5. Debido a los órdenes de secuencia arbitrarios en esta región, el grado de paralelismo es elevado casi a voluntad y, por consiguiente, se da un procedimiento de detección para un análisis multiparámetro. El sistema se puede emplear preferentemente para la detección de una o varias biomoléculas iguales o diferentes en una mezcla. Además, el sistema se puede emplear ventajosamente para la amplificación de al menos una, o en especial varias moléculas objetivo, tratándose ventajosamente de moléculas objetivo no idénticas. Además puede ser preferente emplear el sistema bajo utilización de la actividad de una enzima de restricción, disponiendo la molécula de identificación de un grupo protector químico en la zona 3'-terminal, que se disocia de la molécula de identificación tras la reacción con la región mediadora por medio de una molécula auxiliar, y se genera un grupo OH 3'-terminal.

En una solución del problema según la invención, la sonda mediadora se aplica, se procesa de modo apropiado y se detecta con la muestra a investigar en las moléculas de identificación inmovilizadas en el cartucho de reacción desechable. A continuación se puede eliminar el cartucho de reacción sin contaminación. Por lo demás, se puede llevar a cabo un paso de amplificación en el recipiente de reacción de manera previa, o bien paralela a la detección, con lo que se puede efectuar, en caso dado, una concentración específica de la molécula objetivo. De este modo, la transferencia de cargas de reacción con concentración elevada de molécula objetivo (por ejemplo cargas post PCR) de una zona de amplificación a una zona de detección, y los pasos de trabajo y riesgos de contaminación producidos con la misma, resultan superfluos. En el presente documento se da a conocer además un aparato de procesamiento y un cartucho de reacción microfluídico para empleo del procedimiento o del sistema. El cartucho presenta al menos una cámara de reacción, en la que se presenta en especial una matriz de detección universal, que está constituida preferentemente por una disposición disuelta localmente de una o varias moléculas de identificación.

El aparato de procesamiento somete preferentemente a los cartuchos y al líquido de reacción a una temperatura constante, o bien a un desarrollo de temperatura definido (calentamiento y/o refrigeración). El aparato de procesamiento puede detectar la modificación de la molécula de identificación mediante un sistema o procedimiento preferente. A tal efecto se puede emplear, a modo de ejemplo, una señal fluorescente. Adicionalmente, el aparato puede posibilitar un transporte de líquido del cartucho de reacción por medio de elementos activos o pasivos. Las explicaciones expuestas anteriormente se refieren a la sonda mediadora, al sistema y al procedimiento.

Los costes para la puesta en práctica de un procedimiento según la invención se pueden reducir, ya que la aplicación de la muestra a investigar y de los reactivos requeridos se puede llevar a cabo en un cartucho desechable de manera automatizada en una posible forma de realización. Por consiguiente, se suprime la necesidad de emplear personal cualificado para este trabajo.

Además, en el presente procedimiento se da a conocer un kit que comprende al menos una molécula de identificación en el sentido de la invención, polimerasas y dNTPs. El kit puesto a disposición se puede emplear en cualquier reacción de identificación o detección, y es ventajosamente, por lo tanto, un kit de identificación universal.

Ejemplos

A continuación se explicará la invención, así como el estado de la técnica, por medio de figuras y ejemplos de realización, sin limitarse a las mismas. Muestran:

- | | | |
|----|-----------------|---|
| 5 | la Fig. 1(A-D) | diferentes procedimientos de detección basados en fase sólida tras disociación invasiva de una sonda inmovilizada |
| | la Fig. 2 | estructura preferente de una sonda mediadora |
| | la Fig 3A, B | interacción preferente de la sonda mediadora con la molécula objetivo y disociación de sonda mediadora |
| | la Fig. 4A, B | representación de una molécula de identificación preferente |
| 10 | la Fig 5i). vi) | representación esquemática de una prolongador de mediador enzimática preferente |
| | la Fig. 6 | representación esquemática de la posición preferente de la modificación química dentro de la molécula de identificación |
| | la Fig. 7 | detección preferente del mediador con ayuda de una molécula de identificación inmovilizada |
| | la Fig. 8 | interacción preferente de sonda mediadora y molécula de identificación |
| 15 | la Fig. 9 | representación esquemática de los campos preferentes de aplicación de la tecnología de sonda mediadora |
| | la Fig. 10 | diagrama de fluorescencia normalizado de una PCR bajo empleo de una sonda mediadora preferente y moléculas de identificación inmovilizadas en el recipiente de reacción |
| | la Fig. 11 | representación esquemática de un procedimiento PCR preferente |
| 20 | la Fig. 12 | comparación de las características de PCR en sonda mediadora y PCR en sonda de hidrólisis |
| | la Fig. 13 | amplificación de diferentes objetivos con PCR en sonda mediadora y PCR en sonda de hidrólisis |

- La Fig. 1(A-D) muestra diferentes procedimientos de detección basados en fase sólida tras disociación invasiva de una sonda inmovilizada. (A) Detección por disociación invasiva directa basada en fluorescencia. Posibilidad 1: la sonda se presenta inmovilizada en la superficie del sustrato. El oligonucleótido invasor (oligonucleótido de línea de entrada) y la secuencia objetivo (objetivo) se añaden a la disolución de reacción (véase la Figura 1). Posibilidad 2: la sonda y el oligonucleótido invasor están inmovilizados en la superficie. La secuencia objetivo se añade a la mezcla de reacción (véase la Figura 2). En ambos casos se efectúa una disociación de la molécula de sonda, resultando de la misma una variación de la señal de fluorescencia. Fuente : (Lu,M.C. et al, 2002, A surface invasive cleavage assay for highly parallel SNP analysis, Hum. Mutat., 19, 416-422.).
- 25 (B) Detección de disociación indirecta. Una sonda modificada con Dabcyl se presenta inmovilizada en una fase sólida. Una vez efectuada la disociación invasiva se efectúa el ligado de un engarce marcado con biotina, al que se unen partículas de oro revestidas con estreptavidina. Fuente: (Nie,B. et al, 2006, Quantitative detection of individual cleaved DNA molecules on surfaces using gold nanoparticles and scanning electron microscope imaging, Anal. Chem., 78, 1528-1534.).
- 30 (C) Detección de disociación indirecta mediante amplificación en círculo rodante. Tras disociación invasiva de una sonda inmovilizada, 5'-marcada, se efectúa un paso de ligado con subsiguiente amplificación en círculo rodante. Se representan dos diferentes estrategias, en las que solo la sonda (a), o bien la sonda y el oligonucleótido invasor (b), se presentan inmoviliados. Fuente: (Chen,Y. et al, 2004, Surface amplification of invasive cleavage products, J. Amer. Chem. Soc., 126, 3016-3017.).
- 35 (D) Detección de disociación indirecta basada en fluorescencia. En una sonda con marca fluorescente se hibrida una sonda de detección marcada y se detecta la señal de fluorescencia. Una vez efectuados los pasos de lavado y llevada a cabo la disociación invasiva se efectúa un paso de hibridación adicional con la sonda de detección descrita. La siguiente medición de fluorescencia permite una conclusión sobre la presencia de la secuencia objetivo en la carga de reacción. Fuente: (Lockett,M.R. et al, 2007, Molecular beacon-style hybridization assay for quantitative

analysis of surface invasive cleavage reactions, Anal. Chem., 79, 6031-6036.).

La Fig. 2 muestra una estructura preferente de una sonda mediadora. La sonda mediadora está constituida en especial por un oligonucleótido y está subdividida en dos regiones funcionales. La región 1 es afín, o bien complementaria a la molécula modelo y/o objetivo, la región 2 interacciona exclusivamente con una molécula de identificación específica. Entre las regiones se encuentra un punto de disociación potencial.

La Fig. 3 muestra una interacción preferente de la sonda mediadora con la molécula modelo y/o con la molécula objetivo y disociación de la sonda mediadora. La sonda mediadora, la molécula auxiliar 1 (en este caso: cebador) y la molécula auxiliar 2 (en este caso: enzima con actividad de polimerización y nucleasa (polimerasa)) interaccionan con la molécula modelo y la molécula objetivo (en este caso: secuencia de ácido nucleico) (A). Bajo condiciones de reacción apropiadas se prolonga el cebador mediante la polimerasa y se disocia la sonda mediadora, liberándose una región mediadora (B).

La Fig. 4A, B muestra una representación de una molécula de identificación preferente. Representación lineal (A). representación de una molécula de identificación 3'-inmovilizada bajo formación de la estructura secundaria (B). Los tramos de secuencia inversos complementarios, a través de cuya interacción se produce la estructura secundaria de la molécula de identificación, se representan como zonas negras, la secuencia de hibridación de mediador se representa como zona rayada en diagonal. En este caso, la región a se puede presentar con o sin modificaciones de PTO.

En una forma de realización preferente, una molécula de identificación está constituida por un oligonucleótido, que está subdividido en varias regiones (véase preferentemente la Fig. 4).

La región a (= primera región) incluye el extremo 5' de la molécula de identificación, que está constituida por un tramo de secuencia y un aceptor de fluorescencia Q en una forma de realización preferente. La región c es un orden de secuencia inverso complementario de la región a, y se separa de la misma mediante la región b. La región d (= tercera región) separa la región c y la región e (= segunda región), que puede interaccionar específicamente con una molécula mediadora. La región f (= cuarta región) incluye la zona de secuencia 3'-terminal, que dispone preferentemente de una modificación química y, por consiguiente, posibilita una inmovilización orientada del oligonucleótido. De modo conocido por el especialista, un donador de fluorescencia F está asociado a una zona de la región b a la región f, a modo de ejemplo la región d. Es preferente que la molécula de identificación presente una estructura de horquilla. La región a y la región c de la molécula de identificación forman una estructura secundaria definida bajo condiciones de reacción (en el sentido de la invención denominada estructura de horquilla), en la que el extremo 5' se hibrida con un tramo de secuencia interno.

La Fig. 5 i)-vi) constituye una representación esquemática de una prolongación de mediador enzimática preferente. i) Una molécula de identificación se presenta inmovilizada en una fase sólida y adopta una estructura secundaria definida bajo las condiciones de reacción. Dos modificaciones de fluorescencia F y Q apropiadas interaccionan entre sí, suprimiéndose la señal de fluorescencia de F. ii) El mediador puede interaccionar con la molécula de identificación en posición definida (secuencia de hibridación de mediador, región 5) iii)-iv), y en este caso se prolonga enzimáticamente con una molécula auxiliar de identificación (en este caso: polimerasa). En este caso, la molécula aceptora de fluorescencia Q se disocia de la molécula de identificación, con lo cual se recupera la intensidad de fluorescencia del colorante fluorescente F. vi) Tras disociación de la región 1, la molécula de identificación adopta una conformación lineal, con lo cual se puede efectuar una prolongación ulterior del mediador. El mecanismo mostrado en la Fig. 5 tiene lugar también si están presentes modificaciones de PTO.

La Fig. 6 muestra una representación esquemática de la posición preferente de la modificación química dentro de la molécula de identificación. En posiciones de secuencia apropiadas dentro de la región 1 y/o región 2 están incorporados nucleótidos modificados, que terminan una elongación de mediador potencial en posición definida.

La Fig. 7 representa una detección preferente del mediador con ayuda de una molécula de identificación inmovilizada. i) Una molécula de inmovilización se presenta inmovilizada en una fase sólida, y adopta una estructura secundaria definida bajo condiciones de reacción. Dos modificaciones de fluorescencia F y Q apropiadas interaccionan entre sí, suprimiéndose la señal de fluorescencia de F. La zona de secuencia 3'-terminal se presenta sin aparear y sirve como secuencia de hibridación de mediador potencial (zona rayada en diagonal). ii) En esa posición definida, el mediador puede interaccionar con la molécula de identificación iii, iv), y en este caso se prolonga enzimáticamente con una molécula auxiliar de identificación (en este caso: polimerasa). v) En este caso, la molécula aceptora de fluorescencia Q se disocia de la molécula de identificación, con lo cual se recupera la intensidad de fluorescencia del colorante fluorescente F. Tras un tiempo apropiado, las condiciones de reacción se modifican mediante calentamiento de la disolución de reacción, de modo que la polimerasa y el mediador prolongado se disocian de la molécula de identificación.

La Fig. 8 muestra una interacción preferente de sonda mediadora y molécula de identificación. Si la sonda mediadora no disociada interacciona con la molécula de identificación, no tiene lugar una reacción de prolongación enzimática, incluso en presencia de moléculas de identificación apropiadas, ya que ésta requiere un extremo 3'-OH de la secuencia mediadora. Por consiguiente, se impide la generación de señales falsas positivas. Adicionalmente

5

La Fig. 9 constituye una representación esquemática de las zonas de aplicación preferentes de la tecnología de sonda mediadora. La tecnología de sonda mediadora puede detectar AND, ARN transcrito en cADN, o aptámeros asociados a proteínas. El procesamiento de la sonda mediadora se puede integrar, en caso dado, en un paso de amplificación (A) de la molécula objetivo. Se representa la detección por medio de una molécula de identificación inmovilizada, específica del mediador. Mediante interacción con una molécula auxiliar (en este caso: polimerasa) se genera una variación de estado de la molécula de identificación mediante una reacción dada por el mediador (en este caso: modificación de fluorescencia).

10

La Fig. 10 muestra un diagrama de fluorescencia normalizado de una PCR bajo empleo de una sonda mediadora preferente y moléculas de identificación inmovilizadas en el recipiente de reacción. Los reactivos, que incluyen, entre otros, cebador específico de la secuencia objetivo, así como la sonda mediadora y diferentes equivalentes genómicos de *Staphylococcus aureus*, se pipetea en un recipiente de reacción apropiado con moléculas de identificación inmovilizadas, y se cierran con una lámina de sellado apropiada. La reacción se llevó a cabo en un termociclador, efectuándose la medida de la fluorescencia en los ciclos indicados en un aparato separado. En cada ciclo de PCR se duplica el tramo de secuencia a amplificar, procediendo un mediador de la disociación de una sonda mediadora en cada duplicación. El mediador liberado interacciona con la molécula de identificación de modo apropiado, produciéndose una señal de fluorescencia detectable. El diagrama muestra una correlación de la cantidad de ADN y el desarrollo de fluorescencia. Las intensidades de fluorescencia se normalizaron en el valor del ciclo 1 (el valor de medida del ciclo 37 se falseó debido al condensado en la lámina protectora y, por lo tanto, no se consideró).

15

20

La Fig. 11 muestra una representación esquemática de un procedimiento preferente. Los pasos A a H muestran en este caso la reacción de amplificación y la detección. En el caso mostrado, un objetivo de ácido nucleico es simultáneamente molécula objetivo y modelo. Tras desnaturalización (B), la sonda mediadora (= muestra mediadora), el cebador y la polimerasa se adicionan a (C). En el paso D se muestra la prolongación del cebador, así como la disociación de la sonda mediadora y la degradación de la región de sonda. La región mediadora se libera en este paso. La región mediadora se adiciona a continuación (E) a una molécula de identificación (= reportero universal). En el paso F, la región mediadora se prolonga mediante una polimerasa. La activación se puede efectuar a través de dos vías. A través de la degradación secuencial del extremo 5' de la molécula de identificación y la liberación del resto de agente de extinción (G), o a través de un desplazamiento del extremo 5' y despliegue de la estructura de horquilla (H). En este caso, todos los pasos tienen lugar en un termociclo.

25

30

La Fig. 12 muestra una comparación entre diferentes características de PCR en sonda mediadora y PCR en sonda de hidrólisis Fig. 12. En este caso se amplificaron diferentes concentraciones de HAPV18DNA y se emplearon controles sin ADN modelo. En el eje x se representaron los números de copias calculados de la PCR en sonda mediadora. En el eje y los de PCR en sonda de hidrólisis (B) a (D). (A) muestra el LOD, el límite de detección para la detección de HPV18. La probabilidad de una amplificación exitosa (eje x) para un determinado número de copias de entrada (eje y) se determinó con análisis Probit. La sonda mediadora resultó en las líneas negras, la sonda de hidrólisis en las grises. Las líneas discontinuas superiores e inferiores muestran 95 % de CI. En (B) se muestra la varianza entre ensayos para cinco concentraciones de ADN diferentes. En (C) se muestra la varianza entre ensayos para cinco concentraciones de ADN en cinco pasos de PCR diferentes. La figura en D muestra los resultados de la PCR dúplex.

35

40

La Fig. 13 muestra los resultados de amplificación de diferentes objetivos con PCR en sonda mediadora y PCR en sonda de hidrólisis. (A):HPV18, (B):E.coli, (C):S.aureus, (D): humanes Beta Aktin.

