

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 792**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6844 (2008.01)

C12Q 1/6818 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2014 PCT/EP2014/075321**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15075198**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2014 E 14800105 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 3071707**

54 Título: **Detección de ácidos nucleicos mediante amplificación basada en invasión de hebra**

30 Prioridad:

22.11.2013 EP 13194118

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

12.03.2019

73 Titular/es:

ORION DIAGNOSTICA OY (100.0%)

Koivu-Mankkaan tie 6 B

02200 Espoo, FI

72 Inventor/es:

EBOIGBODIN, KEVIN y

BRUMMER, MIRKO

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 703 792 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

Detección de ácidos nucleicos mediante amplificación basada en invasión de hebra

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un método para la detección de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra en presencia de al menos una proteína capaz de unirse a un ADN monocatenario, en el que para la detección, se usa una sonda de oligonucleótido que comprende un fluoróforo, un inactivador y una región complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana. La secuencia de la sonda de oligonucleótido comprende al menos un 20 % de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de ANP. La invención se refiere también a kits adecuados para su uso en este método, y a su uso para el diagnóstico de una infección por un patógeno.

15 Antecedentes de la invención

Se ha llevado a cabo la detección de secuencias de ácido nucleico diana utilizando sondas de ADN que comprenden parejas de fluoróforo/inactivador. Dichas sondas presentan un cambio en la actividad de inactivación sobre la unión a un ácido nucleico diana, permitiendo la detección cuantitativa de la diana. Las sondas se pueden usar para controlar la amplificación del ADN en tiempo real, y se pueden detectar las diferentes dianas en la misma reacción mediante el uso de diferentes parejas de fluoróforo/inactivador en cada sonda para las dianas que se van a detectar, permitiendo por tanto la multiplexación. Los ejemplos de sistemas de sondas anteriores para la detección de la amplificación del ADN incluyen sondas de hibridación que muestran cambios conformacionales sobre la unión a la diana (documento US7241596), balizas moleculares (documento US5925517), química Taqman (documento US6214979), y sondas escindibles por endonucleasas (documentos US7435561 y US20050214809). En el documento WO 2009/150467 se describe un proceso isotérmico de amplificación del ADN que se basa en un cebador en la dirección 5', un cebador en la dirección 3, y un sistema de invasión de hebra.

Sumario de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el reconocimiento de un problema asociado con el uso de sondas de ADN en los ensayos de detección donde están presentes proteínas capaces de unirse a un ADN monocatenario. Los presentes inventores descubrieron que las sondas de ADN era incapaces de proporcionar una señal dependiente de molde específica en presencia de proteínas capaces de unirse a ADN monocatenario, y por tanto, de proporcionar una señal incluso en ausencia de molde. Este problema los condujo a investigar una solución que podría proporcionar una detección fiable dependiente del molde de amplificación del ADN en el contexto de proteínas capaces de unirse a ADN monocatenario. Los inventores descubrieron de forma sorprendente que la incorporación de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de ácido nucleico peptídico (ANP) en la secuencia de una sonda de oligonucleótidos marcada con un fluoróforo y un inactivador proporciona resistencia a la perturbación de la señal fluorescente por las proteínas capaces de unirse al ADN monocatenario en comparación con una sonda correspondiente de ADN completo.

La presente invención proporciona un método para la detección de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra en presencia de al menos una proteína capaz de unirse a un ADN monocatenario, que comprende poner en contacto dicha muestra con al menos una sonda de oligonucleótidos que comprende un fluoróforo, un inactivador y una región complementaria a dicha secuencia de ácido nucleico diana, en el que la secuencia de dicha sonda de oligonucleótidos comprende al menos un 20 % de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de ANP y en el que al menos una de dichas proteínas capaz de unirse al ADN monocatenario es una recombinasa.

La divulgación proporciona una sonda de oligonucleótidos que comprende un fluoróforo, un inactivador y una región complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana, en el que la secuencia de dicha sonda de oligonucleótidos comprende al menos un 20 % de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de ANP. La invención proporciona además un Kit, que comprende una sonda de oligonucleótidos que comprende un fluoróforo, un inactivador y una región complementaria a dicha secuencia de ácido nucleico diana, en el que la secuencia de dicha sonda de oligonucleótidos comprende al menos un 20 % de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados, y/o nucleótidos ANP y además al menos una proteína capaz de unirse a un ADN monocatenario en el que dicha al menos una proteína es una recombinasa. La invención también proporciona un método para el diagnóstico de una enfermedad en un sujeto, que comprende llevar a cabo un método para la detección de una secuencia de ácido nucleico de la invención en una muestra de un sujeto para detectar una secuencia de ácido nucleico diana asociada con dicha enfermedad.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el efecto de (A) una recombinasa (UvsX),
 (B) una proteína de unión a un ADN monocatenario (gp32), (C) una mezcla de reactivos para la invasión de hebra

basada en la amplificación, D) la recombinasa RecA de *E. coli* y E) la proteína de unión ET-SSB al ADN monocatenario sobre la señal de las sondas que contienen un fluoróforo y un inactivador. Eje X para (A) y (B): de izquierda a derecha - cuatro condiciones para cada sonda ensayada (solo la sonda; sonda con molde complementario; sonda con proteína(s); sonda con proteína(s) y molde complementario). Eje X para (C): de izquierda a derecha - dos condiciones para cada sonda ensayada (sonda y composición de reactivos; sonda, composición de reactivos y molde complementario). Eje X para (D) y (E): de izquierda a derecha - dos condiciones para cada sonda ensayada (solo la sonda, sonda con proteína). Las sondas ensayadas fueron ADN 16 (SEQ ID NO:1), ADN 21 (SEQ ID NO:2), 2'-O-metil ARN 16 (SEQ ID NO: 5), 2'-O-metil ARN 21 (SEQ ID NO: 6), 2'-fluoro ARN 16 (SEQ ID NO:7), 2'-fluoro ARN 21 (SEQ ID NO: 8), ANB 12 (SEQ ID NO: 9), ANP 14 (SEQ ID NO: 10), ARN 16 (SEQ ID NO: 3) y ARN 21 (SEQ ID NO: 4). Eje Y para cada diagrama: fluorescencia (unidades arbitrarias). La Figura 2 muestra la amplificación de un ADN diana mediante amplificación basada en invasión de hebra. A) Configuración de los cebadores, sonda, invasión de hebra/oligonucleótido intermedio (OI) y ADN diana. B) Control en tiempo real de la amplificación detectada utilizando Verde SYBR. C) Control en tiempo real de la amplificación detectada utilizando la sonda de 2'-fluoro ARN SB-2FLURO (SEQ ID NO: 17). D) Control en tiempo real de la amplificación detectada utilizando la sonda de ANB (SB-ALN SEQ ID NO: 18). E) Control en tiempo real de la amplificación detectada utilizando la sonda de ADN natural (SB-ADN SEQ ID NO: 16). En B) a E) NTC = sin control del molde, se muestran diluciones del molde. Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado. Eje X: Tiempo (minutos). Eje Y para cada diagrama: fluorescencia (unidades arbitrarias).

La Figura 3 muestra el control en tiempo real de la amplificación con sondas que contienen bases de 2'-fluoro ARN marcadas con diferentes fluoróforos e inactivadores que permiten la detección de múltiples dianas de ADN. (A) Amplificación y detección de dos dianas de ADN utilizando una sonda marcada con Cy5 y negro lowa (SC-2FLURO, SEQ ID NO: 25) para una secuencia diana de *Clostridium difficile* y una sonda marcada con ROX y BHQ2 (SB2-FLURO, SEQ ID NO: 17) para una secuencia diana artificial. Eje X: Tiempo (minutos). Eje Y para cada diagrama: fluorescencia (unidades arbitrarias). (B) Análisis de fusión de las dianas tras la amplificación utilizando Verde Sybr I. Eje X: Temperatura (grados centígrados). Eje Y: $-(d(\text{fluorescencia})/d(\text{temperatura}))$, unidades arbitrarias). (C) Análisis de fusión de las dianas tras la amplificación utilizando sondas de 2'-fluoro ARN. Eje X y Eje Y como para la Figura 3(B).

La Figura 4 muestra la potenciación de la señal de sondas de 2'-fluoro ARN inducidas mediante la adición de ARNasa H2 que escinde la sonda. (A) Se incubaron sondas marcadas por duplicado con ADN complementario en presencia o ausencia de mezcla de reactivos de ARNasa H2. Eje X: de izquierda a derecha cuatro condiciones para cada sonda ensayada (sonda con mezcla de reactivos; sonda con molde complementario y mezcla de reactivos; sonda con mezcla de reactivos y ARNasa H2; sonda con molde complementario, mezcla de reactivos y ARNasa H2. Las sondas ensayadas fueron ANB 12 (SEQ ID NO:9), ANP 14 (SEQ ID NO: 10), SB-2'-O-metil ARN 16 (SEQ ID NO: 32), SB-ADN 16 (SEQ ID NO:1), y SB-2'-fluoro ARN 16 (SEQ ID NO:17). Eje Y para cada diagrama: fluorescencia (unidades arbitrarias). (B) Control en tiempo real de la amplificación de la secuencia diana de *C. difficile* en presencia o ausencia de ARNasa H2 utilizando una sonda de 2'-fluoro ARN SC-2FLURO (SEQ ID NO: 24). Eje X: Tiempo (minutos). Eje Y: fluorescencia (unidades arbitrarias).

La Figura 5 muestra la sensibilidad de un ensayo de amplificación basado en invasión de hebra para la detección de *Salmonella typhimurium* utilizando una dilución en serie de ADN genómico de *S. typhimurium* de 10^5 a 10 copias. Control en tiempo real de la amplificación utilizando la sonda de 2'-fluoro ARN. La sonda utilizada era SM-2FLURO (SEQ ID NO: 30). Eje X: Tiempo (minutos). Eje Y: Fluorescencia (unidades arbitrarias). NTC = sin control del molde, se muestran diluciones del molde.

La Figura 6 muestra sondas de 2'-fluoro ARN que ni amplifican ni detectan la diana independientemente de los cebadores (A) en ausencia de ARNasa H2 y (B) en presencia de ARNasa H2. Se muestran las condiciones de reacción para cada traza. Se llevaron a cabo las reacciones tanto en presencia como en ausencia del cebador inverso análogo (SEQ ID NO: 12) o un cebador falso, SPU (SEQ ID NO: 33). Se llevó a cabo el control de la amplificación en tiempo real detectando el fluoróforo ROX de la sonda SB-2FLURO (SEQ ID NO: 17) o Verde SYBR. Eje X: Tiempo (minutos). Eje Y: Fluorescencia (unidades arbitrarias).

La Figura 7 muestra la amplificación de un ADN diana mediante amplificación basada en invasión de banda usando cebadores/sondas de 2'-fluoro ARN de función duplicada y cebadores de ADN naturales. (A) Configuración del cebador directo, sonda-cebador inverso, invasión de hebra/oligonucleótido intermedio (OI) y ADN diana. B) Control en tiempo real de la amplificación de un molde artificial detectado utilizando Verde SYBR. los cebadores utilizados eran el cebador de ADN SB-R20 (SEQ ID NO:12), el cebador de 2'-fluoro ARN SBFLURO1-ARN (SEQ ID NO: 13) y el cebador de 2'fluoro ARN/ADN SBFLURO2-ARN (SEQ ID NO:14). C) Control en tiempo real de la amplificación de un molde artificial detectado utilizando SB-R20 (SEQ ID NO: 12) o una sonda-cebador de 2'-fluoro ARN (SB-2FLURO2, SEQ ID NO: 19) marcado con fluoróforo interno (FAM) y un inactivador en 5'. Amplificación con un cebador de ADN (SEQ ID NO: 12) detectado utilizando Verde SYBR; amplificación con una sonda-cebador de 2'-fluoro ARN (SEQ ID NO: 19) detectado mediante el canal FAM (sin añadir Verde SYBR). NTC = sin control del molde, se muestra la dilución del molde. Eje X: Tiempo (minutos). Eje Y para cada diagrama: fluorescencia (unidades arbitrarias).

La Figura 8 muestra el efecto de la recombinasa UvsX y una proteína de unión monocatenaria T4-gp32 sobre la señal de sondas quiméricas marcadas por duplicado que tienen bases de ADN y ARN (ADN/ARN o ADN/2'-fluoro ARN o ADN/2'-O-metil ARN) en ausencia de un molde complementario. A) efecto de UvsX. B) efecto de T4-gp32. C) Ensayo de UvsX adicional con otra serie de sondas. D) Ensayo de T4 gp32 adicional con otra serie de sondas. Las sondas ensayadas eran ADN 21 (SEQ ID NO:2), ADN 16+ ARN5 (SEQ ID NO: 35), ADN 10+ ARN 11 (SEQ ID NO:36), ADN5+ ARN16 (SEQ ID NO: 37), ARN21 (SEQ ID NO: 4), ADN16 + 2-FLURO ARN5 (SEQ ID NO:

38), ADN10 + 2-FLUORO ARN11 (SEQ ID NO: 39), ADN 5+ 2-FLUORO ARN 16 (SEQ ID NO: 40), 2-FLUORO, ARN21 (SEQ ID NO: 8), ADN16 + 2-O-METIL ARN5 (SEQ ID NO: 41), ADN10 + 2-O-METIL ARN11 (SEQ ID NO: 42), ADN5 + 2-O-METIL ARN16 (SEQ ID NO: 43), 2-O-METIL, ARN21 (SEQ ID NO: 6), ADN20+ ARN1 (SEQ ID NO: 45), ADN19+ ARN2 (SEQ ID NO: 46), ADN18+ ARN3 (SEQ ID NO: 47); ADN17+ ARN4 (SEQ ID NO:48). Eje Y: incremento de veces en la fluorescencia (fluorescencia en presencia de UvsX o T4-gp32 dividido por la fluorescencia en ausencia de UvsX o T4-gp32), unidades arbitrarias.

Descripción de las secuencias

10 SEQ ID NO:1 es la secuencia de nucleótidos de una sonda de ADN.
 SEQ ID NO:2 es la secuencia de nucleótidos de una sonda de ADN.
 SEQ ID NO:3 es la secuencia de nucleótidos de una sonda de ARN.
 SEQ ID NO:4 es la secuencia de nucleótidos de una sonda de ARN.
 SEQ ID NO:5 es la secuencia de nucleótidos de una sonda de 2'-O-metil ARN.
 15 SEQ ID NO:6 es la secuencia de nucleótidos de una sonda de 2'-O-metil ARN
 SEQ ID NO:7 es la secuencia de nucleótidos de una sonda de 2'-fluoro ARN
 SEQ ID NO:8 es la secuencia de nucleótidos de una sonda de 2'-fluoro ARN
 SEQ ID NO:9 es la secuencia de nucleótidos de una sonda de ANB.
 SEQ ID NO:10 es la secuencia de una sonda de ANP.
 20 SEQ ID NO:11 es la secuencia de nucleótidos de un cebador de ADN.
 SEQ ID NO:12 es la secuencia de nucleótidos de un cebador de ADN.
 SEQ ID NO:13 es la secuencia de nucleótidos de un cebador de 2'-fluoro ARN.
 SEQ ID NO:14 es la secuencia de nucleótidos de un sonda de ADN/2'-fluoro ARN mixto.
 SEQ ID NO:15 es la secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido de invasión de hebra de ADN.
 25 SEQ ID NO:16 es la secuencia de nucleótidos de una sonda de ADN.
 SEQ ID NO:17 es la secuencia de nucleótidos de una sonda de 2'-fluoro ARN.
 SEQ ID NO:18 es la secuencia de nucleótidos de una sonda de ANB.
 SEQ ID NO:19 es la secuencia de una sonda/cebador mixto de ADN/2'-fluoro ARN.
 SEQ ID NO:20 es la secuencia de nucleótidos de una secuencia de ácido nucleico diana de ADN artificial.
 30 SEQ ID NO:21 es la secuencia de nucleótidos de un cebador de ADN.
 SEQ ID NO:22 es la secuencia de nucleótidos de un cebador de ADN.
 SEQ ID NO:23 es la secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido de invasión de hebra de ADN.
 SEQ ID NO:24 es la secuencia de nucleótidos de una sonda de 2'-fluoro ARN.
 SEQ ID NO:25 es la secuencia de nucleótidos de una sonda de 2'-fluoro ARN.
 35 SEQ ID NO:26 es una secuencia de nucleótidos del ADN diana de *C. difficile* ATCC BAA 1382
 SEQ ID NO:27 es la secuencia de nucleótidos de un cebador de ADN.
 SEQ ID NO:28 es la secuencia de nucleótidos de un cebador de ADN.
 SEQ ID NO:29 es la secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido de invasión de hebra de ADN.
 SEQ ID NO:30 es la secuencia de nucleótidos de una sonda de 2'-fluoro ARN.
 40 SEQ ID NO:31 es una secuencia de nucleótidos de ADN diana de *S. typhimurium* ATCC 14028
 SEQ ID NO:32 es la secuencia de nucleótidos de una sonda de 2'-O-metil ARN.
 SEQ ID NO:33 es la secuencia de nucleótidos de un cebador de ADN.
 SEQ ID NO:34 es una secuencia de nucleótidos de ADN diana complementaria para las sondas de las SEQ ID NOS 1 a 8.
 45 SEQ ID NOS: 35 a 43 representan las secuencias de nucleótidos de ADN/ARN quimérico, sondas de ADN/2'-fluoro ARN y ADN/2'-O-metil ARN.
 SEQ ID NO:44 es una secuencia de nucleótidos de ADN diana complementaria para las sondas de las SEQ ID NOS 9 y 10.
 SEQ ID NOS:45 a 48 representan las secuencias de nucleótidos de las sondas de ADN/ARN quimérico.

Descripción detallada de la invención

Debe entenderse que las diferentes aplicaciones de los métodos divulgados pueden adaptarse a las necesidades específicas en la técnica. Debe entenderse también que la terminología utilizada en el presente documento es con el fin de describir solo realizaciones particulares de la invención, y no se pretende que sea limitante. además tal y como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el" incluyen las referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un oligonucleótido" incluye dos o más de dichos oligonucleótidos, y similares.

60 Método para la detección de una secuencia de ácido nucleico diana

Muestra

65 Se puede usar cualquier muestra para la detección de la secuencia de ácido nucleico diana, con la condición de que el ácido nucleico pueda obtenerse o derivarse de la muestra. La muestra puede ser, por ejemplo, una muestra ambiental, una muestra de referencia o una muestra clínica. Donde los métodos de la invención se usan para el

diagnóstico de una enfermedad mediante la detección de una secuencia de ácido nucleico diana, la muestra es habitualmente una muestra clínica, por ejemplo, una muestra obtenida de un paciente sospechoso de tener, o tener la enfermedad. Los tipos adecuados de muestra clínica varían de acuerdo con el tipo concreto de enfermedad o infección que está presente, o es sospechosa de estar presente en un sujeto. La muestra puede ser una muestra de saliva, esputo, sangre, plasma, suero, orina o heces. La muestra puede ser de una muestra de células o tejido. En las realizaciones preferidas, las muestras se toman de sujetos animales, tales como sujetos mamíferos. Las muestras se tomarán habitualmente de sujetos humanos, pero la presente invención es también aplicable en general a animales domésticos, ganadería, aves y peces. Por ejemplo, la invención puede aplicarse en un escenario veterinario o agrícola. En las realizaciones donde la invención detecta infección de una infección por *Clostridium difficile* (*C. difficile*) o *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) la muestra es preferentemente una muestra de heces. La muestra de heces puede tomarse de un sujeto que tiene infección en el tracto gastrointestinal. La infección puede estar presente en un paciente que tiene diarrea.

La muestra comprende ácido nucleico que puede ser ADN o ARN. Si está presente el ácido nucleico en la muestra en una forma adecuada para permitir la detección de acuerdo con la invención, la muestra puede utilizarse directamente. Sin embargo, normalmente, se obtiene ácido nucleico, obtenido o extraído de la muestra. Son bien conocidos en la técnica los métodos para procesar muestras que contienen ácidos nucleicos, extrayendo ácidos nucleicos y/o purificando ácidos nucleicos para su uso en los métodos de detección. Se puede aislar ácido nucleico total o el ADN y el ARN se pueden aislar por separado.

Normalmente, se procesa una muestra de una manera adecuada de tal manera que se proporciona ácido nucleico en una forma conveniente para poner en contacto la sonda de oligonucleótidos y la proteína de unión a ADN monocatenario y de forma opcional, componentes de ácido nucleico adicionales. Donde el ácido nucleico es ADN, el ADN se proporciona normalmente en forma bicatenaria. Donde el ácido nucleico es ARN, este se convierte normalmente en ADNc utilizando la transcriptasa inversa o una polimerasa con actividad de transcriptasa inversa. El ARN puede ser útil para la detección bacteriana. Debido a la gran cantidad de ribosomas presentes en las células bacterianas que amplifican eficazmente la concentración de las secuencias diana. Además del ARN ribosómico (ARNr), otras formas de ARN, por ejemplo, los ARN de transferencia (ARNt), ARN mensajeros (ARNm), ARN interferentes pequeños (ARNip), ácido ribonucleico nuclear pequeño (ARNnp), los microRNA (miRNA) pueden ser también útiles para la detección procariota y eucariota.

Secuencia de ácido nucleico diana

Se puede detectar cualquier secuencia de ácido nucleico diana de cualquier origen. la secuencia de ácido nucleico diana puede ser humana, de mamífero, bacteriana o vírica. La secuencia de ácido nucleico diana puede ser una región de un gen o cromosoma. Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico diana es específica para el genotipo o el organismo (tal como el patógeno) que se va a detectar. La secuencia de ácido nucleico diana puede ser única para el genoma de una especie concreta. Por tanto, la secuencia de ácido nucleico diana para detectar una especie concreta diferirá normalmente de cualquier secuencia de ácido nucleico homóloga en una especie relacionada. Normalmente, la secuencia de ácido nucleico diana comprenderá algunos emparejamientos incorrectos con una secuencia de ácido nucleico homóloga en una especie relacionada. La secuencia de ácido nucleico diana puede ser una secuencia específica de una cepa concreta de bacteria o un serotipo, aislado o clado concreto de un virus. La secuencia de ácido nucleico diana puede ser específica de una cepa toxigénica de *C. difficile* o de una cepa de *S. typhimurium*.