45

Ejemplo de realización i)

Los ejemplos de realización se representan además esquemáticamente en la Fig. 9. Una demostración simple de una identificación de ácidos nucleicos preferentes se puede llevar a cabo como sigue: para la identificación de ADN bacteriano en una muestra a analizar se inmoviliza una molécula de identificación en un recipiente de reacción apropiado. No obstante, la molécula de identificación se puede presentar también en disolución. A continuación se añaden la muestra y los reactivos requeridos al recipiente de reacción, y la mezcla se calienta y se enfría cíclicamente tras un paso de mantenimiento de temperatura inicial a 95°C. Durante este proceso se detecta la fluorescencia en el recipiente de reacción en momentos definidos del ciclo. A continuación se describe el ejemplo de realización en detalle:

50

55

en "NucleoLink-Strips" (NUNC, Langensfeld, Alemania, N° cat. 248650) se pipetea 25 µL de una disolución 100 nM de una molécula de identificación de secuencia 5'-DABCYL-CCGCAG*A*A*GATGAGATC(dT-FAM)GCGGTGTTGGTCGTAGAGCCCAGAACGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-[C6NH2]-3' (* = fosfotioato) (IBA, Göttingen, Alemania) en tampón de acoplamiento (1-metil-imidazol 10 mM (1-Melm) (pH 7,0) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida 10 mM (EDC) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)), se cierra con lámina protectora ViewSEAL™ (Greiner-BioOne, Frickenhausen, Alemania, N° cat. 676070) y se incuba durante la noche a 50°C. El exceso se desecha y los recipientes de microrreacción se lavan a continuación con 100 µL de tampón de lavado (tris-HCl 100 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, 0,1% de Tween 20 (Carl Roth, Karlsruhe, Alemania)), y se incuba con 25 µL de una disolución de glicina 1M (Carl Roth, Karlsruhe, Alemania) en tampón de acoplamiento 1 hora a 50°C, y se lava de nuevo.

Los recipientes de reacción se cargan con 25 µL de mezcla de reacción PCR (1x Finnzymes DyNamo Flash Probe (Finnzymes, N° cat. F-455), molécula de cebador de secuencias 5'-GAGGTAGGAACTCTGGATCAGGTAT-3' (300 nM) (biomers.net, Ulm, Alemania), 5'-TCTATTGAAAACTCCTATTGGAAGA-3' (300 nM) (biomers.net, Ulm, Alemania), una sonda mediadora de secuencia 5'-TCTGGGCTCTACGACCAACAGGTATTCACAGTGGTAAAGGCGGACAACAAGAGCCCAG A-[fosfato]-3' (200 nM) (biomers.net, Ulm, Alemania)), así como diferentes concentraciones de un ADN de *Staphylococcus aureus*, que contenía la toxina Lokus Exfoliatin B (número de acceso NCBI M17348). Según concentración de ADN se emplean cuatro recipientes de microrreacción. Los recipientes de reacción se cierran con lámina protectora ViewSEAL™ y se trasladan a un termociclador GeneAmp® 9700 (Perkin-Elmer, Massachusetts). Tras una fase de incubación (7 min a 95 °C) se lleva a cabo el protocolo de temperatura cíclico (30 s a 95 °C, 3 min a 58 °C), y los recipientes de reacción se extraen del termociclador tras ciclos definidos y se mide la señal de fluorescencia con ayuda del aparato lector de placas de microtitulación Victor² 1420 Multilabel Counter (Perkin-Elmer, Massachusetts). A continuación se trasladan los recipientes de reacción de nuevo al termociclador. Los valores de fluorescencia de los recipientes de microrreacción separados se normalizan al respectivo valor del primer ciclo, de modo que para cada recipiente de reacción se puede elaborar un factor de amplificación en dependencia del ciclo de procesamiento (véase la Fig. 10).

Ejemplo de realización ii)

En un segundo ejemplo se empleó ARN como molécula objetivo. El ARN se transcribe en cADN por medio de una transcripción inversa o mediante otro sistema enzimático apropiado. En este caso, este paso se lleva a cabo en un recipiente de reacción separado, y se añade una alícuota a una reacción de identificación según el Ejemplo de realización i). Alternativamente, la transcripción inversa y la subsiguiente amplificación pueden tener lugar en el mismo recipiente de reacción según el Ejemplo de realización i). En este ejemplo, como objetivo de ensayo es determinante el análisis de expresión de uno o varios genes.

Ejemplo de realización iii)

La identificación paralela de ADN y ARN en una muestra se puede llevar a cabo mediante combinación de sistemas enzimáticos apropiados. En este caso, el ARN a identificar se amplifica con ayuda de cebadores con rama de secuencia 5' (véase la Fig. 9). La sonda mediadora empleada para esta identificación está diseñada de modo que enlace el cebador, así como un tramo del cebador prolongado, parcialmente en la rama de secuencia. Mediante este locus definido se asegura que se detecte solo cADN generado a partir de ARN mediante una sonda mediadora específica, pero no el locus genómico del que se transcribió el ARN. Para la detección de ADN genómico en la carga de reacción se emplean sondas mediadoras, que son exclusivamente complementarias a esta secuencia. En la reacción de amplificación, llevada a cabo en caso dado, se amplifica el cADN generado y los tramos específicos de ADN genómico, disociándose sondas mediadoras específicas del locus y pudiéndose detectar el mediador en una molécula de identificación disuelta localmente, inmovilizada, mediante procedimientos de detección apropiados.

Ejemplo de realización iv)

En un recipiente de reacción apropiado se añaden reactivos, que comprenden aptámeros específicos de la molécula objetivo, y la muestra a analizar, presentándose las moléculas de identificación disueltas localmente, inmovilizadas (véase la Fig. 9) o en disolución. La molécula objetivo a identificar puede ser, a modo de ejemplo, una proteína o un péptido, pero no se limita a éstos. Un aptámero se une a la molécula objetivo y modifica su estructura, de modo que, una vez efectuada la interacción, se pueden adicionar una sonda mediadora específica del aptámero y cebador. Mediante procesamiento con un sistema enzimático apropiado se puede prolongar el cebador adicionado, efectuándose una disociación de la sonda mediadora. El mediador liberado se puede detectar con ayuda de una molécula de identificación específica. El proceso de amplificación enzimático puede incluir procedimientos isotérmicos, pero no está limitado a éstos.

Ejemplo de realización v)

En una variante de realización especial se detectan paralelamente en una carga ADN, ARN y péptidos, o bien proteínas, u otra combinación de las citadas clases de sustancias mediante los procedimientos i)-iv) descritos. El procedimiento comprende procedimientos de amplificación isotérmicos, pero no está limitado a éstos. Esta realización se ilustra en la Fig. 9.

5 Ejemplo de realización vi)

Independientemente del tipo de identificación, el recipiente de reacción puede poseer, a modo de ejemplo, el formato de placa de microtitración establecido y ampliamente extendido (placa de 96 pocillos), con lo cual se pueden emplear aparatos de temperado y lectura, o bien aparatos que combinan ambas funciones. En todos los casos, las moléculas de identificación se pueden presentar disueltas localmente, inmovilizadas (matriz). Como posible
 10 recipiente de reacción se puede considerar también una pila de flujo, que se puede depurar y reutilizar, en caso dado, una vez realizado el análisis. En una forma de realización especial, el recipiente de reacción puede representar un cartucho, en el que las moléculas de identificación se pueden presentar inmovilizadas. El espacio de reacción se puede definir también mediante el empleo de un portaobjetos de microscopio modificado y un marco apropiado. Esta realización tiene la propiedad ventajosa de que la inmovilización de las moléculas de identificación
 15 en materiales apropiados se describe en el estado de la técnica, y marcos adhesivos apropiados (marcos adhesivos Peqlab in-situ, Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Alemania), así como aparatos de procesamiento temperables (Peqlab PeqStar in-situ, Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Alemania) y aparatos de lectura (BioAnalyzer, LaVision BioTec GmbH, Bielefeld, Alemania), se encuentran disponibles comercialmente. El formato del cartucho no está determinado y se puede elaborar, en caso dado, según el deseo del usuario. El cartucho puede conducir un haz de luz acoplado para la excitación de fluoróforos próximos a la superficie por medio de TIRF, a través de una zona de
 20 lectura. Además, este cartucho se puede emplear en combinación con un aparato, que dispone de un dispositivo de temperado y componentes ópticos para la excitación y detección de señales de fluorescencia. El cartucho puede disponer, en caso dado, de estructuras microfluídicas, por ejemplo orificios de llenado y ventilación, conectividades para elementos activos, cámaras, canales o estructuras de mezclado, medición y extracción de alícuotas, que se pueden emplear con otros fines. El sistema puede disponer de bombas u otros accionadores, con cuya ayuda se
 25 puede procesar el líquido. Adicionalmente pueden estar almacenados otros reactivos de manera previa.

Ejemplo de realización vii)

Se lleva a cabo una PCR bajo empleo de una sonda mediadora preferente de la invención (véase también la Fig. 11). Para la reacción de amplificación se emplean habitualmente cebador de oligonucleótidos y Taq-polimerasa. En
 30 este caso, la sonda mediadora en el sentido de la invención es un oligonucleótido bifuncional, que posibilita la detección en tiempo real de la reacción PCR. Para comparar la invención con el estado de la técnica, los ensayos se llevaron a cabo paralelamente con una sonda de hidrólisis del estado de la técnica.

Material de muestra

Para el ensayo se emplearon muestras de ADN de *Staphylococcus aureus* (Genomic Research Laboratory; Prof. Jacques Schrenzel, Genf, Schweiz). Las muestras contenían el locus genómico de toxina B exfoliativa (número de
 35 acceso de banco genico AP003088). El plásmido pBR322 contiene el genoma del virus de papiloma humano 18 (HPV18), y se puso a disposición por GenolD (Budapest, Hungría). Se aisló *Escherichia coli* K12 DH5 Z1 DNA, que contenía el locus genómico de la lipoproteína asociada a péptidoglicano (acceso de banco genico _65796), con un kit de aislamiento de ADN basado en perla magnética. Se aisló ADN genómico humano con QIAamp DNA Blood
 40 mini kit (Qiagen) a partir de sangre completa. Para las reacciones PCR dúplex se emplearon ADN humanos disponibles comercialmente (Roche Diagnostics). Las muestras de ADN se diluyeron en tampón 0, 2 X Tris-EDTA. Se añadieron 10 ng/μL de ADN de esperma de salmón (Invitrogen) para impedir la adsorción inespecífica del objetivo de ADN en los recipientes de reacción.

Oligonucleótidos

45 Se emplearon los siguientes oligonucleótidos

Molécula de identificación 01:

CCGCAG*A*A*GATGAGATC(dT-
 FAM)GCGGTGTTGGTCGTAGAGCCCAGAACGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

Modificaciones: 5': DABCYL; 3': C₆NH₂

*= fosfotioatos

Molécula de identificación 02:

CCGCAG*A*A*GATGAGATC(dT-
Cy5)GCGGTGTTCACTGACCGAACTGGAGCATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

5 Modificaciones: 5': BHQ-2; 3': C₆NH₂

Objetivo: lipoproteína asociada a peptidoglicano Escherichia coli K12 (gen de pal), número de acceso de banco genético X05123

Cebador directo: GGCAATTGCGGCATGTTCTTCC

Cebador inverso: TGTTCGATTTGCAGACGAGCCT

10 Sonda de hidrólisis: ATGCGAACGGCGGCAACGGCAACATGT

Modificación: 5': 6-FAM 3': BHQ-1

Sonda mediadora:

AAATCGTTCTGGGCTCTACGCGAACGGCGGCAACGGCAACATGT
Modificación: 3': PH

15 Objetivo: toxina B exfoliativa de Staphylococcus aureus

Cebador directo: AGATGCACGTACTGCTGAAATGAG

Cebador inverso: AATAAAGTACGGATCAACAGCTAAAC

Sonda de hidrólisis: CCGCCTACTCCTGGACCAGG

Modificación: 5': 6-FAM; 3': BBQ

20 Sonda mediadora:

AAATCGTTCTGGGCTCTACGGTATTCACAGTGGTAAAGGCGGACAACA
Modificación: 3': PH

Objetivo: HPV18 N° de acceso de banco genético NC_001357.1

Cebador directo: GCTGGCAGCTCTAGATTATTAAGT

25 Cebador inverso: GGTCAGGTAAGTGCACCCTAA

Sonda de hidrólisis: GGTCCTGCAGGTGGTGGCA

Modificaciones: 5': 6-FAM; 3': BHQ-1

Sonda mediadora: AAATCGTTCTGGGCTCTACGGTTCCTGCAGGTGGTGGCA

Modificaciones: 3 - PH

30 Objetivo: H. sapiens ACTB N° acceso de banco genético AC_000068.1/ HGNC:132

Cebador directo: TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA

Cebador inverso: CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG

Sonda de hidrólisis 01: ATGCCCTCCCCCATGCCATCCTGCGT

Modificación: 5': 6-FAM; 3': DDQ-1

5 Sonda de hidrólisis 02: ATGCCCTCCCCCATGCCATCCTGCGT

Modificación: 5' Cy5; 3': DDQ-2

Sonda mediadora 01:

AAATCGTTCTGGGCTCTACGCCCTCCCCCATGCCATCCTGCGT

Modificación: 3': PH

10 Sonda mediadora 02:

ATGCTCCAGTTCGGTCAAGTCCCTCCCCCATGCCATCCTGCGT

Modificación: 3': PH

En este caso se purificaron con HPLC todos los oligonucleótidos modificados.

15 Las sondas mediadoras se diseñaron en un proceso de dos etapas. La región de sonda y la región mediadora solapan con un nucleótido en este caso. Por lo tanto, el extremo 5' de la región de sonda debe coincidir con el extremo 3' de la región mediadora. En el presente ensayo se empleó un nucleótido de guanosina a tal efecto. La región de sonda se diseñó según las directrices para el desarrollo de una sonda de hidrólisis / longitud 25 – 30 nucleótidos, temperatura de fusión de sonda: 5-10° C y > que la temperatura de fusión de cebador). La región mediadora se configuró de modo que esta región no presentara ningún tipo de homología con el objetivo. El extremo 20 3' se bloqueó con un grupo fosfato para impedir una prolongación de la sonda mediadora.

El diseño para las moléculas de identificación se elaboró In silico para obtener una estructura de horquilla con una cepa 3' de hebra simple no apareada. Se hicieron previsiones sobre la estructura secundaria bajo empleo de ARNfold, y se calculó la temperatura de fusión con VisOMP (Visual Oligonucleotide Modeling Program). Para la estructura secundaria se seleccionaron los ajustes "no dangling end energies," "DNA settings," "60 °C" en la opción 25 "advanced folding". La temperatura de fusión de la cepa (contenido por GC 71 %) es 71,4°C, y permite un repliegue durante el paso de refrigeración (60 °C) durante este termociclo. La estructura plegada pone a disposición un par FRET, estando dispuesto el par en ambas hebras en una proximidad espacial. El par FRET comprende un agente de extinción 5'-terminal y se selecciona un fluoróforo interno para obtener una eficiencia de extinción elevada. La cepa 3' no apareada comprende el punto de enlace para la región de mediador, que es inversa complementaria a la 30 región mediadora. Para impedir una prolongación de la molécula de identificación se bloqueó el extremo 3' con un grupo amino. Para los ensayos de PCR dúplex se diseñó una segunda molécula de identificación, presentando esta una secuencia idéntica a la de la primera molécula de identificación, empleándose únicamente un punto de enlace de mediador modificado y otro par FRET.

Eficiencia de extinción

35 La selección de colorantes fluoróforos apropiados y restos de extinción era especialmente importante para posibilitar una eficiencia de extinción elevada y una sensibilidad analítica para la detección de cantidades especialmente reducidas de ácidos nucleicos. Para determinar la eficiencia de la extinción se determinó la emisión de fluorescencia para cada sonda de hidrólisis y cada molécula de identificación marcada doblemente, con y sin tratamiento con DNasa I. La eficiencia de extinción (Eq) se determina como sigue:

40
$$Eq = 1 - (I_{no\ digerida} / I_{digerida}) \times 100$$

siendo $I_{no\ digerida}$ la emisión de fluorescencia de la muestra no digerida e $I_{digerida}$ la emisión de fluorescencia de muestras tratadas con DNasa I.

Ensayos de PCR en sonda mediadora y PCR en sonda de hidrólisis

La carga de reacción de PCR en sonda mediadora comprende tampón 1X PCR (GenolD, Budapest, Hungría), 0,1 U/μl de Hot StarTaq plus Polymerase (Qiagen), 200 μmol/l de desoxirribonucleótidos (Qiagen), 300 nmol/l de molécula de identificación (sintetizada mediante IBA), 300 nmol/l de pares de cebador específicos para el objetivo y 200 nmol/l de sonda mediadora (sintetizada por biomers.net). La carga de reacción de PCR en sonda de hidrólisis contiene las mismas cantidades de reactivos, aparte de la sonda mediadora, que se sustituyó por una sonda de hidrólisis (200 nmol/l; sintetizada por biomers.net). Además no se añadieron moléculas de identificación. A continuación se añadieron a ambas cargas moléculas modelo de ADN (en el caso de controles negativos, en lugar de éstas se añadió la misma cantidad de H₂O). El volumen de reacción ascendía a 10 μl.

Todas las reacciones PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un Corbett Rotor-Gene 6000 (Corbett Research Pty., now Qiagen GmbH) con el siguiente perfil de termociclado universal:

activación de polimerasa inicial: 95 °C durante 5 min

45 ciclos con desnaturalización a 95 °C durante 15 s y

un paso combinado de anelación y elongación a 60 °C durante 45 s.

Las señales de fluorescencia se efectuaron al final de cada paso de elongación. Los análisis de datos se efectuaron con el Rotor-Gene 6000 Software (versión 1.7.87).

Análisis estadístico

Se determinó el límite de detección (LOD) para HPV18 como sigue:

se amplificaron diferentes concentraciones de ADN (10⁴, 10³, 5x10², 10², 5x10¹, 10¹, 10⁰, y 10⁻¹ copias por reacción). Se determinó la proporción de amplificaciones positivas por concentración de ADN. Los análisis Probit con SPSS (Statistical Package for Social Sciences, versión 19; IBM) permiten una predicción del número de copias por reacción, que conduce a una amplificación positiva con una probabilidad del 95 %.

Resultados

Eficiencia de extinción

La emisión de fluorescencia de todas las moléculas fluorógenas aumenta con la degradación en comparación con sondas no digeridas. Los valores E_q observados de las sondas de hidrólisis específicas se situaban entre un 54,5% (3,1%) de [Cy5/2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona 2 (DDQ-2)] y un 92,7% (0,5%) de [FAM/di-terc-butilhidroquinona 1 (BHQ-1)]. Por el contrario, la eficiencia de extinción de las moléculas de identificación se situaba entre un 83,7% (1,4%) (Cy5/BHQ-2) y un 90,9% (0,4%) (FAM/Dabcyl). Estos resultados coinciden con los valores E_q conocidos para FAM/Dabcyl (80%-91%), FAM/BHQ-1 (88%-93%) y Cy5/BHQ-2 (91%-96%) en condiciones optimizadas.

PCR en sonda mediadora frente a PCR en sonda de hidrólisis

En los presentes ensayos se compararon la PCR en sonda mediadora con la PCR en sonda de hidrólisis. En primer lugar se analizaron la eficiencia de reacción, el LOD, la variación entre ensayos, la variación dentro de ensayos y las propiedades de duplexación. Para estos experimentos se amplificaron diferentes concentraciones de HPV18-DNA (10², 10³, 10⁴, 10⁵, und 10⁶ copias por reacción, si no se describe lo contrario), bajo el empleo paralelo de ambas técnicas. En segundo lugar se amplificaron diferentes objetivos bajo el empleo paralelo de ambas técnicas.

LOD (LIMIT OF DETECTION)

Se determinó el LOD como concentración de ADN, resultando una amplificación positiva con un 95 % de probabilidad. Los análisis Probit dieron por resultado una sensibilidad analítica de 78,3 copias por reacción (95% de CI: 47,0 -372,5 copias por reacción) para la PCR en sonda mediadora y 85,1 copias por reacción (95% de CI: 55,7 - 209,4 copias por reacción) para la PCR en sonda de hidrólisis (Fig.12A).

Varianza dentro de ensayos

Se amplificaron cinco concentraciones de la serie de dilución de ADN de HPV18 (10², 10³, 10⁴, 10⁵, y 10⁶ copias por reacción) en 8 repeticiones. Los valores R² 0,975 (PCR en sonda mediadora) y 0,983 (PCR en sonda de hidrólisis) muestran una excelente linealidad (Fig. 12B). CVs porcentuales para las amplificaciones de 10²-10⁶ copias por

reacción eran 55,1%-9,9% (PCR en sonda mediadora) y 38,3%-10,7% (PCR en sonda de hidrólisis). La exactitud se extiende de +21,6% a - 8,1% (PCR en sonda mediadora) y de +19,4% a - 9,8% (PCR en sonda de hidrólisis).

Varianza entre ensayos

5 Se emplearon cinco cargas preparadas por separado para la amplificación de cinco concentraciones de series de dilución de ADN de HPV18 DNA (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , y 10^6 copias por reacción). Cada concentración se aplicó triplemente. Los valores R^2 0,940 (PCR en sonda mediadora) y 0,954 (PCR en sonda de hidrólisis) muestran la linealidad de la amplificación (Fig. 12C). La varianza entre ensayos para números de copias de 10^2 - 10^6 por reacción se situaba entre un 25 % y un 8,7% (PCR en sonda mediadora) y entre un 34,7% y un 12,7% (PCR en sonda de hidrólisis). La exactitud se extiende de +3,4% a - 7% (PCR en sonda mediadora) y de un - 2% a un - 12,4% (PCR en sonda de hidrólisis).

Amplificación dúplex

15 Se coamplificó un fragmento de un plásmido, que contenía ADN de HPV18 (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , y 10^6 copias originales) con 300 copias de genoma de Homo sapiens. Las respectivas reacciones se llevaron a cabo en carga triple. La sonda de hidrólisis para HPV18 se marcó con FAM/BHQ-1, y la sonda para Actin, Beta(ACTB) se marcó con Cy5/DDQ-2. Para la PCR dúplex se marcó la molécula de identificación 01 con FAM/Dabcyl y la molécula de identificación 02 con Cy5/BHQ-2. La Fig. 12D muestra la linealidad de la amplificación de HPV18 para las diferentes concentraciones de ADN para la PCR en sonda mediadora ($R^2 = 0,998$) y para la PCR en sonda de hidrólisis ($R^2 = 0,988$). El cálculo de los valores ACTB no se pudo contar, ya que se empleó solo una concentración en el ensayo dúplex. Los valores de ciclo (cycle of quantification; Cq) se determinaron con un valor umbral de 0,02 en canal rojo para la PCR en sonda mediadora y la PCR en sonda de hidrólisis. Los valores Cq medios para ACTB coamplificada y muestras de ADN de HPV18 eran 33,0 (0,5) y 31,8 (0,4) para la PCR en sonda mediadora y la PCR en sonda de hidrólisis.

Diferentes objetivos

25 La naturaleza universal de la PCR en sonda mediadora se evidenció mediante ensayos con cuatro objetivos relevantes clínicamente. Para la comparación se llevó a cabo paralelamente la PCR en sonda de hidrólisis para cada objetivo. La linealidad entre número de copias de entrada y de salida calculado se determinó para cada objetivo y cada técnica de amplificación (Fig.13). Los resultados para la detección de la serie de ensayos del gen HPV-18 L1 (R^2 de PCR en sonda mediadora = 0,999/ R^2 de PCR en sonda de hidrólisis = 0,975), gen de toxina B exfoliativa de S. aureus (0,991/0,988), gen de lipoproteína asociado a peptidoglicano de E. coli (E. coli pal) (0,996/0,988), y gen de β -actina humano (0,991/0,993), muestran una coincidencia entre ambas PCRs:

Objetivo	PCR en muestra de mediador				PCR en muestra de hidrólisis			
	Número de copias Entrada, n	Salida, n	SD	% CV	Salida, n	SD	% CV	
HPV18 L1	1.0×10^5	1.1×10^5	4.2×10^3	4.0	1.1×10^5	4.1×10^3	3.8	
	1.0×10^4	9.1×10^3	3.6×10^2	4.0	1.0×10^4	1.5×10^3	14.6	
	1.0×10^3	1.0×10^3	5.9×10^2	5.8	8.7×10^2	4.4×10^2	50.9	
	1.0×10^2	1.0×10^2	1.4×10^1	13.2	1.3×10^2	5.1×10^1	39.0	
E. coli pat	6.3×10^4	5.5×10^4	1.1×10^3	1.9	6.4×10^4	5.6×10^3	8.9	
	6.3×10^3	7.1×10^3	5.3×10^2	7.5	7.3×10^3	3.2×10^2	4.3	
	6.3×10^2	6.7×10^2	4.7×10^1	6.1	5.9×10^2	1.4×10^2	23.2	
	6.3×10^1	7.1×10^1	2.7×10^1	29.2	5.1×10^1	2.5×10^1	40.2	
S. aureus ExfB	3.0×10^4	2.9×10^4	2.6×10^3	0.9	3.0×10^4	6.8×10^3	0.9	
	3.0×10^3	4.7×10^3	3.9×10^3	8.4	3.8×10^3	2.5×10^2	6.7	
	3.0×10^2	3.3×10^2	3.1×10^1	9.4	4.0×10^2	2.8×10^1	5.2	
	3.0×10^1	3.8×10^1	2.4×10^0	6.3	4.0×10^1	3.1×10^0	7.8	
H. sapiens ACTB	3.0×10^0	3.2×10^0	2.0×10^0	62.5	2.9×10^0	2.6×10^0	89.7	
	4.0×10^3	2.9×10^3	1.6×10^2	5.4	3.6×10^3	3.4×10^2	9.4	
	4.0×10^2	4.9×10^2	7.8×10^1	15.8	4.8×10^2	1.2×10^2	25.0	
	4.0×10^1	4.3×10^1	5.2×10^0	12.1	2.8×10^1	1.6×10^0	5.7	
Coamplificación	4.0×10^0	4.1×10^0	1.1×10^0	26.8	4.6×10^1	1.2×10^0	26.1	
	HPV18 L1	1.0×10^6	1.1×10^6	3.5×10^4	3.4	1.0×10^6	9.3×10^4	9.1
		1.0×10^5	8.1×10^4	6.9×10^3	8.5	1.2×10^5	2.2×10^4	18.9
		1.0×10^4	1.2×10^4	1.7×10^3	15.1	7.9×10^3	6.1×10^2	7.8
H. sapiens ACTB ^b		1.0×10^3	1.1×10^3	7.7×10^1	6.7	1.0×10^3	3.1×10^2	30.3
		1.0×10^2	9.6×10^1	3.5×10^1	36.8	1.2×10^2	5.6×10^1	45.5
		3.0×10^2	C_q : 33.0	± 0.5		C_q : 31.8	± 0.4	

^a Números de copias calculados (no. salida) de 4 objetivos amplificados con PCR en muestra de mediador y PCR en muestra de hidrólisis. SD e imprecisión (% CV) se calcularon para cada objetivo y número de copias.

^b No es posible la cuantificación de número de copias. El límite para ACTB se ajustó a 0,02, y se presentaron valores C_q obtenidos.

Discusión:

La excepcional característica de los ensayos mostrados es el desacoplamiento de amplificación y detección de fluorescencia, que permite emplear una molécula de identificación estandarizada. La secuencia de la región mediadora y de la molécula de identificación se diseñaron *in silico* y, según una búsqueda BLAST, no muestra ningún tipo de coincidencia con los objetivos. La molécula de identificación muestra una estructura secundaria de horquilla y de este modo pone a disposición condiciones de extinción FRET óptimas (>90% de (FAM/Dabcyl), >80% de (Cy5/BHQ-2)). La proximidad espacial entre fluoróforo y agente de extinción dentro de la estructura de horquilla resultan en una eficiencia de extinción elevada y constante. En contrapartida a los resultados mostrados en este caso, las sondas de hidrólisis marcadas con FAM del estado de la técnica, debido a los diferentes restos de extinción y a eliminaciones de donador y aceptor, alcanzan regularmente eficiencias de extinción de un 60 % a un 93 %. La sonda de hidrólisis marcada con Cy5/DDQ-2 mostraba un menor valor E_q , de apenas un 55%.

La amplificación de ADN de HPV18 se seleccionó como ensayo modelo para comparar entre sí la nueva sonda mediadora y la sonda de hidrólisis, el estándar de oro del estado de la técnica.

El LOD se determinó para ambas sondas con análisis Probit (sonda mediadora: 78,3; sonda de hidrólisis: 85,1 copias por reacción). La varianza entre ensayos y dentro de ensayos se situaban en el mismo orden de magnitud para 10^2 a 10^6 copias por reacción (sonda mediadora 25%-8,7%, 55,1%-9,9%; sonda de hidrólisis 34,7%-12,7%, 38,3%-10,7%).

Una reducción del tiempo de elongación en diversos ensayos de PCR de 50 s a 6 s no reduce la cuantificación. Estos resultados muestran que la PCR en sonda mediadora es apropiada para protocolos de ciclado, que se pueden llevar a cabo con los más actuales termociclos en tiempo real.

Se designaron dos moléculas de identificación diferentes con distintas secuencias de hibridación y modificaciones FRET. Estos sistemas reporteros son aptos para detectar cualquier combinación objetivo-gen, ahorrando costes el sistema, y pudiéndose emplear el mismo como ensayo diagnóstico rutinario. De este modo se pudo mostrar la coamplificación de diferentes cantidades de HPV18-DNA y un número de copias de ACTB constante.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Albert-Ludwigs-Universität Freiburg	
	<120> Sistema reportero multianalito	
	<130> XII 676/12	
5	<150> 10 2011 055 247.2	
	<151> 2012-11-10	
	<160> 20	
	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
10	<211> 66	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
15	<400> 1	
	ccgcagaaga tgagatcgcg gtgttggtcg tagagcccag aacgattttt tttttttttt	60
	tttttt	66
	<210> 2	
	<211> 66	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda	
	<400> 2	
	ccgcagaaga tgagatcgcg gtgttcactg accgaactgg agcatttttt tttttttttt	60
	tttttt	66
25	<210> 3	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador	
	<400> 3	
	ggcaattgcg gcatgttctt cc	22
	<210> 4	
	<211> 22	
35	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

	< 223>Cebador	
	<400> 4 tgttgcattt gcagacgagc ct	22
5	<210> 5 < 211> 27 < 212> DNA < 213>Secuencia artificial	
	<220> < 223>Sonda	
10	<400> 5 atgcgaacgg cggcaacggc aacatgt	27
15	<210> 6 < 211> 44 < 212> DNA < 213>Secuencia artificial	
	<220> < 223>Sonda	
	<400> 6 aaatcgttct gggctctacg cgaacggcgg caacggcaac atgt	44
20	<210> 7 < 211> 24 < 212> DNA < 213>Secuencia artificial	
25	<220> < 223>Cebador	
	<400> 7 agatgcacgt actgctgaaa tgag	24
30	<210> 8 < 211> 26 < 212> DNA < 213>Secuencia artificial	
	<220> < 223>Cebador	
35	<400> 8 aataaaagtac ggatcaacag ctaaac	26
	<210> 9 < 211> 20 < 212> DNA < 213>Secuencia artificial	
40	<220> < 223>Sonda	
	<400> 9 ccgcctactc ctggaccagg	20

	<210> 10 < 211> 48 < 212> DNA < 213>Secuencia artificial	
5	<220> < 223>Sonda	
	<400> 10 aaatcgttct gggctctacg gtattcacag tggtaaaggc ggacaaca	48
10	<210> 11 < 211> 25 < 212> DNA < 213>Secuencia artificial	
	<220> < 223>Cebador	
15	<400> 11 gctggcagct ctagattatt aactg	25
20	<210> 12 < 211> 21 < 212> DNA < 213>Secuencia artificial	
	<220> < 223>Cebador	
	<400> 12 ggtcaggtaa ctgcacccta a	21
25	<210> 13 < 211> 20 < 212> DNA < 213>Secuencia artificial	
30	<220> < 223>Sonda	
	<400> 13 ggtcctgcga ggtggtggca	20
35	<210> 14 < 211> 39 < 212> DNA < 213>Secuencia artificial	
	<220> < 223>Sonda	
40	<400> 14 aaatcgttct gggctctacg gttcctgcag gtggtggca	39
	<210> 15 < 211> 25 < 212> DNA < 213>Secuencia artificial	

	<220> < 223>Cebador	
	<400> 15 tcacccacac tgtgccatc tacga	25
5	<210> 16 < 211> 25 < 212> DNA < 213>Secuencia artificial	
10	<220> < 223>Cebador	
	<400> 16 cagcggaacc gtcattgcc aatgg	25
15	<210> 17 < 211> 26 < 212> DNA < 213>Secuencia artificial	
	<220> < 223>Sonda	
20	<400> 17 atgccctccc ccatgccatc ctgcgt	26
	<210> 18 < 211> 26 < 212> DNA < 213>Secuencia artificial	
25	<220> < 223>Sonda	
	<400> 18 atgccctccc ccatgccatc ctgcgt	26
30	<210> 19 < 211> 43 < 212> DNA < 213>Secuencia artificial	
	<220> < 223>Sonda	
35	<400> 19 aaatcgttct gggctctacg ccctcccca tgccatcctg cgt	43
40	<210> 20 < 211> 43 < 212> DNA < 213>Secuencia artificial	
	<220> < 223>Sonda	
	<400> 20 atgctcagtg tcggtcagtg ccctcccca tgccatcctg cgt	43

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para la detección de al menos una molécula objetivo, que comprende los siguientes pasos:pasos:

- a) puesta a disposición de una sonda mediadora para la detección de al menos una molécula objetivo, que comprende una región de sonda y una región mediadora, siendo la sonda mediadora un oligonucleótido y estando dispuesta la región de sonda en el extremo 3' y la región mediadora en el extremo 5' del oligonucleótido, presentándose entre las regiones un punto de disociación químico, biológico y/o físico, y presentando la región de sonda una afinidad con una molécula modelo y la región mediadora una afinidad adicional con una molécula de identificación,
- b) puesta a disposición de una molécula de identificación, siendo la molécula de identificación un oligonucleótido y presentando al menos las siguientes regiones:
 - una primera región en un extremo 5' de la molécula de identificación, que presenta un aceptor de fluorescencia o un donador de fluorescencia y/o un grupo químico para el enlace con una fase sólida y/o un grupo protector químico,
 - una segunda región que interacciona con la región mediadora, y
 - una tercera región que presenta un donador de fluorescencia o un aceptor de fluorescencia y/o un grupo protector químico,
- c) unión de la región de sonda de la sonda mediadora a una secuencia de la molécula modelo y/o de la molécula objetivo,
- d) amplificación de la molécula modelo y/o de la molécula objetivo con ayuda de una molécula auxiliar, preferentemente mediante un proceso de amplificación que incluye un procedimiento isotérmico y/o procedimiento basado en termociclaje y/o mediante una PCR, de modo especialmente preferente una PCR en tiempo real,
- e) disociación de la sonda mediadora en el punto de disociación durante el paso d) mediante al menos la molécula auxiliar del paso d) u otras moléculas auxiliares, y
- f) unión de la región mediadora disociada de la sonda mediadora a la molécula de identificación,
- g) detección de señal.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la molécula objetivo es la molécula modelo y/o la molécula objetivo se une a la molécula modelo y/o la región de sonda y/o la región mediadora solapan funcional y/o espacialmente, preferentemente con un nucleótido y/o en el extremo 3' de la región de sonda está dispuesta una región bloqueada, que presenta una secuencia complementaria a la región mediadora y/o la sonda mediadora presenta un grupo protector químico en el extremo 3'.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la molécula de identificación presenta una cuarta región en el extremo 3' de la molécula de identificación, que presenta un grupo químico para el enlace con una fase sólida y/o un grupo protector químico.