La secuencia de ácido nucleico diana que se va a detectar puede ser de cualquier tamaño y tener cualquier secuencia. La secuencia de ácido nucleico diana comprende una región complementaria con la sonda de oligonucleótidos. Normalmente, la secuencia de ácido nucleico diana se amplifica junto con la detección por la sonda y comprende por tanto regiones adicionales que son complementarias a los cebadores. Cuando una secuencia de ácido nucleico diana (o amplicón) se amplifica mediante amplificación basada en invasión de hebra en condiciones isotermas, tiene normalmente una longitud suficiente para proporcionar una detección específica del genotipo u organismo diana y para la hibridación de los cebadores en la dirección 5' y en la dirección 3' y el oligonucleótido de invasión de hebra de una manera adecuada. Preferentemente, un amplicón para la amplificación de ADN basada en invasión de hebra en condiciones isotermas tiene al menos 45 nucleótidos de longitud, más preferentemente al menos 50, al menos 55 o al menos 60 nucleótidos de longitud, como se mide desde el sitio 5' de unión del cebador en la dirección 5' del sitio 5' del cebador en la dirección 3'.

Un ejemplo de una secuencia de ácido nucleico diana adecuada para la detección de *C. difficile* toxigénico es la SEQ ID NO 26. Un ejemplo de una secuencia diana adecuada para la detección de *S. typhimurium* es la SEQ ID NO 31.

Se puede detectar más de una secuencia de ácido nucleico diana en un método de la invención proporcionando dos o más sondas de oligonucleótidos, cada una específica de una secuencia de ácido nucleico diana diferente. Normalmente, la unión de las sondas de oligonucleótidos a diferentes secuencias de ácidos nucleicos diana estará marcada con diferentes parejas de fluoróforos/inactivadores, permitiendo por tanto la multiplexación. Se pueden detectar al menos dos, tres, cuatro, cinco, diez o más secuencias diana diferentes. Se puede detectar más de una secuencia de ácido nucleico procedente del mismo organismo. Como alternativa, se pueden detectar secuencias de ácidos nucleicos diana específicas de al menos dos, tres, cuatro, cinco, diez o más genotipos, organismos o patógenos

diferentes.

Sonda de oligonucleótidos

5 La sonda de oligonucleótidos comprende una región complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana, un fluoróforo y un inactivador. La secuencia de la sonda de oligonucleótido comprende al menos un 20 % de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de ANP. En otras palabras, al menos un 20 % de los nucleótidos presentes en la sonda de oligonucleótidos son nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de ANP. El oligonucleótido puede comprender una mezcla de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de ANP, tal como una mezcla de nucleótidos de ARN y nucleótidos de ARN modificados.

10 Como alternativa, La secuencia de la sonda de oligonucleótidos comprende al menos un 20 % de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ADN y al menos un 20 % de nucleótidos de ARN modificados, o nucleótidos de ADN y al menos un 20 % de nucleótidos de ANP.

15 Más preferentemente, La secuencia de la sonda de oligonucleótidos comprende al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, o al menos un 90 % de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de ANP.

20 Cuando la sonda de oligonucleótidos tiene de 12 a 25 o de 15 a 25 nucleótidos de longitud, la sonda de oligonucleótidos comprende normalmente al menos 5 nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de ANP, más preferentemente al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de ANP. Una sonda de oligonucleótidos de hasta 20 nucleótidos de longitud (tal como 10 a 20 o 12 a 20 nucleótidos de longitud) comprende normalmente al menos 4 nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de ANP, más preferentemente al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o

25 al menos 10 nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de ANP. Una sonda de oligonucleótidos de 20 a 25 nucleótidos de longitud puede comprender al menos 12, al menos 15 o al menos 18 nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de ANP. Una sonda de oligonucleótidos de 8 a 12 nucleótidos de longitud puede comprender al menos 3, al menos 4 o al menos 6 nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de ANP. La secuencia de la sonda de oligonucleótidos comprende nucleótidos

30 de ARN suficientes, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de ANP para evitar una señal fluorescente de la sonda en presencia de una proteína capaz de unirse a un ADN monocatenario en ausencia de una secuencia molde complementaria.

35 En las realizaciones particularmente preferidas, la secuencia de nucleótidos de la sonda de oligonucleótidos está compuesta únicamente de ribonucleótidos (que pueden ser ribonucleótidos naturales o ribonucleótidos modificados) o únicamente de nucleótidos de ANP. La secuencia de nucleótidos de la sonda puede estar compuesta únicamente por ribonucleótidos naturales, únicamente ribonucleótidos modificados, o por una mezcla de ribonucleótidos naturales y modificados. La sonda de oligonucleótidos puede tener una estructura principal mixta de nucleótidos de ARN y nucleótidos de ANP o nucleótidos de ARN modificados y nucleótidos de ANP. Los ribonucleótidos modificados

40 preferidos incluyen 2'-fluoro ribonucleótidos, 2'-O-metil ribonucleótidos, y nucleótidos de ANB (ácido nucleico bloqueado), y combinaciones de los mismos. Cualquiera de los anteriores contenidos en porcentaje o cantidades mínimas de nucleótidos de ARN modificados pueden aplicarse de forma específica a la proporción de 2'-fluoro ribonucleótidos, 2'-O-metil ribonucleótidos, o nucleótidos de ANB en la sonda. Como alternativa, la sonda puede estar compuesta únicamente por 2'-fluoro ribonucleótidos, 2'-O-metil ribonucleótidos, o nucleótidos de ANB. Otros

45 ribonucleótidos modificados adecuados incluyen 2'-O-metoxi-etilo y otras sustituciones en 2'.

En algunas realizaciones, con la condición que la sonda de oligonucleótidos comprenda al menos un 20 % de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de ANP, puede comprender además desoxirribonucleótidos, que pueden ser desoxirribonucleótidos naturales o desoxirribonucleótidos modificados.

50 Cuando la sonda de oligonucleótidos tiene 25 nucleótidos de longitud o menos, esta comprende normalmente menos de 20, más preferentemente menos de 18, menos de 15, menos de 12, o menos de 10 desoxirribonucleótidos. La sonda de oligonucleótidos puede comprender 1 a 5, 1 a 8, 1 a 10, o 1 a 15 desoxirribonucleótidos. Cuando la sonda de oligonucleótidos comprende desoxirribonucleótidos o desoxirribonucleótidos modificados, estos pueden estar presentes en el extremo 5' y/o el extremo 3' de una secuencia de ribonucleótidos o ribonucleótidos modificados. La

55 sonda de oligonucleótidos puede por ejemplo comprender 1, 2, 3, 4 o 5 desoxirribonucleótidos o desoxirribonucleótidos en su extremo 5' y/o extremo 3'. Como alternativa, los desoxirribonucleótidos o desoxirribonucleótidos modificados pueden intercalarse en una secuencia de ribonucleótidos.

La sonda de oligonucleótidos tiene normalmente aproximadamente 8 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud.

60 La sonda tiene normalmente al menos 8 nucleótidos de longitud o menos de 30 nucleótidos de longitud, más preferentemente, menos de 25 nucleótidos de longitud. La sonda puede tener al menos 10, al menos 12, o al menos 15 nucleótidos de longitud. La sonda puede tener aproximadamente 10 a aproximadamente 20, aproximadamente 12 a aproximadamente 25, aproximadamente 15 a aproximadamente 25 o de aproximadamente 12 a aproximadamente 22 nucleótidos de longitud. La longitud de la sonda se selecciona de acuerdo con los requerimientos para la hibridación

65 específica o selectiva con una región de la secuencia diana en las condiciones utilizadas, y puede seleccionarse basándose en la longitud de los cebadores utilizados para la amplificación de la secuencia diana, como se analiza a

continuación.

La hibridación específica o selectiva se refiere a la unión de un oligonucleótido (por ejemplo, una sonda o cebador) solo a una secuencia de nucleótidos concreta en condiciones dadas, cuando esta secuencia está presente en un ácido nucleico en una muestra, tal como una mezcla biológica compleja incluyendo ADN o ARN celular y extraño total. Son conocidas en la técnica las condiciones de hibridación adecuadas. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsche y Maniatis "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press (1989). Se proporcionan también condiciones de hibridación adecuadas en los Ejemplos siguientes. Como saben los expertos en la materia, las condiciones de hibridación adecuadas pueden variar dependiendo de la longitud de una sonda y su composición básica. La hibridación se lleva a cabo normalmente a la misma temperatura que la amplificación, y por tanto dependen también del perfil de actividad de las enzimas usadas para la amplificación, incluyendo la polimerasa y la recombinasa según sea aplicable dependiendo del método de amplificación.

La secuencia de nucleótidos de la sonda puede ser parcial o completamente complementaria a una región de la secuencia de ácido nucleico diana. una sonda de oligonucleótidos de menos de 25 nucleótidos de longitud comprenderá normalmente una región de al menos 10, al menos 15 o al menos 20 nucleótidos de longitud que es complementaria a una región de la secuencia del ácido nucleico diana. La sonda de oligonucleótidos puede comprender además regiones flanqueantes de 1, 2, 3, 4, 5, 8 u 10 nucleótidos de longitud en 5' o 3' a la región complementaria que no son complementarias a la secuencia de ácido nucleico diana. La sonda de oligonucleótidos puede comprender un total de 1, 2, 3, 4, o 5, 8 o 10 nucleótidos en los extremos 5' y 3' que flanquean la secuencia complementaria, que no son complementarios a la secuencia de ácido nucleico diana. Dichas regiones flanqueantes pueden ser autocomplementarias, conduciendo a una estructura en horquilla.

Pueden estar presentes emparejamientos incorrectos entre la sonda de oligonucleótidos y la secuencia de ácido nucleico diana, en particular cuando la secuencia de ácido nucleico diana se amplifica usando cebadores en la dirección 5' y en la dirección 3' específicos de la secuencia diana. La unión de la sonda en combinación con la amplificación específica detectará específicamente la secuencia diana. Pueden existir 1, 2, 3, 4 o 5 emparejamientos incorrectos entre la región complementaria de la sonda de oligonucleótidos y la región correspondiente de la secuencia de ácido nucleico diana. Cualesquiera emparejamientos incorrectos en la secuencia de la sonda son preferentemente al menos 4, al menos 5, al menos 8 o al menos diez nucleótidos separados.

Preferentemente, se cree que la sonda es completamente complementaria con una región de la secuencia de ácido nucleico diana.

La sonda de oligonucleótidos puede tener una región de estructura secundaria cuya conformación se altera en la unión a la secuencia de ácido nucleico diana. Por tanto, la sonda de oligonucleótidos puede comprender un tallo en horquilla formado por regiones autocomplementarias en los extremos 5' y 3' de la sonda, y una región bucle que comprende la región de complementariedad con la secuencia diana. En dicha realización, el fluoróforo y el inactivador se localizan normalmente en los extremos 5' y 3' de la sonda, en estrecha proximidad entre sí en la región del tallo, de tal manera que la fluorescencia se inactiva en ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana. La sonda de oligonucleótidos puede ser una sonda de balizas moleculares. En otras realizaciones, la sonda de oligonucleótidos no tiene ninguna región de la estructura secundaria o no es una sonda de balizas moleculares.

La sonda de oligonucleótidos puede tener una sonda y una función de cebador. Por tanto, la sonda de oligonucleótidos puede ser capaz de cebar la amplificación de su secuencia de ácido nucleico diana. Una sonda de oligonucleótidos que actúa como un cebador puede estar compuesta únicamente por ARN, ARN modificado o ANP. Como alternativa, una sonda de oligonucleótidos que actúa como un cebador puede comprender 1 a 5, 1 a 8, 1 a 10, o 1 a 15 desoxirribonucleótidos. Una sonda de oligonucleótidos que actúa como un cebador puede comprender al menos un desoxirribonucleótido en su extremo 3', más preferentemente, al menos dos, o al menos tres desoxirribonucleótidos en su extremo 3'. La sonda de oligonucleótidos puede ser un cebador en la dirección 5' o en la dirección 3' para su secuencia de ácido nucleico diana. Una sonda de oligonucleótidos que tiene una función de cebador tendrá un extremo 3' libre y comprenderá uno o ambos del fluoróforo e inactivador en las posiciones internas en la secuencia de la sonda. Una sonda de oligonucleótidos que tiene una función de cebador puede tener un fluoróforo en el extremo 5' y un inactivador en una posición interna, o un inactivador en el extremo 3' y un fluoróforo en una posición interna. Se describe con más detalle a continuación el uso de una sonda de oligonucleótidos como un cebador.

La sonda de oligonucleótidos puede estar marcada con cualquier fluoróforo y cualquier inactivador. El fluoróforo y el inactivador se seleccionarán de tal manera que el espectro de absorción del inactivador se solape con el espectro de emisión del fluoróforo. El fluoróforo y el inactivador se seleccionarán y colocarán adicionalmente en la sonda de tal manera que, tras la hibridación con un molde diana, el fluoróforo produce un aumento en la señal debido a un efecto de inactivación reducido.

El inactivador puede ser no fluorescente, por ejemplo, un cromóforo no fluorescente. El inactivador puede ser un inactivador oscuro. Como alternativa, el inactivador puede fluorescer con un espectro de emisión diferente al del fluoróforo, de tal manera que cuando se controla específicamente la fluorescencia del fluoróforo o el inactivador, se puede notificar un cambio en cualquiera de las señales sobre la hibridación con el molde diana. el fluoróforo y el

- inactivador se colocan preferentemente en los extremos 5' y 3' de las sondas, en particular en realizaciones donde es indeseable la extensión dependiente de la polimerasa de la sonda. El fluoróforo puede localizarse en el extremo 5' y el inactivador en el extremo 3' de la sonda. Como alternativa, el inactivador puede localizarse en el extremo 5' y el fluoróforo en el extremo 3' de la sonda. El fluoróforo y/o el inactivador puede localizarse también en posiciones internas dentro de la sonda, tal como diez o menos nucleótidos lejos del extremo 5' o 3' de la sonda. Por ejemplo, en una sonda de menos de 25 nucleótidos de longitud, el fluoróforo o el inactivador puede localizarse 1 a 3, 1 a 5, 1 a 8 o 1 a 10 lejos del extremo 5' o 3' de la sonda. Preferentemente, solo uno del fluoróforo y el inactivador está en posición interna, con el otro miembro de la pareja en el extremo 5' o 3'.
- El fluoróforo y el inactivador se colocan normalmente al menos ocho nucleótidos separados en la secuencia de la sonda, Más preferentemente al menos diez o al menos doce nucleótidos separados, dependiendo de la longitud de la sonda. Cuando la sonda tiene 15 a 25 nucleótidos de longitud, el fluoróforo y el inactivador pueden estar al menos ocho, al menos diez, al menos doce, al menos quince o al menos veinte nucleótidos separados. El fluoróforo y el inactivador pueden localizarse en los extremos 5' y 3', y por tanto, la máxima distancia de separación que es posible en la sonda. La distancia entre el fluoróforo y el inactivador se seleccionará de tal manera que cuando la sonda se hibrida con la secuencia del ácido nucleico diana (en una conformación abierta o lineal), se reducirá la inactivación del fluoróforo por el inactivador, conduciendo a una señal detectable para la presencia de la secuencia del ácido nucleico diana. Se puede optimizar empíricamente una distancia adecuada entre el fluoróforo y el inactivador.
- El fluoróforo puede ser cualquier resto fluorescente, normalmente un colorante orgánico fluorescente. El inactivador puede ser cualquier resto que inactiva la fluorescencia del fluoróforo, y es normalmente una molécula cromógena, tal como un colorante orgánico. La persona experta es capaz de seleccionar parejas de fluoróforo-inactivador adecuadas para una sonda de oligonucleótidos basada en su conocimiento general común. Los emparejamientos adecuados se describen, por ejemplo, en las siguientes referencias: Marras SE: Selection of Fluorophore and Quencher Pairs for Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes. En: Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes. Editado por Didenko V, vol. 335: Humana Press; 2006: 3-16, y Didenko VV: DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. Biotechniques 2001, 31(5): 1106-1116, 1118, 1120-1101.
- Los fluoróforos adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, fluoresceína y derivados de fluoresceína, tal como carboxifluoresceínas (FAM, incluyendo 6-FAM, 5-FAM, dT FAM), VIC, hexacloro-6-carboxifluoresceína (HEX), y JOE, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), cumarina y derivados de cumarina tales como 3-fenil-7-isocianatocumarina, amarillo Lucifer, NED, rojo Texas, tetrametilrodamina, carboxitetrametilrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 5 carboxirodamina, N-(p-2-benzoxazolil)fenil)maleimida, colorantes de cianina tales como CY5, colorantes de rodamina, colorantes de xanteno, naftilaminas, acridinas, benzoxadiazoles, estilbenos, y pirenos.
- Los inactivadores adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, DABSYL, ácido 4'-(4-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL), 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-maleimida (DABMI), tetrametilrodamina, carboxitetrametilrodamina (TAMRA), Inactivador Black Hole 1, Inactivador Black Hole 2, Inactivador Dark 1, Inactivador Dark 2, Negro Iowa RQ, Negro Iowa FQ.
- Los emparejamientos de fluoróforo/inactivador preferidos incluyen:
- TAMRA e Inactivador Black Hole 2;
 - ROX e Inactivador Black Hole 2;
 - ROX y DABCYL;
 - FAM (tal como dT-FAM) y negro Iowa FQ;
 - FAM (tal como dT-FAM) y DABCYL;
 - ROX y Negro Iowa FQ;
 - CY5 y negro Iowa RQ.
- El fluoróforo y el inactivador se unen normalmente de forma covalente a la sonda. El fluoróforo y el inactivador se pueden unir mediante cualquier enlazador adecuada a uno o más nucleótidos presentes en la secuencia de la sonda. La persona experta es capaz de seleccionar cualquier enlazador adecuado basado en su conocimiento general común. Los enlazadores adecuados se describen por ejemplo en Agrawal S (ed.): Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties: Humana Press; 1993.
- Las sondas de oligonucleótidos concretas proporcionadas en el presente documento son complementarias con las secuencias de ácidos nucleicos diana en *C. difficile* toxigénico y *S. typhimurium*. Los ejemplos preferidos de dichas sondas son las SEQ ID NOS 24 y 25 para *C. difficile* toxigénico y la SEQ ID NO: 30 para *S. typhimurium*. El método de la invención puede usar también las sondas y las sondas-cebadores de las SEQ ID NOS 3 a 10, 17 a 19, 32, 35 a 43 y 48.
- Las variantes de las SEQ ID NOS 3 a 10, 17 a 19, 24, 25, 30, 32, 35 a 43 y 48 pueden también utilizarse en el método de la invención. Las variantes de 3 a 10, 17 a 19, 24, 25, 30, 32, 35 a 43 y 48 incluyen sondas que tienen una secuencia de nucleótidos correspondiente con la de la sonda original pero que comprenden un fluoróforo y/o un inactivador alternativo. Las anteriores variantes pueden comprender cualquier pareja de fluoróforo inactivador adecuada de los fluoróforos e inactivadores descritos en el presente documento.

Las variantes de las SEQ ID NOS 3 a 10, 17 a 19, 24, 25, 30, 32, 35 a 43 y 48 pueden tener también una secuencia de nucleótidos correspondiente a la de la sonda original compuesta de un modelo diferente de ribonucleótidos naturales, ribonucleótidos modificados o nucleótidos de ANP. Por ejemplo, las sondas originales de las SEQ ID NOS 5 24, 25 y 30 están compuestas de 2'-fluoro ribonucleótidos. Las secuencia de nucleótidos de las variantes de las mismas pueden comprender o estar compuestas únicamente por ribonucleótidos naturales. Las variantes adicionales de los mismos pueden comprender ribonucleótidos modificados alternativos en lugar de 2'-fluoro ribonucleótidos, o una mezcla de ribonucleótidos naturales y modificados. Los ribonucleótidos modificados alternativos preferidos incluyen 2'-O-metil ribonucleótidos y nucleótidos de ANB (ácido nucleico bloqueado). Por tanto, por ejemplo, las 10 variantes de las SEQ ID NOS 24, 25 y 30 pueden estar compuestas de 2'-fluoro ribonucleótidos y 1 a 8, 1 a 5 o 1 a 3 ribonucleótidos naturales, o 2'-fluoro ribonucleótidos y 1 a 8, 1 a 5 o 1 a 3 2'-O-metil ribonucleótidos. Las variantes de las SEQ ID NOS 24, 25 y 30 pueden comprender al menos un 20 % de los nucleótidos de ANB o ANP, o estar compuestas únicamente de los nucleótidos de ANB y ANP correspondientes.

15 Las variantes de las sondas pueden ser también sondas quiméricas que comprenden 1 a 10, 1 a 5 o 1 a 3 desoxirribonucleótidos o desoxirribonucleótidos modificados en lugar de los ribonucleótidos o los nucleótidos de ANP correspondientes en la secuencia de las SEQ ID NOS 3 a 10, 17 a 19, 24, 25, 30, 32 y 35 a 43. El método de la invención puede usar también una variante de la sonda de ADN de la SEQ ID NO: 16 que comprende al menos un 20 % de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de ANP.

20 Las variantes de las SEQ ID NOS 3 a 10, 17 a 19, 24, 25, 30, 32, 35 a 43 y 48 pueden ser también oligonucleótidos de menos de 25 nucleótidos de longitud que comprenden una región que es parcial o completamente complementaria con al menos ocho nucleótidos contiguos de la secuencia de la sonda original correspondiente. Preferentemente, dichas variantes comprenderán una región que es parcial o completamente complementaria con al menos nueve, al 25 menos diez, al menos doce o al menos catorce nucleótidos contiguos de la secuencia de la sonda original correspondiente. Las anteriores variantes pueden comprender una región que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 emparejamientos incorrectos (sustituciones) con respecto a la región correspondiente de la secuencia de la sonda original (y por tanto, la secuencia diana) y por tanto, es parcialmente complementaria a la anterior. Por tanto, por ejemplo, las variantes pueden comprender una región de al menos doce nucleótidos de longitud que tiene 1, 2, o 3 emparejamientos 30 incorrectos con una región correspondiente de al menos doce nucleótidos de la secuencia de la sonda original. Cualesquiera emparejamientos son preferentemente al menos 4, al menos 5 o al menos 8 nucleótidos separados.

Las variantes de las SEQ ID NOS 3 a 10, 17 a 19, 24, 25, 30 y 32 pueden ser también oligonucleótidos de menos de 25 nucleótidos de longitud que tienen al menos un 70 % de identidad de la secuencia con la secuencia de la secuencia 35 de la sonda original correspondiente, preferentemente al menos un 75 %, al menos un 80 %, más preferentemente al menos del 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % de identidad de la secuencia.

Las anteriores variantes de sondas pueden comprender regiones flanqueantes en 5' y/o 3' en la región que es parcial o completamente complementaria a la sonda original. Las regiones flanqueantes en 5' y/o 3' pueden comprender una 40 secuencia que no es complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana, o la secuencia complementaria en las regiones que flanquean la región de unión de la sonda original en la secuencia de nucleótidos diana. Por ejemplo, en las variantes de las SEQ ID NO: 24, 25 y 30, la región flanqueante en 5' puede comprender una secuencia de 1-10 o 1-5 nucleótidos de longitud que es complementaria con los 1-10 o 1-5 nucleótidos que están en posición 5' con la región de unión de la sonda en la secuencia de ácido nucleico relevante de la SEQ ID NO:26 o la SEQ ID NO:31.

45 *Detección de la señal*

Se puede llevar a cabo la detección de la señal de la sonda mediante cualquier medio adecuado para la detección de la fluorescencia. La sonda se puede usar para detectar la secuencia de ácido nucleico diana sin ninguna amplificación 50 anterior del ADN. Más normalmente, la sonda se usa para detectar la secuencia de ácido nucleico diana después o durante la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana. Preferentemente, la señal de la sonda se controla en tiempo real junto con la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana.

Se puede detectar una única señal de una sonda para una única secuencia diana. Como alternativa, las sondas que 55 detectan diferentes secuencias diana se pueden usar con cada señal a diferentes longitudes de onda fluorescentes para proporcionar detección multiplexada. Se pueden usar dos o más, tales como tres, cuatro, cinco, seis, ocho, diez o más sondas diferentes para la detección multiplexada de varias secuencias diana diferentes en una única reacción.

60 Los colorantes que se intercalan con ADN amplificado se pueden usar también en paralelo con la(s) sonda(s) de oligonucleótidos para detectar la amplificación del ADN, tales como el verde SYBR y el naranja de tiazol.

Las sondas de oligonucleótidos de ADN para las mismas o secuencias diana alternativas se pueden usar también en 65 paralelo con la(s) sonda(s) de oligonucleótidos.

La invención proporciona también un medio para potenciar la señal procedente de la sonda. La muestra en la que se

va a llevar a cabo la detección de la secuencia de ácido nucleico diana puede ponerse en contacto con una enzima ARNasa H, tal como ARNasa H2. Una enzima ARNasa H2 preferida es la ARNasa H2 de *Thermococcus gammatolerans*. Tal como se muestra por los inventores, una enzima ARNasa H es capaz de potenciar la señal de una sonda. Se cree que la enzima ARNasa H escinde el duplete formado en la hibridación de la sonda de oligonucleótidos con la secuencia de ácido nucleico diana, dando como resultado por tanto una inactivación reducida.

Más en general, la muestra se puede poner en contacto con cualquier nucleasa capaz de degradar específicamente el duplete de sonda de oligonucleótidos/secuencia de ácido nucleico diana.

10 *Amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana*

15 Cuando el método de la invención comprende la amplificación de la secuencia del ácido nucleico diana, se puede usar cualquier método adecuado de amplificación del ADN. Normalmente, la amplificación del ADN se lleva a cabo en condiciones isotermas. El método de amplificación del ADN puede comprender la amplificación basada en invasión de hebra, amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación de polimerasa recombinasa (RPA). Se prefiere la amplificación basada en invasión de hebra (SIBA). Los métodos de amplificación anteriores requieren la presencia de una proteína capaz de unirse a un ADN monocatenario, y por tanto, la sonda de oligonucleótidos de la invención permite de forma conveniente la detección de la amplificación en dichos métodos.

20 La presente invención proporciona por tanto un método para la detección de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra en presencia de al menos una proteína capaz de unirse a un ADN monocatenario, que comprende poner en contacto dicha muestra con una sonda de oligonucleótidos como se ha descrito anteriormente que promueve la amplificación de dicha secuencia de ácido nucleico diana.

25 Dichas condiciones comprenden normalmente la presencia de uno o más cebadores y una enzima ADN polimerasa. La persona experta será capaz de seleccionar cebadores adecuados para una secuencia diana concreta dependiendo del tipo de ADN polimerasa que se va a usar. Cuando la ADN polimerasa es una enzima RCA (tal como phi29) se pueden usar cebadores aleatorios o una única especie de cebador que amplifica la secuencia de ácido nucleico diana. Más normalmente, las condiciones de amplificación comprenderán la presencia de un cebador en la dirección 5' y un cebador en la dirección 3' para la secuencia de ácido nucleico diana.

30 Como se ha analizado anteriormente, la sonda de oligonucleótidos puede proporcionar una función de cebador y, por tanto, las condiciones de amplificación pueden comprender la presencia de una sonda de oligonucleótidos que actúa como un cebador en la dirección 3' y un cebador en la dirección 5' separado (y opcionalmente, ningún otro cebador(es) en la dirección 3') o la presencia de una sonda de oligonucleótidos que actúa como un cebador en la dirección 5' y un cebador en la dirección 3' separado (y opcionalmente, ningún otros cebador(es) en la dirección 5').

40 Cuando se usa SIBA, las condiciones comprenden además la presencia de un oligonucleótido de invasión de hebra. se describen con más detalle a continuación las características de los cebadores preferidos y de los oligonucleótidos de invasión de hebra para la amplificación de SIBA.

45 Las condiciones adecuadas para la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana comprenden además cualesquiera condiciones para proporcionar la actividad de las enzimas polimerasa conocidas en la técnica. las condiciones incluyen normalmente la presencia de cuatro dNTP, dATP, dTTP, dCTP y dGTP o los análogos de los mismos, los agentes tamponantes/pH adecuados y otros factores que se requieren para el rendimiento o la estabilidad enzimática. Las condiciones pueden incluir la presencia de detergentes y agentes estabilizantes. La temperatura usada es normalmente isotérmica, es decir, constante a través del proceso de amplificación. La temperatura usada depende normalmente de la naturaleza de la enzima polimerasa y otros componentes enzimáticos, y refleja también la temperatura de hibridación requerida para los cebadores y los oligonucleótidos de invasión de hebra.

50 La polimerasa usada normalmente tiene actividad de desplazamiento de hebra. La expresión "desplazamiento de hebra" se usa en el presente documento para describir la capacidad de una ADN polimerasa, opcionalmente junto con proteínas accesorias, para desplazar hebras complementarias o encontrar una región de ADN bicatenario durante la síntesis de ADN. Las ADN polimerasas adecuadas incluyen poll de *E. coli*, *B. subtilis*, o *B. stearothermophilus*, y fragmentos o variantes funcionales de la misma, y las ADN polimerasas T4 y T7 y los fragmentos o variantes funcionales de la misma. Una polimerasa preferida es la ADN polimerasa Bsu o un fragmento o variante funcional de la misma.

55 Las condiciones de amplificación comprende la presencia de una proteína capaz de unirse a ADN monocatenario. La proteína capaz de unirse a ADN monocatenario puede ser cualquier proteína que produzca un cambio en la señal fluorescente de una sonda de oligonucleótidos marcada con un fluoróforo y un inactivador en ausencia de un molde complementario, y que se pueda unir a un ADN monocatenario. La proteína puede ser cualquier proteína de unión monocatenaria (SSB) o cualquier proteína que sea capaz de unirse a A>DN monocatenario y tenga también otra actividad funcional. La proteína capaz de unirse a ADN monocatenario puede ser una recombinasa o una proteína o cofactor recombinasa accesorio. La proteína capaz de unirse a una proteína monocatenaria puede ser mesófila o termófila.

Las condiciones de amplificación comprenden la presencia de una recombinasa. Se puede usar cualquier sistema de recombinasa en el método de la invención. El sistema de recombinasa puede ser de origen procariota o eucariota, y puede ser bacteriano, de levadura, fago, o mamífero. La recombinasa puede polimerizar sobre un oligonucleótido monocatenario en la dirección 5'-3' o 3'-5. la recombinasa puede derivarse de un fago de myoviridae, tal como T4, T2, T6, Rb69, Aeh1, KVP40, fago 133 de Acinetobacter, fago 65 de Aeromonas, cianofago P-SSM2, cianofago PSSM4, cianofago S-PM2, Rbl4, Rb32, fago 25 de Aeromonas, fago nt-1 de Vibrio, phi-1, Rbl6, Rb43, Fago 31, fago 44RR2.8t, Rb49, fago Rb3, o fago LZ2. En una realización preferida, se usa la recombinasa UvsX de T4 (número de registro: P04529) o una variante o fragmento funcional de la misma. Se pueden usar también los sistemas Rad de eucariotas o el sistema recA-Reco de *E. coli* u otros sistemas procariotas. la recombinasa puede ser RecA de *E. coli*.

Las condiciones pueden comprender además la presencia de proteínas recombinasa accesorias, tal como una proteína de unión monocatenaria (por ejemplo, T4 gp32, número de registro P03695) y un agente de carga de recombinasa (por ejemplo UvsY, número de registro NP_049799.2). En una realización preferida, las condiciones comprende la presencia de las proteínas T4 gp32, UvsX y UvsY. La recombinasa (tal como UvsX), y cuando se usa el agente de carga de la recombinasa (tal como UvsY) y una proteína de unión a ADN monocatenario (tal como gp32), pueden ser cada uno proteínas nativas, híbridas o mutantes de la misma fuente o de fuentes diferentes de fagos de myoviridae. Una proteína nativa puede ser una proteína natural o una variante natural.

La proteína capaz de unirse a ADN monocatenario puede ser alternativamente cualquier proteína utilizada para proporcionar actividad de unión monocatenaria en un método de amplificación del ADN. El método de amplificación puede ser la PCR. La proteína capaz de unirse a ADN monocatenario puede ser la proteína de unión a ADN monocatenario termoestable extrema (ET-SSB), que se puede obtener de New England Biolabs.

Las condiciones pueden comprender además otros factores utilizados para potenciar la eficacia de la recombinasa tales como los compuestos utilizados para controlar las interacciones del ADN, por ejemplo, prolina, DMSO o agentes aglomerantes que son conocidos por potenciar la carga de recombinasas sobre el ADN (Lavery P. et al. J. Biol. Chem. 1992, 267, (13), 9307-9314).

Las condiciones pueden comprender también la presencia de un sistema de regeneración del ATP. Las personas expertas en la materia conocen varios sistemas de regeneración del ATP, e incluyen enzimas glicolíticas. Los componentes adecuados de un sistema de regeneración del ATP pueden incluir uno o más de fosfocreatina, creatina quinasa, mioquinasa, pirofosfatasa, sacarosa y sacarosa fosforilasa. Las condiciones pueden comprender además la presencia de ATP.

Componentes adicionales tales como iones magnesio, Se pueden incluir también DTT u otros agentes reductores, sales, BSA/PEG u otros agentes aglomerantes.

Los diversos componentes descritos anteriormente pueden proporcionarse en concentraciones variables para proporcionar la amplificación del ADN. La persona experta en la materia puede proporcionar concentraciones de trabajo adecuadas de los diversos componentes en la práctica. Cuando la sonda de oligonucleótidos se solapa con la secuencia del cebador en la dirección 5' o en la dirección 3', se puede minimizar cualquier competición observada entre la unión del cebador y la sonda utilizando tanto una concentración menor de sonda como una sonda con una región reducida de solapamiento, tal como una sonda cuya longitud es más corta que el cebador inverso desde el extremo 3'.

Amplificación basada en invasión de hebra (SIBA)

Se describen a continuación las características del método preferido para la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana, SIBA. La invención proporciona un método para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra en presencia de al menos una proteína capaz de unirse a un ADN monocatenario, que comprende poner en contacto dicha muestra con al menos una sonda de oligonucleótidos como se describe en el presente documento, al menos un cebador en la dirección 5', al menos un cebador en la dirección 3', al menos un oligonucleótido de invasión de hebra en condiciones que promuevan la amplificación de dicha secuencia de ácido nucleico diana y al menos una de dichas proteínas capaces de unirse a un ADN monocatenario es una recombinasa. Como se ha analizado anteriormente, La sonda de oligonucleótidos puede actuar por sí misma como el cebador en la dirección 5' o el cebador en la dirección 3', o se proporcionan alternativamente por separado cebadores en la dirección 5' y en la dirección 3' en combinación con la sonda de oligonucleótidos. Cada dicho cebador, dicha sonda y dicho oligonucleótido de invasión de hebra comprende una región complementaria a dicha secuencia de ácido nucleico diana. El oligonucleótido de invasión de hebra convierte al menos una porción de la secuencia monocatenaria de ácido nucleico diana para permitir la unión de cada dicho cebador y dicha sonda.

Cebadores para SIBA

Los cebadores en la dirección 5' y en la dirección 3' adecuados se seleccionan basándose en la secuencia de ácido nucleico diana de interés, y teniendo en consideración el sitio de unión del oligonucleótido de invasión de hebra que

- convierte al menos una porción de la secuencia monocatenaria de ácido nucleico diana para permitir la unión del cebador en la dirección 5' y el cebador en la dirección 3'. Los cebadores en la dirección 5' y en la dirección 3' comprenden una secuencia que es parcial o completamente complementaria a la diana y opcionalmente, una secuencia no complementaria flanqueante en 5' y/o 3'. Como alternativa, los cebadores en la dirección 5' y en la dirección 3' pueden consistir completamente en una secuencia parcial o completamente complementaria a la diana. la longitud de la secuencia del cebador que es complementaria con la diana es suficiente para proporcionar una hibridación específica con la secuencia de ácido nucleico diana. La longitud de la secuencia complementaria es normalmente de al menos 10 nucleótidos, más preferentemente al menos 15, al menos 16, o al menos 17 nucleótidos. La longitud de la secuencia complementaria puede ser de 10-25, 15-25, 10-30 o 15-30 nucleótidos.
- Debe entenderse que las longitudes anteriores de la secuencia se refieren a las porciones de los cebadores que pueden ser parcial o completamente complementarias con la secuencia de ácido nucleico diana. pueden estar presentes emparejamientos incorrectos entre los cebadores y la secuencia diana en posiciones concretas permitiendo además a la vez la amplificación y detección específicas de la secuencia diana, en particular, teniendo en cuenta el uso combinado de cebadores en la dirección 5' y en la dirección 3' y un oligonucleótido de invasión de hebra para conseguir la amplificación. Puede haber 1, 2, 3, 4 o 5 emparejamientos incorrectos entre la región complementaria del cebador y la región correspondiente de la secuencia diana.
- Normalmente el cebador en la dirección 5' y el cebador en la dirección 3' tendrán menos de 30 nucleótidos de longitud total, más preferentemente, menos de 25 nucleótidos de longitud, tal como de 15 a 25 o de 15 a 23 nucleótidos de longitud. Se prefiere particularmente que los cebadores de menos de 30 nucleótidos de longitud se use cuando se usa una recombinasa para la invasión de hebra. Dichos cebadores no son capaces de actuar como sustratos para las recombinasas.
- El cebador en la dirección 5' (o directo) se une a la región 5' de una hebra de la secuencia de ácido nucleico diana duplete, en la posición proximal o solapándose con el sitio de unión a 5' del oligonucleótido de invasión de hebra. El cebador en la dirección 3' (o inverso) se une a la región 5' de la hebra opuesta de la secuencia de ácido nucleico diana duplete del cebador en la dirección 5', en la posición proximal o solapándose con el sitio de unión a 3' del oligonucleótido de invasión de hebra. Los sitios de unión en 5' de los cebadores en la dirección 5' y en la dirección 3' tienen normalmente al menos 45 nucleótidos, más preferentemente al menos 50, al menos 55 o al menos 60 nucleótidos separados de la secuencia diana duplete.
- El cebador en la dirección 5' y/o en la dirección 3' puede tener una región de solapamiento de secuencia con la secuencia del oligonucleótido de invasión de hebra. La región de solapamiento de secuencia tiene normalmente 1-8 nucleótidos de longitud, y puede tener al menos 5 o al menos 6 nucleótidos de longitud. El cebador en la dirección 3' puede tener también una región de solapamiento de secuencia de 1-8 nucleótidos de longitud con la secuencia del oligonucleótido de invasión de hebra. Como alternativa, puede no existir solapamiento de secuencia entre el cebador en la dirección 5' y/o en la dirección 3' del oligonucleótido de invasión de hebra, uniéndose el cebador a su vez en una posición que es próxima a la secuencia diana en el sitio de unión del oligonucleótido de invasión de hebra.
- Cuando un cebador se une próximo al oligonucleótido de invasión de hebra, existen normalmente 25 nucleótidos o menos, más preferentemente 20 nucleótidos o menos, 15 nucleótidos o menos, o 10 nucleótidos o menos entre el sitio de unión relevante del oligonucleótido de invasión de hebra y el extremo 5' del cebador. Esto asegura que el cebador es capaz de hibridarse a la región monocatenaria creada mediante la unión del oligonucleótido de invasión de hebra.
- Preferentemente, se diseña cada cebador para permitir la detección específica de una secuencia concreta de ácido nucleico diana, tal como un genotipo concreto, o una secuencia de ácido nucleico presente en una diana concreta, tal como un organismo concreto o un patógeno concreto. Por tanto, cada cebador se hibrida normalmente específica o selectivamente con una secuencia complementaria que se encuentra solo en la diana. Sin embargo, cada cebador puede también hibridarse con otras secuencias, tales como las secuencias que se encuentran en otras especies, con la condición de que cuando se usan en combinación con el segundo cebador, el oligonucleótido de invasión de hebra y la sonda de oligonucleótidos, se obtenga la detección específica de la secuencia de ácido nucleico diana.
- Se proporcionan en el presente documentos ejemplos específicos de cebadores en la dirección 5' y en la dirección 3' adecuados para la amplificación de secuencias de nucleótidos diana en *C. difficile* toxigénico y *S. typhimurium*. El método de la invención puede usar los cebadores de las SEQ ID NOS 21 y 22 o las variantes de los mismos para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana de *C. difficile* toxigénico (tal como la SEQ ID NO: 26) y los cebadores de las SEQ ID NOS 27 y 28 o las variantes de los mismos para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana de *S. typhimurium* (tal como la SEQ ID NO: 31).
- Las variantes de las SEQ ID NOS 21, 22, 27 y 28 pueden ser también oligonucleótidos de hasta 30 nucleótidos de longitud que comprenden una región que es parcial o completamente complementaria con al menos 10 nucleótidos contiguos de la secuencia de la un cebador original correspondiente de la SEQ ID NO: 21, 22, 27 y 28. Preferentemente, dichas variantes comprenderán una región que es parcial o completamente complementaria con al menos 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos contiguos de la secuencia del cebador original correspondiente de SEQ ID NO: 21, 22, 27 y 28. Donde la secuencia del cebador original es más larga de 16 nucleótidos de longitud, tal como hasta

21 nucleótidos de longitud (por ejemplo, SEQ ID NO: 21) las variantes pueden comprender de forma correspondiente una región que es parcial o completamente complementaria a los nucleótidos 16, 17, 18, 19 o 20 contiguos de la misma.

5 Las anteriores variantes pueden comprender una región que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 emparejamientos incorrectos (sustituciones) con respecto a la región correspondiente de la secuencia del cebador original (y por tanto, la secuencia diana) y por tanto, es parcialmente complementaria a la anterior. Por tanto, por ejemplo, las variantes pueden comprender una región de al menos 10 nucleótidos de longitud que tiene 1, 2, o 3 emparejamientos incorrectos, tal como 1 o 2 emparejamientos incorrectos con una región correspondiente de al menos diez nucleótidos contiguos de la secuencia del cebador original correspondiente. Las variantes pueden comprender una región de al menos 13, 14 o 15 nucleótidos de longitud que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 emparejamientos incorrectos, tal como 1-3 emparejamientos incorrectos con una región correspondiente de una longitud equivalente en la secuencia del cebador original correspondiente. Cualesquiera emparejamientos incorrectos en la secuencia de la variante de un cebador puede tener al menos 2, al menos 4, al menos 5 o al menos 10 nucleótidos separados.

15 Como alternativa, Las variantes pueden comprender una región de al menos 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos de longitud que es completamente complementaria con la secuencia del cebador original.

20 Las variantes de las SEQ ID NOS 21, 22, 27 y 28 pueden ser también oligonucleótidos de menos hasta 30 nucleótidos de longitud que tienen al menos un 70 % de identidad de la secuencia con la secuencia de la secuencia del cebador original correspondiente, preferentemente al menos un 75 %, al menos un 80 %, más preferentemente al menos del 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % de identidad de secuencia.

25 Adicionalmente, las variantes de cebadores pueden comprender secuencia(s) de nucleótidos flanqueantes en 5' y/o 3' en la región que es parcial o completamente complementaria con la secuencia del cebador original. Las secuencia(s) flanqueantes en 5' y/o 3' pueden ser no complementarias con la secuencia de ácido nucleico diana, o pueden ser complementarias en la secuencia con las regiones que flanquean la región de unión del cebador original en la secuencia de ácido nucleico diana, tal como en los 5-10 nucleótidos 5' y/o 3' de la región del cebador original en la secuencia de ácido nucleico diana.

30 *Oligonucleótido de invasión de hebra para SIBA*

35 Un oligonucleótido de invasión de hebra adecuado se selecciona basándose en la secuencia de ácido nucleico diana de interés, y teniendo en cuenta el sitio de unión de los cebadores en la dirección 5' y los cebadores en la dirección 3' y el requerimiento del oligonucleótido de invasión de hebra para hacer que la secuencia de ácido nucleico diana monocatenaria en las regiones relevantes permita la unión del cebador en la dirección 5' y el cebador en la dirección 3'.

40 El oligonucleótido de invasión de hebra comprende una secuencia que es complementaria con la diana y opcionalmente secuencia(s) no complementarias flanqueantes adicionales. La persona experta puede determinar la longitud de la secuencia que es complementaria con la diana de forma empírica y es suficiente para proporcionar una invasión de hebra eficaz de la secuencia de ácido nucleico diana, opcionalmente en condiciones isotermas. La secuencia complementaria puede comprender un emparejamiento de bases complementarias de ARN-ADN y nucleótidos modificados. Normalmente, la longitud de la secuencia complementaria es al menos de 25 o al menos de 27 nucleótidos, normalmente al menos 30 nucleótidos, tal como al menos 32, al menos 33 o al menos 35 nucleótidos, más preferentemente al menos 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos de longitud o más. La longitud de la secuencia complementaria puede ser de 30-50, 32-50, 35-50, 40-50, 35 a 48, 35 a 46, 38 a 45, o 40 a 45 nucleótidos de longitud.