4.- Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la sonda mediadora y/o la molécula de identificación presentan nucleótidos con marca fluorescente.

5.- Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la molécula de identificación es una molécula de ácido nucleico de hebra simple o un derivado de ácido nucleico.

6.- Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la molécula de identificación presenta una estructura de horquilla y/o la molécula de identificación presenta al menos modificaciones de fluorescencia en el extremo 5' y/o dentro de la estructura de horquilla.

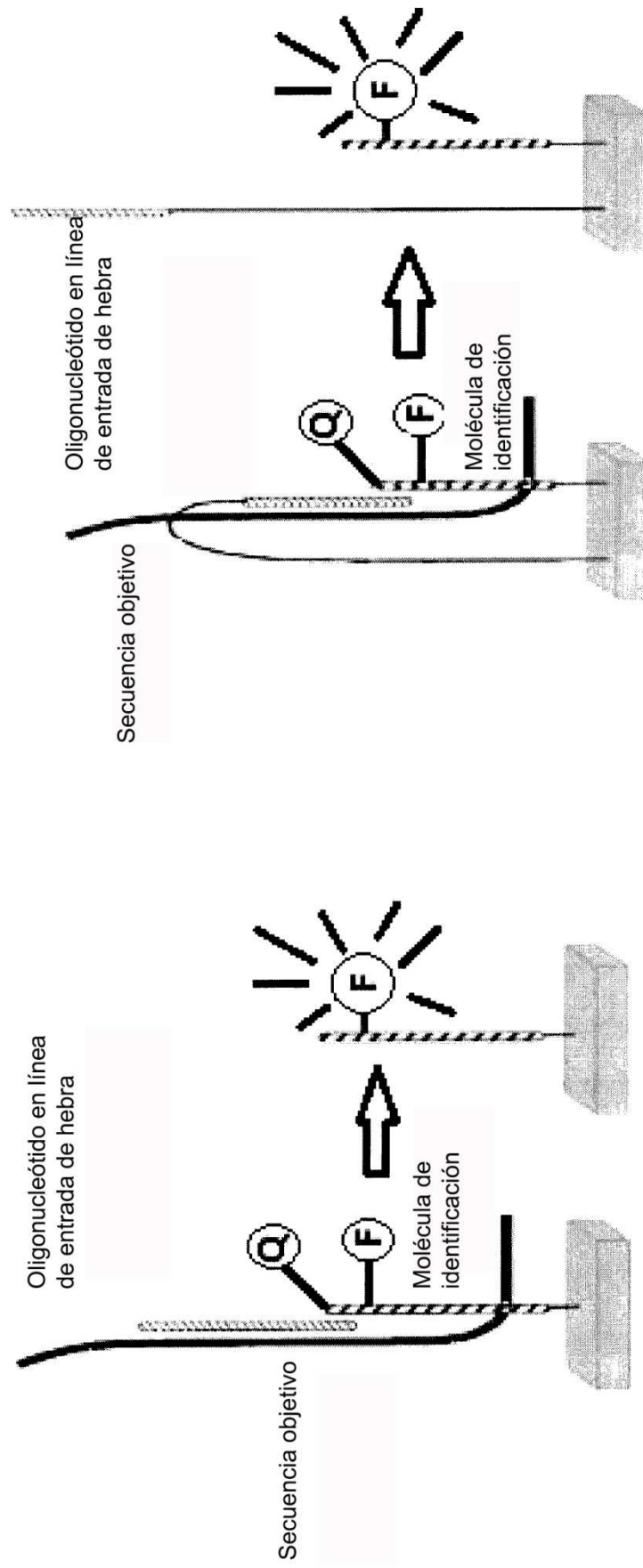
7.- Procedimiento según la reivindicación precedente, caracterizado por que la estructura de horquilla se configura hibridándose de manera complementaria el extremo 5' de la molécula de identificación con un tramo de secuencia interno, y comprendiendo el extremo 3' de la molécula de identificación un tramo de secuencia no apareado.

8.- Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la molécula objetivo y/o la molécula modelo es una biomolécula, seleccionada a partir de grupo que comprende ADN, ARN, péptido, proteína, aptámero y/o una combinación de los mismos, preferentemente siendo al menos una molécula objetivo un ARN y transcribiéndose el ARN en cADN, y siendo el cADN la molécula modelo y/o siendo al menos una molécula objetivo un péptido o una proteína, y siendo la molécula modelo un aptámero, y uniéndose el aptámero al péptido o a la proteína, y siendo accesible el punto de enlace para la región de sonda de la sonda mediadora en este caso.

- 9.- Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que se emplea un cebador con rama de secuencia para la reacción de transcripción, y uniéndose la región de sonda de la sonda mediadora a una zona que comprende cADN y secuencia de ramificación.
- 5 10.- Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la disociación de la sonda mediadora ocasiona una variación de las propiedades físicas y/o químicas de al menos una región de la sonda mediadora, seleccionadas a partir del grupo que comprende masa molecular, actividad enzimática, propiedades de enlace, que incluyen afinidad o actividad, avidéz, reactividad química, presencia de grupos químicos, propiedad eléctrica, que comprende conductividad, polarizabilidad o carga y/o propiedad óptica, que incluye absorción y emisión de luz.
- 10 11.- Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la región mediadora se une a la segunda región de la molécula de identificación.
- 15 12.- Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la región mediadora unida a la segunda región de la molécula de identificación se prolonga enzimáticamente mediante al menos una molécula auxiliar, uniéndose la molécula auxiliar preferentemente al término 3' de la región mediadora, y seleccionándose la molécula preferentemente a partir del grupo que comprendecatalizadores, proteínas, ácidos nucleicos, sustancias naturales, enzimas, sistemas enzimáticos, lisados celulares, componentes celulares, derivados procedentes de componentes celulares y/o moléculas sintéticas y/o una molécula constituida por un sistema de amplificación de ácidos nucleicos y/o un sistema enzimático de restricción.
- 20 13.- Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la molécula de identificación se modifica debido a una interacción directa o indirecta con la región mediadora, comprendiendo modificación de la estructura secundaria, modificación en fluorescencia, fosforescencia, masa, absorción, dispersión de la luz, conductividad eléctrica, actividad enzimática y/o de la afinidad y/o efectuándose una modificación de la molécula de identificación mensurable física o químicamente mediante una interacción indirecta o directa de la región mediadora con la segunda región de la molécula de identificación.
- 25 14.- Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que sondas específicas o inespecíficas de la secuencia, fluorógenas y/o cromógenas, o colorantes fluorescentes interaccionan con al menos una región de la sonda mediadora y/o la molécula de identificación.
- 30 15.- Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la molécula de identificación se modifica mediante una interacción con la región mediadora mediante al menos una molécula de identificación, que comprende disociación, digestión, duplicación de hebra, hibridación interna, fosforilación, desfosforilación, amidación, enlace o disociación de un grupo químico, variación de fluorescencia, fosforescencia o luminiscencia, disponiendo preferentemente la molécula de identificación de al menos una modificación de fluorescencia en la zona 5'-terminal y/o dentro de la estructura de horquilla, y disociándose la modificación de fluorescencia de la molécula de identificación tras la reacción con la región mediadora por medio de una molécula auxiliar de identificación y/o eliminándose el extremo 5' de la estructura de horquilla de la molécula de identificación y/o desplegándose la estructura de horquilla y detectándose una variación de la señal de fluorescencia en la molécula de identificación.
- 35

Fig. 1

(A)



(1)

(2)

Fig. 1 (continuación)

(B)

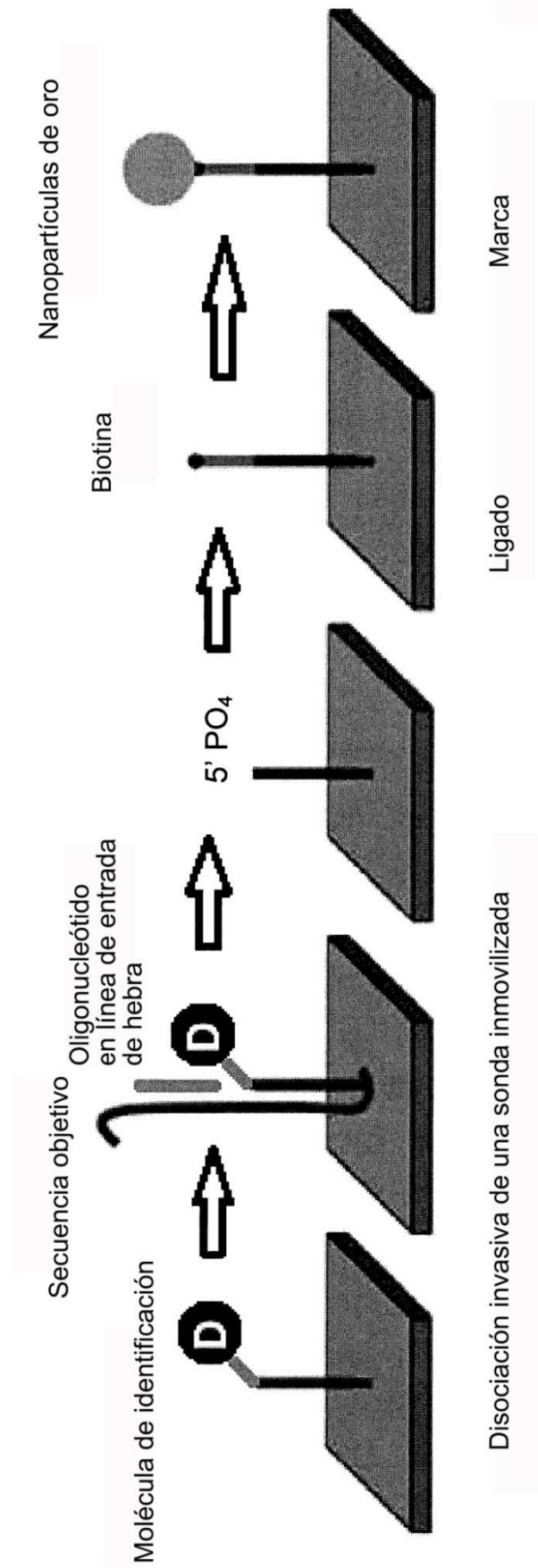
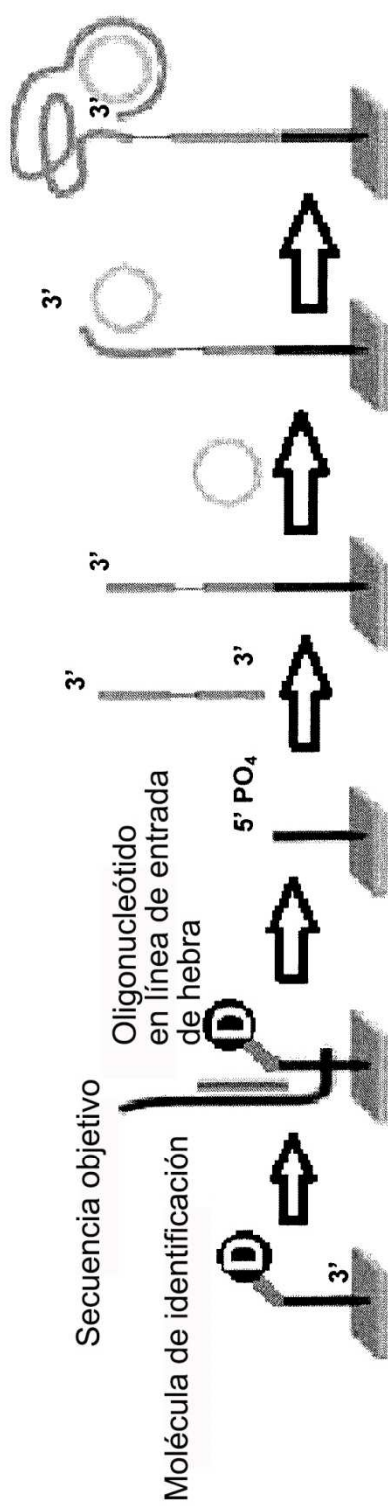


Fig. 1

(continuación)

Estrategia I: adición de oligonucleótido en línea de entrada de hebra a la disolución de reacción

(C)

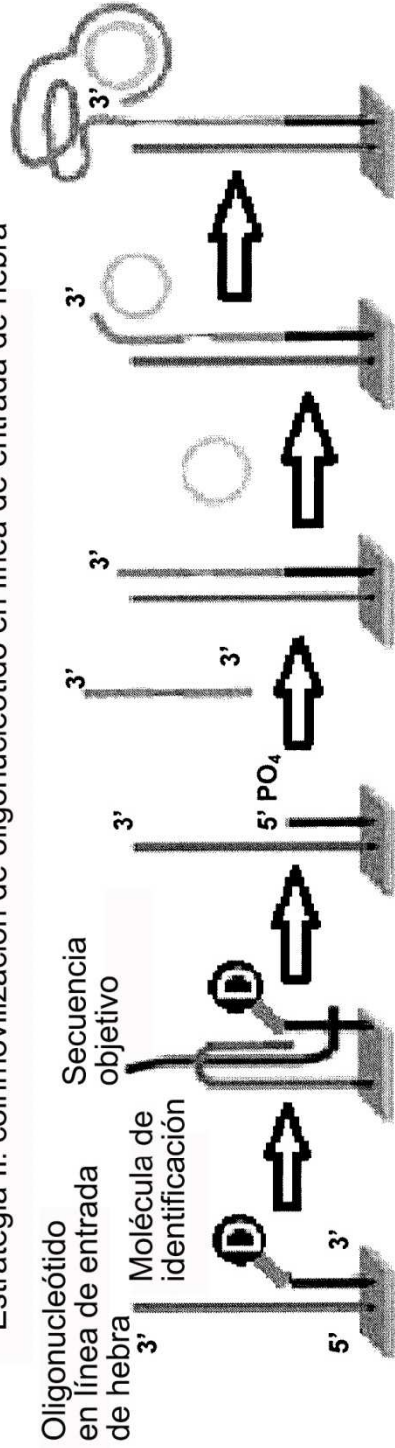


Disociación invasiva de una sonda inmovilizada

Ligado

Amplificación en círculo rodante

Estrategia II: coinmovilización de oligonucleótido en línea de entrada de hebra



Disociación invasiva de una sonda inmovilizada

Ligado

Amplificación en círculo rodante

Fig. 1 (continuación)

(D)