50 Debe entenderse que las longitudes anteriores de la secuencia se refieren a una porción del oligonucleótido de invasión de hebra que pueden ser parcial o completamente complementarias con la secuencia de ácido nucleico diana. pueden estar presentes emparejamientos incorrectos en el oligonucleótido de invasión de hebra y la secuencia diana en posiciones concretas permitiendo además a la vez la amplificación y detección específicas de la secuencia diana, en particular, teniendo en cuenta el uso combinado de cebadores en la dirección 5' y en la dirección 3' y un oligonucleótido de invasión de hebra para conseguir la amplificación. Puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 emparejamientos incorrectos entre la región complementaria del oligonucleótido de invasión de hebra y la región correspondiente de la secuencia diana, dependiendo de la longitud total de la secuencia complementaria.

55 La secuencia complementaria del oligonucleótido de invasión de hebra se hibrida con una porción de la secuencia diana que interviene las regiones de unión de los cebadores en la dirección 5' y en la dirección 3' (y normalmente solapándose con una o más de las mismas). El oligonucleótido de invasión de hebra puede tener una región de solapamiento de 1-8 nucleótidos, tal como una región de al menos 5 o al menos 6 nucleótidos de longitud, con los cebadores en la dirección 5' y/o en la dirección 3'. La porción 5' de la secuencia complementaria del oligonucleótido de invasión de hebra se une normalmente en 25 nucleótidos o menos, más preferentemente 20 nucleótidos o menos desde el límite en 5' de la secuencia de nucleótidos diana duplete que se va a fundir (el amplicón).

65 El oligonucleótido de invasión de hebra comprende además opcionalmente región(ones) no complementarias con la diana que flanquea la región de la secuencia complementaria. El oligonucleótido de invasión de hebra puede

comprender una región 5' no complementaria que puede ser de cualquier secuencia de nucleótidos. La región 5' no complementaria tiene normalmente al menos 3 nucleótidos de longitud, más normalmente al menos 6, al menos 8, preferentemente al menos 10, al menos 12 o al menos 14 nucleótidos de longitud. La región 5' no complementaria puede ayudar a la unión de la recombinasa. El oligonucleótido de invasión de hebra puede comprender una región 3' no complementaria normalmente de 1-3 nucleótidos de longitud que comprende nucleótidos que bloquean la extensión de la polimerasa tales como invdT.

El oligonucleótido de invasión de hebra tiene normalmente al menos 30 nucleótidos de longitud cuando se usa una recombinasa junto con el oligonucleótido. El oligonucleótido de invasión de hebra tiene preferentemente al menos 35, al menos 40 o al menos 45 nucleótidos de longitud, más preferentemente al menos 50, y puede tener al menos 55 nucleótidos de longitud o más. el oligonucleótido de invasión de hebra puede tener 40-70, 45-70, 45-70, 50-70, 55-70, 45-65, 50-65, 50-60 o 55-65 nucleótidos de longitud.

Normalmente, el oligonucleótido de invasión de hebra tiene un extremo 3' no extensible, de tal manera que no puede servir como sustrato para la amplificación del ADN, y la secuencia diana se amplifica a continuación solo en la unión adicional de los cebadores específicos en la dirección 5' y en la dirección 3'. Esto evita la formación de productos de amplificación no específicos. El oligonucleótido de invasión de hebra puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más nucleótidos modificados en su región 3', tal como en los 10-15 o 10-20 nucleótidos del extremo 3'. El oligonucleótido de invasión de hebra puede comprender una modificación 3' del nucleótido del extremo 3' y puede ser un didesoxinucleótido, o comprende un grupo 3'amino-alilo, un separador 3'carbono, 3'fosfato, 3'biotina, 3'sialilo, o 3'tiol. El nucleótido 3' puede ser un nucleótido incorporado en una orientación inversa mediante un enlace 3'-3'. Como alternativa o además, la región 3' del oligonucleótido de invasión de hebra puede comprender nucleótidos con mala capacidad de sustrato para las ADN polimerasas, tal como nucleótidos de ANP (ácido nucleico peptídico), ANB (ácido nucleico bloqueado), ADN unido a 2'-5' o 2'-O-metil ARN, o combinaciones de los mismos.

Cuando el oligonucleótido de invasión de hebra es un oligómero de ANP comprendido completamente por ANP, dicho oligonucleótido puede desestabilizar e invadir el ADN duplete en ausencia de una enzima recombinasa. Por tanto, cuando se usa un oligonucleótido de ANP, se pueden llevar a cabo los métodos de la divulgación sin presencia de una enzima recombinasa.

Se proporcionan en el presente documento ejemplos específicos de oligonucleótidos de invasión de hebra adecuados para las secuencias de nucleótidos diana en *C. difficile* toxigénico y *S. typhimurium*. El método de la invención puede usar el oligonucleótido de invasión de hebra de la SEQ ID NO: 23 o un derivado o variante modificada del mismo para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana de *C. difficile* toxigénico (tal como la SEQ ID NO: 26) y el oligonucleótido de invasión de hebra de la SEQ ID NO 29 o un derivado o variante modificada del mismo para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana de *S. typhimurium* (tal como la SEQ ID NO: 31).

Como se ha analizado anteriormente, se prefiere que el oligonucleótido de invasión de hebra usado en la invención comprenda uno o más oligonucleótidos modificados en su región 3' para bloquear su uso como un sustrato de la polimerasa. Por tanto, Un derivado modificado de la SEQ ID NO: 23 o 29 puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más nucleótidos modificados en su región 3', normalmente en los 10-15 o 10-20 nucleótidos del extremo 3'. Se pueden seleccionar las modificaciones a partir de cualquiera de las descritas anteriormente. El derivado modificado puede ser un oligómero de ANP de la secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 23 o 29.

Las variantes de las SEQ ID NOS 23 y 29 son normalmente oligonucleótidos de más de 30 nucleótidos, más preferentemente al menos 35, al menos 40, o al menos 45 nucleótidos de longitud, que comprende una región que es parcial o completamente complementaria con al menos 30 nucleótidos contiguos de la secuencia complementaria de la diana original correspondiente de la SEQ ID NO: 23 o 29. Preferentemente, dichas variantes comprenderán una región que es parcial o completamente complementaria con al menos 32 35, 37, 40, 42 o 45 nucleótidos contiguos de la secuencia complementaria de la diana presente en la SEQ ID NO: 23 o 29.

Las anteriores variantes pueden comprender una región que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 emparejamientos incorrectos (sustituciones) con respecto a la región complementaria de la diana correspondiente del oligonucleótido de invasión de hebra original de la SEQ ID NO: 23 o 29 (y por tanto, la secuencia diana) y por tanto, es parcialmente complementaria a la anterior. Por tanto, por ejemplo, Las variantes pueden comprender una región de al menos o 30 nucleótidos de longitud que tiene 1, 2, 3, o 4, tal como 1-4 o 1-3 emparejamientos incorrectos con una región correspondiente de al menos 40 nucleótidos contiguos del oligonucleótido de invasión de hebra original correspondiente. Las variantes pueden comprender una región de al menos 35, 40, 42 o 45 nucleótidos de longitud que tiene 1, 2, 3, 4, 5 o 6, tal como 1 -5, o 1-3 emparejamientos incorrectos con una región correspondiente de una longitud equivalente en el oligonucleótido de invasión de hebra original correspondiente. Cualesquiera emparejamientos incorrectos en la secuencia del oligonucleótido de invasión de hebra puede tener al menos 2, al menos 4, al menos 5 o al menos 10 nucleótidos separados.

Como alternativa, Las variantes pueden comprender una región de al menos 32, 35, 37, 40, 42 o 45 nucleótidos de longitud que es completamente complementaria con la región complementaria diana del oligonucleótido de invasión de hebra original.

Las variantes de las SEQ ID NOS 23 y 29 pueden ser también oligonucleótidos de más de 30 nucleótidos de longitud que comprenden una región complementaria diana que tiene al menos un 70 % de identidad de la secuencia con la secuencia complementaria diana del oligonucleótido de invasión de hebra original correspondiente, preferentemente al menos un 75 %, al menos un 80 %, más preferentemente al menos del 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % de identidad de secuencia.

Las variantes de oligonucleótidos de invasión de hebra pueden comprender secuencia(s) de nucleótidos flanqueantes en 5' y/o 3' en la región que es parcial o completamente complementaria con la secuencia de oligonucleótidos de invasión de hebra original. Las secuencia(s) flanqueantes en 5' y/o 3' pueden ser no complementarias con la secuencia de ácido nucleico diana, o pueden ser complementarias en la secuencia con las regiones que flanquean la región de unión del oligonucleótido de invasión de hebra original en la secuencia de ácido nucleico diana, tal como en los 5 -10 o 5-15 nucleótidos 5' y/o 3' de la región de unión del oligonucleótido de invasión de hebra original en la secuencia de ácido nucleico diana.

La secuencia restante de las variantes de los oligonucleótidos de invasión de hebra está normalmente sin relacionar con la secuencia diana, y está también normalmente sin relacionar con el oligonucleótido de invasión de hebra original.

Las variantes de los oligonucleótidos de invasión de hebra comprenden además uno o más oligonucleótidos modificados en su región 3' tales como, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más nucleótidos modificados, que pueden estar en los 10-15 o 10-20 nucleótidos del extremo 3'. Se pueden seleccionar las modificaciones a partir de cualquiera de las descritas anteriormente.

Detección de secuencias de nucleótidos diana

Se describen en el presente documento combinaciones concretas de cebadores en la dirección 5' y en la dirección 3', sondas de oligonucleótidos y oligonucleótidos de invasión de hebra para la detección de secuencias de nucleótidos diana. Por tanto, la invención proporciona un método para la detección de una secuencia de ácido nucleico diana de *C. difficile* toxigénico en una muestra en presencia de al menos una proteína de unión a ADN monocatenario que es una recombinasa, que comprende poner en contacto dicha muestra con una sonda de oligonucleótido de la SEQ ID NO: 24 o 25 o una variante de cualquiera de las mismas como se ha descrito anteriormente, un cebador en la dirección 5' de la SEQ ID NO: 21 o una variante de la misma como se ha descrito anteriormente, un cebador en la dirección 3' de la SEQ ID NO: 22 o una variante de la misma como se ha descrito anteriormente, y un oligonucleótido de invasión de hebra de SEQ ID NO: 23 o un derivado modificado o variante del mismo como se ha descrito anteriormente, en condiciones que promueven la amplificación de dicha secuencia de ácido nucleico diana. Dicho método puede comprender la detección de la secuencia de ácido nucleico diana de SEQ ID NO: 26.

La invención proporciona además un método para la detección de una secuencia de ácido nucleico diana de *S. typhimurium* en una muestra en presencia de al menos una proteína de unión de ADN monocatenario que es una recombinasa que comprende poner en contacto dicha muestra con una sonda de oligonucleótido de la SEQ ID NO: 30 o una variante de la misma como se ha descrito anteriormente, un cebador en la dirección 5' de la SEQ ID NO: 27 o una variante de la misma como se ha descrito anteriormente, un cebador en la dirección 3' de la SEQ ID NO: 28 o una variante de la misma como se ha descrito anteriormente, y un oligonucleótido de invasión de hebra de SEQ ID NO: 29 o un derivado modificado o variante del mismo como se ha descrito anteriormente, en condiciones que promueven la amplificación de dicha secuencia de ácido nucleico diana. Dicho método puede comprender la detección de la secuencia de ácido nucleico diana de SEQ ID NO: 31.

la invención proporciona un método para la detección de una secuencia de ácido nucleico diana de la SEQ ID NO: 20 en una muestra en presencia de al menos una proteína de unión a ADN monocatenario que es una recombinasa, que comprende poner en contacto dicha muestra con una sonda de oligonucleótido de la SEQ ID NO: 13 o 14 o una variante de la misma como se ha descrito anteriormente, un cebador en la dirección 5' de la SEQ ID NO: 11 o una variante de la misma, un cebador en la dirección 3' de la SEQ ID NO: 12 o una variante de la misma, y al menos un oligonucleótido de invasión de hebra de la SEQ ID NO: 15 un derivado modificado o variante del mismo, en condiciones que promueven la amplificación de dicha secuencia de ácido nucleico diana. Las variantes de las SEQ ID NOS 11 y 12 se pueden seleccionar de acuerdo con los mismos criterios descritos anteriormente para las variantes de las SEQ ID NOS 21, 22, 27 y 28. Las variantes y los derivados modificados de la SEQ ID NO 15 se pueden seleccionar de acuerdo con los mismos criterios descritos anteriormente para las variantes de las SEQ ID NOS 23 y 29.

La invención proporciona también un método para la detección de la secuencia de ácido nucleico diana de la SEQ ID NO: 34 en una muestra en presencia de una proteína de unión al ADN monocatenario que es una recombinasa que comprende poner en contacto dicha muestra con una sonda de oligonucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NOS 3 a 10 o una variante de las mismas.

Productos de la invención

65 *Ácidos nucleicos*

La divulgación proporciona además una sonda de oligonucleótidos que comprende un fluoróforo, un inactivador y una región complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana como un producto *per se*. La secuencia de la sonda de oligonucleótido comprende al menos un 20 % de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de ANP. La sonda de oligonucleótidos de la divulgación puede ser cualquier sonda de oligonucleótidos descrita anteriormente para su uso en los métodos de la invención. La divulgación proporciona también específicamente una sonda de oligonucleótidos de SEQ ID NOS: 3 a 10, 13, 14, 24, 25 o 30 o una variante de cualquiera de las mismas como se ha descrito anteriormente.

10 *Composiciones*

La divulgación proporciona también una composición y formulación que comprende una sonda de oligonucleótidos. La composición puede ser, por ejemplo, una solución, un liofilizado, una suspensión o una emulsión en un vehículo oleoso o acuoso. La composición puede comprender además uno o más componentes de oligonucleótidos seleccionados entre un cebador en la dirección 5', un cebador en la dirección 3' y un oligonucleótido de invasión de hebra. La composición puede comprender además uno o más proteínas seleccionados entre una ADN polimerasa, una proteína capaz de unirse a ADN monocatenario, una recombinasa y una proteína recombinasa accesoria. La composición comprende preferentemente la sonda de oligonucleótidos y además (i) un oligonucleótido de invasión de hebra que comprende una región complementaria a la de la secuencia del ácido nucleico diana y/o (ii) al menos una proteína capaz de unirse a un ADN monocatenario. Los componentes de la sonda, el cebador y el oligonucleótido de invasión de hebra de la composición se diseñan cada uno para la detección de la secuencia de ácido nucleico diana.

La composición puede comprender una sonda de oligonucleótidos de la SEQ ID NO: 24 o 25 o una variante de la misma en combinación con (i) un cebador en la dirección 5' de la SEQ ID NO: 21 o una variante de la misma, (ii) un cebador en la dirección 3' de la SEQ ID NO: 22 o una variante de la misma, y/o un oligonucleótido de invasión de hebra de la SEQ ID NO: 23 o una variante de la misma. De forma adicional, o alternativa, la composición puede comprender una sonda de oligonucleótidos de la SEQ ID NO: 30 o una variante de la misma en combinación con (i) un cebador en la dirección 5' de la SEQ ID NO: 27 o una variante de la misma, (ii) un cebador en la dirección 3' de la SEQ ID NO: 28 o una variante de la misma, y/o un oligonucleótido de invasión de hebra de la SEQ ID NO: 29 o una variante de la misma. Además, o como alternativa, la composición puede comprender una sonda de oligonucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NOS 17 a 19 y 32 o una variante de la misma en combinación con (i) un cebador en la dirección 5' de la SEQ ID NO: 11 o una variante de la misma, (ii) un cebador en la dirección 3' de la SEQ ID NO: 12 o una variante de la misma, y/o un oligonucleótido de invasión de hebra de la SEQ ID NO: 15 o una variante de la misma.

35 *Kits*

La invención proporciona además un kit que comprende una sonda de oligonucleótidos que comprende un fluoróforo, un inactivador y una región complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana, en el que la secuencia de dicha sonda de oligonucleótidos comprende al menos un 20 % de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados, y/o nucleótidos ANP y además al menos una proteína capaz de unirse a un ADN monocatenario en el que dicha al menos una proteína comprende una recombinasa. El kit puede comprender además opcionalmente instrucciones para su uso en un método de la invención. El kit puede comprender medios para la detección de ADN amplificado. El kit puede comprender un cebador en la dirección 5' y/o un cebador en la dirección 3'. El kit puede comprender un oligonucleótido de invasión de hebra. Se puede proporcionar cada uno de los anteriores oligonucleótidos en un kit como una mezcla, o en recipientes separados.

El kit o composición comprende opcionalmente uno o más de una ADN polimerasa, una recombinasa, y una proteína recombinasa accesoria. Preferentemente, la ADN polimerasa es polimerasa Bsu. Preferentemente, la recombinasa es un bacteriófago T4 UvsX, opcionalmente en combinación con las proteínas recombinasas accesorias UvsY y gp32. El kit o composición puede comprender además dNTP, tampones adecuados y otros factores que se requieren para la amplificación del ADN en el método de la invención, como se ha descrito anteriormente.

El kit puede comprender cualquier combinación de sonda de oligonucleótidos, un cebador en la dirección 5', un cebador en la dirección 3' y/o un oligonucleótido de invasión de hebra descrito anteriormente junto con los métodos y composiciones de la invención.

Aplicaciones para la detección de las secuencias de ácidos nucleicos diana

60 Se pueden utilizar los métodos de la invención en cualquier aplicación donde se desea detectar una secuencia de ácido nucleico diana.

Métodos de diagnóstico

65 La presente invención es particularmente ventajosa en el escenario médico. Los métodos de detección de la invención proporcionan un ensayo muy específico para permitir la determinación de si una muestra clínica contiene una

secuencia de ácido nucleico diana. El método puede aplicarse a una gama de escenarios de enfermedad. La invención proporciona un método para el diagnóstico de una enfermedad en un sujeto, que comprende llevar a cabo un método de detección de una secuencia de ácido nucleico diana de la invención en una muestra procedente de dicho sujeto para detectar una secuencia de ácido nucleico diana asociada con dicha enfermedad.

5 Dicho método puede ser para el diagnóstico de una infección por un patógeno en un sujeto, que comprende la detección de una secuencia de ácido nucleico diana procedente de dicho patógeno. La determinación de si el patógeno está presente o no puede ser en el contexto de cualquier enfermedad o afección presente o sospechosa de estar presente en un paciente. Dichas enfermedades pueden incluir aquellas producidas por, vinculadas a, o exacerbadas por la presencia del patógeno. Por tanto, un paciente puede presentar síntomas que indican la presencia del patógeno, y se puede obtener una muestra a partir del paciente a fin de determinar la presencia del patógeno mediante el método descrito anteriormente.

15 Se puede detectar cualquier patógeno. El patógeno puede ser un virus o bacteria o parásito. El patógeno puede ser una patógeno, tal como, aunque no de forma limitativa, hongos, virus, incluyendo los virus del papiloma humano (VPH), VIH, VHS2/VHS1, Virus de la gripe (tipos A, B y C), Virus de la polio, Virus VSR, Rinovirus, Rotavirus, Virus de la hepatitis A, Grupo de virus de Norwalk, Enterovirus, Astrovirus, Virus del sarampión, Virus paragripal, Virus de las paperas, Virus de la varicela zóster, Citomegalovirus, virus de Epstein Barr, Adenovirus, Virus de la rubeola, Virus de tipo I del linfoma de linfocitos T humano (HTLV-I), Virus de la hepatitis B (VHB), Virus de la hepatitis C (VHC), Virus de la hepatitis D, Virus de la viruela, Marburg y Ébola; bacterias que incluyen *Mycobacterium tuberculosis*, *Clamidia*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Treponema pallidum*, *Pseudomonas*, *Bordetella pertussis*, *Brucella*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Leptospira interrogans*, *Legionella pneumophila*, *Yersinia pestis*, *Streptococcus* (tipos A y B), *Pneumococcus*, *Meningococcus*, *Haemophilus influenza* (tipo b), *Toxoplasma gondii*, *Campilobacteriosis*, *Moraxella catarrhalis*, *Donovanosis*, y *Actinomicosis*; patógenos fúngicos incluyendo *Candidiasis* y *Aspergilosis*; patógenos parasíticos incluyendo *Taenia*, *Duelas*, *Lombrices intestinales*, *Amebiasis*, *Giardiasis*, *Cryptosporidium*, *Schistosoma*, *Pneumocystis carinii*, *Tricomoniasis* y *Triquinosis*.

20 Los patógenos concretos de interés incluyen *C. difficile* toxigénico y *S. typhimurium* y los métodos y combinaciones de oligonucleótidos adecuados para el diagnóstico de infecciones por estos patógenos se han descrito anteriormente.

30 Una realización particularmente preferida de la invención es la identificación de *C. difficile* toxigénico presente en pacientes que tienen una infección en el tracto gastrointestinal, teniendo en concreto síntomas de diarrea.

35 La invención proporciona por tanto un método diagnóstico para las enfermedades gastrointestinales, tales como diarrea que se producen por *C. difficile* toxigénico y *S. Typhimurium*. El método diagnóstico puede comprender además detectar marcadores de resistencia a antibióticos y marcadores de virulencia. El método proporciona una mejora drástica en la gestión del paciente de las enfermedades gastrointestinales debido a que permite el tratamiento terapéutico óptimo para un paciente dado. Por lo cual el ensayo reduciría la duración de las estancias hospitalarias, la frecuencia de readmisión y reduciría los costes.

40 El método diagnóstico puede llevarse a cabo de forma conveniente basándose en el ácido nucleico derivado de una muestra de un paciente, que proporciona una indicación a los médicos de si la enfermedad gastrointestinal es debida a una infección por *C. difficile* toxigénico o *S. typhimurium*. El método diagnóstico puede, por ejemplo, proporcionar una indicación sobre el toxintipo y la virulencia de *C. difficile* y si *C. difficile* es resistente a cualquier antibiótico. Dependiendo del resultado del ensayo, se puede optimizar a continuación el tratamiento médico, por ejemplo, mediante el uso de antibióticos.

Detección de Salmonella typhimurium

50 La invención proporciona además un método para detectar *S. typhimurium* en una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra en presencia de al menos una proteína capaz de unirse a un ADN monocatenario en el que dicha al menos una proteína es una recombinasa, con al menos un cebador en la dirección 5', al menos un cebador en la dirección 3' y al menos un oligonucleótido de invasión de hebra en condiciones que promueven la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana que comprende la SEQ ID NO: 31, en el que dicho cebador y dicho oligonucleótido de invasión de hebra comprende una región complementaria a dicha secuencia de ácido nucleico diana; y en el que dicho oligonucleótido de invasión de hebra convierte al menos una porción de la secuencia monocatenaria del ácido nucleico diana para permitir la unión de dicho cebador en la dirección 5' y un cebador en la dirección 3', y en el que al menos una sonda de oligonucleótido comprende un fluoróforo, un inactivador y una región complementaria a dicha secuencia de ácido nucleico diana. la sonda de oligonucleótidos comprende al menos un 20 % de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de ANP. Normalmente, dicho método para detectar *Salmonella typhimurium* se lleva a cabo en presencia de al menos una proteína capaz de unirse a un ADN monocatenario. Normalmente, dicha proteína capaz de unirse a un ADN monocatenario es una recombinasa.

65 Preferentemente, el cebador en la dirección 5' comprende la secuencia de SEQ ID NO: 27 o una variante de la misma, el cebador en la dirección 3' comprende la secuencia de SEQ ID NO: 28 o una variante de la misma, y el oligonucleótido de invasión de hebra comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 o una variante de la misma.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

Ejemplos

5

Ejemplo 1- Afinidad de diferentes oligonucleótidos por proteínas de unión a ADN monocatenario

Se investigó el efecto de las proteínas capaces de unirse a ADN monocatenario sobre la señal producida por sondas de oligonucleótidos monocatenarios que contienen fluoróforo e inactivador. Las sondas de oligonucleótidos estaban compuestas de ADN o ARN natural, o ácidos nucleicos modificados, tales como 2'-fluoro ARN, 2'-O-metil ARN, ANP, o ANB. Las longitudes de las sondas de ANB y ANP eran de 12 y 14 bases respectivamente en comparación con las otras sondas (16-21 bases de longitud). Se utilizaron sondas de ANB y ANP más cortas por sus temperaturas de fusión superiores. La concentración de las sondas de oligonucleótidos en los ensayos de afinidad fue de 100 nM, excepto para ANP que fue de 800 nM.

15

Las sondas de oligonucleótidos se incubaron en presencia o ausencia de molde complementario 200 nM (SEQ ID NO: 34 para las sondas con SEQ ID NO 1-8, o SEQ ID NO: 44 para las sondas con SEQ ID NO 9 o 10) y UvsX 5 µM en tampón que contenía Tris-acetato 20 mM pH 8,0, Acetato de magnesio 10 mM, ATP 2 mM, Tris-Fosfocreatina 60 mM y 0,025 U/µl de Creatina quinasa. Se midió la fluorescencia tras 20 minutos de incubación a 40 grados centígrados.

20

La incubación de todas las sondas de oligonucleótidos con su molde complementario condujo a un aumento en la señal de la fluorescencia en comparación con la señal producida en ausencia del molde complementario (Figura 1a). La presencia de bacteriófago T4 UvsX en ausencia de un molde complementario condujo también sin embargo a un aumento significativo en la señal de la fluorescencia con sondas de oligonucleótidos de ADN naturales (SEQ ID NOS: 1 y 2), como se muestra en la Figura 1a. Una posible explicación de esta observación era que UvsX desestabiliza la conformación secundaria de una sonda de ADN dando como resultado un aumento de la distancia entre la sonda y el inactivador y un aumento en la señal de la sonda incluso en ausencia de un molde complementario. Esta activación no específica de la sonda se esperaba que condujera a una mala señal en la relación de fondo cuando se controla la amplificación del ADN en una reacción que contiene UvsX.

25

Por el contrario, Las sondas de oligonucleótidos tienen una secuencia idéntica pero están compuestas por ARN (SEQ ID NOS: 3 y 4) o ARN modificado (SEQ ID NOS: 5, 6, 7, 8) o de ANB (SEQ ID NO: 9) o ANP (SEQ ID NO: 10) que permaneció inactivado en presencia de UvsX con un aumento significativo de la señal que se produce solo en presencia de un molde complementario.

30

Se elucidó también el efecto de la proteína de unión monocatenaria, el bacteriófago T4 gp32 (New England Biolabs), sobre la señal procedente de las mismas sondas de oligonucleótidos utilizadas con UvsX. se incubaron concentraciones similares de sondas de oligonucleótidos a las utilizadas con UvsX en presencia o ausencia de 0,25 mg/ml de gp32 y molde complementario 200 nM ((SEQ ID NO: 34 para las sondas con la SEQ ID NO 1-8 o la SEQ ID NO: 44 para las sondas con la SEQ ID NO: 9 o 10) en un tampón que contiene Tris-acetato 20 mM pH 7,9, acetato de potasio 50 mM, Acetato de magnesio 10 mM, y DTT 1 mM.

35

La presencia de gp32 dio como resultado de nuevo un aumento significativo en la señal de las sondas de ADN (SEQ ID NOS: 1 y 2) en ausencia de molde del complemento como se muestra en la Figura 1b. No hubo diferencias significativas entre la señal producida a partir de las sondas de ADN en presencia o ausencia de molde complementario cuando estuvo presente gp32. En consecuencia, las sondas de ADN natural marcadas por duplicado no son adecuadas para la detección de la diana en reacciones que contienen T4 gp32.

40

Por el contrario, las sondas de ARN (SEQ ID NO: 3 y 4) o ARN modificado (SEQ ID NOS: 5, 6, 7, 8), ANB (SEQ ID NO: 9) y ANP (SEQ ID NO: 10) presentaron poco o ningún aumento significativo en la fluorescencia en presencia de T4 gp32.

45

Se ensayaron también las sondas de oligonucleótidos con condiciones de reactivos utilizados en un método de amplificación basado en invasión de hebra isotérmica utilizando proteína de unión monocatenaria y una recombinasa para la amplificación. Los componentes reactivos en la reacción fueron Tris-acetato 10 mM pH 8,0, Acetato de magnesio 10 mM, DMSO al 5 %, PEG 1000 al 5 %, DTT 4 mM, EDTA 0,5 mM, 0,1 mg/ml de ASB, sacarosa 150 mM, ATP 2 mM, 200 µM de DNTP, 1:100.000 de verde SYBR I, Tris-Fosfocreatina 60 mM. Las proteínas en la reacción tenían 250 ng/µl de gp32, UvsX 5 µM, 0,0625 U/µl de BSU, 0,0125 U/µl de sacarosa fosforilasa y 0,025 U/µl creatina quinasa (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EE.UU.). Las concentraciones de cebadores y oligonucleótidos de invasión de hebra eran de 200 nM. La concentración de la sonda utilizada era de 200 nM excepto cuando se indicó otra cosa.

50

Se prepararon todas las reacciones sin el ADN diana o acetato de magnesio. Las reacciones se iniciaron a continuación añadiendo tanto una cantidad adecuada de ADN diana preparado en acetato de magnesio como con acetato de magnesio solo. Se llevó a cabo la detección en tiempo real de la señal fluorescente generada en placas de 96 pocillos a 40 °C.

55

60

65

En la incubación de la composición del reactivo anterior (desprovista de cebadores y oligonucleótidos de invasión de hebra) con sondas de ADN (SEQ ID NOS 1 y 2) no hubo diferencia en la señal producida en presencia o ausencia de un molde complementario (Figura 1c). Por tanto, las sondas que contienen ADN natural son indeseables para usar en reacciones de amplificación del ADN cuando se emplean una proteína de unión monocatenaria y/o una recombinasa.

Por el contrario, las sondas de ARN (SEQ ID NO: 3 y 4) o ARN modificado (SEQ ID NOS: 5, 6, 7, 8), ANB (SEQ ID NO: 9) y ANP (SEQ ID NO: 10) se mostraron para generar solo un aumento en la señal cuando un molde complementario estaba presente. Por tanto, las sondas de ARN, ARN modificado, ANB y ANP son adecuadas para las reacciones de amplificación del ADN cuando se emplean una proteína de unión monocatenaria y/o una recombinasa.

Se elucidó también el efecto de la recombinasa de *Escherichia coli*, RecA (New England Biolabs) sobre la señal de las sondas de oligonucleótidos (Figura 1d). Se incubaron concentraciones similares de sondas de oligonucleótidos a aquellas utilizadas en la Figura 1a y 1b en presencia o ausencia de 100 µg/ml de RecA en un tampón que contenía Tris-HCl 70 mM pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM y ATP 10 mM. La presencia de RecA dio como resultado también un aumento de la señal de las sondas que contenían ADN natural (Figura 1d, ADN21 [SEQ ID NO:2]). Sin embargo, el aumento no fue tan alto como el observado con T4 UvsX. No obstante, como se ha observado con T4 UvsX, la incubación de RecA con sondas que contienen ARN (ARN21 SEQ ID NO: 4), 2'-fluoro ARN (2-FLUORO ARN21, SEQ ID NO: 8), 2'-O-metil ARN (2-O-METIL ARN21, SEQ ID NO: 6), ANB (SEQ ID NO: 9) o ANP (SEQ ID NO: 10) no da como resultado ningún aumento significativo en la señal.

Se elucidó adicionalmente el efecto de la proteína de unión al ADN monocatenario termoestable extrema ET-SSB (New England Biolabs) sobre estas sondas de oligonucleótidos (Figura 1e). A diferencia de T4-gp32 cuya actividad se pierde si se usa a una temperatura por encima de 50 °C, ET-SSB retiene además su actividad a 95 °C. ET-SSB es por tanto una elección adecuada, si se requieren proteínas de unión monocatenarias en la reacción llevada a cabo a alta temperatura tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o en la secuenciación del ADN. Se incubaron concentraciones similares de sondas de oligonucleótidos a las utilizadas en las Figuras 1a y 1b en presencia o ausencia de 50 µg/ml de ET-SSB en un tampón que contenía Tris-acetato 20 mM pH 7,9, acetato de potasio 50 mM, Acetato de magnesio 10 mM, y DTT 1 mM. La presencia de ET-SSB dio también como resultado un aumento significativo en la señal de las sondas que contenían ADN natural (Figure 1a, ADN21 SEQ ID NO2). Las sondas marcadas por duplicados que contenían ADN natural solo no son por tanto adecuadas en las reacciones que contienen ERT-SSB. Por el contrario, las sondas que contienen ARN (ARN21, SEQ ID NO: 4), 2'-fluoro ARN (2-FLUORO ARN21, SEQ ID NO: 8), 2'-O-metil ARN (2-O-METIL, ARN21, SEQ ID NO: 6), ANB (SEQ ID NO: 9) o ANP (SEQ ID NO: 10) fueron más resistentes a ET-SSB. Estas sondas modificadas son por tanto más adecuadas para las reacciones llevadas a cabo en presencia de proteínas de unión monocatenarias análogas a ET-SSB.

Ejemplos 2 - Detección de amplificación basada en invasión de hebra (SIBA™) usando diferentes sondas de oligonucleótidos

Se ensayaron tres sondas compuestas de ADN natural (SEQ ID NO: 16), 2'-fluoro ARN (SEQ ID NO: 17) y ANB (SEQ ID NO: 18) marcadas con un fluoróforo y un inactivador. La configuración del cebador directo (SEQ ID NO: 11), el cebador inverso (SEQ ID NO: 12), la sonda, el oligonucleótido de invasión de hebra (SEQ ID NO: 15), y la secuencia de ácido nucleico diana (SEQ ID NO: 20) se resumen en la Figura 2a. Las sondas se diseñaron para solapar parcialmente una región en la dirección 3' del cebador inverso (SEQ ID NO: 12), y por tanto, se unen a la misma región en el molde diana que el cebador inverso.

Se amplificó en tiempo real un ADN diana artificial (SEQ ID NO: 20) y se detectó utilizando la sonda, los cebadores y el oligonucleótido de invasión de hebra en una reacción de amplificación basada en la invasión de hebra como se describe en el Ejemplo 1. Se obtuvo solo la amplificación del ADN diana en reacciones que contenían el ADN diana, aunque si no hay control del molde (NTC) no se produce la amplificación, como se muestra en las reacciones detectadas utilizando el colorante verde SYBR I (Figura 2 b). Se observó también la detección específica de la amplificación dependiente del molde cuando se utilizaron las sondas de 2'-fluoro RNA o de ANB de las SEQ ID NOS 17 y 18, respectivamente, (Figuras 2c y 2d). Se observó un ligero retraso en el inicio de la amplificación en muestras detectadas con sondas que contenían 2'-fluoro ARN o ANB, como resultado de la competición entre el cebador inverso y la sonda. Esta competición se puede minimizar adicionalmente reduciendo la concentración de las sondas.

Por el contrario, la sonda de ADN (SEQ ID NO: 16) fue incapaz de detectar ninguna amplificación en presencia del molde diana (Figura 2e). Esto es debido al hecho de que la presencia de proteínas de unión monocatenarias en la reacción dan como resultado un aumento drástico en la señal de la sonda incluso en ausencia del amplicón. Por lo tanto, Se encontró que las sondas de ADN no eran adecuadas para el uso en los métodos que contienen las proteínas de unión a ADN en su protocolo de reactivos.

Ejemplo 3- Detección multiplexada de SIBA utilizando las sondas de oligonucleótidos de ARN

Se incorporaron sondas de 2'-fluoro ARN marcadas tanto con Cy5 y negro Iowa (SEQ ID NO: 25) como con ROX y BHQ2 (SEQ ID NO: 17) simultáneamente en las condiciones de reacción de amplificación mediante invasión de hebra descritas en el Ejemplo 1. La amplificación de una secuencia diana de *C. difficile* (SEQ ID NO: 26) y una secuencia diana artificial (SEQ ID NO: 20) se detectó en paralelo.

El cebador directo, el cebador inverso y el oligonucleótido de invasión de hebra utilizados para la amplificación de la secuencia diana del gen de *C. difficile* fueron la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22 y la SEQ ID NO: 23, respectivamente. El cebador directo, el cebador inverso y el oligonucleótido de invasión de hebra utilizados para la amplificación de la diana artificial fueron la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12 y la SEQ ID NO: 15, respectivamente. Se llevó a cabo la reacción con 10.000 y 10⁷ copias de ADN genómico de *C. difficile* y el ADN diana artificial respectivamente. La Figura 3a muestra que el control en tiempo real de la amplificación de las dianas de ADN se consiguió simultáneamente utilizando sondas que contenían bases de 2'-fluoro ARN. Se utilizaron sondas de 2'-fluoro ARN marcadas con Cy5 y negro Iowa (SEQ ID NO:25) para detectar la secuencia diana de *C. difficile*, mientras que se usaron ROX y BHQ2 (SEQ ID NO:17) para detectar la secuencia diana artificial. El análisis de la fusión usando sondas tanto de verde SYBR I (Figura 3b) como de 2'-fluoro ARN (Figura 3c) confirmó además que ambas reacciones fueron específicas y se produjeron en el mismo tubo de reacción. las sondas de 2'-fluoro ARN pueden servir también como una herramienta para el análisis de fusión en vez del verde SYBR, debido a que las sondas no están hidrolizadas en las reacciones.

15 **Ejemplo 4 - Escisión mediante la ARNasa de las sondas de ARN para una generación potenciada de la señal**

Se incubaron sondas de ADN natural, ARN modificado ANB y ANP en presencia o ausencia de su molde diana complementario en las condiciones de reacción de amplificación del ADN mediante invasión de hebra descritas en el Ejemplo 1 con o sin 10 µg/ml de ARNasa H2 de *Thermococcus gammatolerans*. Como en los experimentos anteriores, todas las sondas (excepto para aquellas que contienen ADN natural) produjeron un aumento en la señal cuando su secuencia diana estuvo presente (Figura 4a). Sin embargo, se detectó un aumento adicional en la señal para la sonda de 2'-fluoro ARN (SEQ ID NO: 17) en las condiciones de reacción donde la ARNasa H2 estuvo presente, debido a la escisión de las bases de ARN procedentes del duplete de ARN-sonda y el ADN diana. Las otras sondas de ADN (SEQ ID NO: 16), ANP (SEQ ID NO: 10), ANB (SEQ ID NO: 9) y 2'-O-metil ARN (SEQ ID NO: 32) no se escindieron mediante la ARNasa H2.

La sonda de 2'-fluoro ARN de la SEQ ID NO: 24 se usó también para detectar la amplificación de una secuencia diana de *C. difficile* en presencia o ausencia de ARNasa H2 en las condiciones de reacción anteriores. La Figura 4b muestra que la ARNasa H2 no tuvo requerimientos de producción de señales procedentes de la sonda. Sin embargo, la presencia de la ARNasa H2 potenció adicionalmente la señal.

Ejemplo 5 - detección de *Salmonella typhimurium* mediante amplificación basada en invasión de hebra y una sonda de oligonucleótidos de ARN

Se usó una sonda de 2'-fluoro ARN (SEQ ID NO: 30) para detectar un número bajo de copias de un ADN diana. La sonda de 2'-fluoro ARN se incorporó en las condiciones de reacción de amplificación basadas en invasión de hebra descritas en el Ejemplo 1 en un ensayo para la detección de un gen diana de *S. typhimurium*. El cebador directo, el cebador inverso y el oligonucleótido de invasión de hebra utilizados para la amplificación fueron la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28 y la SEQ ID NO: 29 respectivamente.

Se evaluó la sensibilidad del ensayo utilizando una dilución en serie del ADN genómico de *S. typhimurium* de 10⁵ a 10 copias. La sonda fue capaz de detectar un mínimo de 10 copias de muestras de ADN genómico (Figura 5). La falta de control del molde (NTC) no produce ninguna señal detectable confirmando que la sonda de 2'-fluoro ARN fue muy específica.

Ejemplo 6 - Las sondas de oligonucleótidos de ARN con inactivador unido al extremo 3' no actúan como sustrato para la extensión mediante una polimerasa

se diseñaron las sondas de ARN descritas anteriormente para solapar con la región en la dirección 3' del cebador inverso y por tanto, pueden competir con el cebador inverso para la unión con la secuencia diana. Se investigó esto utilizando el sistema artificial descrito en el Ejemplo 2 para ver si la sonda de la SEQ ID NO: 17 podría actuar como un sustrato para estimular la amplificación del ADN. La Figura 6a muestra que la sonda no actúa como un cebador debido a la presencia de un inactivador unido a su extremo 3'. La amplificación de la secuencia diana se produjo solo en presencia del cebador inverso complementario (SEQ ID NO: 12). Cuando se usó la sonda sola sin el cebador inverso análogo, o se usó con cebador inverso no análogo o falso, el cebador SPU R (SEQ ID NO: 33) no produjo la amplificación. Además, no se observó amplificación en presencia de ARNasa H2 en muestras desprovistas del cebador inverso (Figura 6b). Esto sugirió que la sonda fue inerte durante la amplificación y solo estuvo implicada en la unión del amplicón diana.

60 **Ejemplo 7 -Oligonucleótido de ARN con función de cebador/sonda duplicada**

Se investigó esto utilizando el sistema artificial descrito en el Ejemplo 2 para ver si un oligonucleótido que contiene 2'-fluoro ARN podría servir como una sonda y un cebador (Figura 7a). Parte o todos los nucleótidos de ADN naturales en el cebador inverso de la SEQ ID NO: 12 se sustituyeron con 2'-fluoro ARN para generar los oligonucleótidos de las SEQ ID NOS: 13 y 14. Estos cebadores de 2'-fluoro ARN fueron capaces de amplificar un ADN diana artificial con una eficacia tan buena como el cebador inverso del ADN natural (Figura 7b). El cebador de 2'-fluoro ARN que retenía unas

pocas bases de ADN natural en el extremo 3' (SEQ ID NO: 14) fue ligeramente más eficaz.

Se razonó a continuación que se pueden añadir un fluoróforo y un inactivador al cebador de 2'-fluoro ARN para proporcionar una función de sonda siempre que el extremo 3' estuviera libre para extender la secuencia diana. Se postuló además que dicha configuración sería además resistente a la interferencia por las proteínas de unión al ADN con la señal de la sonda y por tanto permitiría además la detección específica de la amplificación. El cebador de 2'-fluoro ARN se marcó con un fluoróforo interno y un inactivador 5' (SEQ ID NO 19). La Figura 7c muestra que la SEQ ID NO: 19 fue capaz de amplificar y detectar el ADN de la diana artificial (SEQ ID NO: 20) en una reacción de amplificación basada en invasión de hebra.

Ejemplo 8 - Afinidad de sondas de ADN-ARN quimérico marcadas por duplicado para las proteínas de unión al ADN

Se investigó la capacidad de proporcionar resistencia a las proteínas de unión al ADN modificando la secuencia de una sonda de ADN natural para incorporar en parte bases de ARN o ARN modificado. Las concentraciones de las sondas marcadas por duplicado, UvsX y T4-gp32 fueron idénticas a las utilizadas en el Ejemplo 1.

La Figura 8 muestra que las sondas marcadas por duplicado contienen una mezcla de ADN y ARN (SEQ ID NOS: 35, 36, 37) o ADN y 2'-fluoro RNA (SEQ ID NOS: 38, 39, 40) o ADN y 2'-O-metil ARN (SEQ ID NOS: 41, 42, 43), las bases presentaron también resistencia a las proteínas de unión al ADN UvsX y T4-gp32. Se muestran los resultados como veces de aumento en la fluorescencia como resultado de la adición de UvsX o T4-gp32. El grado de resistencia fue predominantemente dependiente de la cantidad de bases de ARN presentes en las sondas marcadas por duplicado. La resistencia de las sondas marcadas por duplicado a las proteínas de unión al ADN aumentó como la cantidad de bases de ARN presentes en las sondas aumentadas.

Se incubó UvsX con 21 bases de sondas marcadas por duplicado que contenían diferentes relaciones de ADN-ARN, ADN-2'-fluoro ARN y 2'-O-metil ARN (Figura 8a). En todos los casos, las 21 bases de sondas marcadas por duplicado que contenían 5 bases de ARN o 2'-fluoro ARN o 2'-O-metil ARN y 15 bases de ADN fueron más resistentes a UvsX que una sonda de 21 bases marcada por duplicado que contenía solo bases de ADN. Se llevó a cabo un experimento similar con el bacteriófago T4 gp32 (proteína de unión monocatenaria) (Figura 8b). La resistencia a las proteínas de unión del ADN fue de nuevo predominantemente dependiente de la cantidad de bases de ADN presentes en las sondas marcadas por duplicado. Las 21 bases de las sondas marcadas por duplicado que contenían 5 bases de ARN o 2'-fluoro ARN o 2'-O-metil ARN y 15 bases de ADN fueron suficientes para presentar resistencia a T4-gp32. Por tanto, las sondas de ADN-ARN quimérico o ADN-2'-fluoro-ARN o ADN-2'-O-metil ARN marcadas por duplicado son también adecuadas para su uso en reacciones que contienen proteínas de unión a ADN.