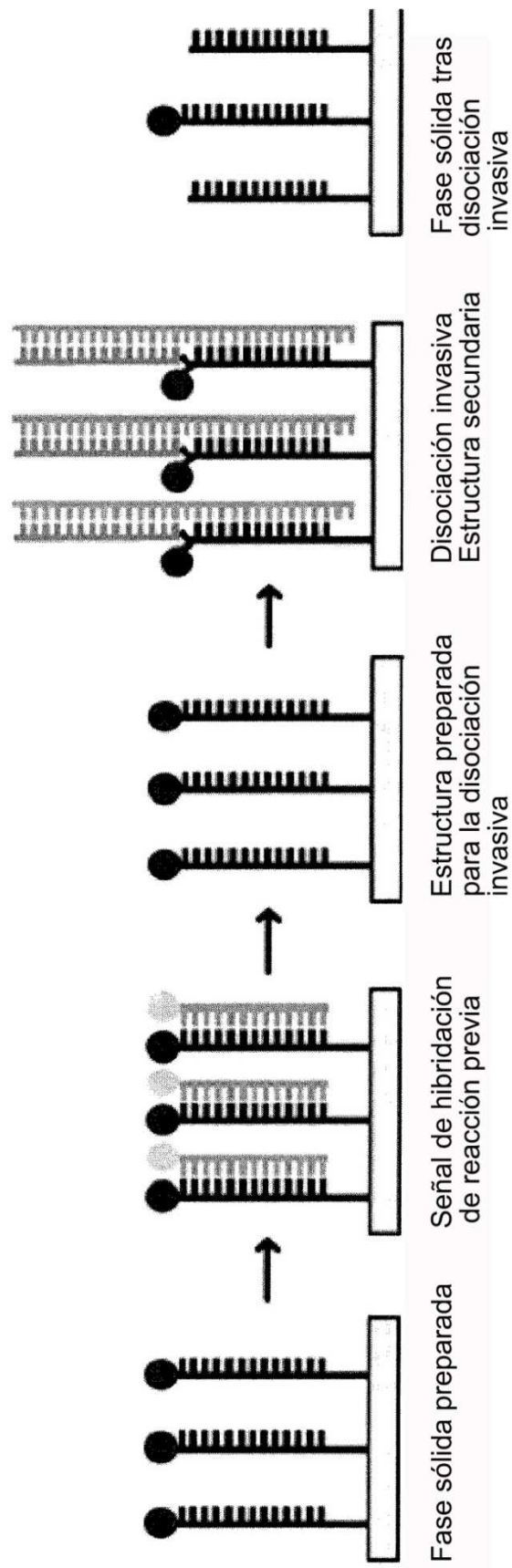


Fig. 2

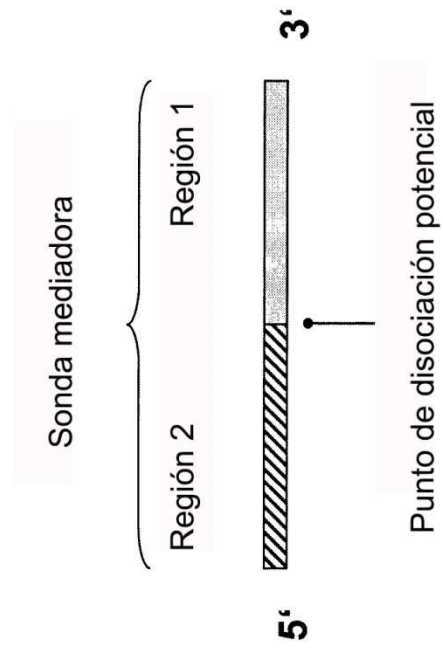
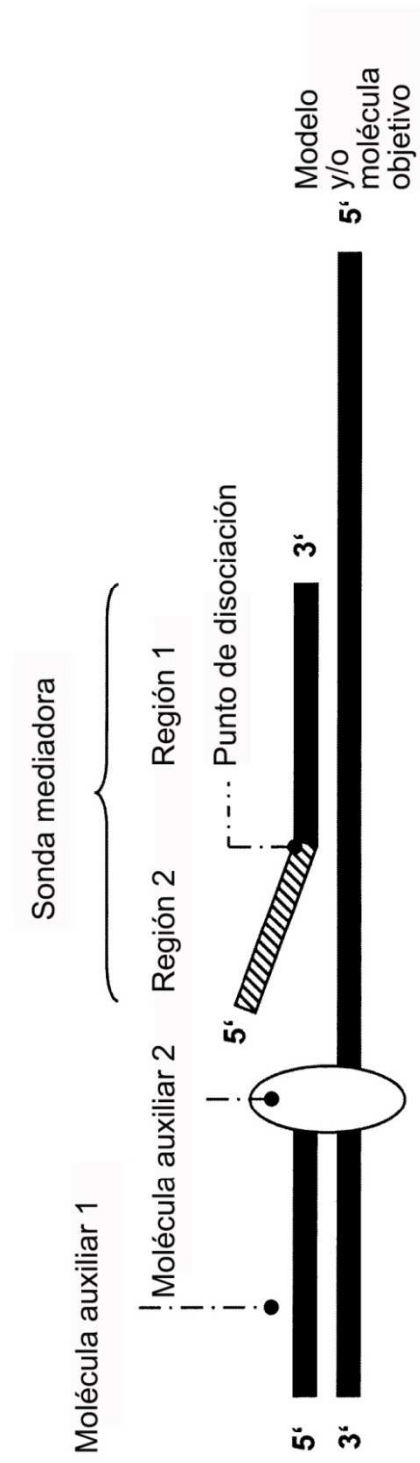


Fig. 3

A



B

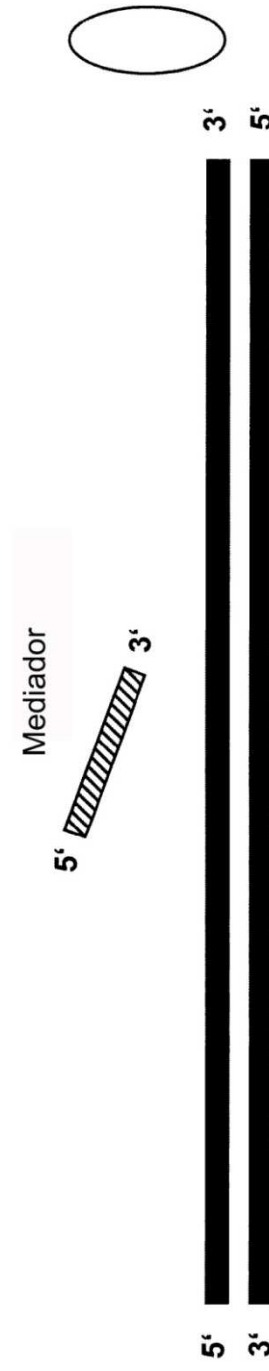


Fig. 4

A

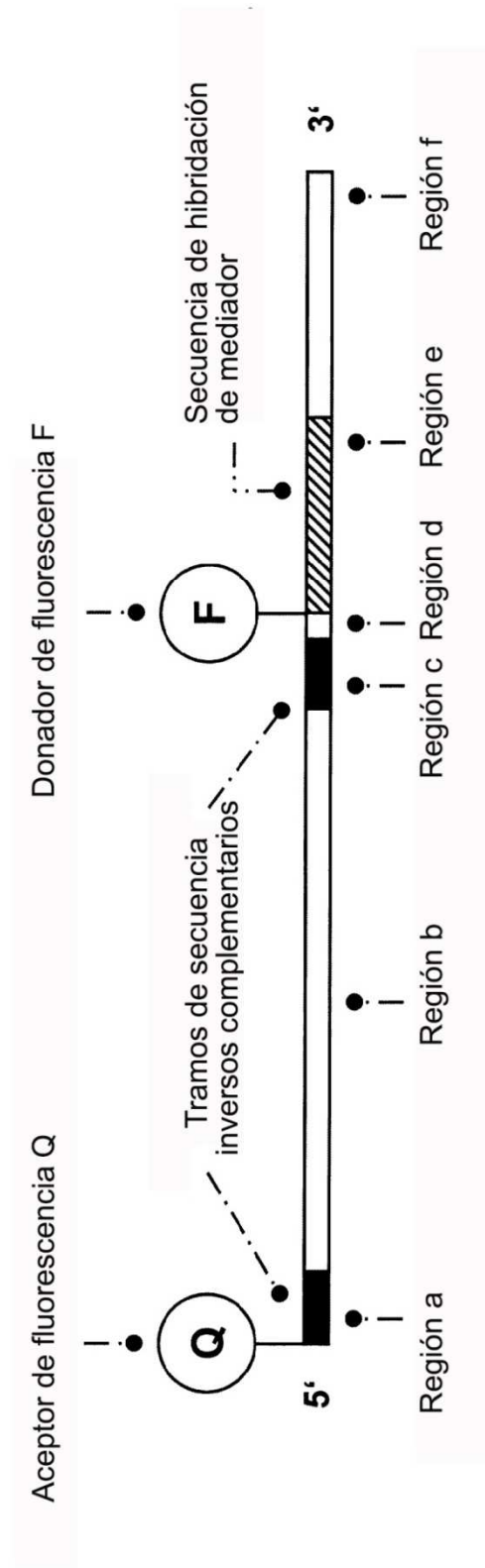


Fig. 4 (continuación)

B

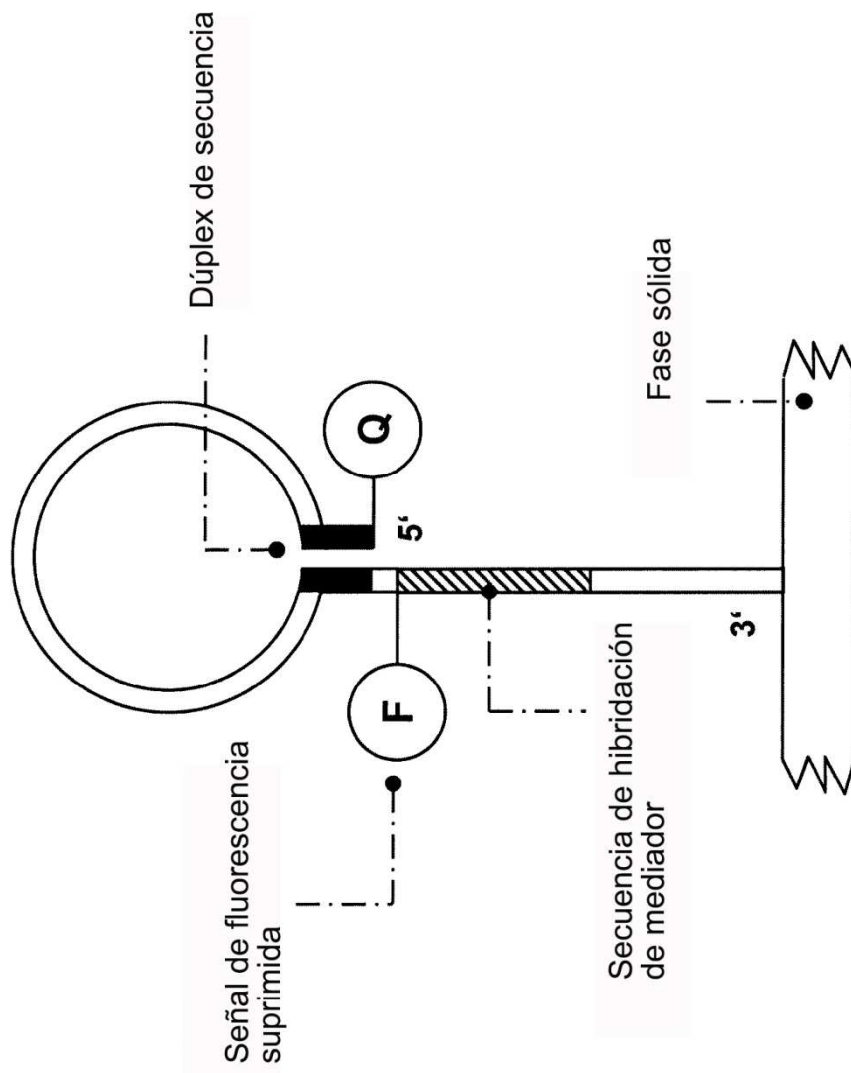


Fig. 5

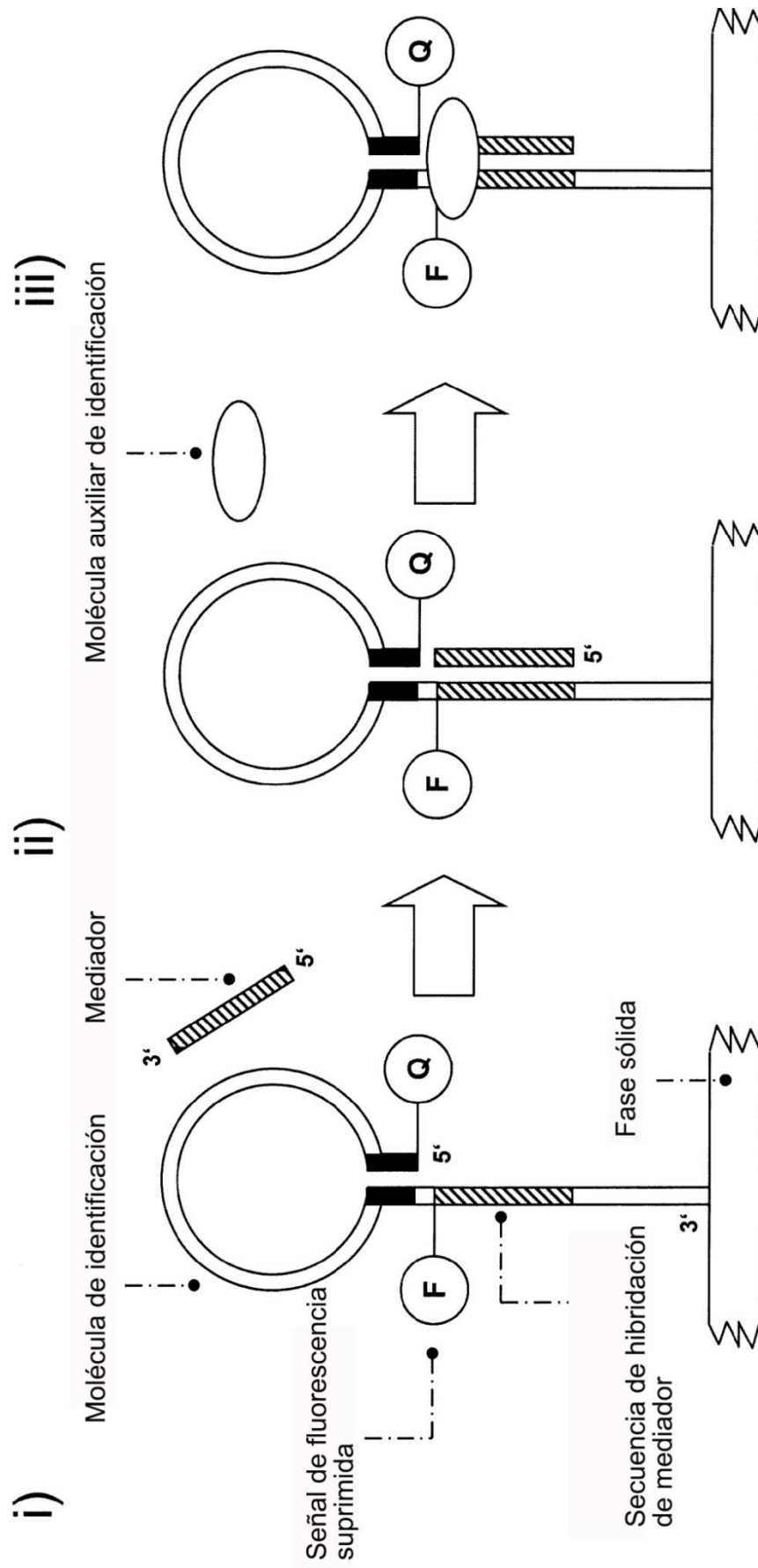


Figura 5 (continuación)

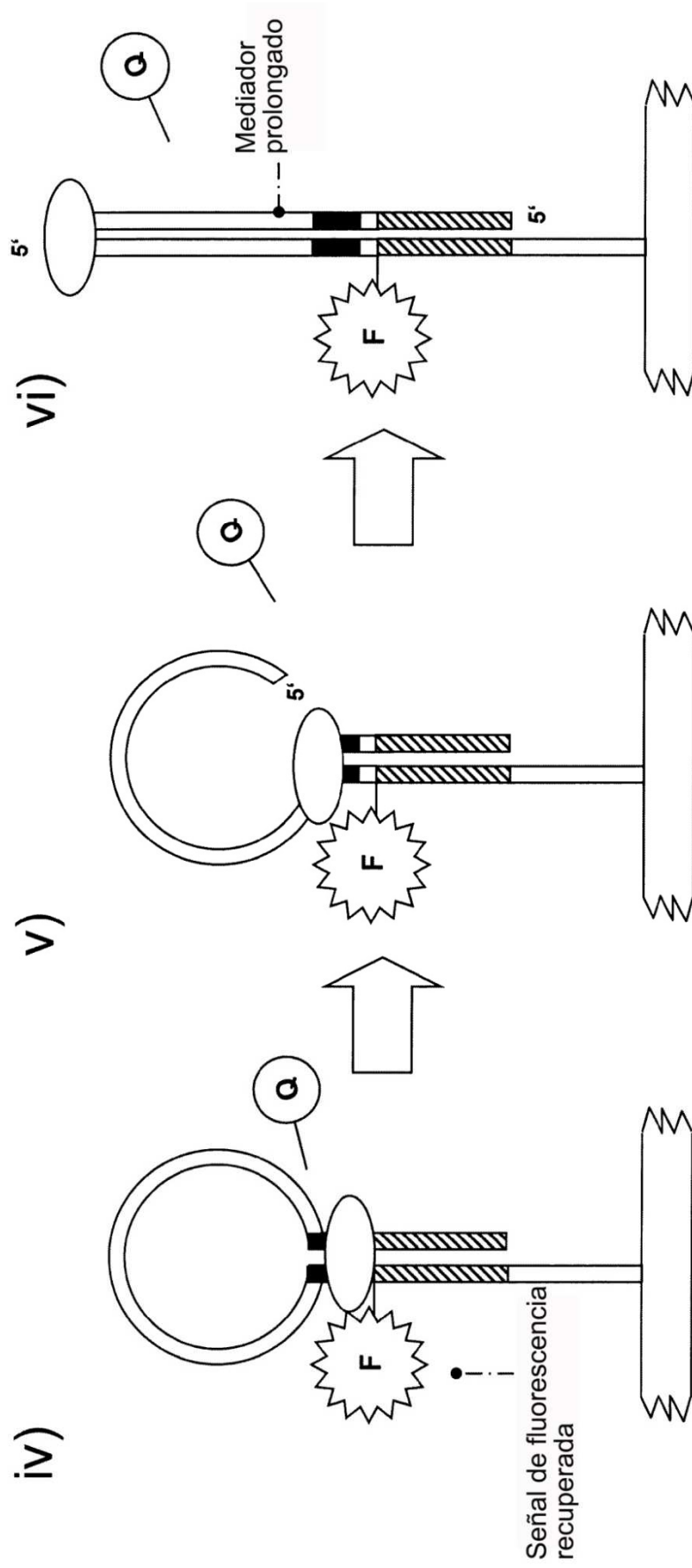


Fig. 6

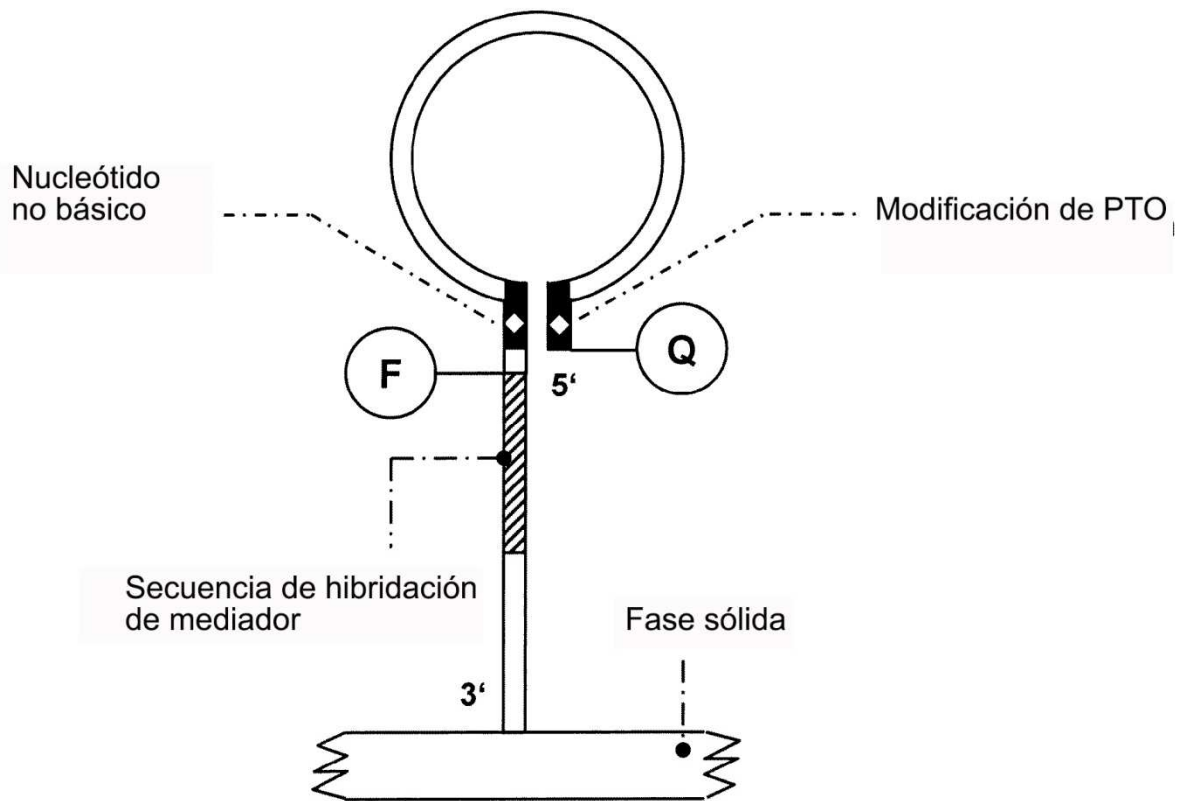


Fig. 7

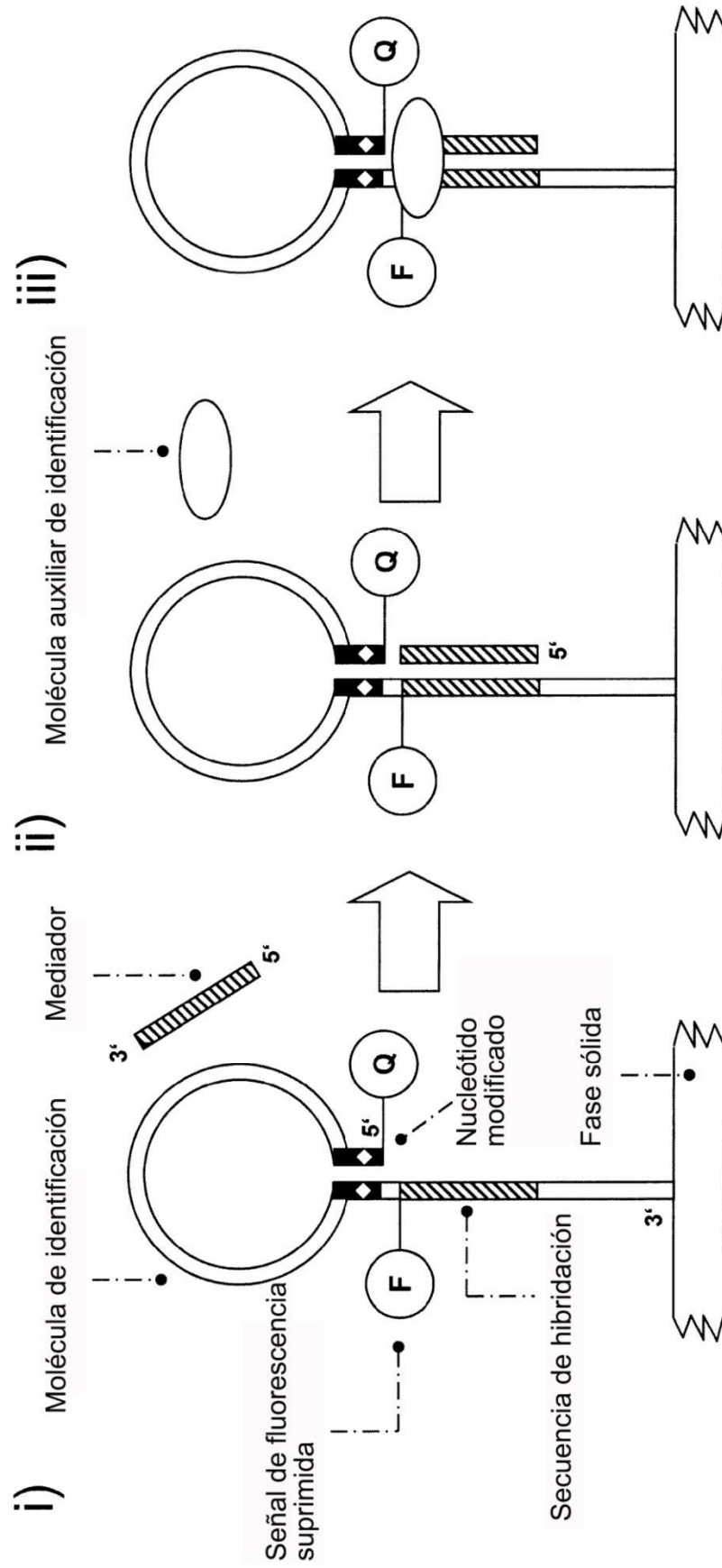


Fig. 7 (continuación)

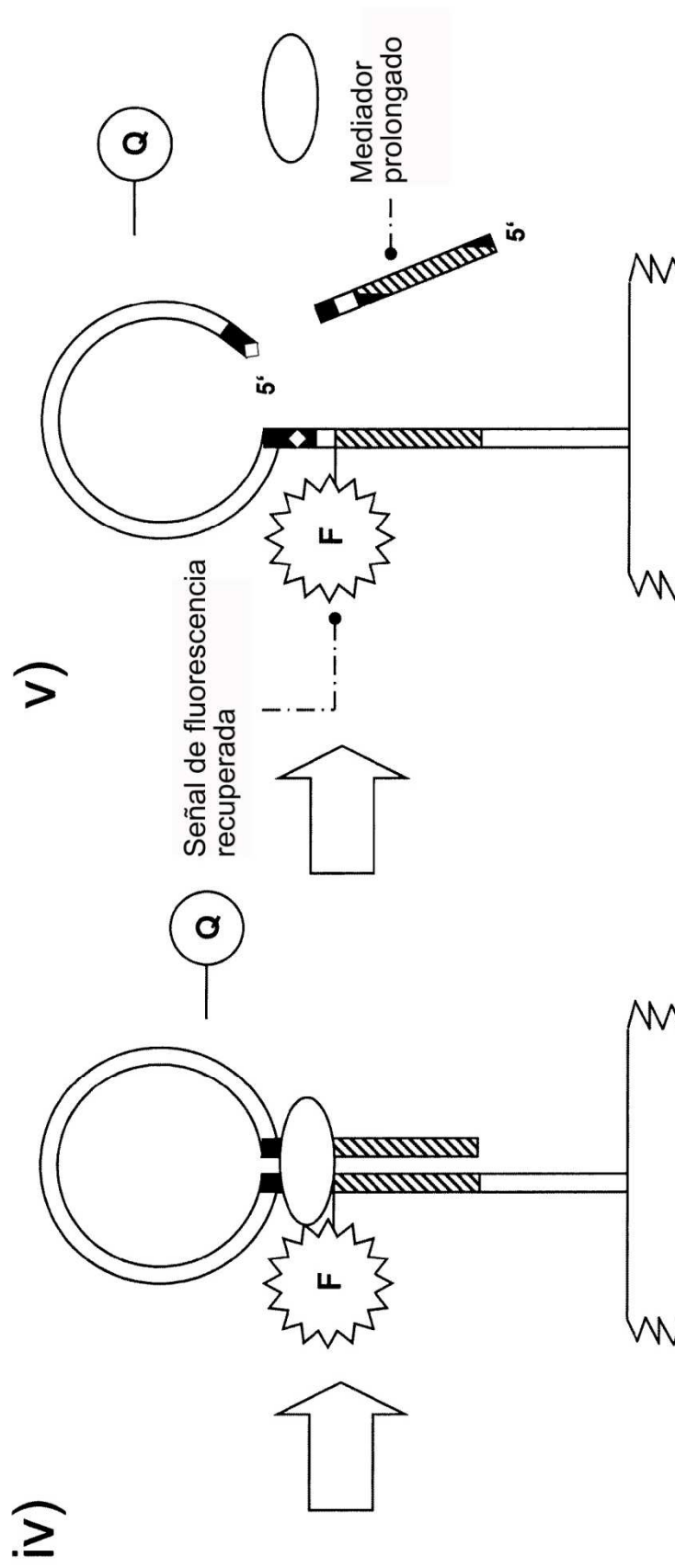
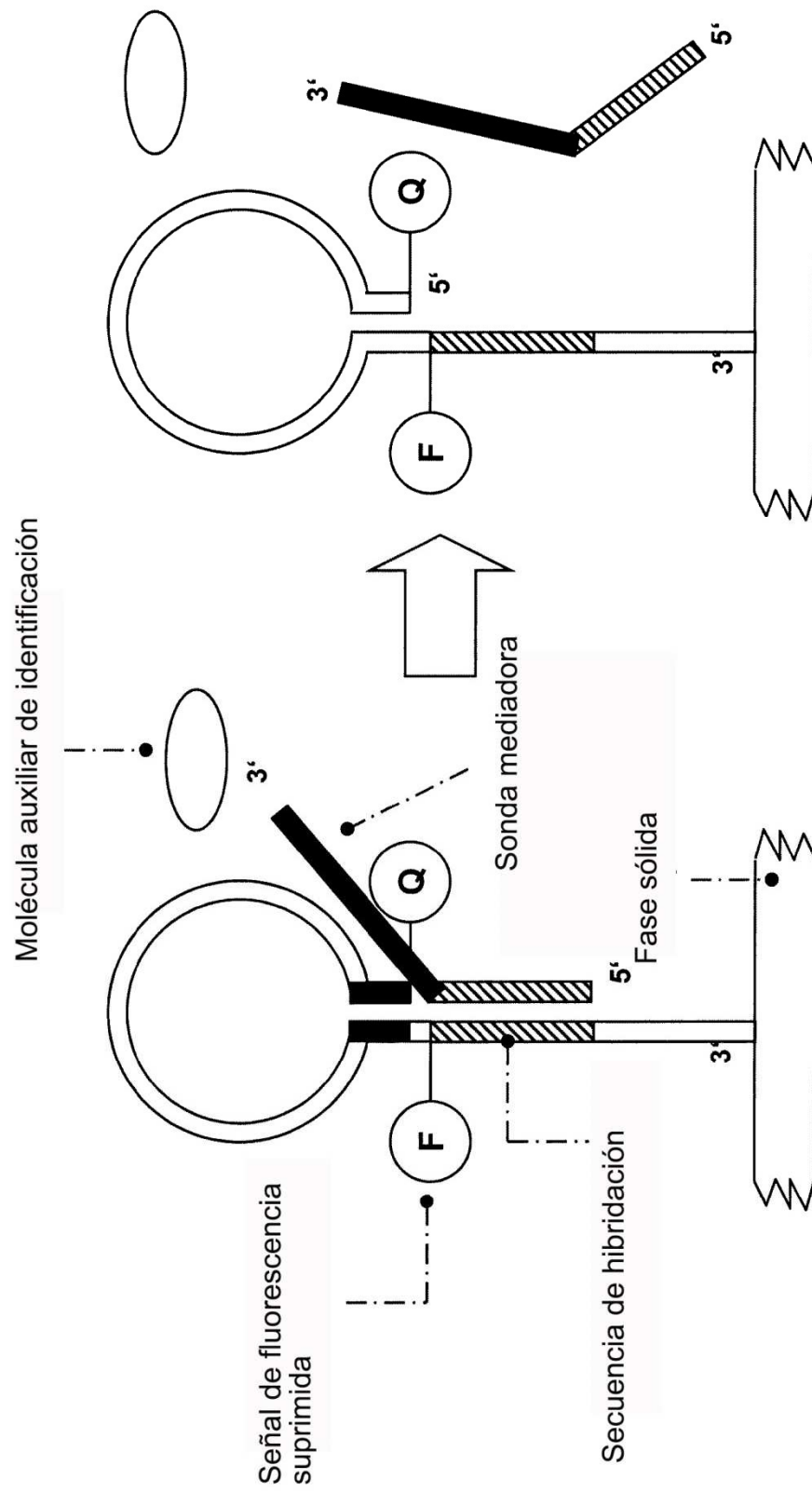


Fig. 8



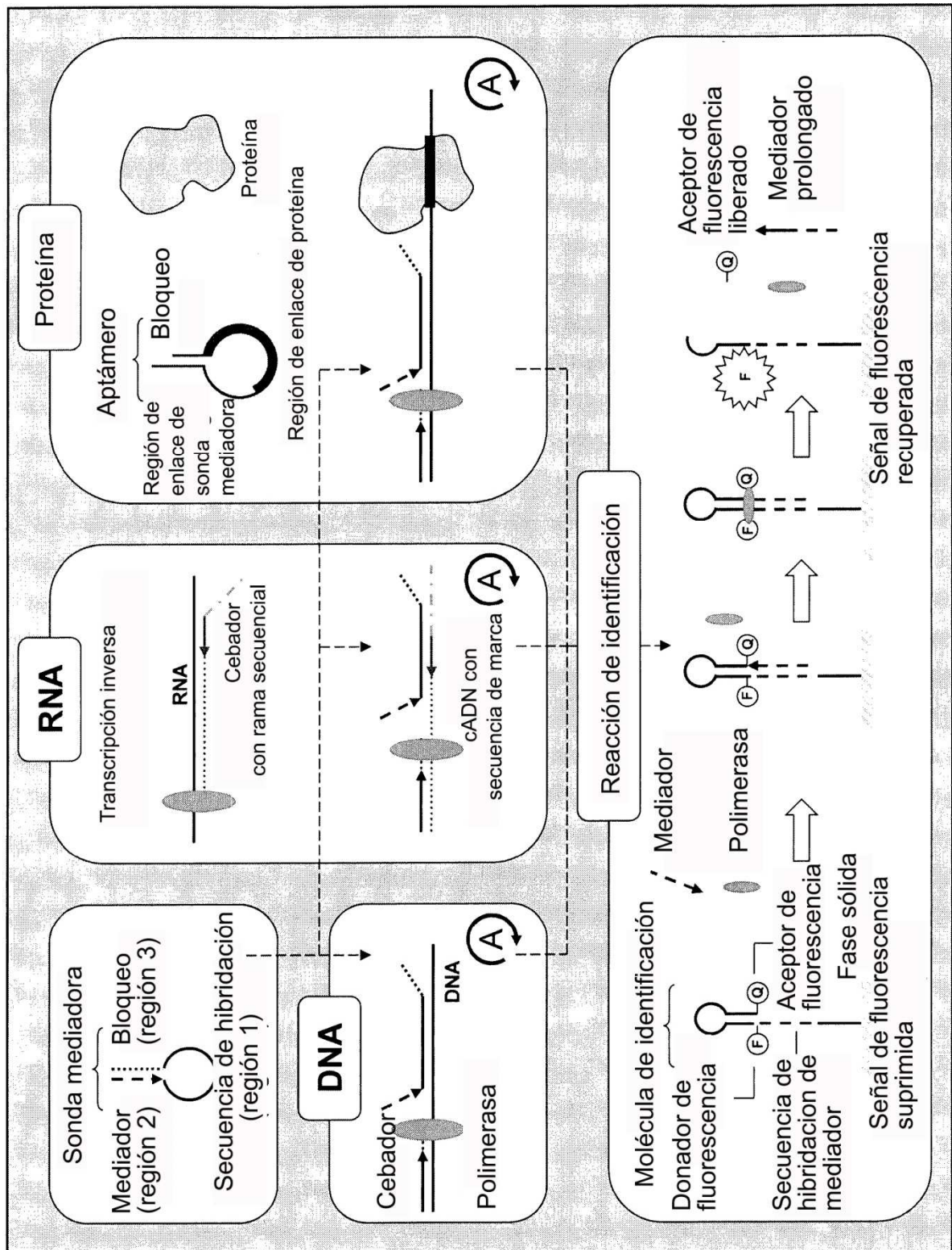


Fig. 9

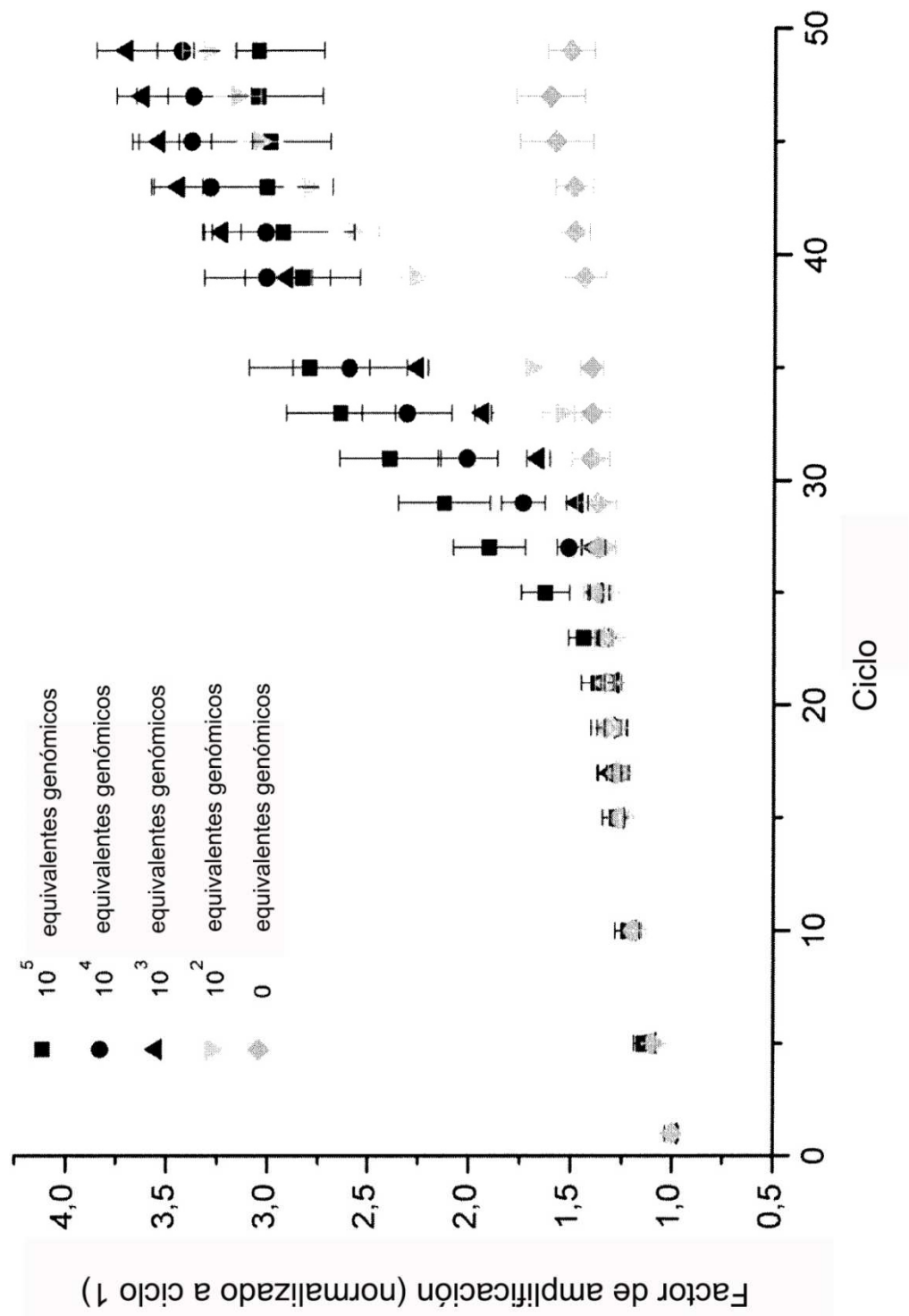


Fig. 10

Fig. 11

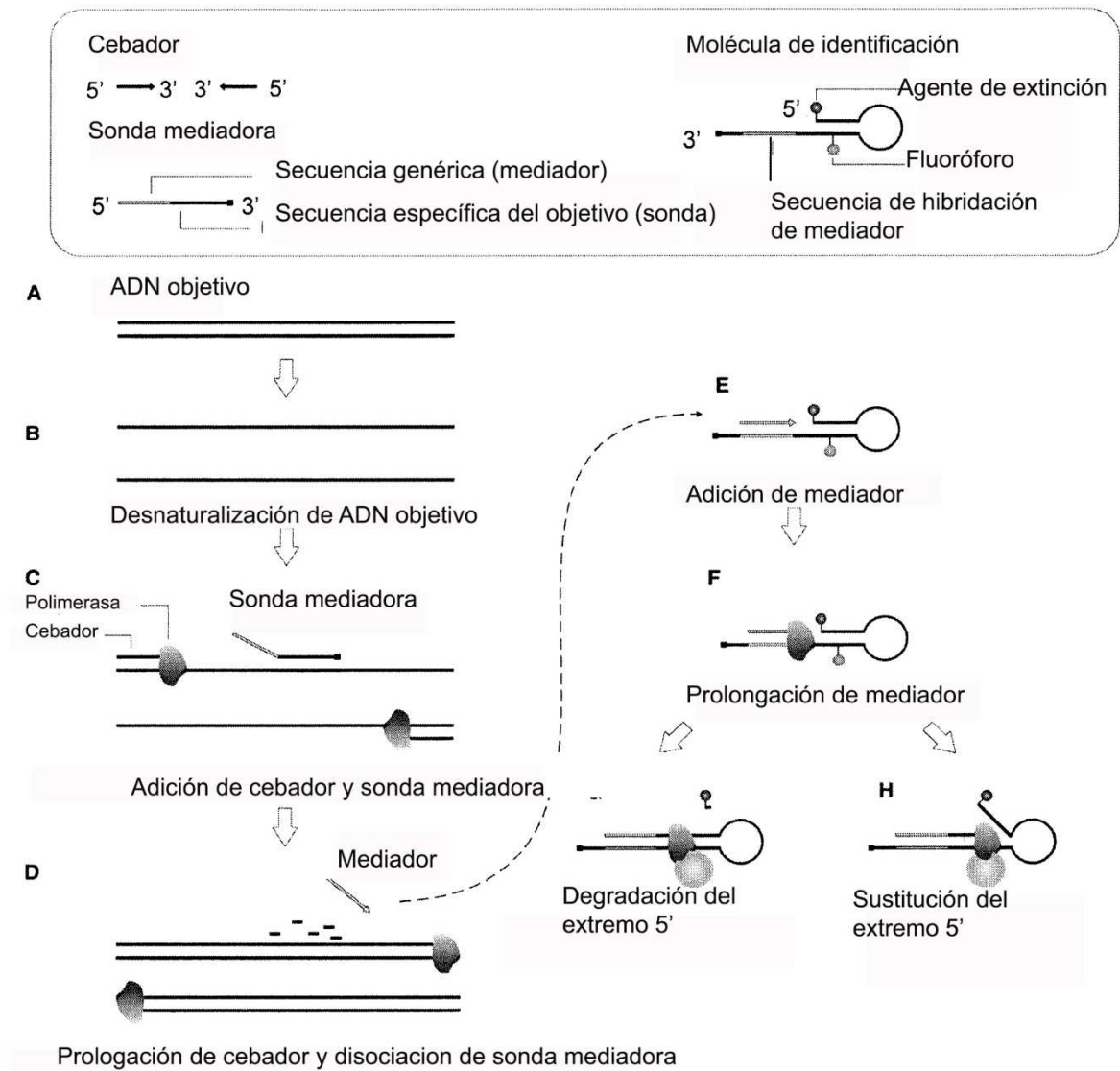


Fig. 12

A

Límite de detección

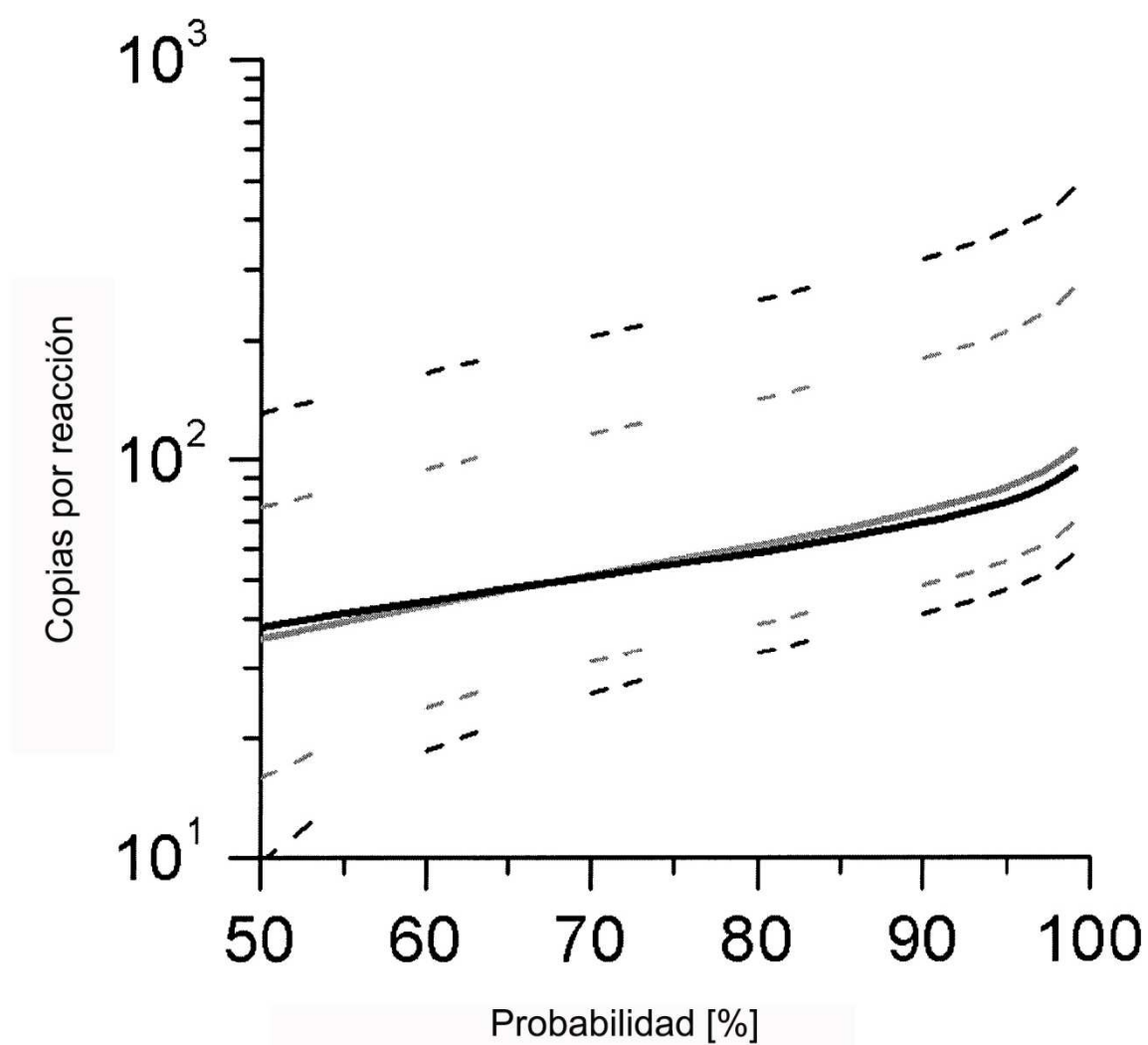


Fig. 12 (continuación)

B

Imprecisión dentro de ensayos

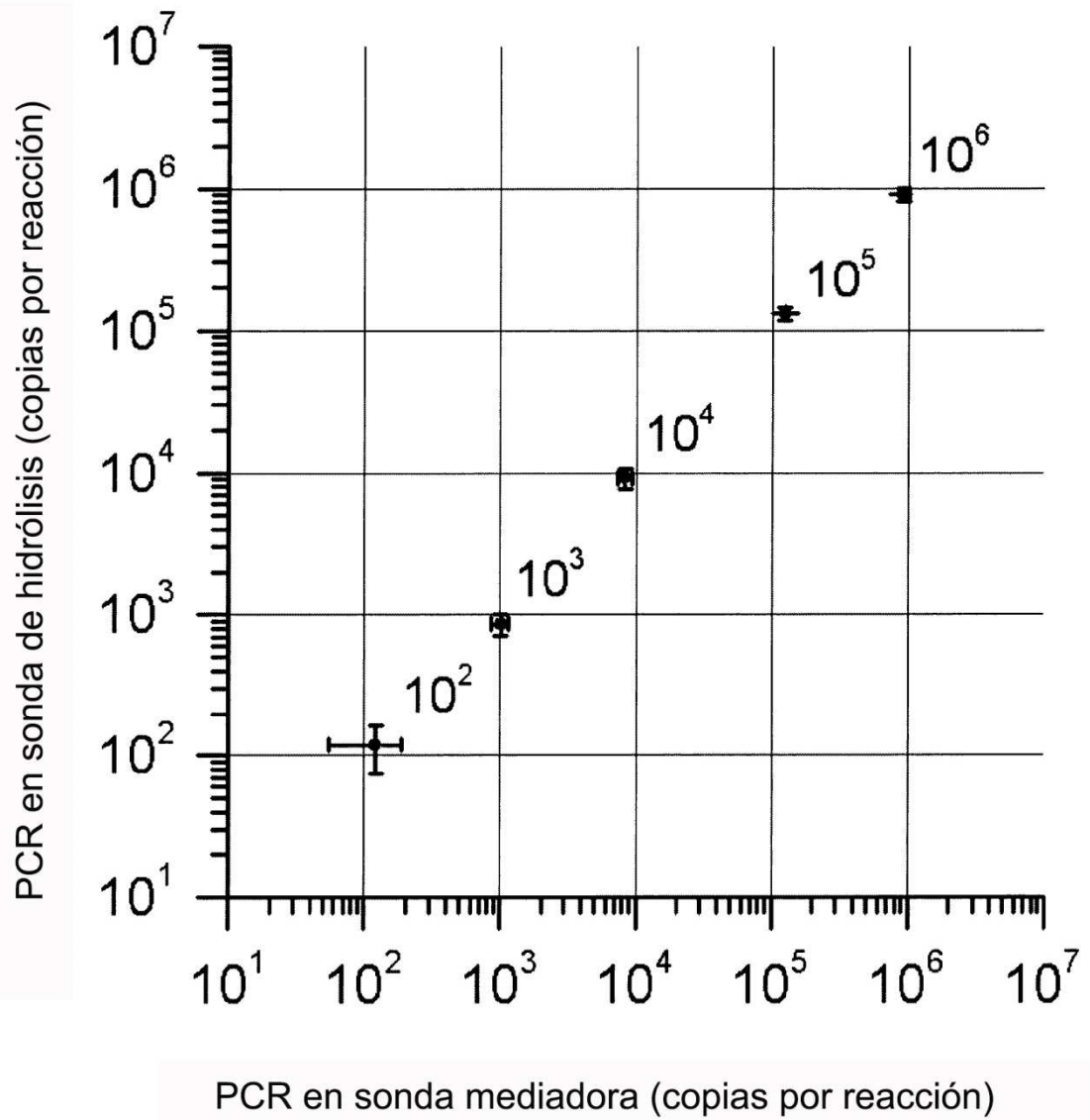


Fig. 12 (continuación)

C

Imprecisión entre ensayos

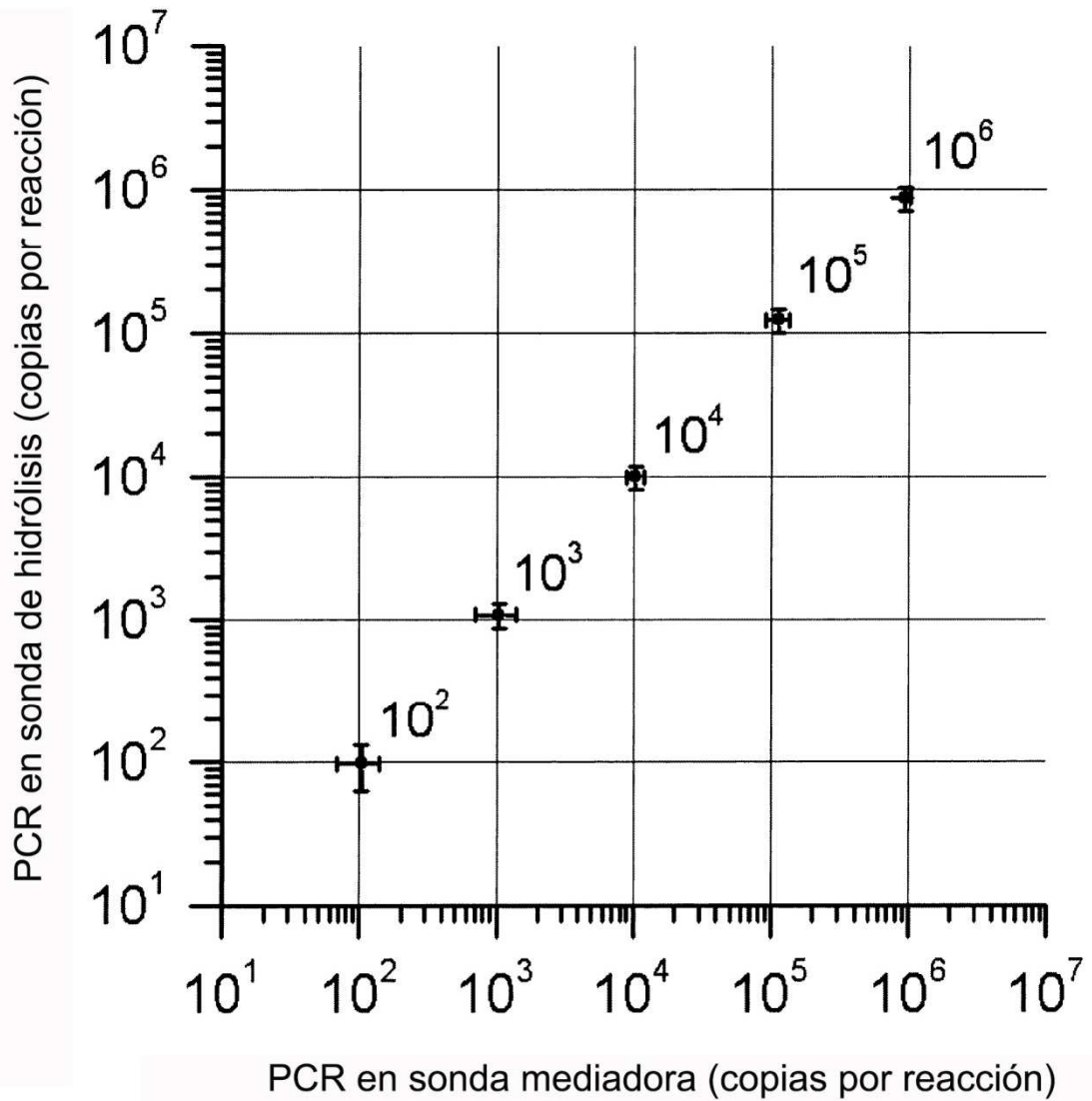


Fig. 12 (continuación)

D

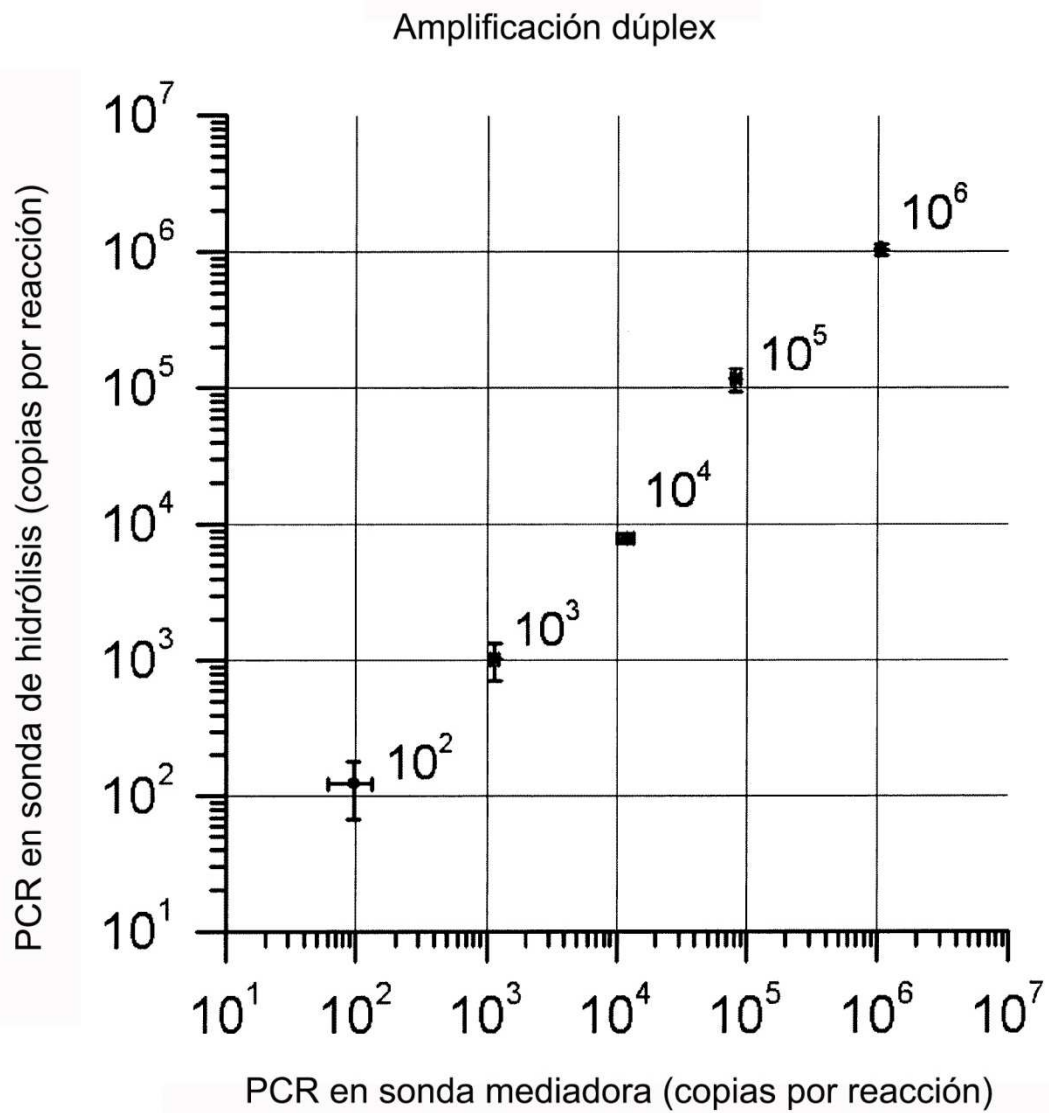


Fig.13

A

HPV18 L1

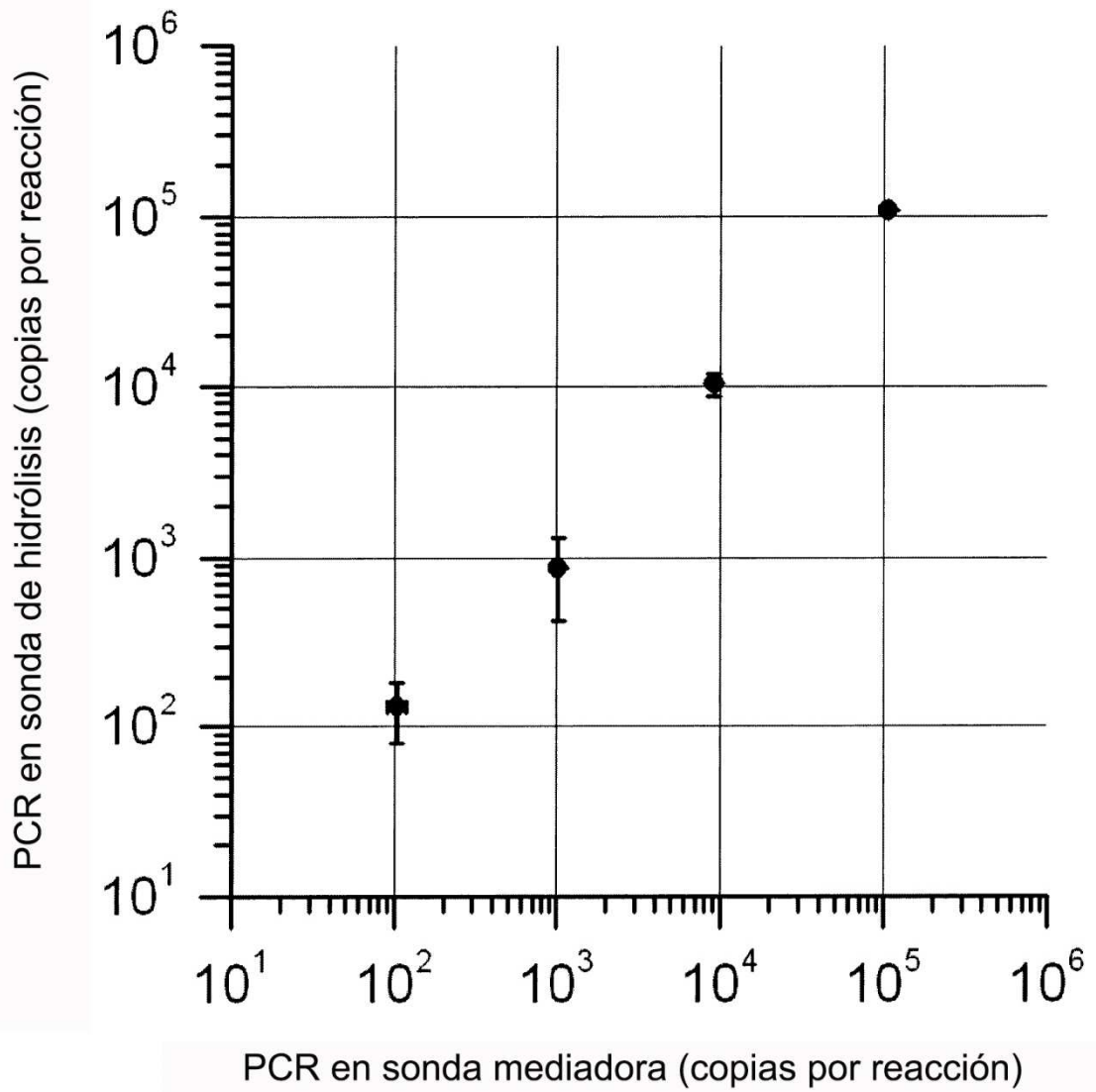


Fig. 13 (continuación)

B

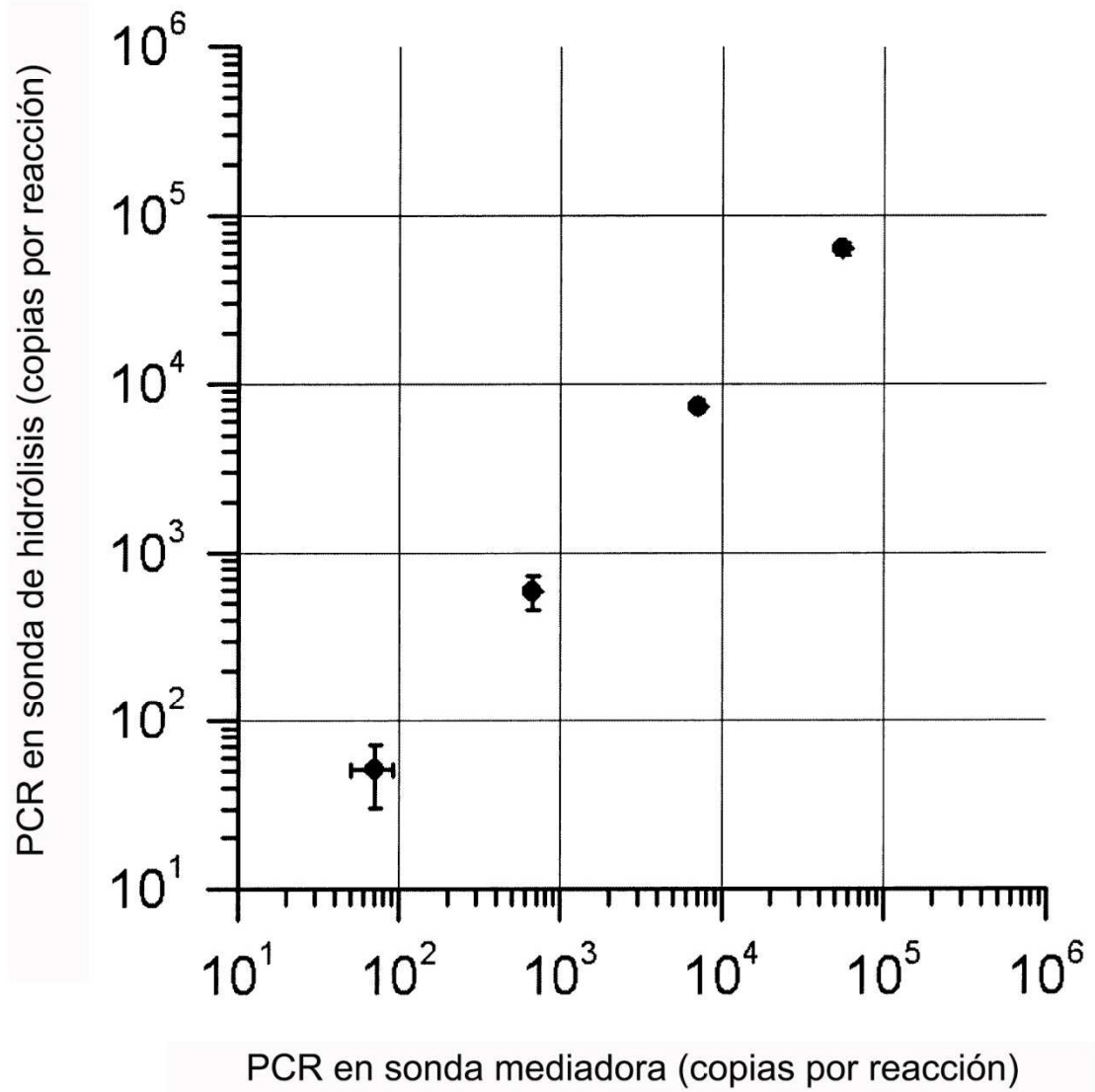
E. coli pal

Fig. 13 (continuación)

C

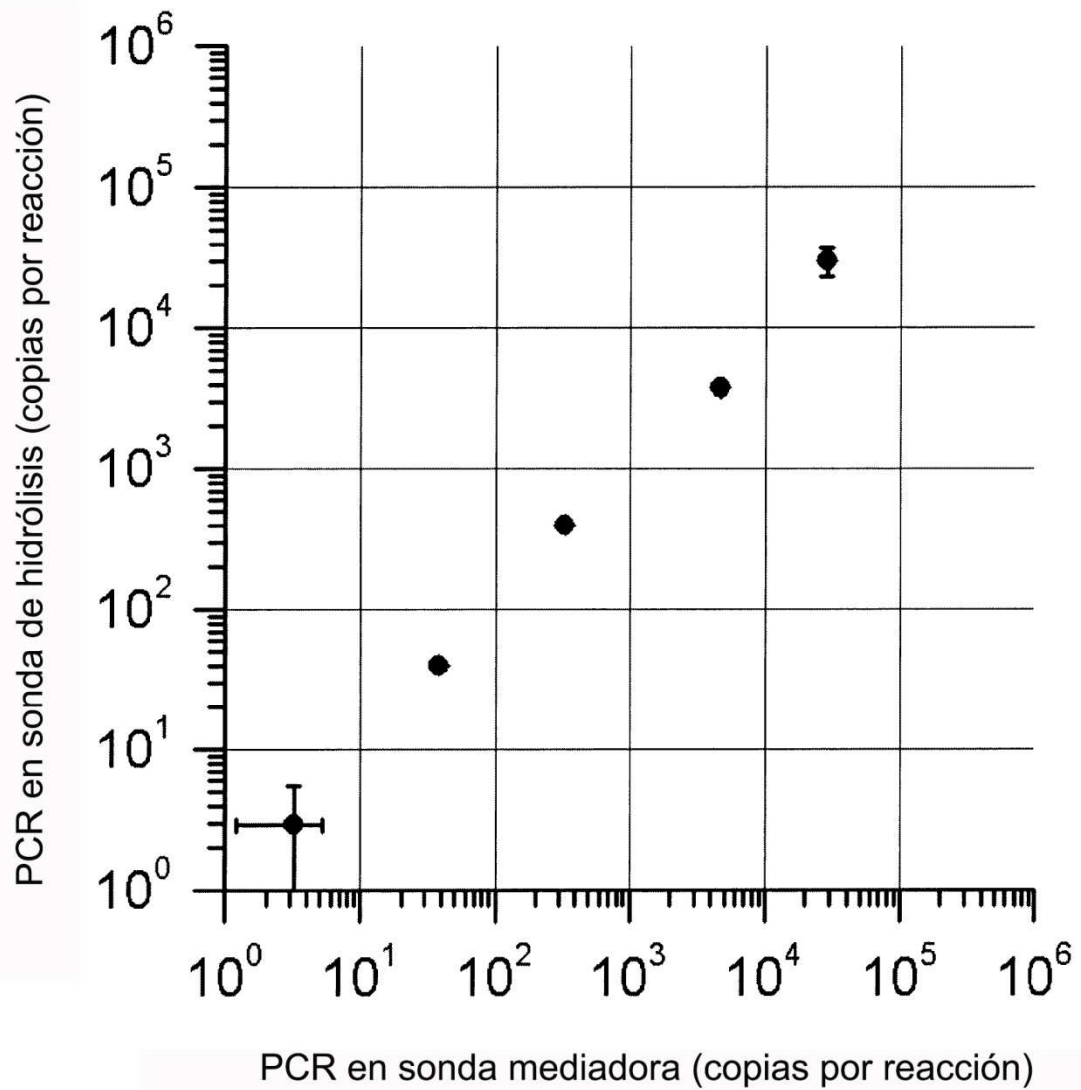
S. aureus ExfB

Fig. 13 (continuación)

D

H. sapiens ACTB