Se investigó además la relación entre el número de bases de ARN incluidas en la sonda quimérica y la resistencia a la alteración de la señal de la sonda por proteínas capaces de unirse al ADN monocatenario. La Figura 8c muestra los resultados de la incubación de UvsX con una serie adicional de 21 bases de sondas marcadas por duplicado que contienen diferentes relaciones de ADN-ARN. La Figura 8d muestra los resultados con la misma serie de sondas y la incubación con gp32. Los ensayos se llevaron a cabo como se ha descrito en el ejemplo 1. Se encontró que se observó una reducción consistente en la interferencia con la señal de la sonda cuando al menos 20 % de las bases en la sonda de ADN fueron sustituidas por bases de ARN (véase, por ejemplo, la sonda ADN 17 + ARN 4).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ORION DIAGNOSTICA OY

<120> DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

<130> N400592WO

<140> tbc

<141> tbc

<150> EP13194118.9

<151> 22/11/2013

<160> 48

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 16

<212>ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> SONDA DE ADN

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> ETIQUETA DE 5' TETRAMETILRODAMINA

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2

15 <400> 1
 agccgatgac taatgc 16

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

20 <220>
 <223> SONDA DE ADN

25 <220>

 <221> misc-feature <222> (1)..(1)
 <223> ETIQUETA DE 5' TETRAMETILRODAMINA

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2

35 <400> 2
 acgaaagccg atgactaatg c 21

40 <210> 3
 <211> 16
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> SONDA DE ARN

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> ETIQUETA DE 5' TETRAMETILRODAMINA

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2

55 <400> 3
 agccgaugac uaaugc 16

60 <210> 4
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> SONDA DE ARN
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1)..(1)
 <223> ETIQUETA DE 5' TETRAMETILRODAMINA
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (21)..(21)
 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2
 <400> 4
 15 acgaaagccg augacuaaug c 21
 <210> 5
 <211> 16
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> SONDA DE ARN
 <220>
 25 <221> misc-feature
 <222> (1)..(16)
 <223> 2'-O-METIL ARN
 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> ETIQUETA DE 5' TETRAMETILRODAMINA
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2
 40 <400> 5
 agccgaugac uaaugc 16
 <210> 6
 <211> 21
 45 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> SONDA DE ARN
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 55 <223> 2'-O-METIL ARN
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 60 <223> ETIQUETA DE 5' TETRAMETILRODAMINA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 65 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2

ES 2 703 792 T3

<400> 6
 acgaaagccg augacuaaug c 21

5 <210> 7
 <211> 16
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> SONDA DE ARN

<220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (1)..(16)
 <223> 2'-FLUORO ARN

<220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (1)..(1)
 <223> ETIQUETA DE 5' TETRAMETILRODAMINA

<220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (16)..(16)
 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2

<400> 7
 agccgaugac uaaugc 16

30 <210> 8
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> SECUENCIA DE LA SONDA DE ARN

<220>
 <221> misc-feature
 40 <222> (1)..(21)
 <223> 2'-FLUORO ARN

<220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (1)..(1)
 <223> ETIQUETA DE 5' TETRAMETILRODAMINA

<220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (21)..(21)
 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2

<400> 8
 acgaaagccg augacuaaug c 21

55 <210> 9
 <211> 12
 <212> ARN
 60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> SONDA DE ANB

65 <220>

<221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 < 223> ÁCIDO NUCLEICO BLOQUEADO

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> ETIQUETA DE 5' TETRAMETILRODAMINA

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2

15 <400> 9
 aguugaugug ua 12

 <210> 10
 <211> 14

20 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> SONDA DE ANP

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 < 223> ÁCIDO NUCLEICO PEPTÍDICO

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> ETIQUETA DE TETRAMETILRODAMINA

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' T BLACK HOLE 2 CONJUGADO A LISINA

40 <400> 10
 agttgatgtg tact 14

 <210> 11
 <211> 21

45 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> SECUENCIA DEL CEBADOR DE ADN

50 <400> 11
 aacaagaagg cgtactcgac c 21

55 <210> 12
 <211> 20
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> SECUENCIA DEL CEBADOR DE ADN

 <400> 12
 agttgatgtg tactgagatc 20

65

ES 2 703 792 T3

<210> 13
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> CEBADOR DE ARN

 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1)..(24)
 <223> 2'-FLUORO ARN

 <400> 13
 15 aguugaugug uacugacuga gauc 24

 <210> 14
 <211> 24
 <212>ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CEBADOR DE ADN/ARN MIXTO
 25 <220>

 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> 2'-FLUORO ARN
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(24)
 <223>ADN
 35
 <400> 14
 aguugaugug uacugacuga gatc 24

 <210> 15
 40 <211> 61
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> OLIGONUCLEÓTIDO DE INVASIÓN DE HEBRA

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (48)..(60)
 50 <223> 2'-O-METIL ARN

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (61)..(61)
 55 <223> dTTP INVERTIDO

 <400> 15
 ttgtccatag actgctcgac ctgatacag ttatcgtcca tacggatucg ggaucucaua 60

 t 61

 60 <210> 16
 <211> 16
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> SECUENCIA DE LA Sonda DE ADN

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 6-CARBOXIL-X-RODAMINA

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2

15 <400> 16
 agttgatgtg tactca 16

 <210> 17
 <211> 16
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> SECUENCIA DE LA Sonda DE ARN

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 6-CARBOXIL-X-RODAMINA

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> 2'-FLUORO ARN

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> 3' BLACK HOLE QUENCHER 2 TAG

40 <400> 17
 aguugaugug uacuga 16

45 <210> 18
 <211> 12
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> SECUENCIA DE LA Sonda DE ANB

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> ÁCIDO NUCLEICO BLOQUEADO

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 6-CARBOXIL-X-RODAMINA

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> DABCYL

65

ES 2 703 792 T3

<400> 18
 aguugaugug ua 12

5 <210> 19
 <211> 16
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> SONDA DE ADN/ARN/CEBADOR

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(10)
 <223> 2'-FLUORO ARN

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 < 223> NEGRO IOWA FQ

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> FLUORESCÉINA UNIDA A LA POSICIÓN 5' DE LA TIMIDINA

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-FLUORO ARN

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(16)
 <223>ADN

<400> 19
 aguugaugug tactga 16

40 <210> 20
 <211> 72
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> ADN DE LA SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO DIANA

<400> 20
 aacaagaagg cgtactcgac ctgatacacg ttatcgtcca tacggattcg ggatctcagt 60
 acacatcaac tg 72

50 <210> 21
 <211> 21
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> SECUENCIA DEL CEBADOR DE ADN

60 <400> 21
 aaccaaagtg gagtgttaca a 21

<210> 22
 <211> 16

<212>ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> SECUENCIA DEL CEBADOR DE ADN

 <400> 22
 tggggcaaaa tattta 16

 10 <210> 23
 <211> 57
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO DE INVASIÓN DE HEBRA

 <220>

 20 <221> misc_feature
 <222> (44)..(56)
 <223> 2'-O-METIL ARN

 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (57)..(57)
 <223> dTTP INVERTIDO

 <400> 23
 30 tcctcctgta cctcgttaca aacaggtgta ttagtacag aagauggauu uaaauat 57

 <210> 24
 <211> 16
 <212> RNA
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> SECUENCIA DE LA Sonda DE ARN

 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 6-CARBOXIL-X-RODAMINA

 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> 2'-FLUORO ARN

 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> NEGRO IOWA FQ

 55 <400> 24
 uggggcaaaa uauuuu 16

 <210> 25
 <211> 15
 60 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> SECUENCIA DE LA Sonda DE ARN

 65

ES 2 703 792 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> ETIQUETA 5 DE 5' CIANINA
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(15)
 <223> 2'-FLUORO ARN
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> ETIQUETA DE 3' NEGRO IOWA RQ
 15
 <400> 25
 uggggcaaaa uauuu 15
 <210> 26
 <211> 66
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> SECUENCIA DIANA
 25
 <400> 26
 aaccaaagtg gagtggtaca aacaggtgta tttagtagcag aagatggatt taaatatttt 60
 gcccca 66
 <210> 27
 <211> 18
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> SECUENCIA DEL CEBADOR DE ADN
 <400> 27
 ctggcgatat tgggttt 18
 35
 <210> 28
 <211> 16
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> SECUENCIA DEL CEBADOR DE ADN
 <400> 28
 accgcaggaa acgttg 16
 45
 <210> 29
 <211> 63
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO DE INVASIÓN DE HEBRA
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 60

ES 2 703 792 T3

<222> (47)..(62)
 <223> 2'-O-METHYL RNA

 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (63)..(63)
 <223> INVERTED dTTP

 <400> 29
 tcctcctctt cctttgttta tggggtcgtt ctacattgac agaatccuca guuuuacaac 60
 10 gat 63

 <210> 30
 <211> 13
 <212> ARN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> SECUENCIA DE LA Sonda DE ARN

 20 <220>
 <221> misc-feature
 <222> (1)..(1)
 <223> ETIQUETA DE 6-CARBOXIL-X-RODAMINA

 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> 2'-FLUORO ARN

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> ETIQUETA DE NEGRO IOWA FQ

 35 <400> 30
 accgcaggaa acg 13

 <210> 31
 <211> 86
 40 <212> ADN
 <213> Salmonella typhimurium

 <400> 31
 tgaatatcgt actggcgata ttggtgttta tggggtcgtt ctacattgac agaatcctca 60
 gtttttcaac gtttcctgcg gtactg 86
 45
 <210> 32
 <211> 16
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> SECUENCIA DE LA Sonda DE ARN

 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 6-CARBOXIL-X-RODAMINA

 <220>

<221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> 2'-O-METIL ARN

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2

10

<400> 32
 aguugaugug uacuca 16

<210> 33
 <211> 21
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> SECUENCIA DEL CEBADOR DE ADN

20

<400> 33
 gtgtacagag catttaagat t 21

25

<210> 34
 <211> 21
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> SECUENCIA DE ADN DIANA

<400> 34
 gcattagtca tcggctttcg t 21

35

<210> 35
 <211> 21
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> SONDA DE ADN/ARN

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> ETIQUETA DE 5' TETRAMETILRODAMINA

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> ARN

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> ARN

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> ARN

65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)

<223> ARN
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (19)..(19)
 <223> ARN
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (21)..(21)
 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2
 <400> 35
 acgaaagccg atgactaaug c 21
 15
 <210> 36
 <211> 22
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> SONDA DE ADN/ARN
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (1)..(1)
 <223> ETIQUETA DE 5' TETRAMETILRODAMINA
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (1)..(1)
 <223> ARN
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (3)..(3)
 <223> ARN
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (5)..(5)
 <223> ARN
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (7)..(7)
 <223> ARN
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (9)..(9)
 <223> ARN
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (11)..(11)
 <223> ARN
 <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (13)..(13)
 <223> ARN
 <220>
 <221> misc_feature
 65

<222> (15)..(15)
 <223> ARN

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> ARN

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> ARN

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> ARN

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2

25 <400> 36
 tacgaaagcc gatgactaa gc 22

30 <210> 37
 <211> 21
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> SONDA DE ADN/ARN

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> ARN

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(7)
 <223> ARN

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(11)
 <223> ARN

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(15)
 <223> ARN

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> ARN

65 <220>

<221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> ARN

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2

10 <400> 37
 acgaaagccg atgactaug c 21

<210> 38
 <211> 21
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> SONDA DE ADN/ARN

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' TETRAMETILRODAMINA

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2' FLUORO ARN

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2' FLUORO ARN

35 <220>

<221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2' FLUORO ARN

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> 2' FLUORO ARN

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2' FLUORO ARN

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2

55 <400> 38
 acgaaagccg atgactaug c 21

60 <210> 39
 <211> 21
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> SONDA DE ADN/ARN

 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1)..(1)
 <223> ETIQUETA DE 5' TETRAMETILRODAMINA

 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (1)..(1)
 <223> 2' FLUORO ARN

 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (3)..(3)
 <223> 2' FLUORO ARN

 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (5)..(5)
 <223> 2' FLUORO ARN

 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (7)..(7)
 <223> 2' FLUORO ARN

 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (9)..(9)
 <223> 2' FLUORO ARN

 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (11)..(11)
 <223> 2' FLUORO ARN

 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (13)..(13)
 <223> 2' FLUORO RNA

 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (15)..(15)
 <223> 2' FLUORO ARN

 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (17)..(17)
 <223> 2' FLUORO ARN

 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (19)..(19)
 <223> 2' FLUORO ARN

 <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (21)..(21)
 <223> 2' FLUORO ARN

 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (21)..(21)
 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2

ES 2 703 792 T3

<400> 39
 acgaaagccg atgactaaug c 21

5 <210> 40
 <211> 21
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> SONDA DE ADN/ARN

<220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (1)..(1)
 <223> ETIQUETA DE 5' TETRAMETILRODAMINA

<220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (1)..(3)
 <223> 2' FLUORO ARN

<220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (5)..(7)
 <223> 2' FLUORO ARN

<220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (9)..(11)
 <223> 2' FLUORO ARN

<220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (13)..(15)
 <223> 2' FLUORO ARN

<220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (17)..(19)
 <223> 2' FLUORO ARN

<220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (21)..(21)
 <223> 2' FLUORO ARN

<220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (21)..(21)
 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2

<400> 40
 acgaaagccg atgactaaug c 21

55 <210> 41
 <211> 21
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> SONDA DE ADN/ARN

<220>
 <221> misc_feature
 65

<222> (1)..(1)
 <223> ETIQUETA DE 5' TETRAMETILRODAMINA

 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O METIL ARN

 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-O METIL ARN

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O METIL ARN

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O METIL ARN

 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O METIL ARN

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2

 <400> 41
 35 **acgaaagccg atgactaaug c** 21
 <210> 42
 <211> 21
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> SONDA DE ARN

 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> ETIQUETA DE 5' TETRAMETILRODAMINA

 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O METIL ARN

 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O METIL ARN

 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O METIL ARN

 65 <220>

<221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-O METIL ARN

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-O METIL ARN

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O METIL ARN

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O METIL ARN

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-O METIL ARN

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-O METIL ARN

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-O METIL ARN

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O METIL ARN

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2

45

<400> 42
 acgaaagccg atgactaaug c 21

<210> 43
 <211> 21

50

<212>ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> SONDA DE ADN/ARN

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> ETIQUETA DE 5' TETRAMETILRODAMINA

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> 2'-O METIL ARN

65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(7)
 <223> 2'-O METIL ARN
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(11)
 <223> 2'-O METIL ARN
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(15)
 <223> 2'-O METIL ARN
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> 2'-O METIL ARN
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-O METIL ARN
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2
 30

<400> 43
 acgaaagccg atgactaug c 21

<210> 44
 <211> 20
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 35

<220>
 <223> SECUENCIA DE ADN DIANA
 40

<400> 44
 gatctcagta cacatcaact 20

<210> 45
 <211> 21
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 45

<220>
 <223> SONDA DE ADN/ARN
 50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> ETIQUETA DE 5' CARBOXITETRAMETILRODAMINA
 55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> RNA BASE
 60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 65

<223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2

<400> 45
 acgaaagccg atgactaatg c 21

5

<210> 46
 <211> 21
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> SONDA DE ADN/ARN

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> ETIQUETA DE 56-TAMN

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> BASE DE ARN

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> BASE DE ARN

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2

30

<400> 46
 acgaaagccg atgactaaug c 21

35

<210> 47
 <211> 21
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> SONDA DE ADN/ARN

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> ETIQUETA DE 5' CARBOXITETRAMETILRODAMINA

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> BASE DE ARN

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> BASE DE ARN

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> BASE DE ARN

65

<220>

ES 2 703 792 T3

<221> misc_feature <222> (21)..(21)
<223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2

<400> 47
5 acgaaagccg atgactaaug c 21

<210> 48
<211> 21
<212>ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> SONDA DE ADN/ARN

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> ETIQUETA DE 5' CARBOXITETRAMETILRODAMINA

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> BASE DE ARN

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> BASE DE ARN

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> BASE DE ARN

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> BASE DE ARN

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> ETIQUETA DE INACTIVADOR 3' BLACK HOLE 2

45 <400> 48
acgaaagccg atgactaaug c 21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la detección de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra en presencia de al menos una proteína capaz de unirse a un ADN monocatenario, que comprende poner en contacto dicha muestra con al menos una sonda de oligonucleótidos que comprende un fluoróforo, un inactivador y una región complementaria a dicha secuencia de ácido nucleico diana, en el que la secuencia de dicha sonda de oligonucleótidos comprende al menos un 20 % de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de ANP y en el que al menos una de dichas proteínas capaz de unirse al ADN monocatenario es una recombinasa.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la amplificación de dicha secuencia de ácido nucleico diana, opcionalmente en condiciones isotermas que promueven la amplificación de dicha secuencia de ácido nucleico diana.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende poner en contacto dicha muestra con al menos un cebador en la dirección 5' y al menos un cebador en la dirección 3', comprendiendo cada uno una región complementaria a dicha secuencia de ácido nucleico diana.
- 20 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende poner en contacto dicha muestra con un oligonucleótido de invasión de hebra que comprende una región complementaria a dicha secuencia de ácido nucleico diana.
- 25 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, donde dicha sonda de oligonucleótidos es capaz de estimular la amplificación de dicha secuencia de ácido nucleico y funciona como dicho al menos un cebador en la dirección 5' o un cebador en la dirección 3'.
- 30 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la presencia de una proteína capaz de unirse al ADN monocatenario que es una proteína accesorio de cofactor de recombinasa, opcionalmente en el que dicha proteína accesoria recombinasa se selecciona entre UvsY o gp32.
- 35 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha recombinasa se selecciona entre UvsX o RecA.
8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los nucleótidos de ARN modificados presentes en la sonda de oligonucleótidos comprenden al menos un 2'-fluoro ribonucleótido, 2'-O-metil ribonucleótido o ANB de ribonucleótido.
- 40 9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende poner en contacto dicha muestra con ARNasa H.
- 45 10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha sonda de oligonucleótidos comprende la secuencia de SEQ ID NO: 24, 25 o 30 o una variante de cualquiera de las mismas, que comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente que comprende ribonucleótidos seleccionados entre ribonucleótidos naturales, 2'O-metil ribonucleótidos, nucleótidos de ANP o nucleótidos de ANB.
- 50 11. Un kit que comprende una sonda de oligonucleótidos que comprende un fluoróforo, un inactivador y una región complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana, en el que la secuencia de dicha sonda de oligonucleótidos comprende al menos un 20 % de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados, y/o nucleótidos de ANP y además al menos una proteína capaz de unirse a un ADN monocatenario en el que dicha al menos una proteína es una recombinasa.
- 55 12. Un kit de acuerdo con la reivindicación 11, en el que (i) dicho kit comprende además un cebador en la dirección 5' y /o en la dirección 3' que comprende una región complementaria a dicha secuencia de ácido nucleico diana; y un oligonucleótido de invasión de hebra que comprende una región complementaria a dicha secuencia de ácido nucleico diana o (ii) dicha sonda de oligonucleótidos es capaz de estimular la amplificación de dicha secuencia de ácido nucleico diana y funciona como dicho cebador en la dirección 5' o dicho cebador en la dirección 3'.
13. Un método para el diagnóstico de una enfermedad en un sujeto, que comprende llevar a cabo un método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en una muestra de dicho sujeto para detectar una secuencia de ácido nucleico diana asociada con dicha enfermedad.

Figura 1a:

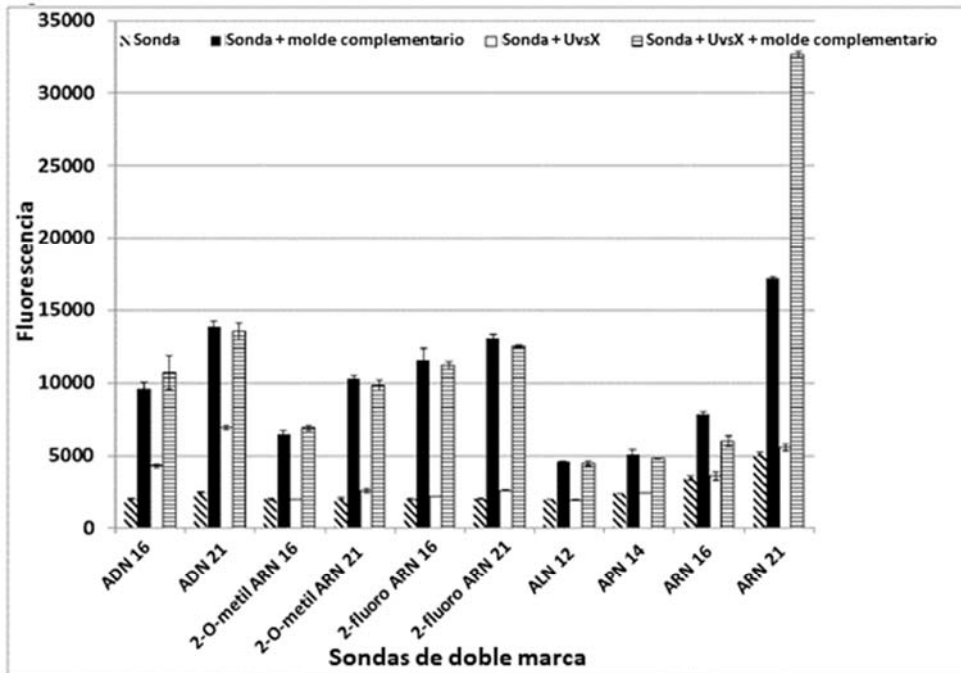


Figura 1b:

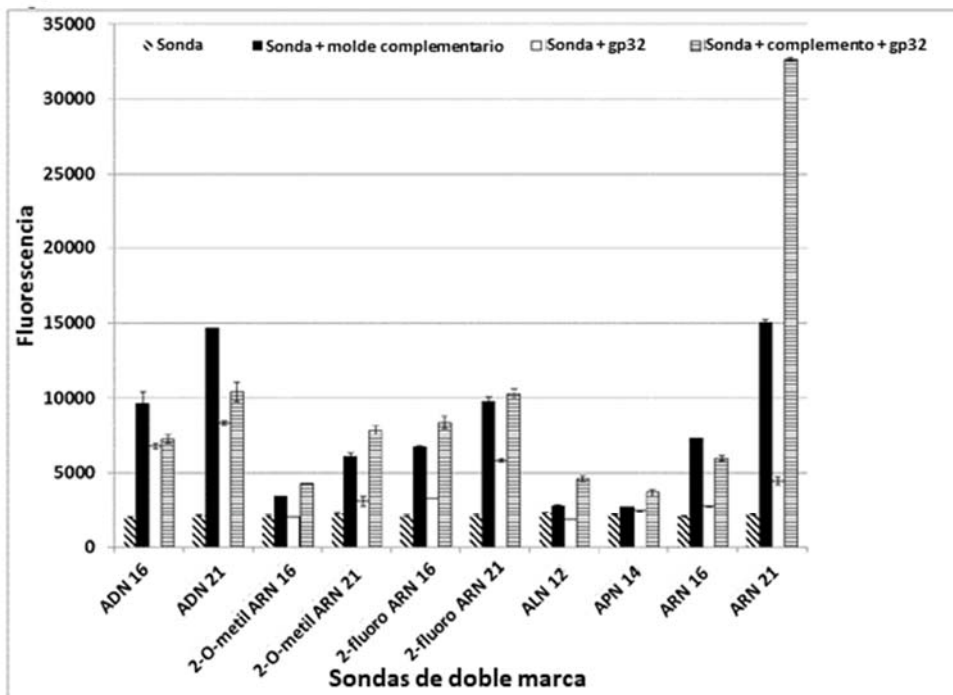


Figura 1c:

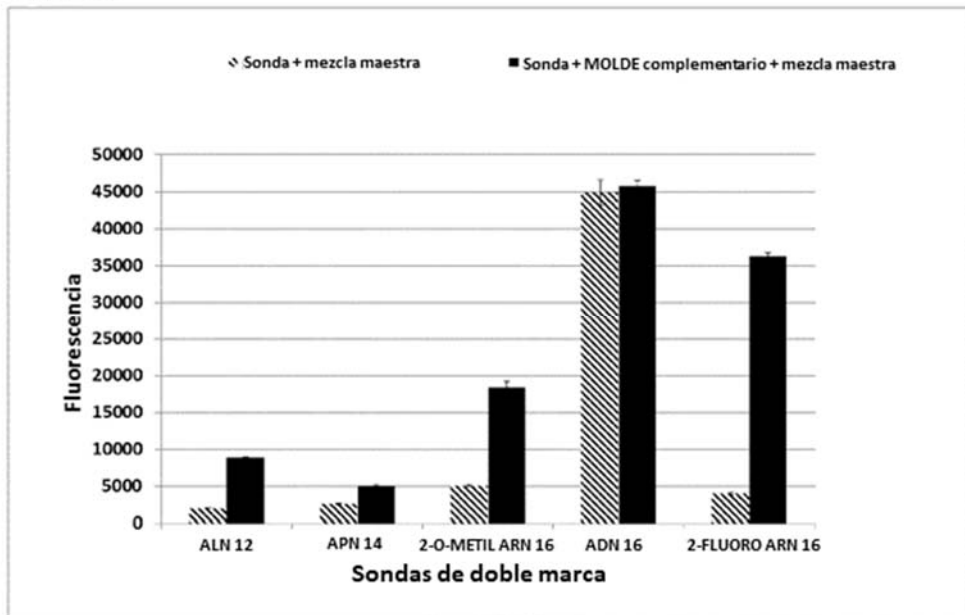


Figura 1d:

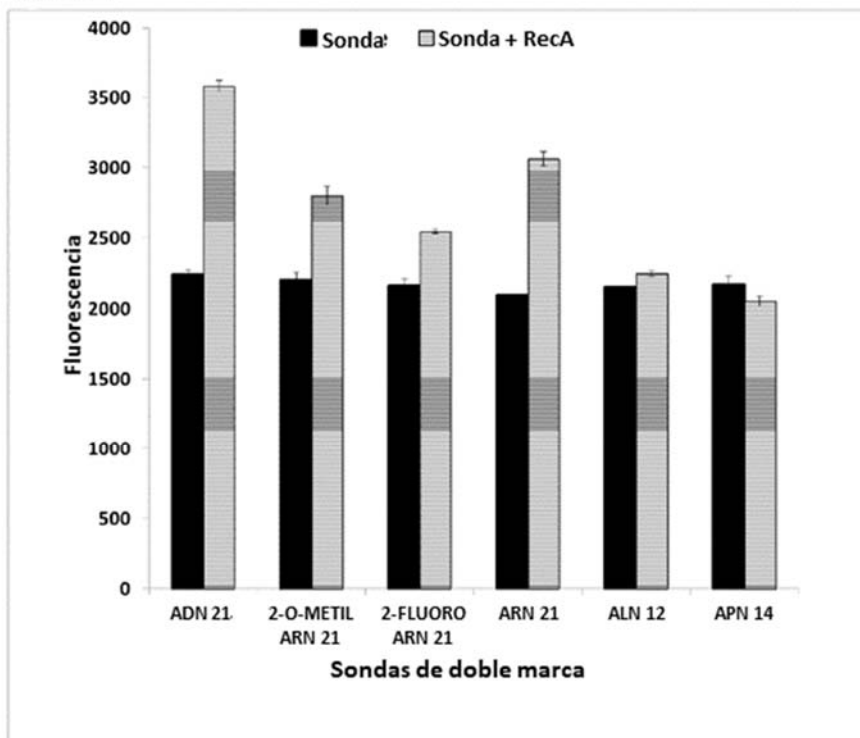


Figura 1e:

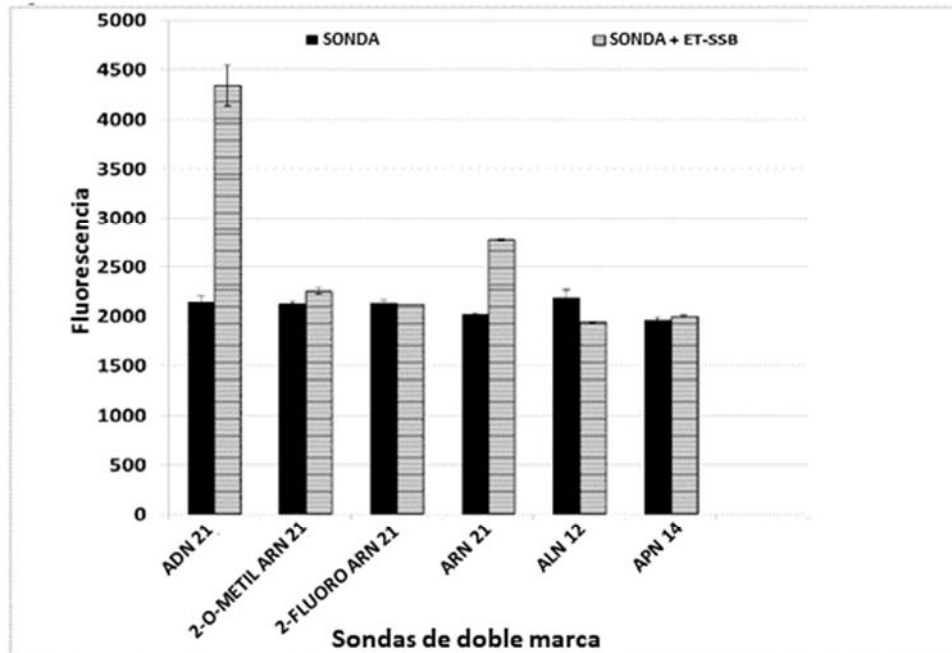


Figura 2a:

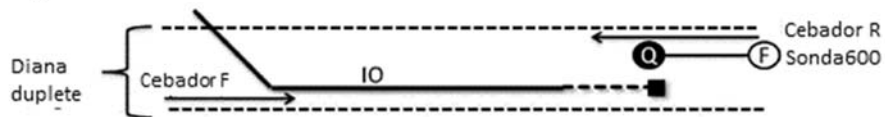


Figura 2b

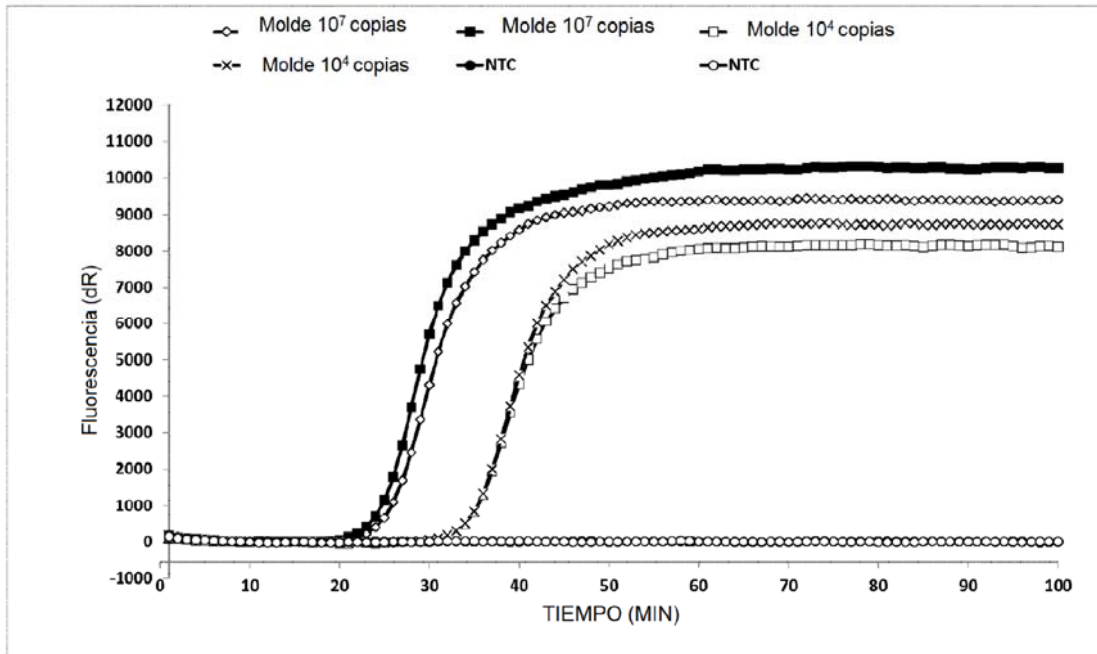


Figura 2c

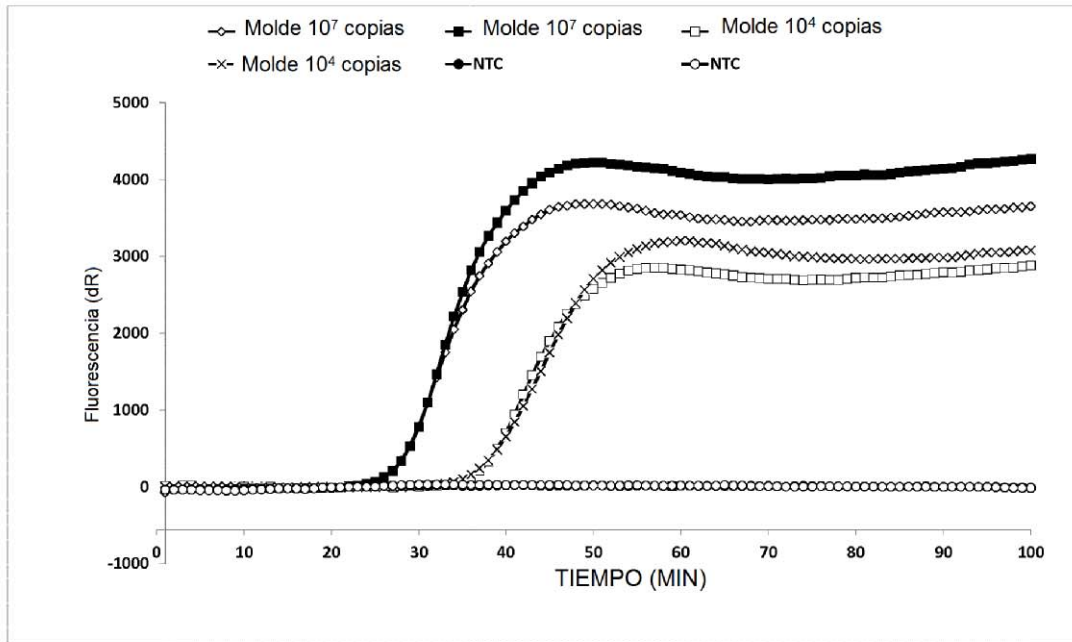


Figura 2d

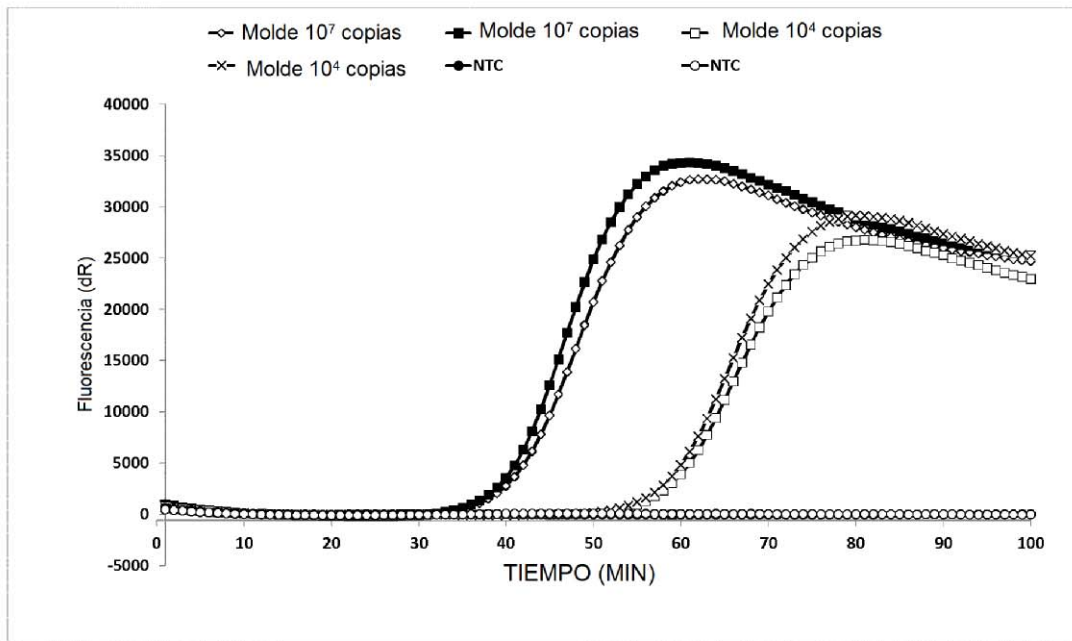


Figura 2e

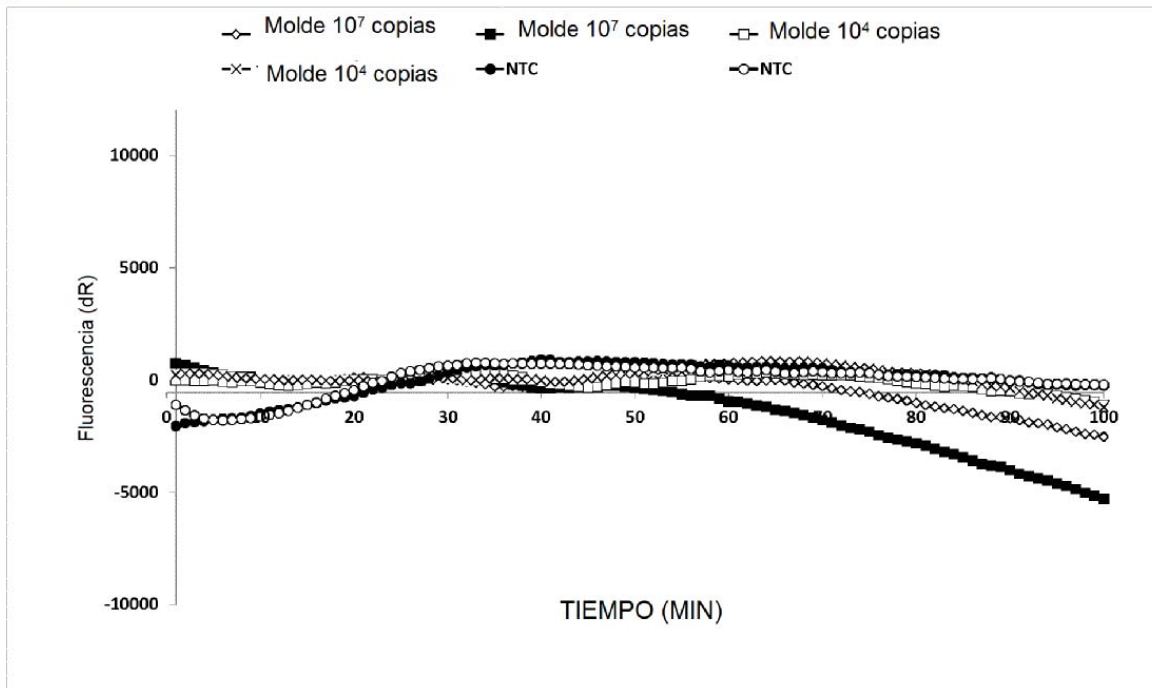


Figura 3a

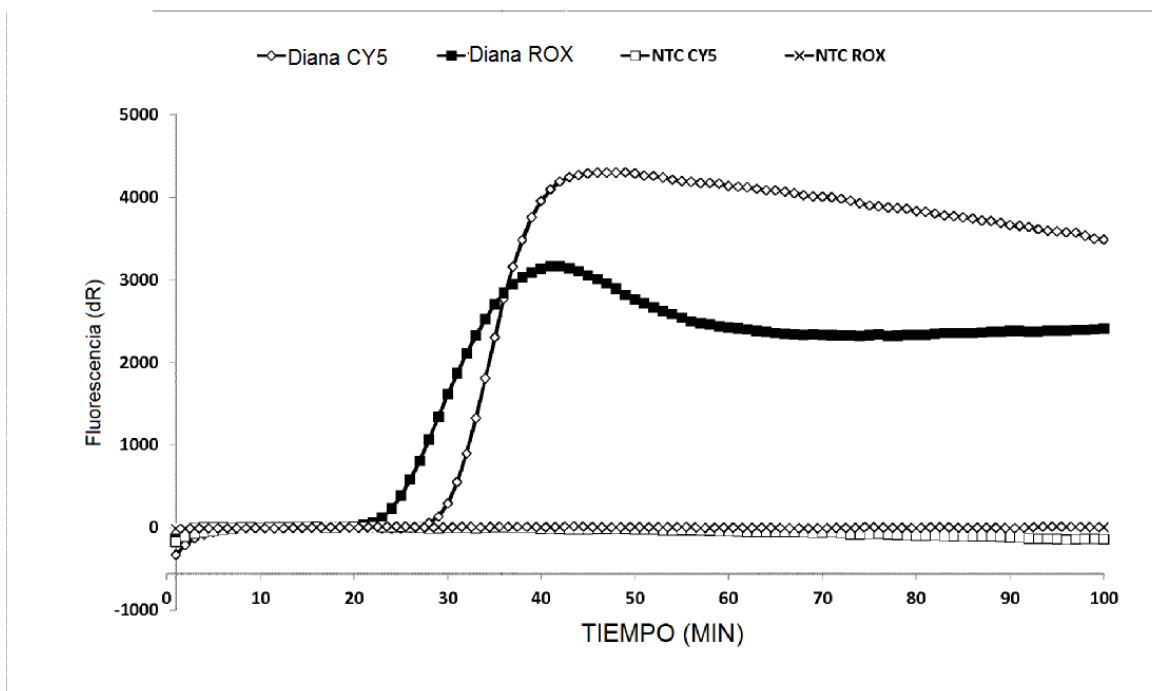


Figura 3b:

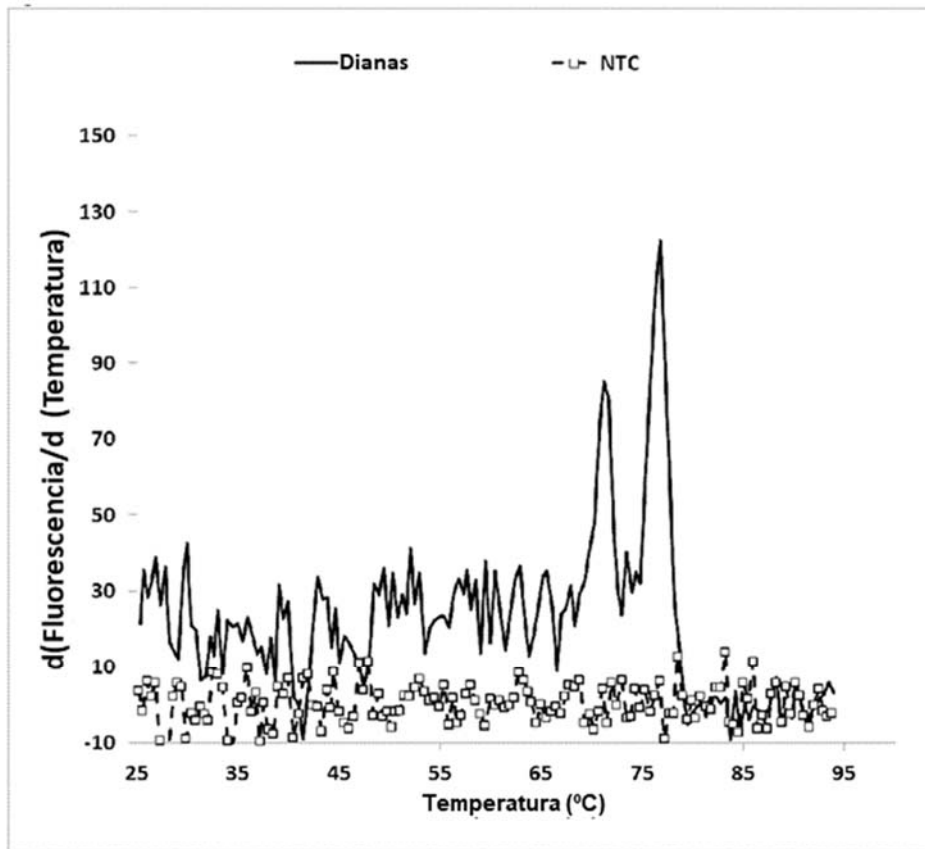


Figura 3c:

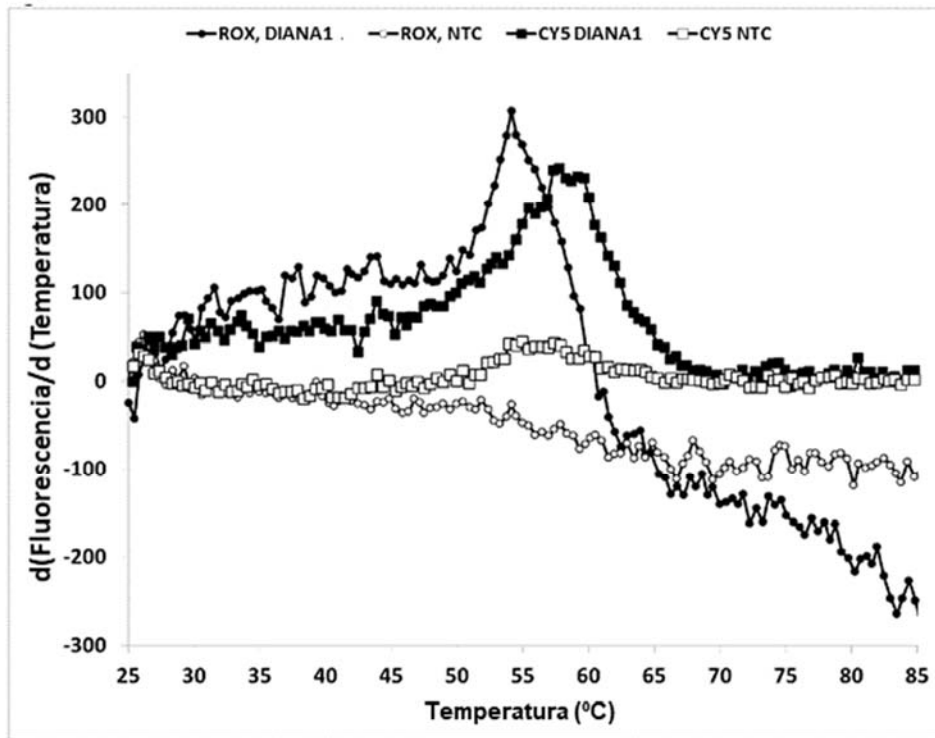


Figura 4a

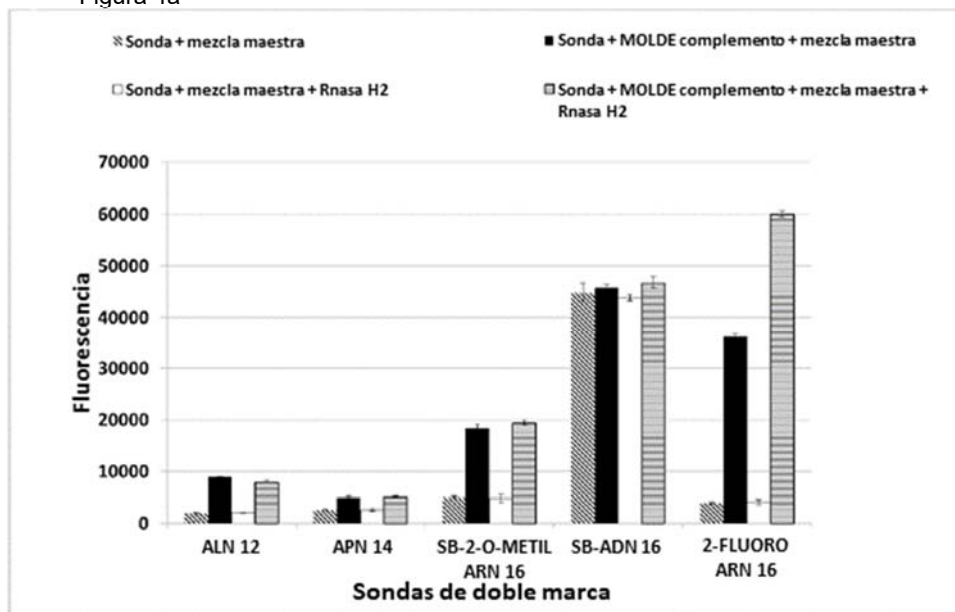


Figura 4b:

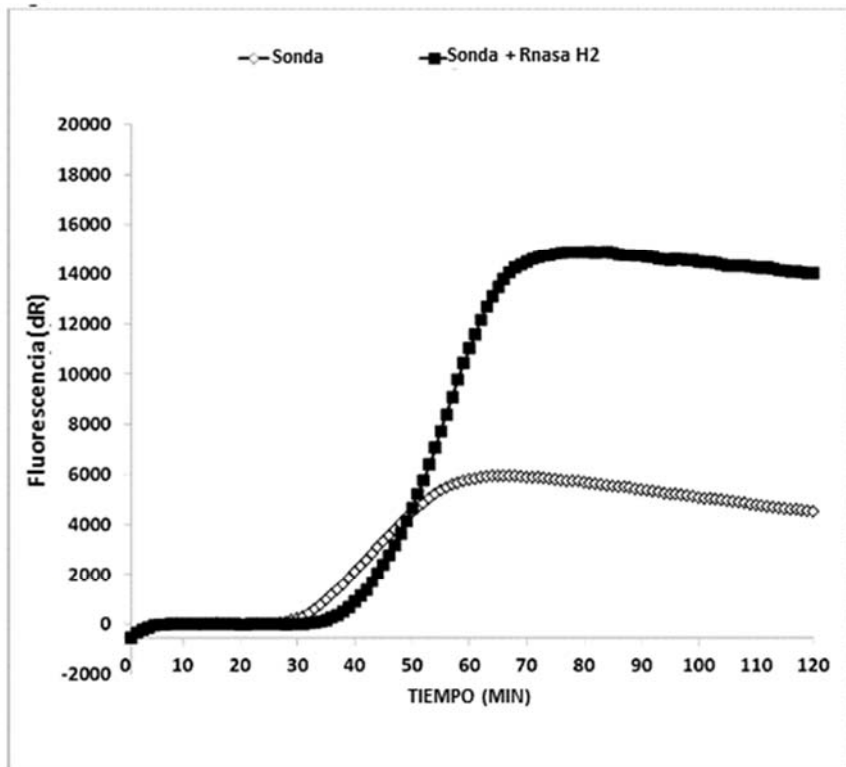


Figura 5:

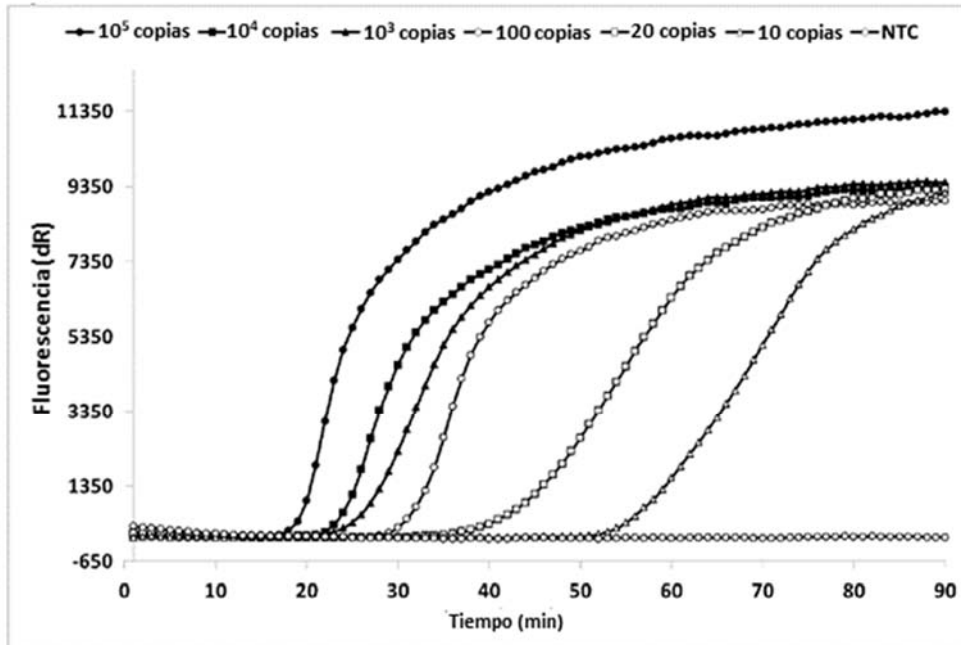


Figura 6a:

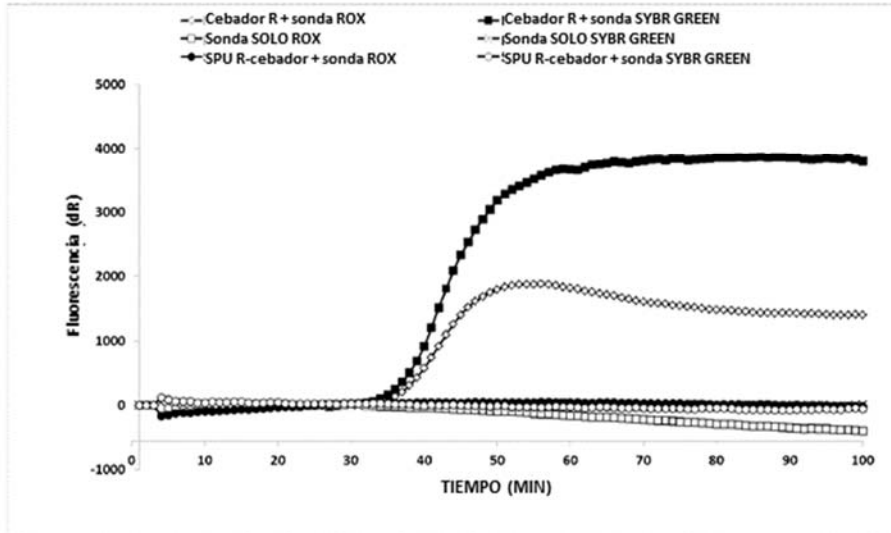


Figura 6b:

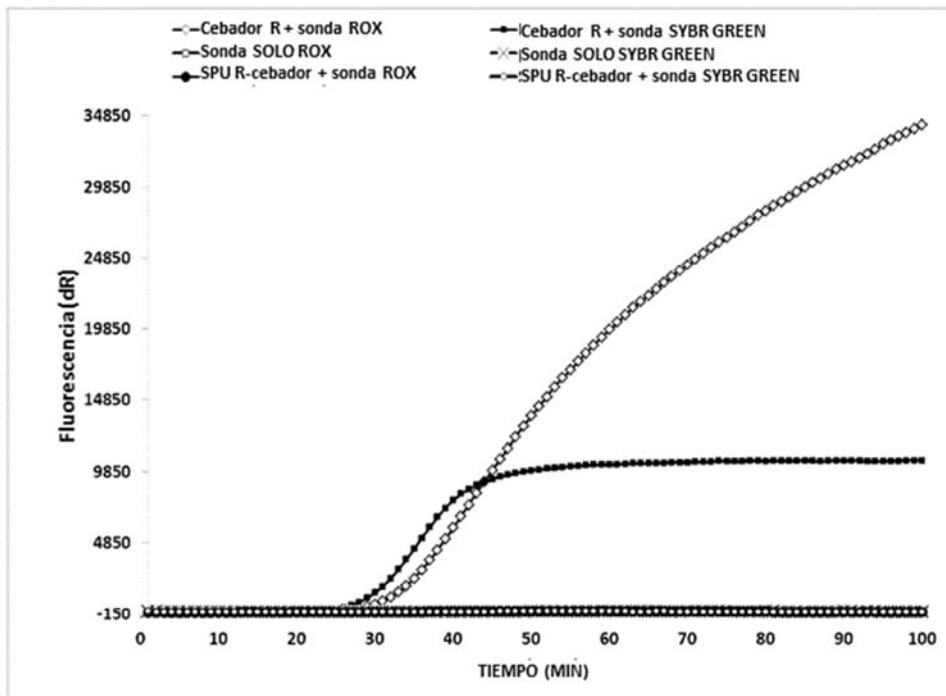


Figura 7a:

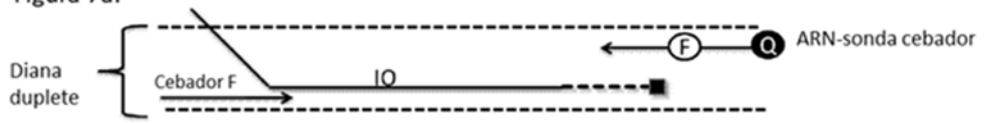


Figura 7b:

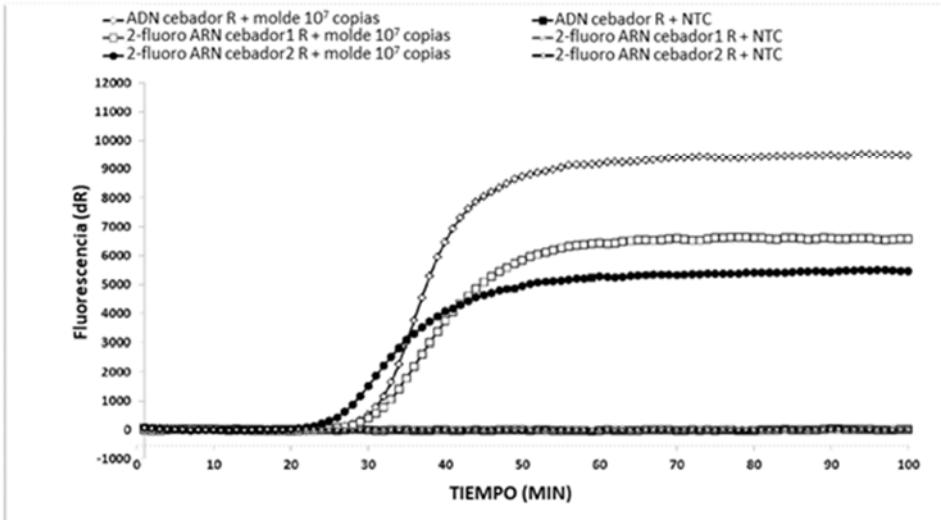


Figura 7c:

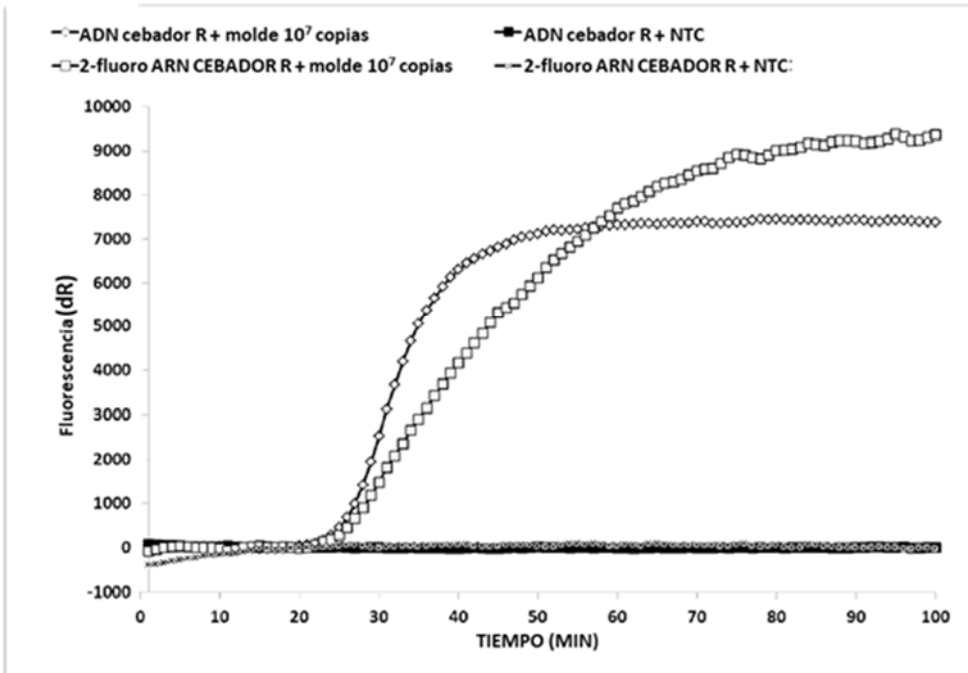


Figura 8a:

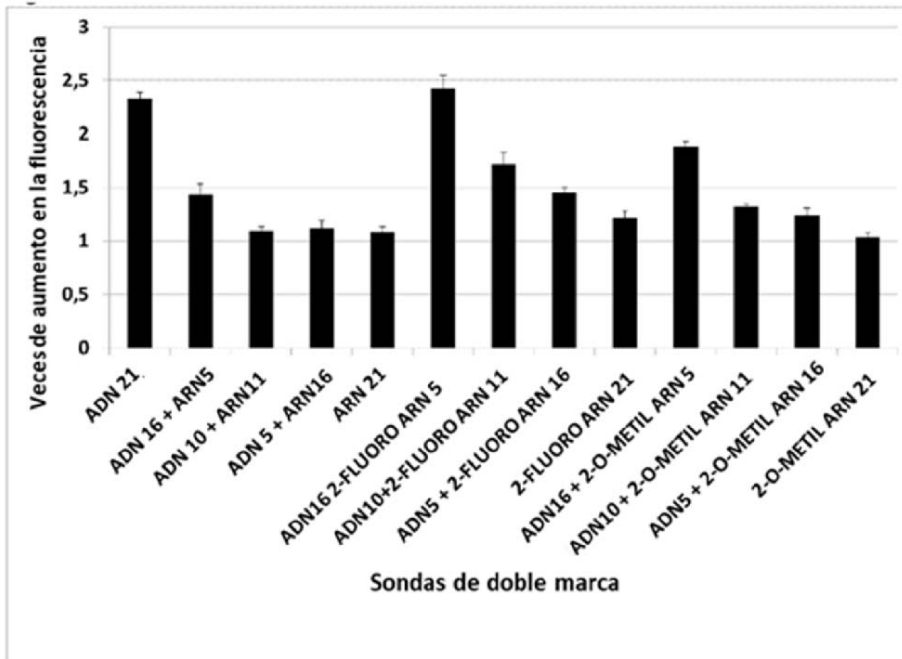


Figura 8b:

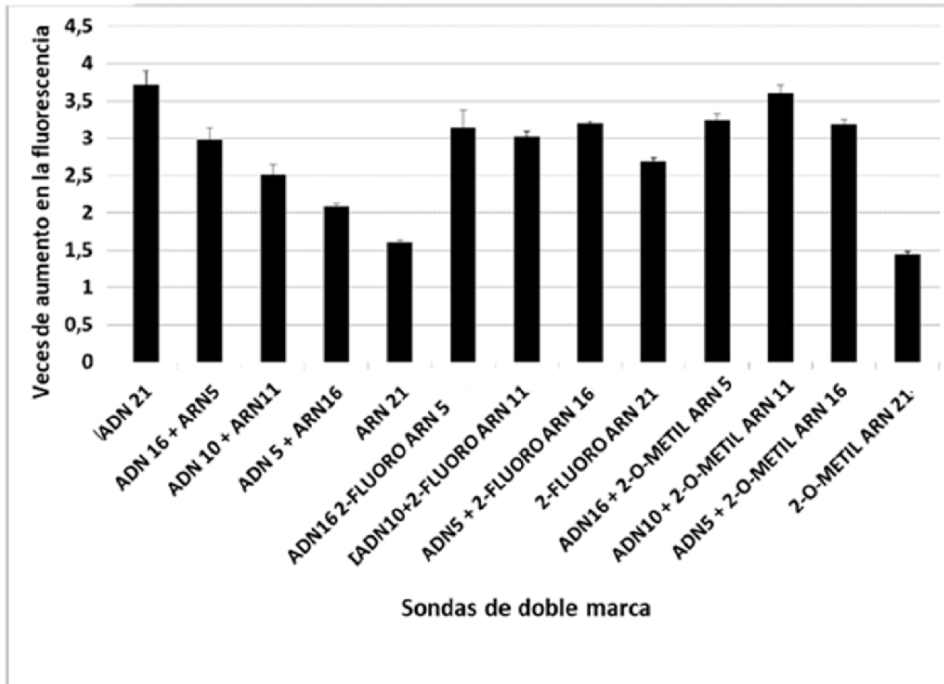


Figura 8c:

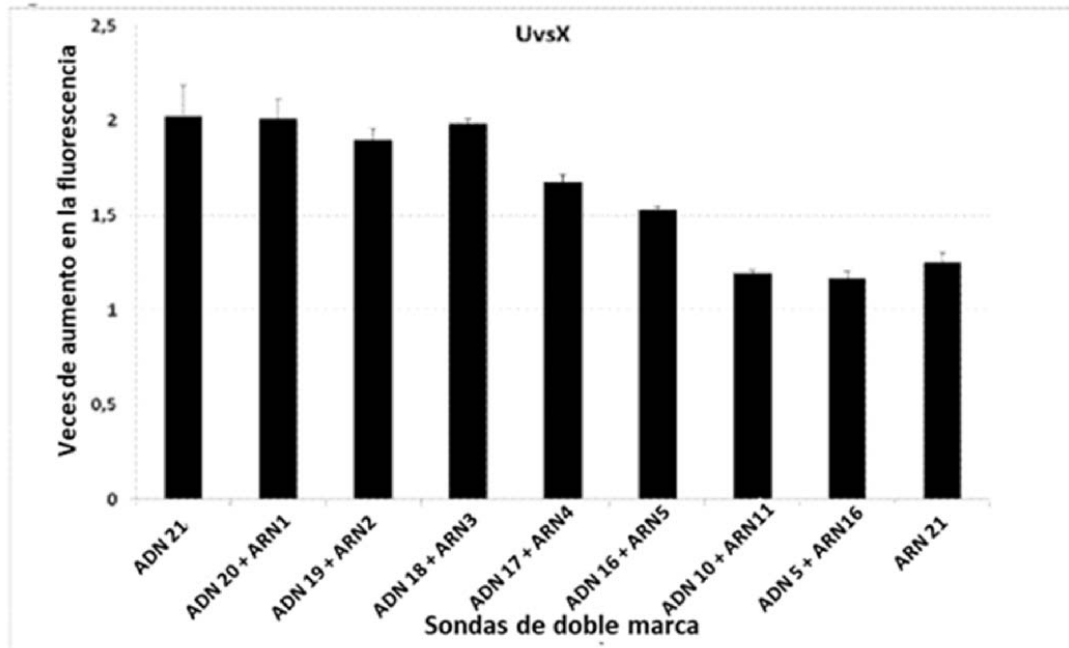


Figura 8d:

