

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 743**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2012 E 17166444 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 3216878**

54 Título: **Flujo de trabajo para la detección de ligandos utilizando ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

17.01.2011 US 201161433475 P

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

28.10.2019

73 Titular/es:

**LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION (100.0%)
5823 Newton Drive
Carlsbad, CA 92008, US**

72 Inventor/es:

**CHEN, SHIAW-MIN;
SWARTZMAN, ELANA;
RUFF, DAVID;
SHANNON, MARK;
LU, JULIA y
HENDRICKS, STEPHEN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 728 743 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

Flujo de trabajo para la detección de ligandos utilizando ácidos nucleicos

Campo de la descripción

5 Esta solicitud se refiere a métodos para ligar oligonucleótidos que tienen complementariedad con un ácido nucleico diana y para amplificar los oligonucleótidos ligados, donde la ligación y la amplificación ocurren en la misma mezcla de reacción.

Antecedentes de la descripción

10 La correlación de los cambios en la expresión de genes y proteínas en los sistemas biológicos se ha visto obstaculizada por la necesidad de separar plataformas de manipulación y análisis de muestras para ácidos nucleicos y proteínas. En contraste con el flujo de trabajo simple, rápido y flexible de los métodos de PCR cuantitativa (de sus siglas en inglés, qPCR), que permiten la caracterización de varias clases de biomarcadores de ácido nucleico (p. ej., ADN, ARNm y microARNs), métodos de análisis de proteínas tales como la transferencia Western son engorrosos, laboriosos, y mucho menos cuantitativos. Se ha demostrado que los ensayos de ligación por proximidad (de sus siglas en inglés, PLAs) eliminan algunos de estos problemas. Sin embargo, los expertos en la técnica desean mejoras en las PLAs.

15 Las PLAs típicas o convencionales habitualmente involucran al menos tres o cuatro etapas. La primera etapa es normalmente la unión de la primera y segunda sondas (p. ej., sondas de anticuerpos) a un ligando (p. ej., una proteína de interés) de manera que las sondas están muy cerca de otra. Cada una de las sondas contiene normalmente un oligonucleótido. Los oligonucleótidos se acercan entre sí con la unión de las sondas y, en la segunda etapa, se ligan entre sí (p. ej., el evento de ligación). Los oligonucleótidos ligados se pueden amplificar y detectar para determinar la presencia del ligando con una muestra de ensayo (p. ej., una muestra biológica). Esta etapa se realiza normalmente mediante la adición de componentes de ligación, tales como la ligasa, el trifosfato de adenosina (ATP) y la mezcla tampón-sal, a la reacción de unión. En la tercera etapa, la ligasa generalmente se desactiva (p. ej., mediante la digestión con proteasas) para prevenir cualquier ligación adicional de los oligonucleótidos no unidos. En la cuarta etapa, la mezcla de reacción se transfiere a una mezcla de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real y la cantidad del producto amplificado se determina mediante PCR cuantitativa (qPCR). Como se describe a continuación, sorprendentemente se ha encontrado que la tercera etapa (digestión con ligasa) puede ser eliminada, lo que permite que la ligación y la amplificación ocurran en la misma mezcla de reacción sin inactivación de la ligasa. Estas y otras características y ventajas de los métodos descritos en este documento serán evidentes para el experto en la materia a partir de esta descripción.

20 En la técnica anterior se describen diversos ensayos de ligación de proximidad. La publicación de EE. UU. No. 2002/064779 A1 describe un método para detectar y cuantificar diversos analitos en disolución para seleccionar fármacos candidatos y detectar agentes infecciosos en alimentos, utilizando sondas de proximidad que comprenden un resto de unión con afinidad por los analitos.

25 35 Gullberg et al. (P.N.A.S. 2004, vol. 101, no. 22, páginas 8420-8424) describe un método de ligación de proximidad basada en anticuerpos, en donde las sondas de proximidad que contienen extensiones de oligonucleótidos se diseñaron para unirse por pares a las proteínas diana y para formar secuencias de marcador amplificables por ligación cuando se aproximaban.

40 Fredriksson et al. (Nature Biotechnology, 2002, vol. 20, páginas 473-477) describe un ensayo para la detección de proteínas utilizando la ligación de ADN dependiente de la proximidad, en la cual la unión proximal de una proteína diana por dos aptámeros de ADN promueve la ligación de oligonucleótidos unidos a cada sonda de afinidad de aptámero. El documento WO 01/61037 A1 describe un método combinado de ligación/detección que utiliza el sondeo de proximidad con aptámeros selectivos.

La invención busca aumentar el rendimiento de los ensayos de PLA como se describe en las reivindicaciones.

45 Sumario de la invención

En este documento se proporcionan métodos para ligar y amplificar oligonucleótidos. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos están unidos a sondas específicas de ligando, y la amplificación de los oligonucleótidos indica que las sondas se han unido a un ligando en la muestra. En una realización, se proporciona un método para ligar al menos dos oligonucleótidos para producir un oligonucleótido ligado y amplificar el oligonucleótido ligado, en donde la ligación y la amplificación se producen en una sola mezcla de reacción (p. ej., que puede considerarse sin diluir). En algunas realizaciones, se puede usar un tercer oligonucleótido para formar un enlace puente entre los al menos dos oligonucleótidos que están unidos a las sondas. En ciertas realizaciones, el método puede comprender detectar un ligando en una muestra de ensayo (p. ej., una muestra biológica) que comprende poner en contacto la proteína con al menos una primera y segunda sonda, cada una de las cuales tiene una especificidad de unión para la proteína y está unida a al menos un tipo de oligonucleótido, los oligonucleótidos en la primera y segunda sondas, respectivamente, siendo al menos parcialmente complementarios entre sí; ligar los oligonucleótidos en la primera y segunda sondas usando una ligasa para producir un ácido nucleico diana y amplificar el ácido nucleico diana; y detectar el ácido

nucleico diana amplificado. P. ej., el método puede comprender detectar una proteína en una muestra de ensayo, comprendiendo el método poner en contacto la proteína con al menos dos sondas que tienen especificidad de unión con ellas, comprendiendo cada uno de los dos agentes al menos un oligonucleótido; ligar los oligonucleótidos para producir un oligonucleótido ligado y amplificar el oligonucleótido ligado en una sola mezcla de reacción; y, detectar la amplificación del oligonucleótido ligado. En algunas realizaciones, una o más de las sondas es un anticuerpo. En ciertas realizaciones, al menos uno de los oligonucleótidos comprende al menos tres nucleótidos. Algunas realizaciones proporcionan la unión del oligonucleótido usando una ligasa de huella pequeña, que puede ponerse en contacto con trifosfato de adenosina antes de su uso. Se puede usar cualquier tipo de procedimiento de amplificación, tal como, sin limitación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (p. ej., PCR cuantitativa (qPCR)). En algunas realizaciones, puede ser beneficioso inactivar la ligasa antes de la amplificación (p. ej., usando una proteasa). Otras realizaciones de los métodos descritos en este documento serán evidentes para el experto en la materia a partir de la descripción proporcionada en este documento.

Breve descripción de los dibujos

El experto en la técnica entenderá que los dibujos que se describen a continuación son solo para fines ilustrativos. Los dibujos no pretenden limitar el alcance de las presentes enseñanzas de ninguna manera.

Figura 1. Un diagrama esquemático de un proceso típico de PLA ilustrativo o convencional.

Figura 2. Un diagrama esquemático de un proceso de PLA mejorado ilustrativo (como se describe en este documento).

Figura 3. (A) Un diagrama esquemático de un flujo de trabajo ilustrativo de PLA típico o convencional. (B) Un diagrama esquemático de un flujo de trabajo ilustrativo de PLA mejorado (como se describe en este documento).

Figura 4. Un diagrama esquemático de férulas de oligonucleótidos ("conectores») ilustrativas (A) asimétricas (p. ej., 3+6) y (B) simétricas (p. ej., 4+4).

Figura 5. Comparación de un proceso de PLA típico o convencional (PLA1) y el proceso mejorado (PLA2) (se muestran los datos dCT).

Figura 6. Uso del proceso de PLA mejorado con varios ácidos nucleicos diana.

Figura 7. Comparación de dos longitudes de férula diferentes en concentraciones variables.

Figura 8. Comparación de cinco longitudes de férula diferentes.

Figura 9. Comparación de la ligasa T4 con dos ligasas SF diferentes (p. Ej., SF y DLxD).

Descripción detallada

En este documento se describen métodos para realizar ensayos de ligación por proximidad. En los procesos típicos o convencionales de ensayo de ligación por proximidad (PLA) (Fig. 1), una mezcla de sonda y una muestra se combinan en una reacción de unión. Después de la reacción de unión, la mezcla de reacción de ligación se añade para llevar a cabo la reacción de ligación. Para preparar la mezcla de reacción de ligación, se diluyen una ligasa y un tampón de ligación. Después de la reacción de ligación, el producto ligado se estabiliza por digestión con proteasa; la proteasa se inactiva después (p. ej., usando calor). Una parte del producto ligado se transfiere a una mezcla de reacción de PCR en tiempo real, después se coloca en un recipiente de reacción de PCR (p. ej., una placa) en un instrumento de qPCR. La detección y cuantificación del producto ligado se realiza después utilizando técnicas estándar.

En una realización del proceso de PLA mejorado descrito en este documento, se puede preparar un lisado celular y añadirle un tampón de ligación. A esa mezcla se le puede agregar una mezcla de sonda de proximidad, una ligasa y una mezcla de PCR (que puede incluir, p. ej., una polimerasa termoestable). Esta mezcla de reacción combinada se puede incubar después durante un período de tiempo adecuado (p. ej., una hora, 37 °C), la ligasa se inactiva opcionalmente (p. ej., usando calor) y la PCR se realiza directamente en la mezcla. En la Fig. 2 se ilustra un esquema de una realización ilustrativo del proceso de PLA mejorado. Como se muestra aquí, la reacción de unión es la misma que la que se muestra en la Fig. 1. Sin embargo, en algunas realizaciones de los procesos de PLA mejorados, la ligasa se añade a la mezcla de PCR en tiempo real que después se añade directamente a la reacción de unión. En algunas realizaciones, esta mezcla de reacción se deposita después en una placa de reacción y después se analiza con un instrumento qPCR. La detección y cuantificación del producto ligado se realiza después utilizando técnicas estándar.

En algunas realizaciones, el menor factor de dilución provisto puede resultar en una mayor concentración de la sonda de PLA en la reacción de ligación. El aumento de la concentración de la sonda puede causar un aumento de la señal de fondo, que se puede minimizar utilizando un oligonucleótido de férula corta a una concentración reducida. P. ej., un oligonucleótido de férula adecuado puede tener una longitud de 14 nucleótidos (p. ej., al menos cinco nucleótidos en el extremo 3' y al menos nueve nucleótidos en el extremo 5'; 5+9). Para garantizar la eficacia de ligación, se puede usar una ligasa de huella pequeña (de sus siglas en inglés, SFL). En algunas realizaciones, para simplificar aún más la etapa de ligación-PCR, se puede omitir la adición típica de ATP a la reacción de ligación. En su lugar, uno puede usar opcionalmente una SFL enriquecida con ATP (p. ej., una SFL que está expuesta o puesta en contacto con una abundancia o suministro adicional de ATP durante algún tiempo). Esta etapa de enriquecimiento puede ser

especialmente útil cuando se usan co-sustratos para otras ligasas. Por lo tanto, la reacción de unión se puede ensamblar combinando sondas de proximidad y muestras que contienen una o varias moléculas diana, e incubando la mezcla de manera que se produzca la unión entre las sondas y la o las moléculas diana. En algunas realizaciones, después de la reacción de unión, se puede añadir una mezcla de ligación-PCR (p. ej., que comprende un oligo de férula corta (p. ej., un oligonucleótido que contiene al menos 6 nucleótidos, p. ej., 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos) de longitud, un SFL y componentes estándar de PCR en tiempo real. En algunas otras realizaciones, la reacción de ligación puede tener lugar a temperatura ambiente, y el producto se amplifica y cuantifica por PCR en tiempo real. En algunas realizaciones, la ligasa se puede desactivar (p. ej., usando calor). El producto ligado puede después someterse a PCR en tiempo real inmediatamente o después del almacenamiento. Así, las diversas realizaciones de los nuevos flujos de trabajo para los procesos de PLA mejorados como se describen en este documento proporcionan factores de dilución reducidos que permiten realizar la ligación y la PCR en una sola mezcla de reacción (p. ej., o en una sola etapa sin etapas intermedias/de intervención). En algunas realizaciones preferidas, también se puede usar un oligonucleótido de férula corta y un SFL para controlar cualquier aumento de las reacciones de fondo. En realizaciones adicionales, la SFL se puede enriquecer previamente usando ATP.

Los procesos de PLA típicos y mejorados ilustrativos se comparan adicionalmente en las **Figs. 3A y 3B**. Como se muestra aquí, los procesos típicos incluyen la preparación de muestras, una reacción de unión, la ligación, la inactivación de la ligasa usando una proteasa, la inactivación de la proteasa (p. ej., usando calor), seguida de una PCR en tiempo real. Para llevar a cabo la etapa de PCR en procesos PLA típicos, una parte de la mezcla de reacción que contiene la ligasa inactivada y la proteasa generalmente se transfiere a una placa de PCR, y la "mezcla de PCR" (p. ej., que contiene cebadores, dNTP, polimerasa y similares) añadido al mismo. Como se muestra en la Fig. 3B, los procesos mejorados descritos pueden eliminar el uso de una proteasa y la dilución de la mezcla de reacción antes de la PCR. Como se muestra allí, la ligasa se puede inactivar utilizando, p. ej., calor, y la mezcla de reacción resultante se coloca directamente en un ensayo/instrumento de qPCR. Por lo tanto, los flujos de trabajo de PLA simplificados y mejorados pueden usar productos de reacción de unión completa en un ensayo de PCR en tiempo real (p. ej., en un pozo de múltiples placas). Esto proporciona un flujo de trabajo mejorado y una dilución reducida de la mezcla de reacción. Como resultado, en algunas realizaciones de los procesos de PLA mejorados, la mezcla de reacción de PCR contiene una mayor concentración del producto ligado (p. ej., el ácido nucleico diana). En algunas realizaciones, la mejora proporcionada por los procesos PLA mejorados se puede medir como el dCT de la reacción (p. ej., una señal de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más (dCT)); ver, p. ej., la Fig. 4). También se puede observar la sensibilidad de los procesos de PLA mejorados en comparación con los procesos de PLA típicos (p. ej., como cambio múltiplo; véase, p. ej., la Fig. 5).

Los procesos descritos en este documento proporcionan, en algunas realizaciones, la detección de una proteína en una muestra de ensayo, los métodos que comprenden poner en contacto la proteína con al menos dos sondas que tienen especificidad de unión con la misma, cada una de las dos sondas que comprende al menos un oligonucleótido; ligando los oligonucleótidos para producir un oligonucleótido ligado; amplificar el oligonucleótido ligado en una sola mezcla de reacción; y, detectar la amplificación del oligonucleótido ligado. En algunas realizaciones, también se puede usar un tercer oligonucleótido para unir cada uno de los oligonucleótidos unidos a cada una de las sondas. En algunas realizaciones, una o más de las sondas es un anticuerpo. En ciertas realizaciones, al menos uno de los oligonucleótidos comprende al menos tres nucleótidos. Algunas realizaciones proporcionan el uso de un SFL, que se puede poner en contacto opcionalmente con trifosfato de adenosina (ATP) antes de su uso, para la ligación de los oligonucleótidos. Se puede usar cualquier tipo de procedimiento de amplificación, tal como, sin limitación, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (p. ej., PCR cuantitativa). En algunas realizaciones, puede ser beneficioso inactivar la ligasa antes de la amplificación (p. ej., utilizando una proteasa, calor, o cualquier otro método conocido en la técnica). Otras realizaciones de las invenciones descritas en este documento serán evidentes para el experto en la materia a partir de la descripción proporcionada en este documento.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para detectar un objetivo en una muestra donde el método incluye las etapas para unir una primera y una segunda sonda, cada una de las cuales se une específicamente al objetivo, en donde cada una de las sondas comprende una parte de oligonucleótido (o cola); ligando las colas del primer o segundo oligonucleótido, produciendo así un molde de oligonucleótido ligada; y realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del molde de oligonucleótidos a través de las colas del primer y segundo oligonucleótido para cuantificar dicha molde. En algunas realizaciones, las tapas de ligación y PCR se pueden realizar en la misma mezcla de reacción. En otras realizaciones, el método puede incluir unirse a una primera y una segunda sonda, en donde cada sonda se une específicamente al objetivo, cada una de las sondas comprende una cola de oligonucleótido; ligar las colas de oligonucleótidos para producir un molde de oligonucleótidos ligada y amplificar el molde por PCR en una sola etapa para producir un molde amplificada; y, cuantificando el molde amplificada. Las sondas pueden comprender anticuerpos que se unen específicamente al objetivo. Los oligonucleótidos se pueden ligarse utilizando un oligonucleótido de férula (p. ej., oligos de férula de al menos 6 nucleótidos de longitud que tienen salientes de 3' y 5' de, p. ej., 9+9, 9+8, 9+7, 9+6, 9+5, 8+8, 5+3, 4+7, 3+3 nucleótidos, o cualquier otra posible variación en longitud o simetría según se contempla y describe con más detalle a continuación). En algunas realizaciones, la ligasa se puede enriquecer previamente usando ATP y/o inactivar usando, p. ej., una o más proteasas y/o calor. El molde amplificado se puede cuantificar mediante cualquier método adecuado que incluya, p. ej., PCR en tiempo real (p. ej., un ensayo TaqMan o un ensayo de baliza molecular).

Los procesos mejorados descritos y/o ejemplificados en este documento proporcionan tiempos de trabajo reducidos desde el tiempo de inicio del proceso hasta la recopilación de resultados (p. ej., más rápido), tiempo de práctica reducido

(p. ej., más simple y más barato), uso reducido de artículos de plástico de laboratorio (p. ej., más barato y más ambientalmente racional ("más verde"), y aumento de las señales y sensibilidades (p. ej., más sensibles). En algunas realizaciones, estos procesos mejorados proporcionan flujos de trabajo simplificados al combinar la ligación y las etapas de PCR, los factores de dilución reducidos desde la etapa de unión a la etapa de ligación, las concentraciones reducidas de la sonda de unión para permitir los factores de dilución reducidos, el uso de oligonucleótidos conectores más cortos (p. ej., como pocos como 6 nucleótidos de longitud) para controlar señales de fondo, uso de concentraciones de oligonucleótidos de conector más bajas para controlar señales de fondo, uso de ligasas SF para permitir el uso de longitudes de oligonucleótidos de conector más cortas, esquemas de purificación de ligasa de SF enriquecidos con ATP para omitir ATP en la etapa de ligación-PCR y/o habilitar el uso de todo el volumen de reacción para mejorar la señal de PLA y la sensibilidad.

Los métodos descritos en este documento son particularmente útiles porque se pueden usar con varios sistemas para detectar proteínas. Los ejemplos de tales sistemas incluyen, p. ej., los ensayos de proteínas TaqMan®. Los ensayos de proteínas TaqMan® son una forma adaptada de PLA™, una tecnología de ensayo de ligación por proximidad que combina la unión de proteína-anticuerpo con la detección del ácido nucleico informador mediante PCR en tiempo real. Applied Biosystems ha optimizado esta técnica para uso con lisados crudos de células y tejidos y la combinó con la química TaqMan® para crear un proceso altamente sensible y específico para medir la expresión de proteínas en muestras pequeñas. Se han desarrollado ensayos para la detección de OCT3/4, NANOG, SOX2 y LIN28 en células madre embrionarias humanas, así como ICAM1 y CSTB para medir la cuantificación relativa en células humanas. Las etapas básicas de tales ensayos incluyen la unión de una diana proteica por sondas de ensayo pareadas, la ligación de los oligonucleótidos por una ADN ligasa y la amplificación del producto de ligación por el ensayo de PCR en tiempo real TaqMan. Las sondas usadas en la primera etapa son normalmente anticuerpos específicos de diana conjugados a oligonucleótidos a través de un enlace biotina-estreptavidina (SA). Cada oligonucleótido en el par presenta un extremo 5' o 3' que se ponen en proximidad cuando las sondas de ensayo se unen a dos epítopos diferentes en la proteína diana. El sustrato para la ligasa es normalmente una estructura de puente formada por hibridación de un tercer oligonucleótido con los extremos de oligonucleótido del par de sondas de ensayo. Esta estructura se forma preferentemente cuando las sondas de ensayo están cerca unas de otras. El producto de ligación sirve normalmente a el molde en el ensayo TaqMan® de PCR en tiempo real. Los sistemas se pueden usar, p. ej., para realizar análisis de proteínas en muestras pequeñas (p. ej., células madre, tumores de células germinales), correlacionar y/o validar resultados de la cuantificación de ARN y proteínas, analizar modificaciones postraduccionales, validar el silenciamiento de genes siRNA-inducido, y/o validar experimentos de transfección/transducción de genes. Los datos generados utilizando estos sistemas pueden analizarse utilizando un software como, p. ej., el paquete de software Protein Assist™ (Applied Biosystems™).

Para describir y señalar de manera más clara y concisa el objeto de la presente descripción, se proporcionan las siguientes definiciones para términos específicos, que se utilizan en la siguiente descripción y en las reivindicaciones adjuntas. A lo largo de la especificación, la ejemplificación de términos específicos debe considerarse como ejemplos no limitantes.

Como se usa en este documento, los términos "nucleótido" o "base de nucleótido" se refieren a un fosfato nucleósido. Incluye, pero no se limita a, un nucleótido natural, un nucleótido sintético, un nucleótido modificado o un resto de reemplazo sustituto o un nucleótido universal (p. ej., inosina). El fosfato de nucleósido puede ser un monofosfato de nucleósido, un difosfato de nucleósido o un trifosfato de nucleósido. Un "nucleótido" se refiere a un nucleótido, nucleósido o análogo de los mismos. Opcionalmente, el nucleótido es un glucósido N o C de una base de purina o pirimidina. (p. ej., desoxirribonucleósido que contiene 2-deoxi-D-ribosa o ribonucleósido que contiene D-ribosa). Los ejemplos de otros análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, ribonucleótidos 2-O-metilo. Las bases de nucleótidos usualmente tienen un anillo o anillos aromáticos parentales sustituidos o no sustituidos. En ciertas realizaciones, el anillo o anillos aromáticos contienen al menos un átomo de nitrógeno. En ciertas realizaciones, la base de nucleótido es capaz de formar enlaces de hidrógeno de Watson-Crick y/o Hoogsteen con una base de nucleótido apropiadamente complementaria. Las bases de nucleótidos ilustrativas y análogos de los mismos incluyen, pero no se limitan a, purinas tales como 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, adenina (A), etenoadenina, N6- Δ 2-isopenteniladenina (6iA), N6- Δ 2-isopentenilo -2-metiltoadenina (2ms6iA), N6-metilamina, guanina (G), isoguanina, N2-dimetilguanina (dmG), 7-metilguanina (7 mG), 2-tiopirimidina, 6-tioguanina (6sG), hipoxantina y O6-metilguanina; 7-deaza-purinas tales como 7-deazaadenina (7-deaza-A) y 7-deazaguanina (7-deaza-G); pirimidinas, tales como citosina (C), 5-propinilcitosina, isocitosina, timina (T), 4-tiotimina (4sT), 5,6-dihidrotimina, O4-metiltimina, uracilo (U), 4-tiouracilo (4sU) y 5, 6-dihidrouracilo (dihidrouracilo; D); indoles tales como nitroindol y 4-metilindol; pirroles tales como nitropirrol; nebularina; base (Y); etc. En ciertas realizaciones, las bases de nucleótidos son bases de nucleótidos universales. Se pueden encontrar bases de nucleótidos adicionales adicionales, p. ej., en Fasman, 1989, Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, pp. 385-394, CRC Press, Boca Raton, Fla., y las referencias citadas aquí. Una "base universal", como se usa en este documento, es una base que es complementaria de más de una otra base. Las bases completamente universales pueden emparejarse con cualquiera de las bases que se encuentran normalmente en ácidos nucleicos naturales. La base no necesita ser igualmente capaz de emparejarse con cada una de las bases naturales. Alternativamente, la base universal puede emparejarse solo o selectivamente con dos o más bases pero no todas las bases. Opcionalmente, los pares de bases universales solo o selectivamente con purinas, o alternativamente con pirimidinas. Si así se desea, se pueden incluir dos o más bases universales en una posición particular en una sonda. Se conocen varias bases universales en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, hipoxantina, 3-nitropirrol, 4-nitroindol, 5-nitroindol, 4-nitrobenzimidazol, 5-nitroindazol, 8-aza-7-deazaadenina, 6H,8H-3,4-dihidropirimido[4,5-c][1,2]oxazin-7-ona (P. Kong Thoo Lin. Y DM

Brown, *Nucleic Acids Res.*, 1989, 17, 10373-10383), 2-amino-6-metoxiaminopurina (DM Brown y P. Kong Thoo Lin, *Carbohydrate Research*, 1991, 216, 129-139), etc. La hipoxantina es una base completamente universal preferida. Los nucleósidos que comprenden hipoxantina incluyen, pero no se limitan a, inosina, isoinosina, 2'-desoxiinosina y 7-deaza-2'-desoxiinosina, 2-aza-2'-deoxinosina. También se pueden usar análogos de origen natural y sintéticos, que incluyen, p. ej., hipoxantina, 2-aminoadenina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-N⁴ etencitosina, 4-aminopirazolo [3,4-d]pirimidina y 6-amino-4-hidroxi[3,4-d]pirimidina, entre otros. Las unidades de nucleótidos de los oligonucleótidos también pueden tener una función de reticulación (p. ej., un agente alquilante).

Un nucleósido es generalmente un compuesto que tiene una base de nucleótido unida covalentemente al carbono C-1' de un azúcar pentosa. En ciertas realizaciones, el enlace es a través de un anillo de nitrógeno heteroaromático. Los azúcares de pentosa típicos incluyen, pero no se limitan a, aquellas pentosas en las que uno o más de los átomos de carbono están cada uno independientemente sustituidos con uno o más de los mismos o diferentes grupos -R, -OR, -NRR o halógeno, donde cada R es independientemente hidrógeno, alquilo (C₁-C₆) o arilo (C₅-C₁₄). El azúcar pentosa puede ser saturada o insaturada. Los ejemplos de azúcares de pentosa y sus análogos incluyen, pero no se limitan a, ribosa, 2'-desoxirribosa, 2'-(C₁-C₆)alcoxirribosa, 2'-(C₅-C₁₄)ariloxirribosa, 2',3'-dideoxirribosa, 2',3'-didehidrorribosa, 2'-desoxi-3'-halorribosa, 2'-desoxi-3'-fluororribosa, 2'-desoxi-3'-clororribosa, 2'-desoxi-3'-aminorribosa, 2'-desoxi-3'-(C₁-C₆)alquilribosa, 2'-desoxi-3'-(C₁-C₆)alcoxirribosa y 2'-desoxi-3'-(C₅-C₁₄)ariloxirribosa. Uno o más de los carbonos pentosa de un nucleósido pueden estar sustituidos con un éster de fosfato, como se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. Nº 7,255,994. En ciertas realizaciones, los nucleósidos son aquellos en los que la base de nucleótidos es una purina, una 7-desazapurina, una pirimidina, una base de nucleótidos universal, una base de nucleótidos específica o un análogo de la misma. Los análogos de nucleótidos incluyen derivados en los cuales el azúcar pentosa y/o la base de nucleótidos y/o uno o más de los ésteres de fosfato de un nucleósido pueden reemplazarse con su análogo respectivo. Ejemplos de análogos de azúcar pentosa y análogos de bases de nucleótidos se describen anteriormente. Los ejemplos de análogos de éster de fosfato incluyen, pero no se limitan a, alquilfosfonatos, metilfosfonatos, fosforamidatos, fosfortriésteres, fosforotioatos, fosforodielioatos, fosforoselenoatos, fosforodiselenoatos, fosforoanilotoatos, fosforoanilidatos, fosforoamidatos, boronofosfats, etc., and y pueden incluir contraiones asociados. Otros análogos de nucleótidos son monómeros de análogos de nucleótidos que se pueden polimerizar en análogos de polinucleótidos en los que el esqueleto de éster de fosfato de ADN/ARN y/o azúcar de fosfato de éster se reemplaza con un tipo diferente de enlace. Ejemplos de análogos de polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos peptídicos, en los que el esqueleto de fosfato de azúcar del polinucleótido se reemplaza por un esqueleto peptídico. Los enlaces de internucleósidos pueden ser un enlace fosfodiéster, aunque se pueden usar otros enlaces (p. ej., enlaces escindibles que se pueden escindir sustancialmente en condiciones en las que los enlaces fosfodiéster no se escinden sustancialmente). P. ej., un enlace que contiene un sitio sensible a endonucleasa AP, p. ej. un residuo básico, un residuo que contiene una base dañada que es un sustrato para su eliminación por una ADN glicosilasa, u otro residuo o enlace que es un sustrato para la escisión por un AP endonucleasa, o un nucleósido disacárido.

Como se usa en este documento, el término "oligonucleótido" ("oligo") o "polinucleótido" puede referirse a un oligómero de nucleótidos o derivados de los mismos. Los polinucleótidos incluyen ADN bicatenario y monocatenario, así como híbridos de ARN bicatenario y monocatenario, ADN:ARN, ácidos peptídicos nucleicos (ANP) e híbridos entre ANP y ADN o ARN, y también incluyen tipos conocidos de modificaciones. p. ej., marcadores conocidas en la técnica, metilación, "tapas", sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones de internucleótidos como, p. ej., aquellas con enlaces no cargados (p. ej., fosfonatos de metilo, fosfortriésteres, fosforamidatos, carbonatos, etc.), con enlaces cargados negativamente (p. ej., fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), con enlaces cargados positivamente (p. ej., aminoalquilfosforamidatos, aminoalquilfosfortriésteres), aquellos que contienen restos colgantes, como, p. ej., proteínas (incluyendo nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (p. ej., acridina, psoraleno, etc.), que contienen quelantes (p. ej., metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquiladores, aquellos con enlaces modificados (p. ej., ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido u oligonucleótido. Los oligómeros también pueden incluir bases modificadas y/o esqueletos (p. ej., enlace de fosfato modificado o resto de azúcar modificado). Los ejemplos no limitantes de esqueletos sintéticos que confieren estabilidad y/u otras ventajas a los oligómeros pueden incluir enlaces fosforotioato, ácido nucleico peptídico, ácido nucleico bloqueado (Singh, et al. *Chem Commum* 4: 455-456 (1998)), ácido nucleico de xilosa, y/o análogos de los mismos. En otros casos, el polinucleótido puede contener esqueletos no nucleotídicos, p. ej., poliamida (p. ej., ácidos nucleicos peptídicos (PNA)) y polimorfolino (disponible comercialmente en Anti-Virals, Inc., Corvallis, Oregon, como polímeros Neugene™) y otros polímeros de ácido nucleico sintéticos específicos de secuencia que proporcionan que los polímeros contienen nucleobases en una configuración que permite el apareamiento de bases y el apilamiento de bases, como se encuentra en el ADN y el ARN.

Los oligonucleótidos y/o polinucleótidos pueden tener cualquier longitud "n". P. ej., n puede ser cualquiera de los números de nucleótidos 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, etc. La estructura del polinucleótido (N)_n representa un oligonucleótido que consiste en n número de nucleótidos N (p. ej., (I)₈ es representativo de un oligonucleótido que tiene la secuencia IIIIIIII; o (A)₁₂ es representativo de un oligonucleótido que tiene la secuencia AAAAAAAAAAAAAA). Otros tipos de oligonucleótidos o polinucleótidos también pueden ser adecuados para su uso, como entenderán los expertos en la técnica a partir de esta descripción.

Los oligonucleótidos y/o polinucleótidos pueden unirse opcionalmente a uno o más restos no nucleotídicos tales como marcadores y otras moléculas pequeñas, moléculas grandes tales como proteínas, lípidos, azúcares y soportes sólidos

o semisólidos, p. ej. a través del extremo 5' o 3'. Los marcadores incluyen cualquier resto que sea detectable utilizando un método de detección de elección y, por lo tanto, hace que el nucleótido o polinucleótido unido sea detectable de manera similar utilizando un método de detección de elección (p. ej., utilizando un SGC y/o un marcador detectable). Opcionalmente, el marcador emite radiación electromagnética que es visible o visible ópticamente. En algunos casos, el nucleótido o polinucleótido no está unido a un marcador, y la presencia del nucleótido o polinucleótido se detecta directamente.

Como se usa en este documento, el término "ácido nucleico" se refiere a polímeros de nucleótidos o derivados de los mismos. Como se usa en este documento, el término "ácido nucleico diana" se refiere a un ácido nucleico que se desea amplificar en una reacción de amplificación de ácido nucleico. P. ej., el ácido nucleico diana comprende un molde de ácido nucleico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana puede ser el producto de la ligación de al menos dos oligonucleótidos entre sí.

Como se usa en este documento, el término "secuencia" se refiere a una secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido o un ácido nucleico. A lo largo de la especificación, siempre que un oligonucleótido/ácido nucleico está representado por una secuencia de letras, los nucleótidos están en orden 5' a 3' de izquierda a derecha. P. ej., si el polinucleótido contiene bases de adenina, guanina, citosina, timina o uracilo, la secuencia del polinucleótido se puede representar por una sucesión correspondiente de las letras A, G, C, T o U), p. ej., una molécula de ADN o ARN. Y, un oligonucleótido representado por una secuencia $(I)_n(A)_n$ en donde $n = 1, 2, 3, 4$ y así sucesivamente, representa un oligonucleótido en el que el (los) nucleótido(s) terminal es 5' es inosina y el nucleótido(s) terminal en el extremo 3' es adenosina.

Los oligonucleótidos y/o polinucleótidos pueden considerarse opcionalmente que tienen secuencias "complementarias" si las mismas pueden hibridarse entre sí. El término "hibridación" se refiere normalmente al proceso mediante el cual los oligonucleótidos y/o polinucleótidos se hibridan entre sí. El término adjetivo "hibridado" se refiere a dos polinucleótidos que están unidos entre sí por dos o más pares de bases secuencialmente adyacentes. Normalmente, estos términos se refieren a "hibridación específica". Dos oligonucleótidos y/o polinucleótidos se pueden hibridar selectivamente (o específicamente) entre sí si se unen de manera significativa o detectable entre sí en condiciones de hibridación rigurosas cuando están presentes en una mezcla compleja de polinucleótidos, como el ADN celular total o de biblioteca. En algunas realizaciones, para una hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces el fondo, preferiblemente 10 veces la hibridación del fondo. Opcionalmente, se seleccionan condiciones rigurosas para que sean aproximadamente 5-10 °C más bajas que el punto de fusión térmico para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definido. Las condiciones más rigurosas son, opcionalmente, en las cuales la concentración de sal es inferior a aproximadamente 1,0 M de ión de sodio, normalmente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de ión de sodio (u otras sales) a un pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (p. ej., 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (p. ej., más de 50 nucleótidos). También se pueden lograr condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes como la formamida. Las condiciones de hibridación rigurosas ilustrativas pueden ser las siguientes: 50% de formamida, 5x SSC y 1% de SDS, incubando a 42 °C, o, 5x SSC, 1% de SDS, incubando a 65 °C, con lavado en 0.2x SSC, y SDS al 0,1% a 65 °C. Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí en condiciones rigurosas son todavía sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. La "hibridación inespecífica" se utiliza para referirse a cualquier hibridación no intencionada o insignificante, p. ej., hibridación a una secuencia de polinucleótidos no intencionada distinta de la secuencia de polinucleótidos diana deseada. La secuencia de polinucleótido no iniciada puede estar en el mismo polinucleótido o en el diferente del objetivo deseado. En algunos casos, la única hibridación prevista puede ser a partir del emparejamiento de bases de Watson-Crick entre dos polinucleótidos. Otros tipos de emparejamiento de bases pretendidos pueden incluir el emparejamiento de bases entre análogos correspondientes de dichos nucleótidos o entre iso-citidina e iso-guanina. En algunos casos donde la hibridación solo se pretende entre bases complementarias, cualquier enlace entre bases no complementarias se considera una hibridación inespecífica.

En algunas realizaciones, las secuencias complementarias pueden ser aquellas que, cuando se hibridan juntas, pueden ligarse eficazmente a un tercer polinucleótido que se ha hibridado adyacentemente a él. De manera similar, los residuos de nucleótidos pueden considerarse complementarios si, cuando ambos están emparejados entre sí dentro de dos polinucleótidos hibridados, ambos nucleótidos pueden ligarse en una reacción de ligación impulsada por un molde cuando se sitúan como el nucleótido terminal en su polinucleótido. Los nucleótidos que se incorporan eficientemente por las ADN polimerasas opuestas entre sí durante la replicación del ADN en condiciones fisiológicas también se consideran complementarios. En una realización, los nucleótidos complementarios pueden formar pares de bases entre sí, tales como los pares de bases AT/U y G-C formados a través del enlace de hidrógeno del tipo Watson-Crick específico entre las nucleobases de nucleótidos y/o posiciones antiparalelas polinucleótidos entre sí. La complementariedad de otros pares de bases artificiales puede basarse en otros tipos de enlaces de hidrógeno y/o hidrofobicidad de las bases y/o complementariedad de formas entre las bases. En casos apropiados, los polinucleótidos pueden considerarse complementarios cuando los mismos pueden experimentar un emparejamiento de bases acumulativo en dos o más posiciones correspondientes individuales en orientación antiparalela, como en un dúplex hibridado. Opcionalmente, puede haber una complementariedad "completa" o "total" entre una primera y una segunda secuencia de polinucleótidos, donde cada nucleótido en la primera secuencia de polinucleótidos puede experimentar una interacción de apareamiento de bases estabilizadora con un nucleótido en la posición antiparalela correspondiente en el segundo polinucleótido. La complementariedad "parcial" describe secuencias de polinucleótidos en las cuales al menos el 20%, pero menos del 100%, de los residuos de un polinucleótido son complementarios a los

residuos en el otro polinucleótido. Un "desajuste" está presente en cualquier posición en los dos nucleótidos opuestos que no son complementarios. En algunos ensayos de ligación, un polinucleótido puede experimentar una ligación dependiente del molde sustancial incluso cuando tiene uno o más desajustes con su molde hibridada. Opcionalmente, el polinucleótido no tiene más de 4, 3 o 2 desajustes, p. ej., 0 o 1 desajuste, con su molde. En algunos ensayos, el polinucleótido no sufrirá una ligación sustancial dependiente del molde a menos que sea al menos un 60% complementario, p. ej., al menos aproximadamente el 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% complementario a su molde.

"Degenerado", con respecto a una posición en un polinucleótido que es uno de una población de polinucleótidos, significa que la identidad de la base del nucleósido que ocupa esa posición varía entre los diferentes miembros de la población. Una población de polinucleótidos en este contexto es opcionalmente una mezcla de polinucleótidos en una sola fase continua (p. ej., un fluido). La "posición" puede designarse mediante un valor numérico asignado a uno o más nucleótidos en un polinucleótido, generalmente con respecto al extremo 5' o 3'. P. ej., al nucleótido terminal en el extremo 3' de una sonda de extensión se le puede asignar la posición 1. Así, en un conjunto de sondas de extensión de la estructura 3'-XXXNXXX-5', la N está en la posición 4. Se dice que una posición está k degenerada si puede ser ocupada por nucleósidos que tengan cualquiera de diferentes identidades k. P. ej., una posición que puede ser ocupada por nucleósidos que comprenden una de dos bases diferentes está degenerada en 2 veces.

Un "soporte sólido", como se usa en este documento, normalmente se refiere a una estructura o matriz en la cual los reactivos de ligación y/o amplificación (p. ej., moléculas de ácido nucleico, micropartículas y/o similares) se pueden inmovilizar de manera que sean significativamente o totalmente impedidos de difundirse libremente o moverse entre sí. Los reactivos se pueden colocar, p. ej., en contacto con el soporte y, opcionalmente, se unen de forma covalente o no covalente o incrustados parcialmente/completamente. Los términos "micropartícula", "perlas" "microperlas", etc., se refieren a partículas (opcionalmente pero no necesariamente de forma esférica) que tienen una longitud de la sección transversal más pequeña (p. ej., diámetro) de 50 micrones o menos, preferiblemente 10 micrones o menos, 3 micrones o menos, aproximadamente 1 micrómetro o menos, aproximadamente 0,5 micrones o menos, p. ej., aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3 o 0,4 micrones, o más pequeño (p. ej., bajo 1 nanómetro, aproximadamente 1-10 nanómetro, aproximadamente 10- 100 nanómetros, o alrededor de 100-500 nanómetros). Las micropartículas (p. ej., Dynabeads de Dynal, Oslo, Noruega) pueden estar hechas de una variedad de materiales inorgánicos u orgánicos que incluyen, entre otros, vidrio (p. ej., vidrio de poro controlado), sílice, circonia, poliestireno reticulado, poliacrilato, polimetilmetacrilato, dióxido de titanio, látex, poliestireno, etc. La magnetización puede facilitar la recolección y concentración de los reactivos unidos a micropartículas (p. ej., polinucleótidos o ligasas) después de la amplificación, y facilita pasos adicionales (p. ej., lavado, eliminación de reactivos, etc.). En ciertas realizaciones, se puede usar una población de micropartículas que tienen diferentes tamaños de formas y/o colores. Las micropartículas se pueden codificar opcionalmente, p. ej., con puntos cuánticos de manera que cada micropartícula puede identificarse individual o únicamente.

Como se usa en este documento, el término "mezcla de reacción" se refiere a la combinación de reactivos o disoluciones de reactivos, que se utilizan para llevar a cabo un análisis químico o un ensayo biológico. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende todos los componentes necesarios para llevar a cabo una reacción de síntesis/amplificación de ácido nucleico (ADN). Como se describe anteriormente, dichas mezclas de reacción pueden incluir al menos un par de cebadores de amplificación adecuado para amplificar una secuencia de ácido nucleico de interés (p. ej., ácido nucleico diana). Como se describió anteriormente, una mezcla de reacción adecuada también puede incluir una "mezcla maestra" que contiene los componentes (p. ej., normalmente sin incluir el par de cebadores) necesarios para realizar una reacción de amplificación (p. ej., detergente, magnesio, componentes de tampón, etc.). Otras realizaciones de mezclas de reacción también se contemplan en este documento como entenderán los expertos en la materia.

Como se usa en este documento, los términos "disolución de reactivo" o "disolución adecuada para realizar una reacción de síntesis de ADN" se refieren a cualquiera o todas las disoluciones, que se usan normalmente para realizar una reacción de amplificación o síntesis de ADN. Incluyen, pero no se limitan a, disoluciones utilizadas en los métodos de amplificación de ADN, disoluciones utilizadas en reacciones de amplificación por PCR o similares. La disolución adecuada para la reacción de síntesis de ADN puede comprender un tampón, sales y/o nucleótidos. Puede comprender además cebadores y/o moldes de ADN para amplificar. Una o más disoluciones de reactivos se incluyen normalmente en las mezclas de reacciones o mezclas maestras descritas en este documento.

Como se usa en este documento, el término "cebador" o "secuencia de cebador" se refiere a un oligonucleótido lineal corto que hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana (p. ej., un molde de ADN para amplificar) para cebar una reacción de síntesis de ácido nucleico. El cebador puede ser un oligonucleótido de ARN, un oligonucleótido de ADN o una secuencia química (p. ej., que comprende ARN y ADN). El cebador puede contener nucleótidos naturales, sintéticos o modificados. Los límites superior e inferior de la longitud del cebador están determinados empíricamente. El límite inferior en la longitud del cebador es la longitud mínima que se requiere para formar un dúplex estable en la hibridación con el ácido nucleico diana en condiciones de reacción de amplificación de ácido nucleico. Los cebadores muy cortos (generalmente de menos de 3 nucleótidos de largo) no forman dúplex termodinámicamente estables con ácido nucleico diana en tales condiciones de hibridación. El límite superior a menudo se determina por la posibilidad de tener una formación dúplex en una región distinta de la secuencia de ácido nucleico predeterminada en el ácido nucleico diana. Generalmente, las longitudes del cebador adecuadas están en el intervalo de aproximadamente cualquiera de, p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, (y así sucesivamente) nucleótidos de longitud.

- En algunas realizaciones, los términos "sonda (s)", "oligonucleótido (s)" y/o "cebador (es)" pueden ser términos intercambiables en este documento, de modo que cualquiera de estos puede tomarse como referencia a otro. Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido", "sonda", "cebador", "molde", "ácido nucleico" y similares se pueden tomar para referirse a poblaciones o grupos de moléculas individuales que son sustancialmente idénticas en toda su longitud o a través de una parte relevante de interés. P. ej., el término "molde" puede indicar una pluralidad de moléculas de molde que son sustancialmente idénticas, etc. En el caso de polinucleótidos que están degenerados en una o más posiciones, se apreciará que el polinucleótido degenerado puede comprender una pluralidad de moléculas de polinucleótidos, que tienen secuencias que son sustancialmente idénticas solo en las posiciones no degeneradas y difieren en secuencia en las posiciones degeneradas. Así, la referencia a "un" polinucleótido (p. ej., "un" cebador, sonda, oligonucleótido, molde, etc.) se puede interpretar como una población de moléculas de polinucleótido sustancialmente idénticas, de manera que la naturaleza plural de una población de moléculas de ácidos nucleicos sustancialmente idénticos no necesitan indicarse explícitamente, pero puede, si así se desea. Estos términos también pretenden proporcionar un soporte adecuado para una reclamación que especifique explícitamente una molécula de polinucleótido única.
- La "ligación" implica la formación de un enlace o enlace covalente entre los extremos de dos o más ácidos nucleicos, p. ej., oligonucleótidos y/o polinucleótidos, opcionalmente en una reacción dirigida por un molde. Las ligaciones ilustrativas se pueden llevar a cabo enzimáticamente para formar un enlace fosfodiéster entre un carbono 5' de un nucleótido terminal de un oligonucleótido con el carbono 3' de otro oligonucleótido (p. ej., usando una ligasa). La naturaleza del enlace o enlace puede variar ampliamente y la ligación preferiblemente se logra enzimáticamente. La eficacia de la ligación se refiere a la velocidad de ligación. Donde la eficacia relativa de la ligación se especifica en términos comparativos o relativos en comparación con un ensayo de ligación de referencia, está implícito que todos los demás reactivos y condiciones (p. ej., temperatura, concentración de todos los reactivos, pH, concentración de iones necesarios, como Mg⁺⁺ y Mn⁺⁺, la concentración de los cofactores requeridos tales como NAD y/o ATP, sales, tampones, concentraciones molares de todos los reactivos, incluyendo la enzima, el molde, el cebador de la sonda, los oligonucleótidos, etc. se mantienen de lo contrario idénticos. P. ej., una condición de que una ligasa (p. ej., una SFL (ver a continuación)) puede ligar una sonda corta (p. ej., menos de 6 nucleótidos) al menos X% (p. ej., donde X es 100 o menos; 100, 99, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 50, 25, 10, 1, 0,5, 0,1, etc., o cualquier incremento entre) tan eficientemente como la ligasa puede ligar un octanucleótido correspondiente, se puede entender que significa que la tasa la ligación de la sonda más corta se produce a una tasa que es al menos X% de la tasa de ligación del octanucleótido, donde todos los reactivos, excepto las sondas (p. ej., cebador, molde, enzimas y cualquier otro reactivo) y todas las condiciones de reacción (p. ej., la temperatura, las concentraciones de reactivos, las concentraciones de cualquier otro reactivo, etc. se mantienen invariantes para propósitos prácticos. Se entiende que la eficiencia de la ligación en términos absolutos o relativos puede aumentar o disminuir según las condiciones de reacción exactas utilizadas.
- Opcionalmente, la ligación se realiza en condiciones in vitro que se han determinado experimentalmente como adecuadas u óptimas para la actividad de la ligasa. Preferiblemente, las condiciones de reacción se mantienen sustancialmente similares a las condiciones in vivo o fisiológicas en las que una forma natural de la ligasa que se usa es naturalmente activa. Lo más preferiblemente, las condiciones de reacción para una ligasa particular se emparejan lo más estrechamente posible a las condiciones de ligación in vitro ilustrativas descritas en este documento para esa ligasa. En otras realizaciones, las condiciones son tales que el ensayo de ligación de referencia produce una ligación significativa o detectable en 30 minutos, en 10 minutos, en 1 minuto o en 10 segundos. Otro ejemplo no limitante de una velocidad de ligación significativa o detectable se genera en el intervalo de 100 pM del producto de ligación, opcionalmente alrededor de 1000 pM o 10,000 pM, en un tiempo apropiado (p. ej., 10 minutos).
- En líneas similares, debe entenderse que una declaración de que ha ocurrido un resultado (p. ej., ligación, unión) pretende indicar que el resultado ha ocurrido en un nivel significativo o sustancial o un nivel mejorado en comparación con cuando no ha ocurrido. P. ej., se dice que la ligación no se produce si no es significativa, insustancial o muy reducida (p. ej., reducida en al menos 80%, 90%, 95% o 99% en comparación con cuando se produce la ligación descrito en el último párrafo). En referencia a la ligación de dos polinucleótidos, el extremo "proximal" de cualquiera de los polinucleótidos es el término que está destinado a ser ligado al otro polinucleótido. Generalmente, es el término que está más cerca del otro polinucleótido, o el extremo que se pone en contacto con el sitio activo de la ligasa, o el extremo que finalmente se liga al otro polinucleótido, mientras que el extremo opuesto es el extremo "distal". El residuo de nucleótido terminal en el extremo proximal se puede denominar nucleótido proximal, y la posición de nucleótido proximal se designa opcionalmente como posición 1, la penúltima posición de nucleótido como posición 2, etc. Los extremos de ambos polinucleótidos se hibridan adyacentemente entre sí.
- Un tipo ilustrativo de ligación enzimática (ligación de doble cadena) incluye la formación de un enlace covalente entre los nucleótidos de un polinucleótido (p. ej., dando como resultado la circularización) o entre dos o más polinucleótidos (p. ej., un primer extremo de doble cadena de un primer polinucleótido y un segundo extremo de doble cadena diferente de un segundo polinucleótido). Los polinucleótidos pueden ser diferentes, o pueden ser los mismos. Los polinucleótidos también se pueden ligar utilizando un oligonucleótido "férula" que se puede usar para enlazar los nucleótidos que el usuario desea ligar (p. ej., en los mismos o diferentes polinucleótidos). Opcionalmente, los extremos de ambos extremos de doble cadena se pueden unir independientemente de sus secuencias (p. ej., ligación de extremo a extremo o unión de extremo no homóloga).
- En otra variación, se pueden ligar dos polinucleótidos de doble cadena con extremos monocatenarios sobresalientes

que son complementarios entre sí (p. ej., ligación de extremo cohesivo). En otros casos, la ligación puede ligar dos polinucleótidos de cadena única, uno o ambos de los cuales se ha hibridado opcionalmente (alineado) a otra secuencia de nucleótidos. En la ligación dependiente del molde, la ligación entre un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido se produce tras la hibridación de al menos una parte de uno o ambos polinucleótidos con una secuencia diana. La secuencia diana puede ser una parte de cualquiera de los polinucleótidos (p. ej., auto-hibridación o hibridación entre sí) o en una secuencia en un tercer polinucleótido diferente (p. ej., un oligonucleótido "férula"). La parte hibridada del polinucleótido puede tener, p. ej., no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15 o 20 nucleótidos de longitud. La parte hibridada es opcionalmente una parte terminal del nucleótido (p. ej., incluye el nucleótido 5' o 3'). P. ej., la parte hibridada puede consistir en el nucleótido terminal 5' o 3', o el nucleótidos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15 o 20 terminal del extremo 5' o 3'. Opcionalmente, la ligación se produce cuando no hay una falta de coincidencia presente en las partes hibridadas.

En otros casos, la ligación ocurre cuando pueden estar presentes uno, dos o tres desajustes dentro de la parte hibridada. En algunos casos, la ligación no se produce cuando el nucleótido terminal y/o el segundo nucleótido más terminal y/o el tercer nucleótido más terminal no coinciden. Como se mencionó, los nucleótidos terminales pueden ser los nucleótidos terminales 5' o 3' del polinucleótido. Un tipo de ensayo ilustrativo hace uso de la ligación dependiente del molde entre un primer polinucleótido monocatenario y un segundo polinucleótido monocatenario, donde la ligación se puede efectuar cuando uno o ambos polinucleótidos se hibridan con un tercer polinucleótido monocatenario diferente. En algunos casos, ambas sondas deben hibridar con el molde para que se produzca una ligación significativa. Para facilitar la referencia, el primer polinucleótido se llama "sonda de inicialización", el segundo polinucleótido se llama "sonda de extensión" y el tercer polinucleótido se llama "molde".

En algunas variaciones (p. ej., «ligación de mellas»), ambas sondas deben hibridar adyacentemente entre sí en el molde para que se produzca la ligación. En algunos ensayos, las sondas se hibridan de forma adyacente y se pueden ligar solo cuando un nucleótido terminal de la sonda de inicialización se hibrida con un primer nucleótido del molde y un nucleótido terminal de la sonda de extensión se hibrida con un segundo nucleótido del molde, donde el primer y segundo nucleótidos en el molde no están separados por un nucleótido intermedio del molde. En otras realizaciones, unos pocos nucleótidos intermedios pueden estar presentes entre los primeros y segundos nucleótidos en el molde (p. ej., 1, 2, 3 o más nucleótidos). En tales realizaciones, se puede realizar una etapa de "llenado de huecos" para extender el extremo 3' de una sonda antes de que pueda ligarse al extremo 5' de la otra sonda.

En los métodos descritos en este documento, el nucleótido terminal de la sonda de inicialización puede ser el nucleótido terminal 5' y el nucleótido terminal de la sonda de extensión puede ser el nucleótido terminal 3'. Alternativamente, el nucleótido terminal de la sonda de inicialización puede ser el nucleótido terminal 3' y el nucleótido terminal de la sonda de extensión puede ser el nucleótido terminal 5'. El producto de ligación de una reacción cualquiera puede someterse opcionalmente a otras reacciones de ligación y/o no ligación sucesivamente. P. ej., el producto de ligación se puede utilizar como sonda de inicialización o sonda de extensión o molde en una ligación siguiente. También, p. ej., se puede usar como molde o cebador para la extensión de la polimerasa, como en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Puede escindirse enzimáticamente o químicamente (p. ej., cuando tiene enlaces escindibles), tratarse con exo o endonucleasas, quinasas, fosfatasa, etc. adenilato, etc. Los extremos de un producto bicatenario pueden ser extremo romo o relleno, tapado, o adenilado, etc.

Como se usa en este documento, "oligonucleótido de férula", "oligo de férula" o "conector" se refiere a un oligonucleótido que se usa para proporcionar un sitio de alineamiento o una "molde de ligación" para unir dos extremos de una molécula o moléculas de ácido nucleico utilizando una ligasa u otra enzima con actividad ligasa. La férula de ligación mantiene los extremos adyacentes entre sí y "crea una unión de ligación" entre los extremos 5'-fosforilados y 3'-hidroxilados que se deben ligar. P. ej., cuando se utiliza un oligo de férula de ligación para unir el extremo 3' de un primer oligo (oligo A) de sonda al extremo 5' de un oligo de segunda sonda, el oligo de férula de ligación tiene una secuencia complementaria al extremo 3' del oligo A (p. ej., secuencia de la cola de oligo y una segunda secuencia vecina (p. ej., una secuencia adyacente) que es complementaria al extremo 5' del oligo B (Fig. 4).

En algunas realizaciones de los procesos PLA mejorados, los oligos de férula pueden ser simétricos o asimétricos, dependiendo del número de nucleótidos que hibridan con cada una de las dos sondas de oligo que se conectan o ligan. La Fig. 4 muestra diagramas asimétricos y tipos de férulas simétricas para usar en los procesos de PLA mejorados como se describe en este documento. En algunas realizaciones, las férulas asimétricas (o "conectores") se extienden a través de las dos sondas oligo separadas (p. ej., la sonda oligo A y B) con uno de los extremos de la férula (p. ej., el extremo 3' o el extremo 5') que tiene más nucleótidos que hibridan con uno de los oligos de sonda que el otro extremo de la férula tiene nucleótidos que hibridan con el oligo de sonda alternativo (Fig. 4A). En otras realizaciones, las férulas simétricas abarcan las dos sondas oligo separadas (p. ej., la sonda oligo A y B) con ambos extremos de la férula (p. ej., el extremo 3' y el extremo 5') que tienen el mismo número de nucleótidos que hibridan con cada uno de los dos oligos sonda (Fig. 4BA).

Tanto las férulas asimétricas como las simétricas pueden tener cualquier número de nucleótidos intermedios entre cada uno de sus extremos 3' y 5' que hibridan con los oligos de la sonda por separado. Alternativamente, no puede haber nucleótidos intermedios entre cada uno de los extremos 3' y 5' que hibridan con los oligos de la sonda. En realizaciones preferidas, los oligonucleótidos de la férula (oligos) tienen al menos 6 nucleótidos de largo (p. ej., 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más). En ciertas otras realizaciones, cada uno de los extremos 3' o 5' de la férula oligo comprenden al menos 3 (p. ej., 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) nucleótidos que hibridan por separado

para (o "superponerse") una sonda oligo, en este documento denominada la región "saliente".

En algunas realizaciones de los procesos de PLA mejorados, el oligo de la férula se bloquea en su extremo 3'. El agente de bloqueo puede ser cualquier resto covalentemente conectado que impida la actividad de la polimerasa. Se impide que después este oligo de férula bloqueado en 3' interfiera con la parte de la reacción de PCR del proceso de PLA mejorado. En algunas realizaciones, p. ej., el agente de bloqueo 3' puede incluir, pero no se limita a, 3'-fluoro-, 3'-bromo-, 3'-yodo-, 3'-desoxi-, 3'-metil, 3'-metoxi, 3'-fosfato, 3'-amino enlace, 3'-amidita básica, o cualquier otro grupo de modificación 3'. Los expertos en la técnica podrán contemplar además otros agentes de bloqueo para su uso como se describe en este documento.

Uno o más de los métodos de ligación proporcionados en este documento se pueden usar en un ensayo de ligación. Los ejemplos no limitantes de ensayos de ligación incluyen un ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA), una reacción en cadena de la ligasa (LCR), una reacción de detección de la ligasa (LDR) y ensayos de combinación tales como el OLA acoplado a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), p. ej., OLA-PCR y PCR-OLA, la reacción en cadena combinada (CCR; una combinación de PCR y LCR) y PCR-LDR (véase, p. ej., Landegren et al., *Science* 241: 1077-80, 1988; Barany, *Proc. Natl Acad. Sci.* 88: 189-93, 1991; Grossman y otros, *Nucl. Acids Res.* 22(21):4527-34, 1994; Bi and Stambrook, *Nucl. Acids Res.* 25(14):2949-51, 1997; Zirvi et al., *Nucl. Acids Res.*, 27(24):e40, 1999; Patente de EE.UU. N° 4,988,617; y las publicaciones PCT números WO 97/31256 y WO 01/92579. Tales ensayos se han utilizado para el análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNP), el genotipado de SNP, la detección de mutaciones, la identificación de genes de copia única, la detección de secuencias de repetición de microsatélites y el mapeo de aductos de ADN, entre otras cosas. Véase también Whitely et al, Patente de EE.UU. N° 4,883,750; Letsinger et al, Patente de EE.UU. N° 5,476,930; Fung et al., Patente de EE.UU. N° 5,593,826; Kool, Patente de EE.UU. N° 5,426,180; Landegren et al., Patente de EE.UU. N° 5,871,921; Xu y Kool, *Nucleic Acids Research*, 27: 875-881 (1999); Higgins et al, *Methods in Enzymology*, 68: 50-71 (1979); Engler et al, *The Enzymes*, 15-3-29 (1982); y Namsaraev, Patente de EE.UU. Pub. 2004/0110213. Se ha informado la fidelidad de varias ligasas conocidas, basadas en, p. ej., la evaluación de la ligación de desajuste o las tasas de ligación. P. ej., la ligasa dependiente de NAD⁺ de la bacteria hipertermofílica *Aquifex aeolicus* genera, según se informa, productos sin ligar en 3' detectables con desajustes de C:A, T:G y G:T (Tong et al., *Nucl. Acids Res.* 28(6):1447-54, 2000); una preparación parcialmente purificada de ADN ligasa III bovina generó productos sin ligar en 3' detectables con desajustes C:T, G:T y T:G, mientras que la ligasa humana I generó productos sin ligar en 3' detectables con desajustes C:T y G:T, pero no los desajustes de T:G (Husain et al., *J. Biol. Chem.* 270 (16): 9683-90, 1995); y la ADN ligasa de las bacterias termófilas *Thermus thermophilus* (Tth) genera niveles detectables de productos sin ligar 3' con desajustes T:G y G:T (Luo et al., *Nucl. Acids Res.* 24(14):3071-78, 1996). La DNA ligasa del bacteriófago T4 genera, según se informa, productos sin ligar detectables con una amplia gama de sustratos no coincidentes y parece tener menor fidelidad que las ligasas de la especie *Thermus* en al menos uno o dos órdenes de magnitud (Landegren et al., *Science* 241: 1077-80, 1988; Tong et al., *Nucl. Acids Res.* 27(3):788-94, 1999).

Un ensayo particularmente útil es el ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA). El OLA es un método conveniente y altamente riguroso que permite la distinción entre variantes de secuencia de ADN conocidas (Landegren, 1988). P. ej., el análisis múltiple de loci altamente polimórfico es útil para la identificación de individuos, p. ej., para ensayos de paternidad y en ciencia forense, la correspondencia entre donante y receptor de trasplante de órganos, diagnóstico de enfermedades genéticas, pronóstico y asesoramiento prenatal, y otros ensayos de base genética que depende de la discriminación de las diferencias de base única en una multiplicidad de loci (Delahunty, 1996). Los productos de un OLA múltiple se pueden resolver electroforéticamente entre sí y de sondas no ligadas en condiciones de desnaturalización con detección de fluorescencia (Grossman, 1994). P. ej., dos quimeras PNA-DNA, una quimera de secuencia de tipo salvaje (WT) y una quimera de secuencia mutante, pueden llevar diferentes tintes fluorescentes. Solo cuando la secuencia mutante esté presente en la muestra objetivo, la secuencia quimérica mutante se ligará a la segunda sonda (oligo) alineada de forma adyacente si el par de bases mutantes está en el sitio de ligación. Los productos de ligación se pueden discriminar por separación en función de: (i) el tamaño utilizando electroforesis o cromatografía y/o (ii) marcadores detectables (Grossman, 1994). Con una pluralidad de colorantes fluorescentes marcados para quimeras con secuencias que apuntan a secuencias diana únicas, el OLA multiplexado se puede realizar en una sola muestra en un solo recipiente. Los requisitos para un OLA múltiple eficiente incluyen sondas que se alinean y ligan de una manera altamente específica y rápida. Las quimeras y las secuencias de la segunda sonda se pueden seleccionar de modo que la base mutante, o el polimorfismo de base única, puedan estar en el fosfato 5' de la segunda sonda o en el extremo 3' de la quimera. Se contempla que los experimentos de OLA se pueden realizar en soportes sólidos donde el ácido nucleico molde, la sonda quimérica PNA-ADN o la segunda sonda se pueden inmovilizar sobre una partícula sólida o perla, o una superficie sólida porosa o no porosa. Cuando está inmovilizada, el molde, la quimera o la segunda sonda se unen covalentemente al sustrato sólido, p. ej., a través de una unidad monomérica terminal. El sustrato sólido puede ser poliestireno, vidrio de poros controlados, gel de sílice, poliacrilamida, perlas magnéticas, poliacrilato, metacrilato de hidroxietilo, poliamida, polietileno, polietilenoxi y copolímeros e injertos de cualquiera de los sustratos sólidos anteriores. La configuración o formato del sustrato sólido pueden ser pequeñas partículas o perlas de aproximadamente 1 a 50 µm de diámetro, membranas, fritas, portaobjetos, placas, chips micromaquinados, capas de alcanotiol-oro, superficies no porosas y medios inmovilizadores de polinucleótidos.

Como se describió anteriormente, la ligación enzimática se realiza normalmente usando una ligasa, que puede ser un polipéptido. Las ligasas adecuadas incluyen, p. ej., ligasa de ácido nucleico, ligasa oligonucleótida, ligasa de ADN, ligasa de ARN y similares. Las ligasas de ARN adecuadas incluyen las descritas o utilizadas en, p. ej., cualquiera de

las patentes de EE.UU. Nos. 4.582.802; 5,665,545; 6,194,637; 6,444,429; 6,455,274; 6,576,453; 6,635,425; 6.855.523; 7.811.753; y similares, y/o cualquiera de las patentes de EE.UU. Pubs. 2004/0171047A1, 2004/0191871A1, US20050266487A1, 2006/0223098A1, 2007/0037190A1, 20080160526A1; 2009/0061481A1, 2010/0099683A1, y/o 2010/0184618A1; y similares, las ADN ligasas ilustrativas pueden incluir, p. ej., ADN ligasa T3, ADN ligasa T4, ADN ligasa T5, ADN ligasa T7, ADN ligasa ADN del virus vaccinia, ADN ligasa de *E. coli*, ADN ligasa I de mamífero, ADN ligasa II de mamífero, ADN ligasa III de mamífero, ADN ligasa Tth, ADN ligasa KOD, una ADN ligasa termoestable y/o derivados, fragmentos y/o combinaciones de los mismos. Las ligasas de ARN adecuadas incluyen las descritas o utilizadas en, p. ej., cualquiera de las patentes de EE.UU. Nos. 4.661.450; 5,516,664; 5,602,000; 5,807,674; 6.368.801; 6,492,161; 6,635,453; y similares, o cualquiera de las patentes de EE.UU. Pub. Nos. 2003/0082536A1; 2004/0058330A1; 2005/0266439A1; 2005/0074774A1; 2008/0045418A1; 2010/00159526A1; y similares, las ARN ligasas ilustrativas pueden incluir, p. ej., ARN ligasa T4, ARN ligasa del bacteriófago RB69, ARN ligasa del virus de la polihedrosis nuclear *Autographa californica*, una ARN ligasa termófila, ARN ligasa del bacteriófago RM378, ARN ligasa del bacteriófago TS2126, fragmentos, y/o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, la ligasa es una "ligasa de huella pequeña" (SFL). Un SFL tiene la capacidad de ligar polinucleótidos cortos (p. ej., al menos aproximadamente 3 nucleótidos). Como se describe en este documento, una SFL puede ligar oligonucleótidos que tienen una longitud de oligo conector tan corta como 3 bases de ADN hibridado adyacente a ADN hibridado con 5'-fosfato. En algunas realizaciones, la SFL se puede usar para ligar oligonucleótidos que comprenden secuencias cortas de solapamiento (p. ej., longitud de oligo conector corta). P. ej., el SFL se puede usar para ligar oligonucleótidos de varios nucleótidos de longitud, por lo que cada oligo tiene al menos una superposición de 3 nucleótidos con el oligo férula. Las ligasas típicas serían más adecuadas para ligar oligonucleótidos más largos (p. ej., que comprenden 9 o más nucleótidos; que comprenden 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, etc. nucleótidos). De esta manera, la concentración de oligonucleótidos también puede reducirse para minimizar la posibilidad de una ligación no ligante de unión a antígeno promovida por hibridación en disolución. Para combinar la ligación y la reacción de PCR en un solo paso, se puede omitir ATP (cofactor para la ligasa) de la mezcla de reacción. Para mantener la función de la ligasa, la SFL se puede enriquecer previamente con ATP antes de su purificación y uso.

Una SFL puede ser una ligasa natural o no natural (p. Ej., Artificial, sintética). Una SFL puede comprender una secuencia polipeptídica que es homóloga o una variante de una secuencia de ligasa conocida o cualquier porción de la misma. Los SFL ilustrativas pueden tener una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 70%, opcionalmente al menos 85%, opcionalmente al menos 90 o 95%, con una ligasa conocida, y posee una o más actividades funcionales de una ligasa. Un SFL puede comprender así un polipéptido que tiene una o más de las siguientes actividades: (1) ataque nucleofílico en ATP o NAD⁺ que resulta en la liberación de PPi o NMN y la formación de un intermedio de adenilato de ligasa covalente; (2) transferir el adenilato al extremo 5' de la cadena de ADN terminada en 5'-fosfato para formar adenilato de ADN (p. ej., el oxígeno 5'-fosfato de la cadena de ADN ataca el fósforo de adenilato de ligasa); y, (3) formación de un enlace covalente que se une al extremo polinucleótido y la liberación de AMP (p. ej., por el ataque del 3'-OH al adenilato de ADN). Opcionalmente, el SFL puede mediar una cualquiera o más de las siguientes transformaciones de enlace: de fosfohidruro (ATP) a fosforamidato (ligasa-adenilato); de fosforamidato (ligasa-adenilato) a fosfoanhidruro (ADN-adenilato); y/o de fosfohidruro (adelanilato de ADN) a fosfodiéster (ADN sellado). El SFL en un aspecto es una enzima que puede mediar la formación de un enlace covalente entre dos extremos polinucleótidos, p. ej., un extremo 3'-OH y un extremo 5'-PO₄ se unen para formar un enlace fosfodiéster. En algunos casos, la ligación del ADN conlleva uno o más de las tres etapas de transferencia de nucleotidilo secuenciales, que se describen a continuación. Las tres etapas químicas dependen de un cofactor de cationes divalentes. En un aspecto, la SFL es una ligasa dependiente de ATP o una ligasa dependiente de NAD⁺.

P. ej., la SFL puede comprender uno o más dominios característicos de una ligasa (p. ej., un dominio de nucleotidiltransferasa N-terminal (NTasa) y/o un dominio OB C-terminal). El dominio OB comprende opcionalmente un barril beta antiparalelo de cinco cadenas más una hélice alfa. Dentro del dominio de la NTasa se encuentra una bolsa de unión a adenilato compuesta por los seis motivos peptídicos que definen la familia de enzimas de la NTasa covalente de ligasas de polinucleótido. Opcionalmente, el dominio de NTasa puede comprender uno o más de los motivos de aminoácidos de la ligasa I, III, IIIa, IV y/o V, y preferiblemente los seis motivos. El motivo I (p. ej., KxDGxR o un motivo "KXDG") contiene opcionalmente una lisina. Las secuencias ilustrativas para cada motivo en la ligasa CV son ATPKIDGIR (motivo I) (SEC ID NO.: 1), SRT (motivo Ia), EGSDGEIS (motivo III) (SEC ID NO.: 2), YWFDY (motivo IIIa) (SEC ID NO.: 3), EGVMIR (motivo IV) (SEC ID NO.: 4), LLKMK (motivo V) (SEC ID NO.:5). El motivo 1 pfy contiene un residuo de lisina. Otros ejemplos del motivo I incluyen CELKLDGLA (SEC ID NO.: 6), VEHKVDGLS (SEC ID NO.: 7), CEPKLDGLA (SEC ID NO.: 8), CELKLDGVA (SEC ID NO.: 9), AEIKYDGVR (SEC ID NO.: 10), CEYKYDGQR (SEC ID NO.: 11), VDYKYDGER (SEC ID NO.: 12), FEIKYD GAR (SEC ID NO.: 13), FEGKWDGYR (SEC ID N°: 14), AREKIHGTN (SEC ID NO.: 15), ACEKVHGTN (SEC ID NO.: 16), ILTKEDGSL (SEC ID NO.: 17) y VEEKVDGYN (SEC ID NO.: 18). Los ejemplos del motivo Ia incluyen TRG, SRT, SRR, SRN, SRS, KRT, KRS, SKG y TRG. Los ejemplos del motivo III incluyen LEVRGEVF (SEC ID NO.: 19), VEVRGECY (SEC ID NO.: 20), LEVRGEVY (SEC ID NO.: 21), LEARGEAF (SEC ID NO.: 22), FMLDGE LM (SEC ID NO.: 23), EGSDGEIS (SEC ID NO.: 24), FILDTEAV (SEC ID NO.: 25), FIIEGEIV (SEC ID NO.: 26), AIVEGELV (SEC ID NO.: 27), VVLDGEAV (SEC ID NO.: 28), YQVFGEFA (SEC ID NO: 29), LVLNGELF (SEC ID NO.: 30), FTANFEFV (SEC ID NO.: 31) y LILVGEMA (SEC ID NO.: 32). Los ejemplos del motivo IIIa incluyen FCYGV (SEC ID NO.: 33), FLYTV (SEC ID NO.: 34), TFYAL (SEC ID NO.: 35), ICHGL (SEC ID NO.: 36), NAYGI (SEC ID NO.: 37), FVYGL (SEC ID NO.: 38), KLYAI (SEC ID NO.: 39), YWFDY (SEC ID NO.: 40), YAFDI (SEC ID NO.: 41), FLFDL (SEC ID NO.: 42), NLFDV (SEC ID NO.: 43), WAFDL (SEC ID NO.: 44), YVFDI (SEC ID NO.: 45), FAFDI (SEC ID NO.: 46), ILLNA (SEC ID NO.: 47), y FLFDV (SEC ID NO.: 48). Ejemplos del motivo IV incluyen DGVVIK (SEC ID NO.: 49), DGIVIK (SEC ID NO.: 50), DGVVVK (SEC ID

ES 2 728 743 T3

NO.: 51), DGTVLK (SEC ID NO.: 52), EGLIVK (SEC ID NO.: 53), EGVMIR (SEC ID NO.: 54), EGLMVK (SEC ID NO.: 55), EGVMVK (SEC ID NO.: 56), EGLMAK (SEC ID NO.: 57), EGVIK (SEC ID NO.: 58), EGYVLK (SEC ID NO.: 59), EGVVIR (SEC ID NO.: 60), EGYVAV (SEC ID NO.: 61) y EGIIMK (SEC ID NO.: 62). Los ejemplos del motivo V incluyen AVAFK (SEC ID NO.: 63), AIAYK (SEC ID NO.: 64), ALAYK (SEC ID NO.: 65), AIAYK (SEC ID NO.: 66), WWKMK (SEC ID NO.: 67), LLKMK (SEC ID NO.: 68), WLKLK (SEC ID NO.: 69), WIKLK (SEC ID NO.: 70), WLKIK (SEC ID NO.: 71), WVKDK (SEC ID NO.: 72), AIKCK (SEC ID NO.: 73), IIKLR (SEC ID NO.: 74), HFKIK (SEC ID NO.: 75) e IVKYV (SEC ID NO.: 76). El SFL comprende opcionalmente los seis motivos. Opcionalmente, los seis motivos se encuentran juntos en una ligasa de origen natural, tal como una SFL identificada en este documento. En algunas realizaciones, la SFL no es una enzima que tapa el ARN. La ligasa comprende opcionalmente cualquier parte funcional de un SFL. La ligasa puede ser homóloga a una SFL o cualquier parte funcional de la misma, p. ej., más del 75%, 85%, 90%, 95% o 99% de homóloga a nivel de aminoácidos. Un ejemplo de SFL es una ADN ligasa del virus *Chlorella* (ChVLig) (Ho, et al., *J Virol*, 71 (3): 1931-19374 (1997)) o un fragmento funcional o variante del mismo. Los ejemplos representativos de SFL incluyen ligasa CV, DLX, DLXd, DLXd2 y ligasa MnM. Un SFL preferido es el virus de la *Chlorella* ligasa. Se identifican algunas ligasas ilustrativas y sus GI o números de acceso se proporcionan en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1

PRK08224		
B. Acidobacterias		
<i>Bacterias Grupo de fibrobacterias/acidobacterias; Acidobacterias; acidobacterias sin clasificar; Candidatus Koribacter; Candidatus Koribacter versatilis</i>		
Candidatus Solibacter usitatus Ellin6076Candidatus Solibacter (1 proteínas)	ADN dependiente de ATP Ligasa	YP 826317
C. Actinobacterias		
<i>Bacterias Actinobacterias; Actinobacterias (clase); Actinobacteridae; Actinomycetos; Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium; Mycobacterium marinum</i>		
Mycobacterium gilvum PYR-GCKMycobacterium (26 proteínas)	ADN dependiente de ATP Ligasa	YP_001132524
Mycobacterium vanbaalenii PYR-1Mycobacterium (26 proteínas)	ADN dependiente de ATP Ligasa	YP_956315
Mycobacterium sp. MCSMycobacterium (26 proteínas)	ADN dependiente de ATP Ligasa	YP_642076
F. Chlamydiae/Verrucomicrobia		
<i>Bacterias Grupo de clamidia/verrucomicrobia; Verrucomicrobia; Opitutae; Opitutaes; Opitutaceae; Opitutus; Opitutus terrae</i>		
Opitutus terrae PB90-1Opitutus (1 proteínas)	ADN dependiente de ATP Ligasa	YP_001821013
PRK09125		
Organismo	Nombre de la proteína	Adhesión
O. Betaproteobacteria		
Neisseria meningitidis Z2491Neisseria (7 proteínas)	ADN ligasa	YP_002341892
Thiobacillus denitrificans ATCC 25259 Thiobacillus (1 proteínas)	ADN ligasa	YP 314570
Variovorax paradoxus S110Variovorax (1 proteínas)	ADN ligasa	YP_002944627

ES 2 728 743 T3

Verminephrobacter eiseniae EF01-2Verminephrobacter (1 proteínas)	ADN ligasa	YP_998235
	-	-
P.Deltaproteobacteria		
Desulfobacterium autotrophicum HRM2Desulfobacterium (1 proteínas)	LigA2	YP_002604477
Myxococcus xanthus DK 1622Myxococcus (1 proteínas)	ADN ligasa	YP_628883
	-	-
Q.Epsilonproteobacteria		
Campylobacter jejuni subsp. jejuni NCTC 11168Campylobacter (10 proteínas)	ADN ligasa dependiente de ATP	YP_002345037
Q.Epsilonproteobacteria		
Sulfurimonas denitrificans DSM 1251 Sulfurimonas (1 proteínas)	ADN ligasa	YP_393098
	-	-
R.Gammaproteobacteria		
Aggregatibacter aphrophilus NJ8700Aggregatibacter (2 proteínas)	ADN dependiente de ATP ligasa	YP_003007537
Haemophilus influenzae PittEEHaemophilus (3 proteínas)	ADN dependiente de ATP ligasa	YP_001290961
Shewanella baltica OS 195 Shewanella (18 proteínas)	ADN dependiente de ATP ligasa	YP_001554317
Shewanella loihica PV-4Shewanella (18 proteínas)	ADN dependiente de ATP ligasa	YP_001093713
Vibrio cholerae M66-2Vibrio (9 proteínas)	ADN ligasa	YP_002810248
	-	-
PHA0454		
Organismo	Nombre de la proteína	Adhesión
segundo. Virus		
<i>Virus; virus dsDNA, sin etapa de RNA; Caudovirales; Podoviridae; Autographivirinae; phiKMV-como virus</i>		
Virus de Pseudomonas fago LKD16phiKMV (7 proteínas)	ADN dependiente de ATP ligasa	YP_001522807
CLSZ2445448		
Organismo	Nombre de la proteína	Adhesión
a.Eukaryota		
<i>Eucariota; Alveolata; Ciliophora; Intramacronucleata; Oligohymenophorea; Peniculida; Parameciidae; Paramecio; Paramecium tetraurelia</i>		
Paramecium tetraurelia cepa d4-2Paramecium (5 proteínas)	ADN ligasa	XP_001347270
PRK07636		
Organismo	Nombre de la proteína	Adhesión
J.Firmicutes		

ES 2 728 743 T3

<i>Bacterias Firmicutes; Bacilos; Bacillales; Bacillaceae; Bacilo; Bacillus clausii</i>		
Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168Bacillus	ADN dependiente de ATP ligasa	NP_389932
<i>Bacterias Firmicutes; Bacilos; Bacillales; Bacillaceae; Geobacilo</i>		
Geobacillus sp. Y412MC10Geobacillus	ADN dependiente de ATP ligasa	YP_ 003240778
CLSK2551528		
Organismo	Nombre de la proteína	Adhesión
J.Firmicutes		
<i>Bacterias Firmicutes; Bacilos; Bacillales; Bacillaceae; Geobacilo</i>		
Geobacillus sp. Y412MC10Geobacillus (1 proteínas)	ADN dependiente de ATP ligasa	YP_ 003245332
	-	-
CLSK2470953		
Organismo	Nombre de la proteína	Adhesión
C.Actinobacterias		
<i>Bacteria, Actinobacterias; Actinobacterias (clase); Actinobacteridae; Actinomycetos; Micrococcineas; Micrococcaceae; Arthrobacter; Arthrobacter chlorophenolicus</i>		
Arthrobacter chlorophenolicus A6 (plásmido) Arthrobacter (2 proteínas)	ADN dependiente de ATP ligasa	YP_ 002478427
CLSK2469924		
Organismo	Nombre de la proteína	Adhesión
J.Firmicutes		
<i>Bacteria, Firmicutes; Bacilos; Bacillales; Alicyclobacillaceae; Alicyclobacillus; Alicyclobacillus acidocaldarius; Alicyclobacillus acidocaldarius subsp.acidocaldarius</i>		
Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. acidocaldarius DSM 446Alicyclobacillus	ADN dependiente de ATP ligasa	YP_ 003185050
CLSK2340991		
Organismo	Nombre de la proteína	Adhesión
N.Alphaproteobacteria		
<i>Bacterias Proteobacterias; Alfabroteobacterias; Caulobacterales; Caulobacteraceae; Fenilobacteria; Phenylobacterium zucineum</i>		
Phenylobacterium zucineum HLK1 (plásmido) Phenylobacterium (2 proteínas)	ADN dependiente de ATP ligasa	YP_ 002128631
	-	-
CLSK2333706		
Organismo	Nombre de la proteína	Adhesión
J.Firmicutes		
<i>Bacterias Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptococcaceae; Candidatus Desulforudis; Candidatus Desulforudis audaxviator</i>		
Candidatus Desulforudis audaxviator MP104CCandidatus Desulforudis (1	ADN dependiente de	YP_

ES 2 728 743 T3

proteínas)	ATP ligasa	001716762
	-	-
CLSK962101		
Organismo	Nombre de la proteína	Adhesión
C.Actinobacterias		
<i>Bacterias Actinobacterias; Actinobacterias (clase); Actinobacteridae; Actinomycetos; Micromonosporineas; Micromonosporaceae; Salinispora; Salinispora arenicola</i>		
Salinispora arenicola CNS-205Salinispora (2 proteínas)	ADN polimerasa LigD región ligasa	YP_ 001539124
Salinispora tropica CNB-440Salinispora (2 proteínas)	ADN dependiente de ATP ligasa	YP_ 001160776
	-	-
CLSK915249		
Organismo	Nombre de la proteína	Adhesión
C.Actinobacterias Ver CLSK2303611 arriba		
<i>Bacterias Actinobacterias; Actinobacterias (clase); Actinobacteridae; Actinomycetos; Streptomycinas; Streptomyetaceae; Streptomyces; Streptomyces coelicolor</i>		
Streptomyces avermitilis MA-4680 (plásmido) Streptomyces (2 proteínas)	putativo ATP- ADN ligasa dependiente	NP_828839
Streptomyces sp. HK1 (plásmido) Streptomyces (2 proteínas)	putativo ATP- ADN ligasa dependiente	YP_ 001661618
CLSK862724		
Organismo	Nombre de la proteína	Adhesión
A.Archaea		
<i>Archaea; Euryarchaeota; Archaeoglobi; Archaeoglobales; Archaeoglobaceae; Archaeoglobus; Archaeoglobus fulgidus</i>		
Archaeoglobus fulgidus DSM 4304 Archaeoglobus (1 proteínas)	ADN ligasa, putativo	NP_070553
J.Firmicutes		
Pelotomaculum thermopropionicum SIPelotomaculum (1 proteínas)	ADN dependiente de ATP ligasa	YP_ 001211793
Thermoanaerobacter pseudethanolicus ATCC 33223Thermoanaerobacter (2 proteínas)	ADN dependiente de ATP ligasa	YP_ 001664477
CLSK820690		
Organismo	Nombre de la proteína	Adhesión
A.Archaea		
<i>Archaea; Euryarchaeota; muestras ambientales</i>		
muestras arqueológicas metanogénicas RC-lenvironmental muestras (1 proteínas)	ADN dependiente de ATP ligasa	YP_686457

ES 2 728 743 T3

(continuación)

N.Alphaproteobacteria		
<i>Bacterias Proteobacterias; Alfaproteobacterias; Rizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium; Bradyrhizobium japonicum</i>		
Bradyrhizobium japonicum USDA 110Bradyrhizobium (2 proteínas)	ADN ligasa	NP 774671
Bradyrhizobium sp. BTAiilBradyrhizobium (2 proteínas)	putativo ATP-ADN ligasa dependiente	YP_001243518
CLSK808255		
Organismo	Nombre de la proteína	Adhesión
N.Alphaproteobacteria		
<i>Bacterias Proteobacterias; Alfaproteobacterias; Rizobiales; Rhizobiaceae; Grupo Sinorhizobium/ensifer; Sinorhizobium; Sinorhizobium medicae</i>		
Sinorhizobium medicae WSM419Sinorhizobium (2 proteínas)	ADN polimerasa LigD región ligasa	YP_001326990
Sinorhizobium meliloti 1021 (plásmido) Sinorhizobium (2 proteínas)	ATP dependiente de ADN ligasa putativo proteína	NP_437750
CLSK806855		
Organismo	Nombre de la proteína	Adhesión
N.Alphaproteobacteria		
<i>Bacterias Proteobacterias; Alfaproteobacterias; Rizobiales; Rhizobiaceae; Grupo Rhizobium/Agrobacterium; Agrobacterium; Agrobacterium tumefaciens</i>		
Agrobacterium tumefaciens str. C58 (plásmido) Agrobacterium (3 proteínas)	Un ADN dependiente de TP ligasa	NP_396032
Rhizobium leguminosarum bv. trifolii WSM1325 (plásmido) Rhizobium (10 proteínas)	ADN polimerasa LigD, proteína del dominio ligasa	YP_002973496
Rhizobium leguminosarum bv. trifolii WSM2304 (plásmido) Rhizobium (10 proteínas)	ADN polimerasa LigD, proteína del dominio ligasa	YP_002278005
CLSK390680		
Organismo	Nombre de la proteína	Adhesión
N.Alphaproteobacteria		
<i>Bacterias Proteobacterias; Alfaproteobacterias; Rizobiales; Phyllobacteriaceae; Mesorhizobium; Mesorhizobium loti</i>		
Mesorhizobium loti MAFF303099Mesorhizobium (3 proteínas)	proteína hipotética	NP_108282

Ejemplos de SFL adicionales pueden incluir, p. ej.:

MAITKPLLAATLENIEDVQFPCLATPKIDGIRSVKQTQMLSRTFKPIRNSVMNRLLELLPEGSDGEISIEGATFQDTTSA
VMTGHKMYNAKFSYYWFDYVTDPLKKYIDRVEDMKNYITVHPHILEHAQVKIIPVEINNITELLQYERDVLKSGFGE
GVMIRKPDGKYKFRSTLKEGILLKMKQFKDAEATIISMTALFKNTNTKTKDNFGYSKRSTHKSQVEEDVMGSIEDY
5 DGVVFSIGTGFDADQRRDFWQNKESYIGKMKVFKYFEMGSKDCPRFPV-FIGIRHEEDR (SF ADN ligasa,
AAC96909.1 GenBank ID, de Paramecium bursaria Chlorella virus 1) (SEC ID NO.: 77);

MSGVPYGFKNLAATLTKPELIKFPVWASPDKIDGIRCVFFGGVAYSRSCLKPIPNPVQEFKAYANLEGLDGLTVGS
PTDANCMQNSMAVMSKAAAPDFTFHVFDWFHPAQAHIEFWQRSDVVEDRIVQFYDRYPEVDIRAAPQVLCTSLAHL
10 DTNEARWLADGYEGMMIRDHCGRYKFRSTEREGGLVKVCRFTDAEAVIGFEEEMHNANEAKRDATGRTERSTSK
AGLHGKGTGALVVKNERGIVFNIGTGFTAAQRADYWANHPSLFGKMKV-FKHFDHGTVDAPRHPVFIGFRHPEDM
(MnM ADN ligasa, GenBank ID YP_333052.1, de Burkholderia pseudomallei 1710b (secuencia equivalente a
ABA50091)) (SEC ID NO.: 78);

MKFYRLLLLFFASSFAFANSIDLMLLHTYNNQPIEGWVMSEKLDGVRGYWNGKQLLTRQGQRLSPPAYFIKDFPPFAID
GELFSEFNHFEEISITKSFKGDGWEKLYVFDVPAEAGNLFERLAKLKAHLLHPTTYIEIIEIQIPVKDKTHLYQFLAQ
15 VENLQEGEVVVRNPAPYERKRSSQILKLTAR **G** EECTVIAHHKGGKGFENVMGALT
CKNHRGEFKIGSGFNLNERENPPPIGVSIVITYKYRGITNSGKPRFATYWREKK (Hin ADN ligasa, GenBank ID P44121,
de Haemophilus influenza) (SEC ID NO.: 79);

MKFYRLLLLFFASSFAFANSIDLMLLHTYNNQPIEGWVMSEKLDGVRGYWNGKQLLTRQGQRLSPPAYFIKDFPPFAID
GELFSEFNHFEEISSITKSFKGDGWEKLYVFDVPAEAGNLFERLAKLKAHLLHPTTYIEIIEIQIPVKDKTHLYQFLAQ
20 VENLQEGEVVVRNPAPYERKRSSQILKLTARGEECTVIAHHKGGKGFENVMGALT

CKNHRGEFKIGSGFNLNERENPPPIGVSIVITYKYRGITNSGKPRFATYWREKK (DLX ADN ligasa, ligasa artificial
derivado de ADN Hin ligasa de Haemophilus influenza) (SEC ID NO.: 80);

MKFYRLLLLFFASSFAFANSIDLMLLHTYNNQPIEGWVMSEKLDGVRGYW
NGKQLLTRQGQRLSPPAYFIKDFPPFAIDGELFSEFNHFEEISSITKSFKGDGWEKLYVFDVPAEAGNLFERLAKL
25 AHLLEHPTTYIEIIEIQIPVKDKTHLYQFLAQVENLQEGEVVVRNPAPYERKRSSQILKLTAR **D**EECTVIAHHKGGKGF
ENVMGALTCKNHRGEFKIGSGFNLNERENPPPIGVSIVITYKYRGITNSGKPRFATYWREKK (DLXd ADN ligasa, ligasa
artificial derivado de ADN Hin ligasa de Haemophilus influenza) (SEC ID NO.: 81); y,

MLLHTYNNQPIEGWVMSEKLDGVRGYWNGKQLLTRQGQRLSPPAYFIKDFPPFAIDGELFSEFNHFEEISITKSFKGD
GWEKLYVFDVPAEAGNLFERLAKLKAHLLHPTTYIEIIEIQIPVKDKTHLYQFLAQVENLQEGEVVVRNPAPYERK
30 RSSQILKLTARDEECTVIAHHKGGKGFENVMGALTCKNHRGEFKIGSGFNLNER

ENPPPIGVSIVITYKYRGITNSGKPRFATYWREKK (DLXd2DNALigase (Gammaproteobacteria, Haemophilus influenza)
(modificado)) (SEC ID NO.: 82).

Como se usa en este documento, los términos "amplificación", "amplificación de ácido nucleico" o "amplificación" se
refieren a la producción de copias múltiples de un molde de ácido nucleico, o la producción de copias de secuencias
35 de ácidos nucleicos múltiples que son complementarias del molde de ácido nucleico. La reacción de amplificación
puede ser una reacción de extensión mediada por polimerasa tal como, p. ej., una reacción en cadena de la polimerasa
(PCR). Sin embargo, cualquiera de las reacciones de amplificación conocidas puede ser adecuada para su uso como
se describe en este documento. El término "amplificación" que normalmente se refiere a un aumento "exponencial" en
40 el ácido nucleico diana se puede usar en este documento para describir aumentos tanto lineales como exponenciales
en los números de una secuencia diana seleccionada de ácido nucleico. El término "mezcla de reacción de
amplificación" y/o "mezcla maestra" pueden referirse a una disolución acuosa que comprende los diversos (algunos o
todos) reactivos utilizados para amplificar un ácido nucleico diana. Tales reacciones también se pueden realizar
utilizando soportes sólidos (p. ej., una matriz). Las reacciones también se pueden realizar en formato único o múltiple,
45 según lo desee el usuario. Estas reacciones incluyen normalmente enzimas, tampones acuosos, sales, cebadores de
amplificación, ácido nucleico diana y trifosfatos de nucleósidos. Dependiendo del contexto, la mezcla puede ser una
mezcla de reacción de amplificación completa o incompleta. El método utilizado para amplificar el ácido nucleico diana
puede estar disponible para un experto en la técnica. Se puede utilizar cualquier medio *in vitro* para multiplicar las
copias de una secuencia diana de ácido nucleico. Estos incluyen lineal, logarítmico y/o cualquier otro método de
50 amplificación. Si bien esta descripción puede discutir en general la PCR como la reacción de amplificación de ácido
nucleico, se espera que otros tipos de reacciones de amplificación de ácido nucleico, incluidas las reacciones de
amplificación mediadas por polímeros (como HDA, RPA y RCA), así como las reacciones de amplificación mediadas
por ligasa (como las versiones LDR, LCR y gap de cada una), y las combinaciones de reacciones de amplificación de
ácidos nucleicos como la LDR y la PCR (ver, p. ej., la patente de EE. UU. 6.797.470) también pueden ser adecuadas.
P. ej., además de los descritos en otra parte en este documento, se emplean diversas reacciones mediadas por la
55 ligación, donde, p. ej., se emplean sondas de ligación en oposición a los cebadores de PCR. Los métodos ilustrativos
adicionales incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; véase, p. ej., las patentes de EE. UU. Nos.
4,683,202; 4,683,195; 4,965,188; y/o 5,035,996), procedimientos isotérmicos (utilizando una o más ARN polimerasas
(véase, p. ej., WO 2006/081222) desplazamiento de la hebra (ver, p. ej., la patente de EE. UU. RE39007E), partial
destruction of primer molecules (see, e.g., WO2006087574), reacción en cadena de la ligasa (LCR) (ver, p. ej., Wu,
60 et al., Genomics 4: 560 -569 (1990)), y/o Barany, et al. PNAS USA 88: 189-193 (1991)), Q β RNA replicase systems

(ver, p. ej., WO/1994/016108), sistemas basados en la transcripción de ARN (p. ej., TAS, 3SR), amplificación de círculo rodante (RCA) (ver, p. ej., la patente de EE.UU. n.º 5,854,033; No. 2004/265897; Lizardi et al. Nat. Genet. 19: 225-232 (1998); y/o Baner et al. Nucleic Acid Res., 26: 5073-5078 (1998)), y la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) (Little, et al. Clin Chem 45: 777-784 (1999)), entre otros. Estos sistemas, junto con los muchos otros sistemas disponibles para el experto en la técnica, pueden ser adecuados para usar en la amplificación de ácidos nucleicos diana para usar como se describe en este documento.

La "eficiencia de amplificación" se puede referir a cualquier producto que se pueda cuantificar para determinar el número de copias (p. ej., el término se puede referir a un amplicón de PCR, un producto de ligación de LCR y/o un producto similar). Las reacciones se pueden comparar realizando al menos dos reacciones de amplificación separadas, cada reacción se lleva a cabo en ausencia y presencia, respectivamente, de un reactivo y/o etapa y cuantificando la amplificación que se produce en cada reacción.

También se proporcionan métodos para amplificar un ácido nucleico usando al menos una polimerasa, al menos un cebador, dNTP, y ligando y amplificando el ácido nucleico diana. En algunas realizaciones de tales métodos, se utiliza al menos un cebador. En ciertas realizaciones, se proporciona una mezcla o mezclas de reacción de amplificación de ácido nucleico que comprenden al menos una polimerasa, dNTP y al menos un cebador. En otras realizaciones, se proporcionan métodos para usar tal mezcla(s). Los ácidos nucleicos diana pueden amplificarse utilizando cualquiera de una variedad de reacciones y sistemas. Los métodos ilustrativos para amplificar ácidos nucleicos incluyen, p. ej., reacciones de extensión mediadas por polimerasa. P. ej., la reacción de extensión mediada por la polimerasa puede ser la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En otras realizaciones, la reacción de amplificación de ácido nucleico es una reacción multiplexada. P. ej., los métodos ilustrativos para amplificar y detectar ácidos nucleicos adecuados para su uso como se describen en este documento están disponibles comercialmente como TaqMan® (véase, p. ej., las patentes de EE. UU. Números 4,889,818; 5,079,352; 5,210,015; 5,436,134; 5,488,972; 5,658,751; 5,488,972; 5,618,711; 5,677,152; 5,723,591; 5,773,258; 5,789,252; 5,094,056; 6,030,787; 6,030,787; Los ensayos TaqMan® se llevan a cabo normalmente realizando una amplificación de ácido nucleico en un polinucleótido diana utilizando una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad nucleasa 5'-3', un cebador capaz de hibridar con dicho polinucleótido diana y una sonda de oligonucleótido capaz de hibridar con dicha diana polinucleótido 3' relativo a dicho cebador. En algunas realizaciones, la sonda oligonucleotídica incluye un marcador detectable (p. ej., una molécula reportera fluorescente) y una molécula desactivante capaz de desactivar la fluorescencia de dicha molécula indicadora. En ciertas realizaciones, el marcador detectable y la molécula desactivante forman parte de una única sonda. A medida que avanza la amplificación, la polimerasa digiere la sonda para separar el marcador detectable de la molécula desactivante. El marcador detectable (p. ej., fluorescencia) se puede monitorizar durante la reacción, donde la detección del marcador corresponde a la aparición de la amplificación de ácido nucleico (p. ej., cuanto más alta es la señal, mayor es la cantidad de amplificación). Las variaciones de los ensayos TaqMan® (p. ej., el ensayo TaqMan® enriquecido con LNA™) son conocidas en la técnica y serían adecuadas para su uso en los métodos descritos en este documento.

Otro sistema ilustrativo adecuado para su uso como se describe en este documento utiliza sondas de doble cadena en métodos de hibridación por desplazamiento (véase, p. ej., Morrison et al. Anal. Biochem., 18: 231-244 (1989); y/o Li, et al. Nucleic Acids Res., 30 (2, e5) (2002)). En tales métodos, la sonda normalmente incluye dos oligonucleótidos complementarios de diferentes longitudes, donde uno incluye un marcador detectable y el otro incluye una molécula desactivante. Cuando no está unido a un ácido nucleico diana, el interruptor suprime la señal del marcador detectable. La sonda se vuelve detectable tras la hibridación de desplazamiento con un ácido nucleico diana. Se pueden usar múltiples sondas, cada una de las cuales contiene diferentes marcadores detectables, de manera que se pueden consultar múltiples ácidos nucleicos diana en una sola reacción.

Métodos ilustrativos adicionales para amplificar y detectar ácidos nucleicos diana adecuados para su uso como se describe en este documento implican "balizas moleculares", que son sondas de oligonucleótidos en forma de horquilla monocatenarias. En presencia de la secuencia objetivo, la sonda se despliega, se une y emite una señal (p. ej., fluorescencia). Una baliza molecular normalmente incluye al menos cuatro componentes: 1) el "bucle", una región de 18-30 nucleótidos que es complementaria a la secuencia diana; 2) dos "vástagos" de 5-7 nucleótidos que se encuentran en cada extremo del bucle y que son complementarios entre sí; 3) en el extremo 5', un marcador detectable; y 4) en el extremo 3', un colorante desactivante que evita que el marcador detectable emita una sola cuando la sonda está en forma de bucle cerrado (p. ej., no está unida a un ácido nucleico diana). Por lo tanto, en presencia de una diana complementaria, la parte "vástago" de la baliza se separa, lo que da como resultado que la sonda se hibrida a la diana. También se conocen otros tipos de balizas moleculares y pueden ser adecuados para uso en los métodos descritos en este documento. Las balizas moleculares se pueden usar en una variedad de sistemas de ensayo. Uno de estos sistemas es la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA®), un proceso isotérmico de una sola etapa para amplificar el ARN a ADN bicatenario sin ciclos de temperatura. Una reacción NASBA normalmente requiere virus de mieloblastosis aviar (AMV), transcriptasa inversa (RT), ARN polimerasa T7, ARNasa H y dos cebadores oligonucleotídicos. Después de la amplificación, el ácido nucleico diana amplificado se puede detectar utilizando una baliza molecular. Otros usos para balizas moleculares son conocidos en la técnica y serían adecuados para uso en los métodos descritos en este documento.

El sistema Scorpion es otro formato de ensayo ejemplar que se puede usar en los métodos descritos en este documento. Los cebadores de escorpión son moléculas bifuncionales en las que un cebador está unido covalentemente a la sonda, junto con un marcador detectable (p. ej., un fluoróforo) y un desactivante. En presencia

de un ácido nucleico diana, el marcador detectable y el desactivante se separan, lo que conduce a un aumento de la señal emitida desde el marcador detectable. Normalmente, un cebador usado en la reacción de amplificación incluye un elemento de sonda en el extremo 5' junto con un elemento "bloqueador de PCR" (p. ej., un monómero de hexetilenglicol (HEG) (Whitcombe, et al. Nat. Biotech. 17: 804 807 (1999)) al inicio del bucle de horquilla. La sonda generalmente incluye una secuencia de vástago autocomplementaria con un marcador detectable en un extremo y un desactivante en el otro. En los ciclos de amplificación iniciales (p. ej., PCR), el cebador se hibrida con la diana y la extensión se produce debido a la acción de la polimerasa. El sistema Scorpion se puede usar para examinar e identificar mutaciones puntuales utilizando múltiples sondas que se pueden marcar de manera diferente para distinguir entre las sondas. Usando la PCR como ejemplo, después de completar un ciclo de extensión, la región diana recién sintetizada se unirá a la misma cadena que la sonda. Después del segundo ciclo de desnaturalización y alineamiento, la sonda y el objetivo se hibridan. La secuencia de horquilla después se hibrida con una parte del producto de PCR recién producido. Esto resulta en la separación del marcador detectable del desactivante y causa la emisión de la señal. Otros usos para balizas moleculares son conocidos en la técnica y serían adecuados para uso en los métodos descritos en este documento.

Las polimerasas de ácido nucleico que se pueden emplear en las reacciones de amplificación de ácido nucleico descritas pueden ser cualquiera que funcione para llevar a cabo la reacción deseada, incluyendo, p. ej., una polimerasa de ácido nucleico procariótica, fúngica, viral, bacteriófaga, vegetal y/o eucariótica. Como se usa en este documento, el término "ADN polimerasa" se refiere a una enzima que sintetiza una cadena de ADN de novo utilizando una cadena de ácido nucleico como molde. La ADN polimerasa utiliza un ADN o ARN existente como molde para la síntesis de ADN y cataliza la polimerización de desoxirribonucleótidos junto con la cadena del molde, el cual lee. La nueva hebra de ADN sintetizada es complementaria a la hebra molde. La ADN polimerasa puede añadir nucleótidos libres solo al extremo 3'-hidroxilo de la nueva cadena de formación. Sintetiza oligonucleótidos a través de la transferencia de un monofosfato de nucleósido de un desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP) al grupo 3'-hidroxilo de una cadena de oligonucleótido en crecimiento. Esto da como resultado el alargamiento de la nueva hebra en una dirección de 5' a 3'. Dado que la ADN polimerasa solo puede añadir un nucleótido a un grupo 3'-OH preexistente, para comenzar una reacción de síntesis de ADN, la ADN polimerasa necesita un cebador al que pueda agregar el primer nucleótido. Los cebadores adecuados pueden comprender oligonucleótidos de ARN o ADN, o quimeras de los mismos (p. ej., cebadores quiméricos de ARN/ADN). Las ADN polimerasas pueden ser una ADN polimerasas naturales o una variante de enzima natural que tenga la actividad mencionada anteriormente. P. ej., puede incluir una ADN polimerasa que tiene una actividad de desplazamiento de cadena, una ADN polimerasa que carece de actividad exonucleasa de 5' a 3', una ADN polimerasa que tiene una actividad de transcriptasa inversa o una ADN polimerasa que tiene una actividad endonucleasa.

Las polimerasas de ácido nucleico adecuadas también pueden comprender holoenzimas, partes funcionales de las holoenzimas, polimerasa quimérica o cualquier polimerasa modificada que pueda efectuar la síntesis de una molécula de ácido nucleico. Dentro de esta descripción, una ADN polimerasa también puede incluir una polimerasa, transferasa terminal, transcriptasa inversa, telomerasa y/o polinucleótido fosforilasa. Ejemplos de polimerasas no limitantes pueden incluir, p. ej., ADN polimerasa de T7, eucariota mitocondrial ADN polimerasa γ , ADN polimerasa procariota I, II, III, IV, y/o V; polimerasa eucariótica α , β , γ , δ , ϵ , η , ζ , ι y/o κ ; ADN polimerasa I de *E. coli*; subunidades de *E. coli* ADN polimerasa alfa y/o épsilon; *E. coli* polimerasa IV, *E. coli* polimerasa V; ADN polimerasa I de *T. aquaticus*; *B. stearothermophilus* ADN polimerasa I; *Euryarchaeota* polimerasas; terminal deoxinucleotidil transferasa (TdT); Polimerasa 4 de *S. cerevisiae*; síntesis de translesión polimerasas; la transcriptasa inversa; y/o telomerasa. Ejemplos no limitantes de ADN polimerasas termoestables adecuadas que se pueden usar incluyen las ADN polimerasas Taq, Tfl, Pfu y Vent™, cualquier ADN polimerasas genéticamente modificadas, cualquiera que tenga una actividad de exonucleasa de 3' a 5' reducida o insignificante (p. ej., ADN SuperScript™ polimerasa) y/o ADN polimerasas modificadas genéticamente (p. ej., aquellas que tienen la mutación del sitio activo F667Y o el equivalente de F667Y (p. ej., en Tth), AmpliTaqFS, ThermoSECUenase™), Therminator I, Therminator II, Therminator III, Therminator Gamma todos disponibles de NEB), y/o cualquier derivado y sus fragmentos. Otras polimerasas de ácido nucleico también pueden ser adecuadas como entendería un experto en la técnica.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona mezclas de reacción para amplificar una secuencia de ácido nucleico de interés (p. ej., una secuencia diana). En algunas realizaciones, la mezcla de reacción puede comprender además un compuesto generador de señal (SGC) y/o un marcador detectable. Los métodos también pueden incluir una o más etapas para detectar el SGC y/o el marcador detectable para cuantificar el ácido nucleico amplificado.

Un SGC puede ser una sustancia que es detectable en sí misma en un ensayo de selección, o capaz de reaccionar para formar una entidad química o física (p. ej., un producto de reacción) que es detectable en un ensayo de selección. Los ejemplos representativos de productos de reacción incluyen precipitados, señales fluorescentes, compuestos que tienen un color, y similares. Los SGC representativos incluyen, p. ej., compuestos bioluminiscentes (p. ej., luciferasa), fluoróforos (p. ej., a continuación), compuestos bioluminiscentes y quimioluminiscentes, radioisótopos (p. ej., ¹³¹I, ¹²⁵I, ¹⁴C, ³H, ³⁵S, ³²P y similares), enzimas (p. ej., a continuación), proteínas de unión (p. ej., biotina, avidina, estreptavidina y similares), partículas magnéticas, compuestos químicamente reactivos (p. ej., tintes de color), oligonucleótidos marcados; sondas moleculares (p. ej., CY3, Research Organics, Inc.), y similares. Los fluoróforos representativos incluyen isotiocianato de fluoresceína, succinil fluoresceína, rodamina B, lisamina, 9,10-difenilantaceno, perileno, rubreno, pireno y derivados fluorescentes de los mismos, tales como isocianato, isotiocianato, cloruro de ácido o cloruro de sulfonilo, umbeliferona, quelatos de tierras raras de lantánidos tales como Europio (Eu) y similares. Los SGC representativos útiles en un conjugado generador de señal incluyen las enzimas en: IUB Clase 1, especialmente

1.1.1 y 1.6 (p. ej., alcohol deshidrogenasa, glicerol deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y similares); IUB Clase 1.11.1 (p. ej., catalasa, peroxidasa, aminoácido oxidasa, galactosa oxidasa, glucosa oxidasa, ascorbato oxidasa, diaforasa, ureasa y similares); IUB Clase 2, especialmente 2.7 y 2.7.1 (p. ej., hexocinasa y similares); IUB Clase 3, especialmente 3.2.1 y 3.1.3 (p. ej., alfa-amilasa, celulasa, β -galacturonidasa, amiloglucosidasa, β -glucuronidasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida y similares); IUB Clase 4 (p. ej., liasas); IUB Clase 5, especialmente 5.3 y 5.4 (p. ej., fosfoglucosa isomerasa, trifosfatasa isomerasa, fosfoglucosa mutasa y similares). Los SGC también pueden generar productos detectables por longitudes de onda fluorescentes y quimioluminiscentes, p. ej., tintes de secuenciación, luciferasa, metales que emiten fluorescencia tales como ^{152}Eu u otros de la serie lantánida; compuestos tales como luminol, isoluminol, sales de acridinio y similares; compuestos bioluminiscentes tales como luciferina; proteínas fluorescentes (p. ej., GFP o variantes de las mismas); y similares. La unión de ciertos SGC a agentes se puede lograr a través de grupos quelantes de metales como el EDTA. El sujeto SGC comparte la propiedad común de permitir la detección y/o cuantificación de una molécula unida. Los SGC son detectables opcionalmente usando un método visual u óptico; preferiblemente, con un método susceptible de automatización, tal como un método espectrofotométrico, un método de fluorescencia, un método quimioluminiscente, un método nanométrico eléctrico que implique, p. ej., un cambio en la conductancia, impedancia, resistencia y similares y un método de campo magnético. Algunos SGC son detectables opcionalmente a simple vista o con un aparato de detección de señal. Algunos SGC no son detectables por sí mismos, pero se vuelven detectables cuando se someten a tratamiento adicional. El SGC se puede unir de cualquier manera (p. ej., mediante enlaces covalentes o no covalentes) a un agente de unión de interés (p. ej., un anticuerpo o un polipéptido PDZ). Los SGC adecuados para la unión a agentes tales como anticuerpos incluyen oro coloidal, anticuerpos fluorescentes, eurpio, partículas de látex y enzimas. Los agentes que se unen a NS1 y NP pueden comprender cada uno SGC distintos. P. ej., las partículas de látex rojo pueden conjugarse con anticuerpos anti-NS1 y las partículas de látex azul pueden conjugarse con anticuerpos anti-NP. Otros SGC detectables adecuados para uso en un formato de flujo lateral incluyen cualquier resto que sea detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos, eléctricos, ópticos, químicos u otros. P. ej., los SGC adecuados incluyen biotina para la tinción con conjugado de estreptavidina marcado, tintes fluorescentes (p. ej., fluoresceína, rojo Texas, rodamina, proteína verde fluorescente y similares), radiomarcadores, enzimas (p. ej., peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otros comúnmente utilizados en un ELISA), y SGC colorimétricos tales como oro coloidal o vidrio o plástico coloreado (p. ej., poliestireno, polipropileno, perlas de látex). Las patentes que describen el uso de tales marcadores incluyen las patentes de EE.UU. N^{os} 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149; y 4,366,241. Véase también el Manual de sondas fluorescentes y productos químicos de investigación (6^a ed., Molecular Probes, Inc., Eugene Oreg.). Los radiomarcadores pueden detectarse utilizando película fotográfica o contadores de centelleo, los marcadores fluorescentes pueden detectarse utilizando un fotodetector para detectar la luz emitida.

De manera similar, el término "marcador detectable" puede referirse a cualquiera de una variedad de moléculas de señalización indicativas de amplificación. P. ej., SYBR GREEN y otros tintes de unión al ADN son marcas detectables. Dichos marcadores detectables pueden comprender o pueden ser, p. ej., agentes de intercalación o agentes no de intercalación de ácido nucleico. Como se usa en este documento, un agente de intercalación es un agente o resto capaz de una inserción no covalente entre pares de bases apiladas de una molécula de ácido nucleico de doble cadena. Un agente no intercalante es uno que no se inserta en la molécula de ácido nucleico de doble cadena. El agente de unión a ácido nucleico puede producir una señal detectable directa o indirectamente. La señal puede ser detectable directamente usando, p. ej., fluorescencia y/o absorbancia, o indirectamente usando, p. ej., cualquier resto o ligando que esté afectado de manera detectable por la proximidad al ácido nucleico de doble cadena es adecuado, tal como un resto marcado sustituido o ligando de unión unido al agente de unión a ácido nucleico. Normalmente es necesario para que el agente de unión a ácido nucleico produzca una señal detectable cuando se une a un ácido nucleico de doble cadena que sea distinguible de la señal producida cuando ese mismo agente está en disolución o unido a un ácido nucleico de una cadena. P. ej., los agentes de intercalación, como bromuro de etidio presentan una fluorescencia más intensa cuando se intercalan en el ADN de doble cadena que cuando se unen a ADN, ARN de una sola cadena o en disolución (ver, p. ej., las patentes de EE.UU. N^{os} 5,994,056; 6,171,785; y/o 6,814,934). De manera similar, la actinomicina D presenta fluorescencia roja cuando se une a ácidos nucleicos de una cadena y verde cuando se une a ácidos nucleicos de doble cadena. Y en otro ejemplo, se ha informado que el psoralen fotorreactivo 4-aminometil-4'-5'-8-trimetilpsoralen (AMT) presenta una absorción disminuida a longitudes de onda largas y fluorescencia tras la intercalación en ADN de doble cadena (Johnson et al. Photochem. & Photobiol., 33: 785-791 (1981)). P. ej., la patente de EE.UU. 4,257,774 describe la unión directa de intercaladores fluorescentes al ADN (p. ej., sales de etidio, daunomicina, mepacrina y naranja de acridina, 4'-diamidino-a-fenilindol). Los agentes no intercaladores (p. ej., ligantes al surco menor como se describen en este documento tal como Hoechst 33258, distamicina, netropsina) también pueden ser adecuados para uso. P. ej., Hoechst 33258 (Searle, et al. Nuc. Acids Res. 18 (13): 3753-3762 (1990) muestra fluorescencia alterada con una cantidad creciente de diana. Los ligantes al surco menor se describen con más detalle en otras partes de este documento.

Otros colorantes de unión a ADN están disponibles para un experto en la técnica y se pueden usar solos o en combinación con otros agentes y/o componentes de un sistema de ensayo. Los colorantes de unión a ADN ilustrativos pueden incluir, p. ej., acridinas (p. ej., naranja de acridina, acriflavina), actinomicina D (Jain, et al. J. Mol. Biol. 68:21 (1972)), antramicina, BOBOTM-1, BOBOTM-3, BO-PROTM-1, cbromomicina, DAPI (Kapuseinski, et al. Nuc. Acids Res. 6 (112): 3519 (1979)), daunomicina, distamicina (p. ej., distamicina D), tintes descritos en la patente de EE.UU. No. 7,387,887, elipticina, sales de etidio (p. ej., bromuro de etidio), fluorcoumanina, intercaladores fluorescentes como se describe en la patente de EE.UU. 4.257.774, GelStar[®] (Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, Me.), Hoechst 33258 (Searle y Embrey, 1990, Nuc. Acids Res. 18: 3753-3762), Hoechst 33342, homidio, JO-PROTM-1, tintes LIZ,

LO-PRO™-1, mepacrina, mitramicina, tintes NED, netropsina, 4'6'-diamidino-a-fenilindol, proflavina, POPO™-1, POPO™-3, PO-PRO™-1, yoduro de propidio, polipiridilos de rutenio, S5, SYBR® Gold, SYBR® Green I (Patente de EE. UU. N° 5,436,134 y 5,658,751), SYBR® Green II, SYTOX azul, SYTOX verde, SYTO® 43, SYTO® 44, SYTO® 45, SYTOX® Azul, TO-PRO®-1, SYTO® 11, SYTO® 13, SYTO® 15, SYTO® 16, SYTO® 20, SYTO® 23, naranja de tiazol (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin), TOTO™-3, YO-PRO®-1 y YOYO®-3 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), entre otros. SYBR® Green I (ver, p. ej., las patentes de EE. UU. Nos. 5,436,134; 5,658,751; y/o 6,569, 6,103,927), p. ej., se ha utilizado para monitorizar reacciones de PCR. Otros colorantes de unión al ADN también pueden ser adecuados como entendería un experto en la técnica.

Para su uso como se describe en este documento, uno o más marcadores detectables y/o agentes de extinción pueden unirse a uno o más cebadores y/o sondas (p. ej., un marcador detectable). El marcador detectable puede emitir una señal cuando está libre o cuando se une a uno de los ácidos nucleicos diana. El marcador detectable también puede emitir una señal cuando está cerca de otro marcador detectable. Los marcadores detectables también se pueden usar con moléculas inhibitoras, de modo que la señal solo sea detectable cuando no esté lo suficientemente cerca de la molécula de desactivador. P. ej., en algunas realizaciones, el sistema de ensayo puede hacer que el marcador detectable se libere de la molécula de desactivador. Se puede usar cualquiera de varios marcadores detectables para marcar los cebadores y las sondas usadas en los métodos descritos en este documento. Como se mencionó anteriormente, en algunas realizaciones, el marcador detectable se puede unir a una sonda, que puede incorporarse a un cebador, o se puede unir de otra manera al ácido nucleico diana amplificado (p. ej., un agente de unión a ácido nucleico detectable, como un tinte intercalador o no intercalador). Cuando se usa más de un marcador detectable, cada uno debe diferir en sus propiedades espectrales de modo que los marcadores puedan distinguirse entre sí, o de manera que los marcadores detectables juntos emitan una señal que no es emitida por ningún marcador detectable solo. Los marcadores detectables ilustrativos incluyen, p. ej., un tinte fluorescente o fluoróforo (p. ej., un grupo químico que puede ser excitado por la luz para emitir fluorescencia o fosforescencia), tintes "aceptores" capaces de desactivar una señal fluorescente de un tinte donante fluorescente, y similares. Los marcadores detectables adecuados pueden incluir, p. ej., fluorosceínas (p. ej., 5-carboxi-2,7-diclorofluoresceína; 5-carboxifluoresceína (5-FAM); 5-HAT (hidroxi triptamina); 5-hidroxi triptamina (HAT); 6- JOE; 6-carboxifluoresceína (6-FAM); FITC; 6-carboxi-1,4-dicloro-2',7'-diclorofluoresceína (TET); 6-carboxi-1,4-dicloro-2', 4', 5', 7'-tetraclorofluoresceína (HEX); 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE); Flores de Alexa (p. ej., 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 635, 647, 660, 680, 700, 750); Fluoróforos BODIPY (p. ej., 492/515, 493/503, 500/510, 505/515, 530/550, 542/563, 558/568, 564/570, 576/589, 581/591, 630/650-X, 650/665-X, 665/676, FL, FL ATP, FI-Ceramida, R6G SE, TMR, conjugado TMR-X, TMR-X, SE, TR, TR ATP, TR-X SE), cumarinas (p. ej., 7-amino-4-metilcumarina, AMC, AMCA, AMCA-S, AMCA-X, ABQ, CPM metilcumarina, cumarina, faloidina, hidroxicumarina, CMFDA, metoxicumarina), calceína, calceína AM, azul de calceína, tintes de calcio (p. ej., calcio carmesí, calcio verde, calcio naranja, calcoflúor blanco), azul cascada, amarillo cascada; tintes Cy™ (p. ej., 3, 3.18, 3.5, 5, 5.18, 5.5, 7), cian GFP, Fluorosensor AMP cíclico (FiCRhR), proteínas fluorescentes (p. ej., proteína fluorescente verde (p. ej., GFP, EGFP), proteína azul fluorescente (p. Ej., BFP, EBFP, EBFP2, Azurite, mKalamal), proteína cian fluorescente (p. Ej., ECFP, Cerulean, CyPet), proteína amarilla fluorescente (p. Ej., YFP, Citrine, Venus, YPet), pares donador/aceptor FRET (p. ej., fluoresceína/tetrametilrodamina, IAEDANS/fluoresceína, EDANS/dabcyl, fluoresceína/fluorosceína, BODIPY FL/BODIPY FL, Fluorescein/QSY7 y QSY7), LysoTracker y LysoSensor (p. ej., LysoTracker Blue DP) Azul-Blanco DPX, LysoTracker Amarillo HCK-123, LysoTracker Verde DND-26, LysoTracker Rojo DND-99, LysoSensor Azul DND-167, LysoSensor Verde DND-189, LysoSensor Verde DND-153, LysoSensor Amarillo/Azul DND-160, LysoSensor Amarillo/Azul, dextrano de 10.000 MW), Oregon Green (p. ej., 488, 488-X, 500, 514); rodaminas (p. ej., 110, 123, B, B 200, BB, BG, B extra, 5-carboxitetrametilrodamina (5-TAMRA), 5 GLD, 6-Carboxirodamina 6G, Lissamine, Lissamine Rhodamine B, Phalloidine, Phalloidine, Red, Rhod -2, ROX (6-carboxi-X-rodamina), 5-ROX (carboxi-X-rodamina), Sulforodamina B puede C, Sulforodamina G Extra, TAMRA (6-carboxitetrametilrodaminamina ine), Tetrametilrodamina (TRITC), WT), Texas Red, Texas Red-X, VIC y otras marcadores descritas en, p. ej., US Pub. No. 2009/0197254 entre otros, como conocerían los expertos en la técnica. También se pueden usar otros marcadores detectables (ver, p. ej., US Pub. No. 2009/0197254), como conocerían los expertos en la técnica. Cualquiera de estos sistemas y marcas detectables, así como muchos otros, se pueden usar para detectar ácidos nucleicos diana amplificados.

Algunos marcadores detectables pueden estar basados en secuencias (también denominados aquí como un "marcador detectable específico de locus"), p. ej., sondas de nucleasa 5'. Dichas sondas pueden comprender una o más marcadores detectables. Se conocen varios marcadores detectables en la técnica, p. ej. (sondas TaqMan® descritas en este documento (véase también la patente de EE. UU. N° 5,538,848) varias balizas moleculares de bucle troncal (véase, p. ej., las patentes de EE. UU. Números 6,103,476 y 5,925,517 y Tyagi y Kramer, 1996, Nature Biotechnology 14: 303-308), balizas sin vástago o lineales (véase, p. ej., el documento WO 99/21881; patente de EE. UU. 6,485,901), PNA Molecular Beacons™ (véase, p. ej., las patentes de EE. UU. Números 6,355,421 y 6,593,091), balizas PNA lineales (Ver, p. ej., Kubista et al., 2001, SPIE 4264: 53-58), sondas que no son FRET (Ver, p. ej., la Patente de Estados Unidos No. 6,150,097), sondas Sunrise®/Amplifluor® (Patente de los Estados Unidos No. 6,548,250), sondas de vástago y dúplex Scorpion™ (Solinas et al., 2001, Nucleic Acids Research 29: E96 y Patente de EE. UU. N° 6,589,743), sondas de bucle abultado (Patente de EE. UU. N° 6,590,091), sondas de pseudotudencia No. 6,589,250), ciclicones (Patente de EE.UU. No. 6,383,752), sonda MGB Eclipse™ (Epoch Biosciences), sondas de horquilla (Patente de EE.UU. No. 6,596,490), sondas de luz de ácido nucleico peptídico (PNA) (Svanvik, et al. Anal Biochem 281: 26-35 (2001), sondas de nanopartículas autoensambladas, sondas modificadas con ferroceno descritas, p. ej., en la patente de EE. UU. No. 6,485,901; Mh-langa et al., 2001, Methods 25: 463-471; Whitcombe et al., 1999, Nature Biotechnology. 17:804-807; Isacson et al., 2000, Molecular Cell Probes. 14:321-328; Svanvik et al., 2000, Anal Biochem. 281:26-35; Wolffs et al., 2001, Biotechniques 766: 769-771; Tsourkas et al., 2002, Nucleic Acids Research.

30:4208-4215; Riccelli et al., 2002, *Nucleic Acids Research* 30:4088-4093; Zhang et al., 2002 *Shanghai*. 34:329-332; Maxwell et al., 2002, *J. Am. Chem. Soc.* 124:9606-9612; Broude et al., 2002, *Trends Biotechnol.* 20: 249-56; Huang et al., 2002, *Chem Res. Toxicol.* 15:118-126; y Yu et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.* 14:11155-11161; QuantiProbes (www.qiagen.com), HyBeacons (French, et al. *Mol. Cell. Probes* 15: 363-374 (2001)), sondas de desplazamiento (Li, et al. *Nucleic Acids Res.* 30: e5 (2002)), HybProbes (Cardullo, et al. *PNAS* 85: 8790-8794 (1988)), MGB Alert (www.nanogen.com), Q-PNA (Fiandaca, et al. *Genome Res.* 11:609-611 (2001)), plexor (www.Promega.com), cebadores LUX (Nazarenko, et *Nucleic Acids Res.* 30:e37 (2002)), cebadores DzyNA (Todd, et al. *Clin. Chem.* 46:625-630 (2000)). Los marcadores detectables también pueden incluir desactivantes de agujeros negros (Biosearch), Iowa Black (IDT), QSY quencher (Molecular Probes) y Dabsyl and Dabcel sulfonate/carboxoxylate Quenchers (Epoch). Los marcadores detectables también pueden comprender dos sondas, en donde, p. ej., un fluor está en una sonda y un desactivante en la otra, en donde la hibridación de las dos sondas en un objetivo apaga la señal, o en donde la hibridación en una diana altera la firma de la señal a través de un cambio en la fluorescencia. Los sistemas ilustrativos también pueden incluir sistemas de ligando FRET, salicilato/DTPA (véase, p. ej., Oser et al. *Angew. Chem. En t. Engl.* 29 (10):1167 (1990)), hibridación por desplazamiento, sondas homólogas y/o ensayos descritos en el documento EP 070685 y/o la patente de EE. UU. N° 6,238,927. Los marcadores detectables pueden comprender también derivados de sulfonato de colorantes de fluoresceína con SO₃ en lugar del grupo carboxilato, formas de fosforamida de fluoresceína, formas de fosforamida de CY5 (disponibles p. ej., de Amersham).

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos, o cualquier variante o fragmento funcional de los mismos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos naturales y polímeros de aminoácidos no naturales. El término "aminoácido" incluye aminoácidos naturales y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, p. ej., hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, p. ej., un carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, p. ej., homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (p. Ej., Norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a un aminoácido natural.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales a un ácido nucleico, péptido, polipéptido o secuencia de proteínas que altera, añade o elimina un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en el código codificado. La secuencia es una "variante modificada conservativamente" en la que la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes modificadas de manera conservativa son además y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecies, y alelos. Los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) alanina (A), glicina (G); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) [0083] (véase, p. ej., Creighton, *Proteins* (1984)). Las variantes de una secuencia de nucleótidos o secuencia polipeptídica dada son variantes modificadas opcionalmente de forma conservadora. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, las variantes modificadas de manera conservativa se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en las que el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas.

El término "anticuerpo" o "anticuerpos" puede incluir todo y/o fragmentos y/o derivados de anticuerpos en forma no purificada o parcialmente purificada (p. ej., sobrenadante de hibridoma, ascitis, antisueros policlonales) o en forma purificada. Un anticuerpo "purificado" puede ser uno que esté separado de al menos aproximadamente el 50% de las proteínas con las que se encuentra inicialmente (p. ej., como parte de un sobrenadante de hibridoma o preparación de ascitis). Preferiblemente, un anticuerpo purificado se separa de al menos aproximadamente el 60%, 75%, 90% o 95% de las proteínas con las que se encuentra inicialmente. Los derivados adecuados pueden incluir fragmentos (p. ej., Fab, Fab₂ o anticuerpos de cadena única (Fv, p. ej.)), como se conoce en la técnica. Los anticuerpos pueden ser de cualquier origen o forma adecuados que incluyan, p. ej., murinos (p. ej., producidos por células de hibridoma murino), o expresados como anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos y similares. Los métodos de preparación y utilización de diversos tipos de anticuerpos son bien conocidos por los expertos en la técnica y serían adecuados para su uso (véase, p. ej., Harlow, et al. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Harlow, et al., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Portable Protocol No. 1, 1998; Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975)); Jones et al. *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al. *Nature*, 332:323-329 (1988); Presta (Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992); Verhoeyen et al. (*Science*, 239: 1534-1536 (1988); Hoogenboom y otros, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks y otros, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991); Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147 (1): 86-95 (1991); Marks et al., *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368 856-859 (1994);

Morrison, *Nature* 368 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature*

Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995); así como la patente de EE.UU. Nº 4,816,567; 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; y, 5,661,016).

En ciertas aplicaciones, los anticuerpos pueden estar contenidos dentro del sobrenadante de hibridoma o ascitis y utilizarse directamente como tal o después de la concentración utilizando técnicas estándar. En otras aplicaciones, los anticuerpos pueden purificarse aún más utilizando, p. ej., fraccionamiento de sales y cromatografía de intercambio iónico, o cromatografía de afinidad utilizando ligandos de Proteína A, Proteína G, Proteína A/G y/o Proteína L acoplados covalentemente a un soporte sólido tal Como cuentas de agarosa, o combinaciones de estas técnicas. Los anticuerpos pueden almacenarse en cualquier formato adecuado, incluida una preparación congelada (p. ej., aproximadamente -20 °C o -70 °C), en forma liofilizada o en condiciones de refrigeración normales (p. ej., aproximadamente 4 °C). Cuando se almacena en forma líquida, se prefiere que se utilice un tampón adecuado, tal como disolución salina tamponada con Tris (TBS) o disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Los anticuerpos y sus derivados pueden incorporarse en composiciones (p. ej., unidas a oligonucleótidos) descritas en este documento para uso *in vitro* o *in vivo*. Los anticuerpos también pueden modificarse para su uso, p. ej., por biotilación. Otros métodos para hacer y usar anticuerpos disponibles para un experto en la técnica también pueden ser adecuados para su uso.

Los métodos descritos en este documento pueden ser útiles para detectar y/o cuantificar una variedad de ácidos nucleicos diana de una muestra de ensayo (p. ej., una muestra biológica). Un ácido nucleico diana es cualquier ácido nucleico para el cual un sistema de ensayo está diseñado para identificar o detectar que está presente (o no) y/o cuantificar en una muestra de ensayo. Dichos ácidos nucleicos pueden incluir, p. ej., los de agentes infecciosos (p. ej., virus, bacterias, parásitos y similares), un proceso de enfermedad como cáncer, diabetes o similares, o para medir una respuesta inmunitaria. Las "muestras de ensayo" ilustrativas incluyen varios tipos de muestras, como las muestras biológicas. Las muestras biológicas ilustrativas incluyen, p. ej., un fluido corporal (p. ej., sangre, saliva, fluido espinal), una muestra de tejido, un producto de alimentos (p. ej., carne) o bebidas (p. ej., leche), o similares. Otros ejemplos de muestras biológicas pueden incluir sangre coompleta, suero, plasma, orina, líquido sinovial, saliva, líquido cefalorraquídeo, infiltrado de tejidos, exudado cervical o vaginal, derrame pleural, líquido de lavado broncoalveolar, líquido de lavado gástrico, contenido intestinal pequeño o grande. y muestras de hisopo de varios orificios corporales dispersos en un medio adecuado. Los ácidos nucleicos expresados pueden incluir, p. ej., genes para los cuales la expresión (o la falta de los mismos) está asociada con afecciones médicas tales como enfermedades infecciosas (p. ej., infecciones bacterianas, virales, fúngicas, protozoarias) o cáncer. Los métodos descritos en este documento también se pueden usar para detectar contaminantes (p. ej., bacterias, virus, hongos y/o protozoos) en productos farmacéuticos, de alimentos o bebidas. Los métodos descritos en este documento también pueden usarse para detectar alelos raros en presencia de alelos de tipo salvaje (p. ej., un alelo mutante en presencia de 10^6 - 10^9 alelos de tipo salvaje). Los métodos son útiles para, p. ej., detectar una enfermedad residual mínima (p. ej., células cancerosas restantes raras durante la remisión, especialmente mutaciones en el gen p53 u otros genes supresores de tumores previamente identificados dentro de los tumores), y/o medir la carga de mutación (p. Ej., la frecuencia de mutaciones somáticas específicas presentes en tejidos normales, como sangre u orina).

También se proporcionan kits para realizar los métodos descritos en este documento. El kit puede comprender una o más sondas (p. ej., anticuerpo conjugado con un oligonucleótido) un par de oligonucleótidos para amplificar al menos un ácido nucleico diana de una muestra, un biocatalizador (p. ej., ADN polimerasa) y/o una o más sondas correspondientes marcadas con un marcador detectable. El kit también puede incluir muestras que contienen ácidos nucleicos diana predefinidos para usarse en reacciones de control. El kit también puede incluir opcionalmente disoluciones de reserva, tampones, enzimas, marcadores detectables o reactivos requeridos para la detección, tubos, membranas y similares que pueden usarse para completar la reacción de amplificación. En algunas realizaciones, se incluyen múltiples conjuntos de cebadores. También se contemplan otras realizaciones de sistemas y kits particulares que entenderán los expertos en la técnica.

Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar utilizando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en este documento. El alcance de la presente invención no pretende limitarse a esta descripción.

A menos que sea evidente por el contexto, cualquier característica puede ser reclamada en combinación con cualquier otra, o ser reclamada como no presente en combinación con otra característica. Una característica puede ser cualquier información que pueda caracterizar una invención o limitar el alcance de una reivindicación, p. ej., cualquier variación, etapa, característica, propiedad, composición, método, paso, grado, nivel, componente, material, sustancia, elemento, modo, variable, aspecto, medida, cantidad, opción, realización, cláusula, término descriptivo, elemento de reivindicación o limitación.

Las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El lenguaje de aproximación, como se usa en este documento a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se puede aplicar para modificar cualquier representación cuantitativa que pueda variar de manera permisible sin producir un cambio en la función básica con la que está relacionada. Por consiguiente, un valor modificado por un término tal como "aproximadamente" no se debe limitar al valor preciso especificado. Donde sea necesario, se han suministrado intervalos, y esos intervalos incluyen todos los sub-intervalos entre ellos.

En esta descripción, el uso del singular puede incluir el plural, a menos que se indique lo contrario o a menos que,

como entenderá un experto en la técnica a la luz de la presente descripción, el singular sea la única realización funcional. Así, p. ej., "a" puede significar más de uno, y "una realización" puede significar que la descripción se aplica a múltiples realizaciones. La frase "y/o" denota una forma abreviada de indicar que la combinación específica se contempla en combinación y, por separado, en la alternativa.

5 Se apreciará que hay un "aproximadamente" implícito antes de las temperaturas, concentraciones, tiempos, etc., discutidos en las presentes enseñanzas, de modo que las desviaciones leves e insustanciales están dentro del alcance de las presentes enseñanzas en este documento. Además, el uso de "comprende", "comprende", "que comprende", "contiene", "contiene", "que contiene", "incluye", "incluye", y "que incluye" no pretende ser limitante. Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la detallada son ilustrativas y explicativas solamente y no son restrictivas de la invención.

10 A menos que se indique específicamente en la especificación anterior, las realizaciones en la especificación anterior que recitan "que comprende" varios componentes también se contemplan como "consistentes en" o "que consisten esencialmente en" los componentes citados; las realizaciones en la memoria descriptiva que recitan "que consiste en" varios componentes también se contemplan como "que comprenden" o "que consiste esencialmente en" los componentes enumerados; y las realizaciones en la memoria descriptiva que recitan "que consisten esencialmente en" varios componentes también se contemplan como "o" que comprenden "los componentes recitados (esta intercambiabilidad no se aplica al uso de estos términos en las reivindicaciones).

15 En general, las características descritas en este documento pretenden ser opcionales a menos que se indique explícitamente que son necesarias en la especificación. Los ejemplos no limitantes de lenguaje que indican que una característica se considera opcional en la especificación incluyen términos como "variación", "donde", "mientras", "cuando", "opcionalmente", "incluye", "preferido", "especial", "recomendado", "aconsejable", "particular", "debería", "alternativo", "típico", "representante", "varios", "tal como", "similar", "puede", "podría", "ejemplo", "realización" o "aspecto", "en algunos", "ejemplo", "ilustrativo", "instancia", "si" o cualquier combinación y/o variación de dichos términos.

25 "Aislado" o "purificado" generalmente se refiere al aislamiento de una sustancia (compuesto, polinucleótido, proteína, polipéptido, composición polipeptídica) de tal manera que la sustancia comprende un porcentaje significativo (p. ej., mayor que 2%, mayor que 5%, mayor que 10%), más del 20%, más del 50% o más, a veces más del 90%, 95% o 99% de la muestra en la que reside. En ciertas realizaciones, un componente sustancialmente purificado comprende al menos 50%, 80% - 85%, o 90-95% de la muestra. Las técnicas para purificar polinucleótidos y polipéptidos de interés son bien conocidas en la técnica e incluyen, p. ej., cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y sedimentación de acuerdo con la densidad. En general, una sustancia se purifica cuando existe en una muestra en una parte mayor de la que se encuentra naturalmente.

30 La identidad de la secuencia (también llamada homología) se refiere a la similitud en la secuencia de dos o más secuencias (p. ej., secuencias de nucleótidos o polipéptidos). En el contexto de dos o más secuencias homólogas, el porcentaje de identidad u homología de las secuencias o subsecuencias de las mismas indica el porcentaje de todas las unidades monoméricas (p. ej., nucleótidos o aminoácidos) que son iguales (p. ej., aproximadamente el 70% de identidad, preferiblemente 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad). El porcentaje de identidad puede estar sobre una región específica, cuando se compara y se alinea para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o una región designada según lo medido utilizando algoritmos de comparación de secuencia BLAST o BLAST 2.0 con los parámetros predeterminados descritos a continuación, o mediante alineación manual e inspección visual. Se dice que las secuencias son "sustancialmente idénticas" cuando hay al menos un 90% de identidad en el nivel de aminoácidos o en el nivel de nucleótidos. Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de ensayo. Preferiblemente, la identidad existe sobre una región que tiene al menos aproximadamente 25, 50 o 100 residuos de longitud, o a lo largo de toda la longitud de al menos una secuencia comparada. Un algoritmo preferido para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1977). Otros métodos incluyen los algoritmos de Smith & Waterman, Adv. Apl. Math. 2:482 (1981), y Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), etc. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones rigurosas.

35 40 45 50 55 60 Cualquier indicación de que una característica es opcional tiene la intención de proporcionar un soporte adecuado (p. ej., bajo 35 USC 112 o Art. 83 y 84 de EPC) para reivindicaciones que incluyan lenguaje cerrado o exclusivo o negativo con referencia a la característica opcional. El lenguaje exclusivo excluye específicamente la característica particular recitada de incluir cualquier tema adicional. Por ejemplo, si se indica que A puede ser el fármaco X, se pretende que dicho lenguaje proporcione soporte para una reivindicación que especifique explícitamente que A consiste en X solo, o que A no incluye ningún otro medicamento además de X. El lenguaje "negativo" excluye explícitamente la característica opcional propia del alcance de las Reivindicaciones. Por ejemplo, si se indica que el elemento A puede incluir X, se pretende que dicho lenguaje proporcione soporte para una reclamación que especifique explícitamente que A no incluye X. Los ejemplos no limitantes de términos exclusivos o negativos incluyen "solo", "únicamente", "sin", "que consiste en", "que consiste esencialmente en", "solo", "sin", "en ausencia de (p. ej., otros elementos del mismo tipo, estructura y/o función)" "que excluye", "que no incluye", "no", "no puede", o cualquier combinación y/o variación de dicho lenguaje.

De manera similar, los referentes, como "un", "una", "dicho" o "el", están diseñados para admitir apariciones simples y/o plurales a menos que el contexto indique lo contrario. Por ejemplo, "un perro" está destinado a incluir apoyo para un perro, no más de un perro, al menos un perro, una pluralidad de perros, etc. Los ejemplos no limitantes de términos calificativos que indican singularidad incluyen "uno solo", "uno", "solo", "solo uno", "no más de uno", etc. Los ejemplos no limitantes de términos calificativos que indican pluralidad (potencial o real) incluyen "al menos uno", "uno o más", "más de uno", "dos o más", "una multiplicidad", "una pluralidad", "cualquier combinación de", "cualquier permutación de", "cualquiera o más de", etc. Reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechos si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes, empleados o, de otro modo, relevantes para un producto o proceso dado, a menos que se indique lo contrario o se demuestre lo contrario en el contexto.

En las reivindicaciones, cualquier verbo activo (o su gerundio) está destinado a indicar la acción real o intento correspondiente, incluso si no se produce ninguna acción real. Por ejemplo, el verbo "hibridar" y gerundio forman "hibridación" y similares se refieren a la hibridación real o al intento de hibridación contactando secuencias de ácido nucleico en condiciones adecuadas para la hibridación, incluso si no se produce una hibridación real. De manera similar, "detectar" y "detección" cuando se utilizan en las reivindicaciones se refieren a la detección real o al intento de detección, incluso si no se detecta ningún objeto.

Cualquiera o más de las características pueden ser excluidas explícitamente de las reivindicaciones, incluso si la exclusión específica no se establece explícitamente en este documento. También debe entenderse que la divulgación de un reactivo para su uso en un método pretende ser sinónimo de (y proporcionar soporte para) ese método que implica el uso de ese reactivo, de acuerdo con los métodos específicos descritos en este documento, u otros métodos conocidos en la técnica, a menos que un experto en la técnica entienda lo contrario. Además, cuando la especificación y/o las reivindicaciones revelan un método, se puede usar uno o más de los reactivos descritos en este documento, a menos que un experto en la técnica entienda lo contrario.

Los registros de genbank referenciados por GID o número de acceso, particularmente cualquier secuencia de polipéptidos, secuencias de polinucleótidos o anotaciones de los mismos, se incorporan aquí como referencia. La cita de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a ser anterior a dicha publicación en virtud de la invención anterior.

Donde se dan los intervalos aquí, se incluyen los puntos finales. Además, debe entenderse que, a menos que se indique lo contrario o sea evidente a partir del contexto y la comprensión de un experto en la técnica, los valores que se expresan como rangos pueden asumir cualquier valor específico o intervalo dentro de los intervalos establecidos en diferentes realizaciones de la invención, a la décima parte de la unidad del límite inferior del intervalo, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Ciertas realizaciones se describen con más detalle en los siguientes ejemplos. Estas realizaciones se proporcionan solo como ejemplos y no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones de ninguna manera.

Ejemplos

Ejemplo 1

En una realización ejemplar de los procesos típicos de ensayo de ligación por proximidad (PLA) (**Fig. 1**), la mezcla de la sonda (p. ej., que comprende dos sondas, A y B, (cada sonda que comprende un componente "SAO" de estreptavidina y un anticuerpo "Ab" El componente) en el tampón de dilución de la sonda "PDB") y la muestra de ensayo (en el tampón de dilución de la muestra "SDB") se combinan en una reacción de unión. Después de la reacción de unión (p. ej., a 37 °C durante 1 hora), la mezcla de reacción de ligación se agrega para llevar a cabo la reacción de ligación. Para preparar la mezcla de reacción de ligación, se diluyen la ligasa y el tampón de ligación. Después de la reacción de ligación (p. ej., a 37 °C durante 10 minutos), el producto ligado se estabiliza mediante digestión con proteasa; la proteasa se inactiva después (p. ej., usando calor por incubación a 37 °C durante 10 minutos, seguido de 95 °C durante 5 minutos). Generalmente, una parte del producto ligado se transfiere a la mezcla de reacción de PCR en tiempo real (que comprende los cebadores de PCR y la mezcla de sonda de proximidad "PCR-PP"), después se coloca en la placa de reacción de PCR en un instrumento qPCR. La detección y cuantificación del producto ligado puede proceder después utilizando técnicas estándar.

En la Fig. 2 se ilustra un esquema de un proceso PLA mejorado ilustrativo. Como se muestra aquí, la reacción de unión es la misma que se muestra en la Fig. 1. Sin embargo, en algunas realizaciones de los procesos mejorados descritos en este documento, como se muestra en la Fig. 2, la ligasa se añade a una mezcla de PCR en tiempo real (que comprende cebadores de PCR, sonda de proximidad y mezcla de férula "PCR-PPS") que después se añade directamente a la reacción de unión. En ciertas realizaciones de los procesos de PLA mejorados, se prepara una muestra de ensayo (p. ej., lisado celular), se permite que tenga lugar una reacción de unión y después se añade un tampón de ligación directamente al mismo. A esa mezcla se le agrega una mezcla de sonda de proximidad, y una mezcla de PCR. Esta mezcla de reacción combinada se incuba después durante un período de tiempo adecuado (p. ej., temperatura ambiente durante 20 minutos y después a 96 °C durante 5 minutos) y se realiza la PCR. La mezcla de reacción de PCR después se deposita sobre la placa de reacción en un instrumento qPCR y la detección y cuantificación del producto ligado puede proceder después utilizando técnicas estándar (como en los procesos típicos

de PLA).

Ejemplo 2

Algunas realizaciones ilustrativas de procesos de PLA típicos y mejorados también se comparan en las **Figs. 3A y 3B**. Como se muestra en las realizaciones ilustradas aquí, el proceso típico incluye la preparación de la muestra, una
 5 reacción de unión, la ligación, la inactivación de la ligasa usando una proteasa, la inactivación de la proteasa (p. ej., utilizando calor), seguida de una PCR en tiempo real. Para llevar a cabo la etapa de PCR, una parte de la mezcla de reacción que contiene la ligasa inactivada y la proteasa se transfiere a la placa de PCR, y se agrega la "mezcla de PCR" (p. ej., que contiene cebadores, dNTP, polimerasa y similares).

Como se muestra en la Fig. 3B, el proceso mejorado puede eliminar el uso de una proteasa y la dilución de la mezcla
 10 de reacción antes de la PCR. Como se muestra aquí, la ligasa se puede inactivar usando calor, y la mezcla de reacción resultante se coloca directamente en el ensayo de qPCR. Así, algunas realizaciones del flujo de trabajo de PLA mejorado utilizan productos de reacción de unión completa en el pozo de PCR en tiempo real. Esto proporciona un flujo de trabajo simplificado y una dilución reducida de la mezcla de reacción. Como resultado, en algunas realizaciones preferidas de los procesos de PLA mejorados, la mezcla de reacción de PCR contiene una mayor concentración del
 15 producto ligado (p. ej., el ácido nucleico diana).

Con el fin de reducir la ligación de la sonda sin unión, la concentración de la sonda se puede reducir. La longitud y concentración de oligo de férula (p. ej., conector) también se puede reducir para minimizar la posibilidad de hibridación de la disolución promovida por la ligación sin unión a antígeno (p. ej., oligonucleótidos conectores de al menos 14
 20 bases de longitud (p. ej., 9 bases que se superponen a un primer oligo sonda y 5 bases que se superponen a una segunda sonda oligo (9+5) frente a oligonucleótidos conectores de al menos 18 bases de longitud (p. ej., 9 bases que se superponen a una primera sonda oligo y 9 bases que se solapan a una segunda sonda oligo (9+9)). En tales realizaciones, se puede usar una ligasa de huella pequeña (SFL). Como se describe en este documento, una SFL puede ligar oligonucleótidos que tienen una longitud de oligo conector tan corta como 3 bases de ADN hibridado adyacente a ADN hibridado en 5'-fosfato. Para combinar la ligación y la reacción de PCR en una etapa, en algunas
 25 realizaciones, el ATP (cofactor para la ligasa) puede omitirse opcionalmente de la mezcla de reacción. Para mantener la función de la ligasa, en otras realizaciones, la SFL se puede enriquecer previamente con ATP antes de su purificación y uso.

En algunas realizaciones de los procesos PLA mejorados, se pueden usar oligos de férula que se consideran férulas simétricas o férulas asimétricas, dependiendo del número de nucleótidos que hibridan con cada una de las dos sondas
 30 de oligo a las que se conecta. La Fig. 4 muestra diagramas asimétricos y tipos de férulas simétricas para usar en los procesos de PLA mejorados como se describe en este documento. Las férulas asimétricas (o "conectores") se extienden a través de las dos sondas oligo separadas (p. ej., la sonda oligo A y B) con uno de los extremos de la férula (p. ej., el extremo 3' o el extremo 5') con más nucleótidos que hibridar con uno de los oligos de la sonda que el otro extremo de la férula tiene nucleótidos que hibridan con el oligo de la sonda alternativa (Fig. 4A). Las férulas simétricas
 35 se extienden a través de las dos sondas oligo separadas (p. ej., la sonda oligo A y B) con ambos extremos de la férula (p. ej., el extremo 3' y el extremo 5') que tienen el mismo número de nucleótidos que hibridan con cada una de las dos oligos de sondas (Fig. 4BA).

Tanto las férulas asimétricas como las simétricas pueden tener cualquier número de nucleótidos intermedios entre
 40 cada uno de sus extremos 3' y 5' que hibridan con los oligos de la sonda por separado. Alternativamente, no puede haber nucleótidos intermedios entre cada uno de los extremos 3' y 5' que hibridan con los oligos de la sonda.

Ejemplo 3

La Fig. 5 proporciona una comparación entre los resultados obtenidos utilizando realizaciones ilustrativas de un
 45 proceso típico ("TaqMan Protein Assay Open Kit de Life Technologies, Inc.; "PLA1") y un proceso mejorado (utilizando métodos descritos en este documento; "PLA2 "). Ambos ensayos se configuraron para apuntar a CSTB en el lisado de células Ntera2. La reacción de unión fue idéntica tanto para PLA1 como para PLA2 utilizando los reactivos y el protocolo recomendados por el fabricante (Life Technologies, Inc.) en 4 µl de reacciones de unión de volumen. Después de la reacción de unión, la PLA1 procedió siguiendo el protocolo y los reactivos del fabricante. La reacción de PLA2 se combinó con 16 µl de la mezcla de reacción de ligación-PCR. La mezcla de reacción de ligación-PCR
 50 consta de 10 µl de la Mezcla Maestra Rápida del Ensayo de Proteínas TaqMan (Life Technologies, Inc.), 1 µl del Ensayo de PCR Universal y el oligonucleótido conector 9+5 y la ligasa SFL y 5 µl de di-agua. La reacción de ligación se dejó proceder durante 10 minutos. El producto ligado se colocó después en un instrumento de PCR en tiempo real (Step1Plus) y se utilizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Como se describió anteriormente, en algunas realizaciones, el proceso mejorado (PLA2) lleva más moléculas diana a
 55 la etapa de PCR (p. ej., lo que resulta en la generación de más amplicones). La mejora proporcionada de este modo se muestra en la figura 5. Como se muestra aquí, el dCt del proceso mejorado (PLA2) se mejora mucho en comparación con el proceso típico (PLA1). En esta realización ejemplar, el proceso mejorado proporciona al menos una mejora de dCt de una a tres veces con respecto al proceso típico.

El proceso mejorado también proporciona sensibilidad de ensayo mejorada. Como se muestra en la realización
 ilustrativa de la Fig. 6, el proceso mejorado proporciona un aumento de sensibilidad de aproximadamente dos a diez

ES 2 728 743 T3

veces con respecto al proceso típico (Fig. 6). La sensibilidad se calculó como el cambio de la cuantificación relativa (RQ) utilizando los resultados del proceso típico como calibrador. El dCt del proceso mejorado se calculó como la mejora del pliegue sobre el proceso típico. Dado que el RQ se calcula a partir del umbral de dCt de 2, y el cambio de frecuencia es por lo tanto indicativo de la mejora en la sensibilidad. Los datos muestran que la sensibilidad del ensayo mejoró al menos dos veces, según lo determinado con cinco objetivos diferentes (GFP, hCSTB, hICAM1, hLIN28 y hOCT3/4). Los datos de GFP se generaron utilizando los procesos típicos (p. ej., PLA1) y mejorados (p. ej., PLA2) como se describió anteriormente utilizando un lisado celular al que se añadió rGFP (p. ej., un lisado celular "enriquecido") y una sonda GFP utilizada.

Ejemplo 4

10 En este ejemplo, se ensayaron dos longitudes de férula diferentes a concentraciones variables.

15 Los experimentos de PLA se llevaron a cabo utilizando las condiciones típicas de PLA ("TaqMan Protein Assay Open Kit de Life Technologies, Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando una ligasa T4, excepto que las concentraciones de la férula se variaron dentro del intervalo de 3,1 nM a 1000 nM. Las férulas también fueron diseñadas para tener dos longitudes de férula diferentes de 18 (9+9; "99") o 16 (8+8; "88"). Se utilizaron sondas de ensayo de cistatina B (CSTB) (del "Kit de ensayo de expresión de proteínas TaqMan (CSTB humano); Life Technologies, Inc.) para detectar 1000 pM o 0pM (sin control de proteínas;" NPC ") de proteína CSTB recombinante en tampón. Los valores de Ct se representaron gráficamente para cada concentración de la férula y los valores de Ct delta (valores Ct de NPC menos los valores de CtB Ct) y se representaron para cada concentración utilizada.

20 Como se muestra en la Fig. 7, se observó una reducción en delta Ct para la férula 99 a una concentración baja de 3,1 nM en comparación con las concentraciones más altas utilizadas. También se observó un delta Ct para la férula 88 en una concentración de 25 nM en comparación con concentraciones más altas. En conjunto, estos datos demuestran que los productos ligados se reducen cuando la longitud de la férula disminuye cuando se usa la ligasa T4.

Ejemplo 5

En este ejemplo, se probaron cinco longitudes de férula diferentes utilizando una única concentración.

25 Los experimentos de PLA se llevaron a cabo utilizando métodos similares a los descritos en el ejemplo 4, excepto que se utilizó SF ligasa en lugar de T4 ligasa. Brevemente, las férulas se diseñaron para tener una longitud de férula diferente de 12 (3+9), 13 (4+9), 14 (5+9 o 7+7), 17 (8+9) o 18 (9+9). La concentración utilizada para cada una de estas férulas fue de 100 nM. Se preparó lisado de Raji (kit de control de lisado de expresión de proteína de Life Technologies, Inc.) a 500 células/reacción o 0 células/reacción ("NPC") y sondas de ensayo de CSTB (del kit de ensayo de expresión de proteína TaqMan (CSTB humano); Life Technologies, Inc.) se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores de Ct se representaron para cada tipo de férula y los valores de delta Ct (valores de NPC Ct menos los valores de entrada de 500 células Ct) y se representaron para cada uno.

30 Como se muestra en la Fig. 8, se observó un aumento de dCt para férulas de 12 nucleótidos de longitud hasta 14 nucleótidos de longitud (incluidos los tipos de férulas asimétricas y simétricas). Esto demuestra que la ligasa SF es capaz de ligar férulas asimétricas y simétricas de longitudes más cortas y más largas.

Ejemplo 6

En este ejemplo, la ligasa T4 se comparó con dos ligasas SF diferentes (p. ej., SF y DLxD).

40 Los experimentos de PLA se llevaron a cabo utilizando métodos similares a los descritos en el Ejemplo 5, utilizando las ligasas y férulas indicadas de longitud variable, como se indica. Brevemente, las férulas se diseñaron para tener dos longitudes de férula diferentes de 14 (5+9; "95") o 18 (9+9; "99"). La concentración utilizada para cada una de estas férulas fue de 100 nM. Se preparó lisado de Raji (kit de control de lisado de expresión de proteína de Life Technologies, Inc.) a 500 células/reacción o 0 células/reacción ("NPC") y sondas de ensayo de CSTB (del kit de ensayo de expresión de proteína TaqMan (CSTB humano); Life Technologies, Inc.) se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores de Ct se representaron para cada tipo de ligasa y férula y los valores de delta Ct (valores de NPC Ct menos 500 valores de entrada de células Ct) y se representaron para cada uno.

45 Como se muestra en la Fig. 9, la ligasa T4 no produjo un daño notable usando la férula 5+9. Sin embargo, ambas ligasas SF, SF y DLxD, fueron capaces de ligar el ADN objetivo utilizando tipos de férulas más cortas. En este experimento, el uso de SF con la férula 5+9 dio como resultado el dCt más alto.

50 Los procesos mejorados descritos aquí, y ejemplificados en los Ejemplos anteriores, brindan tiempos más rápidos desde el inicio del proceso hasta los resultados (rápido), reducen el tiempo de uso (más simple y económico), reducen el uso de material plástico de laboratorio (más barato y más ecológico) y aumentan las señales y sensibilidades. Estos procesos mejorados proporcionan un flujo de trabajo simplificado al combinar las etapas de ligación y PCR, el factor de dilución reducido de la unión al paso de ligación, la concentración reducida de la sonda de unión para permitir el factor de dilución reducido, el uso de un oligo conector más corto para controlar la señal de fondo, el uso de una concentración de oligo conector más baja para controlar señal de fondo, uso de SF ligasa para permitir el uso de un conector de longitud de oligo más corto, ATP enriquecido SF ligasa esquema de purificación para omitir ATP en la etapa de ligación-PCR, y permitir el uso de todo el volumen de reacción para mejorar la señal de PLA y la sensibilidad.

Listado de secuencias

<110> CHEN, SHIAW-MIN SWARTZMAN, ELANA RUFF, DAVID SHANNON, MARCA LU, JULIA HENDRICKS, STEPHEN

5 <120> FLUJO DE TRABAJO PARA LA DETECCIÓN DE LIGANDOS UTILIZANDO ÁCIDOS NUCLEICOS

<130> LT00412 PCT

<140> PCT/US2012/021585

10 <141> 2012-01-17

<150> 61/433,475

<151> 2011-01-17

15 <160> 84

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 1

Ala Thr Pro Lys Ile Asp Gly Ile Arg

1 5

30 <210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 2

Glu Gly Ser Asp Gly Glu Ile Ser

40 1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

50 <400> 3

Tyr Trp Phe Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 6

55 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

60 <400> 4

Glu Gly Val Met Ile Arg

1 5

<210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 5
Leu Leu Lys Met Lys
 1 5
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 20 <400> 6
Cys Glu Leu Lys Leu Asp Gly Leu Ala
 1 5
 <210> 7
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 30 <400> 7
Val Glu His Lys Val Asp Gly Leu Ser
 1 5
 <210> 8
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 8
Cys Glu Pro Lys Leu Asp Gly Leu Ala
 1 5
 45 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 9
Cys Glu Leu Lys Leu Asp Gly Val Ala
 1 5
 55 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 10
Ala Glu Ile Lys Tyr Asp Gly Val Arg
 1 5

5 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 11
Cys Glu Tyr Lys Tyr Asp Gly Gln Arg
 1 5

15 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 12
Val Asp Tyr Lys Tyr Asp Gly Glu Arg
 1 5

25 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 13
Phe Glu Ile Lys Tyr Asp Gly Ala Arg
 35 1 5

40 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 14
Phe Glu Gly Lys Trp Asp Gly Tyr Arg
 1 5

50 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

55 <400> 15
Ala Arg Glu Lys Ile His Gly Thr Asn
 1 5

60 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 16
Ala Cys Glu Lys Val His Gly Thr Asn
 1 5

<210> 17
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 17
Ile Leu Thr Lys Glu Asp Gly Ser Leu
 1 5

<210> 18
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 18
Val Glu Glu Lys Val Asp Gly Tyr Asn
 1 5

30 <210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 19
Leu Glu Val Arg Gly Glu Val Phe
 1 5

40 <210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 20
Val Glu Val Arg Gly Glu Cys Tyr
 50 1 5

<210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

60 <400> 21
Leu Glu Val Arg Gly Glu Val Tyr
 1 5

<210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 22
Leu Glu Ala Arg Gly Glu Ala Phe
 1 5
 <210> 23
 <211> 8
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 20 <400> 23
Phe Met Leu Asp Gly Glu Leu Met
 1 5
 <210> 24
 <211> 8
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 30 <400> 24
Glu Gly Ser Asp Gly Glu Ile Ser
 1 5
 <210> 25
 <211> 8
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 25
Phe Ile Leu Asp Thr Glu Ala Val
 1 5
 45 <210> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 26
Phe Ile Ile Glu Gly Glu Ile Val
 1 5
 55 <210> 27
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 27
Ala Ile Val Glu Gly Glu Leu Val
 1 5

5 <210> 28
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 28
Val Val Leu Asp Gly Glu Ala Val
 1 5

15 <210> 29
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 29
Tyr Gln Val Phe Gly Glu Phe Ala
 1 5

25 <210> 30
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 30
Leu Val Leu Asn Gly Glu Leu Phe
 1 5

35 <210> 31
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 31
Phe Thr Ala Asn Phe Glu Phe Val
 1 5

50 <210> 32
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 32
Leu Ile Leu Val Gly Glu Met Ala
 1 5

60 <210> 33
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 33
Phe Cys Tyr Gly Val
 1 5

<210> 34
 <211> 5
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 34
Phe Leu Tyr Thr Val
 1 5

<210> 35
 20 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 35
Thr Phe Tyr Ala Leu
 1 5

30 <210> 36
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 36
Ile Cys His Gly Leu
 1 5

40 <210> 37
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 37
Asn Ala Tyr Gly Ile
 50 1 5

<210> 38
 <211> 5
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

60 <400> 38
Phe Val Tyr Gly Leu
 1 5

<210> 39
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 39
Lys Leu Tyr Ala Ile
 1 5
 <210> 40
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 20 <400> 40
Tyr Trp Phe Asp Tyr
 1 5
 <210> 41
 <211> 5
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 30 <400> 41
Tyr Ala Phe Asp Ile
 1 5
 <210> 42
 <211> 5
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 42
Phe Leu Phe Asp Leu
 1 5
 45 <210> 43
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 43
Asn Leu Phe Asp Val
 1 5
 55 <210> 44
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 44
Trp Ala Phe Asp Leu
 1 5

5 <210> 45
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 45
Tyr Val Phe Asp Ile
 1 5

15 <210> 46
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 46
Ile Leu Leu Asn Ala
 1 5

25 <210> 47
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 47
Ile Leu Leu Asn Ala
 1 5

35 <210> 48
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 48
Phe Leu Phe Asp Val
 1 5

50 <210> 49
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 49
Asp Gly Val Val Ile Lys
 1 5

60 <210> 50
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 50
Asp Gly Ile Val Ile Lys
 1 5

<210> 51
 <211> 6
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 51
Asp Gly Val Val Val Lys
 1 5

<210> 52
 20 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 52
Asp Gly Thr Val Leu Lys
 1 5

30 <210> 53
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 53
Glu Gly Leu Ile Val Lys
 1 5

40 <210> 54
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 54
Glu Gly Val Met Ile Arg
 50 1 5

<210> 55
 <211> 6
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

60 <400> 55
Glu Gly Leu Met Val Lys
 1 5

<210> 56
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 56
Glu Gly Val Met Val Lys
 1 5
 <210> 57
 <211> 6
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 20 <400> 57
Glu Gly Leu Met Ala Lys
 1 5
 <210> 58
 <211> 6
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 30 <400> 58
Glu Gly Val Ile Ala Lys
 1 5
 <210> 59
 <211> 6
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 59
Glu Gly Tyr Val Leu Lys
 1 5
 45 <210> 60
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 60
Glu Gly Val Val Ile Arg
 1 5
 55 <210> 61
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 61
Glu Gly Tyr Val Ala Val
 1 5

5 <210> 62
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 62
Glu Gly Ile Ile Met Lys
 1 5

15 <210> 63
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 63
Ala Val Ala Phe Lys
 1 5

25 <210> 64
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 64
Ala Ile Ala Tyr Lys
 1 5

35 <210> 65
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 65
Ala Leu Ala Tyr Lys
 1 5

50 <210> 66
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 66
Ala Ile Ala Tyr Lys
 1 5

60 <210> 67
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 67
Trp Trp Lys Met Lys
 1 5

<210> 68
 <211> 5
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 68
Leu Leu Lys Met Lys
 1 5

<210> 69
 20 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 69
Trp Leu Lys Leu Lys
 1 5

30 <210> 70
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 70
Trp Ile Lys Leu Lys
 1 5

40 <210> 71
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 71
Trp Leu Lys Ile Lys
 50 1 5

<210> 72
 <211> 5
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

60 <400> 72
Trp Val Lys Asp Lys
 1 5

<210> 73
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 73
Ala Ile Lys Cys Lys
 1 5
 10
 <210> 74
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

 20 <400> 74
Ile Ile Lys Leu Arg
 1 5

 <210> 75
 <211> 5
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 30
 <400> 75
His Phe Lys Ile Lys
 1 5

 <210> 76
 <211> 5
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 40 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 76
His Phe Lys Ile Lys
 1 5

 45 <210> 77
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Paramecium bursaria Chlorella virus 1

 50 <400> 77

ES 2 728 743 T3

Met Ala Ile Thr Lys Pro Leu Leu Ala Ala Thr Leu Glu Asn Ile Glu
 1 5 10 15

Asp Val Gln Phe Pro Cys Leu Ala Thr Pro Lys Ile Asp Gly Ile Arg
 20 25 30

Ser Val Lys Gln Thr Gln Met Leu Ser Arg Thr Phe Lys Pro Ile Arg
 35 40 45

Asn Ser Val Met Asn Arg Leu Leu Thr Glu Leu Leu Pro Glu Gly Ser
 50 55 60

Asp Gly Glu Ile Ser Ile Glu Gly Ala Thr Phe Gln Asp Thr Thr Ser
 65 70 75 80

Ala Val Met Thr Gly His Lys Met Tyr Asn Ala Lys Phe Ser Tyr Tyr
 85 90 95

Trp Phe Asp Tyr Val Thr Asp Asp Pro Leu Lys Lys Tyr Ile Asp Arg
 100 105 110

Val Glu Asp Met Lys Asn Tyr Ile Thr Val His Pro His Ile Leu Glu
 115 120 125

His Ala Gln Val Lys Ile Ile Pro Leu Ile Pro Val Glu Ile Asn Asn
 130 135 140

Ile Thr Glu Leu Leu Gln Tyr Glu Arg Asp Val Leu Ser Lys Gly Phe
 145 150 155 160

Glu Gly Val Met Ile Arg Lys Pro Asp Gly Lys Tyr Lys Phe Gly Arg

ES 2 728 743 T3

165

170

175

Ser Thr Leu Lys Glu Gly Ile Leu Leu Lys Met Lys Gln Phe Lys Asp
180 185 190

Ala Glu Ala Thr Ile Ile Ser Met Thr Ala Leu Phe Lys Asn Thr Asn
195 200 205

Thr Lys Thr Lys Asp Asn Phe Gly Tyr Ser Lys Arg Ser Thr His Lys
210 215 220

Ser Gly Lys Val Glu Glu Asp Val Met Gly Ser Ile Glu Val Asp Tyr
225 230 235 240

Asp Gly Val Val Phe Ser Ile Gly Thr Gly Phe Asp Ala Asp Gln Arg
245 250 255

Arg Asp Phe Trp Gln Asn Lys Glu Ser Tyr Ile Gly Lys Met Val Lys
260 265 270

Phe Lys Tyr Phe Glu Met Gly Ser Lys Asp Cys Pro Arg Phe Pro Val
275 280 285

Phe Ile Gly Ile Arg His Glu Glu Asp Arg
290 295

<210> 78

5 <211> 306

<212> PRT

<213> Burkholderia pseudomalle

<400> 78

10

Met Ser Gly Val Pro Tyr Gly Phe Lys Pro Asn Leu Ala Ala Thr Leu
1 5 10 15

Thr Lys Pro Glu Leu Ile Lys Phe Pro Val Trp Ala Ser Pro Lys Ile
20 25 30

Asp Gly Ile Arg Cys Val Phe Phe Gly Gly Val Ala Tyr Ser Arg Ser
35 40 45

Leu Lys Pro Ile Pro Asn Pro Val Val Gln Glu Phe Ala Lys Ala Tyr
50 55 60

Ala Asn Leu Leu Glu Gly Leu Asp Gly Glu Leu Thr Val Gly Ser Pro
65 70 75 80

Thr Asp Ala Asn Cys Met Gln Asn Ser Met Ala Val Met Ser Lys Ala
85 90 95

ES 2 728 743 T3

Ala Ala Pro Asp Phe Thr Phe His Val Phe Asp Trp Phe His Pro Ala
 100 105 110

Gln Ala His Ile Glu Phe Trp Gln Arg Ser Asp Val Val Glu Asp Arg
 115 120 125

Ile Val Gln Phe Tyr Asp Arg Tyr Pro Glu Val Asp Ile Arg Ala Ala
 130 135 140

Pro Gln Val Leu Cys Thr Ser Leu Ala His Leu Asp Thr Asn Glu Ala
 145 150 155 160

Arg Trp Leu Ala Asp Gly Tyr Glu Gly Met Met Ile Arg Asp His Cys
 165 170 175

Gly Arg Tyr Lys Phe Gly Arg Ser Thr Glu Arg Glu Gly Gly Leu Val
 180 185 190

Lys Val Lys Arg Phe Thr Asp Ala Glu Ala Ile Val Ile Gly Phe Glu
 195 200 205

Glu Glu Met His Asn Ala Asn Glu Ala Lys Arg Asp Ala Thr Gly Arg
 210 215 220

Thr Glu Arg Ser Thr Ser Lys Ala Gly Leu His Gly Lys Gly Thr Leu
 225 230 235 240

Gly Ala Leu Val Val Lys Asn Glu Arg Gly Ile Val Phe Asn Ile Gly
 245 250 255

Thr Gly Phe Thr Ala Ala Gln Arg Ala Asp Tyr Trp Ala Asn His Pro
 260 265 270

Ser Leu Phe Gly Lys Met Val Lys Phe Lys His Phe Asp His Gly Thr
 275 280 285

Val Asp Ala Pro Arg His Pro Val Phe Ile Gly Phe Arg His Pro Glu
 290 295 300

Asp Met
 305

<210> 79

<211> 268

<212> PRT

<213> Haemophilus influenza

<400> 79

5

ES 2 728 743 T3

Met Lys Phe Tyr Arg Thr Leu Leu Leu Phe Phe Ala Ser Ser Phe Ala
 1 5 10 15

Phe Ala Asn Ser Asp Leu Met Leu Leu His Thr Tyr Asn Asn Gln Pro
 20 25 30

Ile Glu Gly Trp Val Met Ser Glu Lys Leu Asp Gly Val Arg Gly Tyr
 35 40 45

Trp Asn Gly Lys Gln Leu Leu Thr Arg Gln Gly Gln Arg Leu Ser Pro
 50 55 60

Pro Ala Tyr Phe Ile Lys Asp Phe Pro Pro Phe Ala Ile Asp Gly Glu
 65 70 75 80

Leu Phe Ser Glu Arg Asn His Phe Glu Glu Ile Ser Thr Ile Thr Lys
 85 90 95

Ser Phe Lys Gly Asp Gly Trp Glu Lys Leu Lys Leu Tyr Val Phe Asp
 100 105 110

Val Pro Asp Ala Glu Gly Asn Leu Phe Glu Arg Leu Ala Lys Leu Lys
 115 120 125

Ala His Leu Leu Glu His Pro Thr Thr Tyr Ile Glu Ile Ile Glu Gln
 130 135 140

Ile Pro Val Lys Asp Lys Thr His Leu Tyr Gln Phe Leu Ala Gln Val
 145 150 155 160

Glu Asn Leu Gln Gly Glu Gly Val Val Val Arg Asn Pro Asn Ala Pro
 165 170 175

Tyr Glu Arg Lys Arg Ser Ser Gln Ile Leu Lys Leu Lys Thr Ala Arg
 180 185 190

Gly Glu Glu Cys Thr Val Ile Ala His His Lys Gly Lys Gly Gln Phe
 195 200 205

Glu Asn Val Met Gly Ala Leu Thr Cys Lys Asn His Arg Gly Glu Phe
 210 215 220

Lys Ile Gly Ser Gly Phe Asn Leu Asn Glu Arg Glu Asn Pro Pro Pro
 225 230 235 240

Ile Gly Ser Val Ile Thr Tyr Lys Tyr Arg Gly Ile Thr Asn Ser Gly
 245 250 255

<210> 80

<211> 268

5 <212> PRT

<213> Haemophilus influenza

<400> 80

ES 2 728 743 T3

Met Lys Phe Tyr Arg Thr Leu Leu Leu Phe Phe Ala Ser Ser Phe Ala
 1 5 10 15

Phe Ala Asn Ser Asp Leu Met Leu Leu His Thr Tyr Asn Asn Gln Pro
 20 25 30

Ile Glu Gly Trp Val Met Ser Glu Lys Leu Asp Gly Val Arg Gly Tyr
 35 40 45

Trp Asn Gly Lys Gln Leu Leu Thr Arg Gln Gly Gln Arg Leu Ser Pro
 50 55 60

Pro Ala Tyr Phe Ile Lys Asp Phe Pro Pro Phe Ala Ile Asp Gly Glu
 65 70 75 80

Leu Phe Ser Glu Arg Asn His Phe Glu Glu Ile Ser Ser Ile Thr Lys
 85 90 95

Ser Phe Lys Gly Asp Gly Trp Glu Lys Leu Lys Leu Tyr Val Phe Asp
 100 105 110

Val Pro Asp Ala Glu Gly Asn Leu Phe Glu Arg Leu Ala Lys Leu Lys
 115 120 125

Ala His Leu Leu Glu His Pro Thr Thr Tyr Ile Glu Ile Ile Glu Gln
 130 135 140

Ile Pro Val Lys Asp Lys Thr His Leu Tyr Gln Phe Leu Ala Gln Val
 145 150 155 160

Glu Asn Leu Gln Gly Glu Gly Val Val Val Arg Asn Pro Asn Ala Pro
 165 170 175

Tyr Glu Arg Lys Arg Ser Ser Gln Ile Leu Lys Leu Lys Thr Ala Arg
 180 185 190

Gly Glu Glu Cys Thr Val Ile Ala His His Lys Gly Lys Gly Gln Phe
 195 200 205

Glu Asn Val Met Gly Ala Leu Thr Cys Lys Asn His Arg Gly Glu Phe
 210 215 220

Lys Ile Gly Ser Gly Phe Asn Leu Asn Glu Arg Glu Asn Pro Pro Pro
 225 230 235 240

Ile Gly Ser Val Ile Thr Tyr Lys Tyr Arg Gly Ile Thr Asn Ser Gly
 245 250 255

Lys Pro Arg Phe Ala Thr Tyr Trp Arg Glu Lys Lys
 260 265

5 <210> 81
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> Haemophilus influenza

10 <400> 81

ES 2 728 743 T3

Met Lys Phe Tyr Arg Thr Leu Leu Leu Phe Phe Ala Ser Ser Phe Ala
 1 5 10 15

Phe Ala Asn Ser Asp Leu Met Leu Leu His Thr Tyr Asn Asn Gln Pro
 20 25 30

Ile Glu Gly Trp Val Met Ser Glu Lys Leu Asp Gly Val Arg Gly Tyr
 35 40 45

Trp Asn Gly Lys Gln Leu Leu Thr Arg Gln Gly Gln Arg Leu Ser Pro
 50 55 60

Pro Ala Tyr Phe Ile Lys Asp Phe Pro Pro Phe Ala Ile Asp Gly Glu
 65 70 75 80

Leu Phe Ser Glu Arg Asn His Phe Glu Glu Ile Ser Ser Ile Thr Lys
 85 90 95

Ser Phe Lys Gly Asp Gly Trp Glu Lys Leu Lys Leu Tyr Val Phe Asp
 100 105 110

Val Pro Asp Ala Glu Gly Asn Leu Phe Glu Arg Leu Ala Lys Leu Lys
 115 120 125

Ala His Leu Leu Glu His Pro Thr Thr Tyr Ile Glu Ile Ile Glu Gln
 130 135 140

Ile Pro Val Lys Asp Lys Thr His Leu Tyr Gln Phe Leu Ala Gln Val
 145 150 155 160
 Glu Asn Leu Gln Gly Glu Gly Val Val Val Arg Asn Pro Asn Ala Pro
 165 170 175

Tyr Glu Arg Lys Arg Ser Ser Gln Ile Leu Lys Leu Lys Thr Ala Arg
 180 185 190

Asp Glu Glu Cys Thr Val Ile Ala His His Lys Gly Lys Gly Gln Phe
 195 200 205

Glu Asn Val Met Gly Ala Leu Thr Cys Lys Asn His Arg Gly Glu Phe
 210 215 220

Lys Ile Gly Ser Gly Phe Asn Leu Asn Glu Arg Glu Asn Pro Pro Pro
 225 230 235 240

Ile Gly Ser Val Ile Thr Tyr Lys Tyr Arg Gly Ile Thr Asn Ser Gly
 245 250 255

Lys Pro Arg Phe Ala Thr Tyr Trp Arg Glu Lys Lys
 260 265

<210> 82

5 <211> 246

<212> PRT

<213> Haemophilus influenza

<400> 82

ES 2 728 743 T3

Met Leu Leu His Thr Tyr Asn Asn Gln Pro Ile Glu Gly Trp Val Met
1 5 10 15

Ser Glu Lys Leu Asp Gly Val Arg Gly Tyr Trp Asn Gly Lys Gln Leu
20 25 30

Leu Thr Arg Gln Gly Gln Arg Leu Ser Pro Pro Ala Tyr Phe Ile Lys
35 40 45

Asp Phe Pro Pro Phe Ala Ile Asp Gly Glu Leu Phe Ser Glu Arg Asn
50 55 60

His Phe Glu Glu Ile Ser Ser Ile Thr Lys Ser Phe Lys Gly Asp Gly
65 70 75 80

Trp Glu Lys Leu Lys Leu Tyr Val Phe Asp Val Pro Asp Ala Glu Gly
85 90 95

Asn Leu Phe Glu Arg Leu Ala Lys Leu Lys Ala His Leu Leu Glu His
100 105 110

Pro Thr Thr Tyr Ile Glu Ile Ile Glu Gln Ile Pro Val Lys Asp Lys
115 120 125

Thr His Leu Tyr Gln Phe Leu Ala Gln Val Glu Asn Leu Gln Gly Glu
130 135 140

Gly Val Val Val Arg Asn Pro Asn Ala Pro Tyr Glu Arg Lys Arg Ser
145 150 155 160

Ser Gln Ile Leu Lys Leu Lys Thr Ala Arg Asp Glu Glu Cys Thr Val
165 170 175

Ile Ala His His Lys Gly Lys Gly Gln Phe Glu Asn Val Met Gly Ala
180 185 190

Leu Thr Cys Lys Asn His Arg Gly Glu Phe Lys Ile Gly Ser Gly Phe
195 200 205

Asn Leu Asn Glu Arg Glu Asn Pro Pro Pro Ile Gly Ser Val Ile Thr
210 215 220

Tyr Lys Tyr Arg Gly Ile Thr Asn Ser Gly Lys Pro Arg Phe Ala Thr
225 230 235 240

Tyr Trp Arg Glu Lys Lys
245

5 <210> 83
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 83

aaaaaaaaaa aa 12

<210> 84

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Cualquier aminoácido

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Cualquier aminoácido

20

<400> 84

Lys Xaa Asp Gly Xaa Arg

1

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para ligar al menos el primer y segundo oligonucleótidos, en donde cada uno del primer y segundo oligonucleótidos está unido a una sonda específica del objetivo, para producir un molde de oligonucleótido ligada y amplificar el molde del oligonucleótido ligado para producir un ácido nucleico diana amplificado, en donde la ligación y la amplificación se produce en una sola mezcla de reacción, en donde el primer y segundo oligonucleótidos se ligan entre sí utilizando un oligonucleótido de férula y una ligasa, en donde el primer y segundo oligonucleótidos se hibridan al oligonucleótido de férula y en donde la parte hibridada del oligonucleótido de férula no es más de 20 nucleótidos de largo;
- 10 y en donde dicha ligasa se selecciona del grupo que consiste en la ligasa de SEC ID NO.: 77, la ligasa de SEC ID NO.: 78, la ligasa de SEC ID NO.: 79, la ligasa de SEC ID NO.: 80, la ligasa de SEC ID NO.: 81, la ligasa de SEC ID NO.: 82, y combinaciones de las mismas.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la ligación y la amplificación se realizan como una sola etapa.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dichos primer y segundo oligonucleótidos son al menos parcialmente complementarios entre sí.
4. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la ligasa se enriquece previamente con ATP antes de la etapa de ligación.
5. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde se omite el ATP durante la reacción de ligación.
6. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la sonda específica de la diana es un anticuerpo.
- 20 7. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además detectar el ácido nucleico diana amplificado.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el oligonucleótido de férula está bloqueado en su extremo 3'.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que los extremos 3' y 5' de dicho oligonucleótido de férula son simétricos entre sí.
- 25 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que los extremos 3'y 5' de dicho oligonucleótido de férula son asimétricos entre sí.
11. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la amplificación comprende realizar una reacción en cadena de la polimerasa del molde de oligonucleótidos a través del primer y segundo oligonucleótidos para cuantificar el molde, opcionalmente en la que el molde se cuantifica usando PCR en tiempo real.
- 30 12. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la diana es una proteína o analito.
13. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que el método no incluye el uso de una proteasa y/o dilución de la mezcla de reacción antes de la amplificación.
- 35 14. Un kit para realizar un método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una o más sondas específicas de diana, un par de oligonucleótidos para amplificar al menos un ácido nucleico diana de una muestra, una ADN polimerasa y/o una o más correspondientes sondas marcadas con un marcador detectable, un oligonucleótido de férula, en donde el par de oligonucleótidos es capaz de hibridar con el oligonucleótido de férula y en donde la porción hibridada del oligonucleótido de férula no es más larga que 20 nucleótidos, y una ligasa seleccionada del grupo que consiste en la ligasa de SEC ID NO.: 77, la ligasa de SEC ID NO.: 78, la ligase de SEC ID NO.: 79, la ligasa de SEC ID NO.: 80, la ligasa de SEC ID NO.: 81, la ligasa de la SEC ID NO.: 82, y combinaciones de las mismas.
- 40

FIGURA 1

PLA típico/convencional

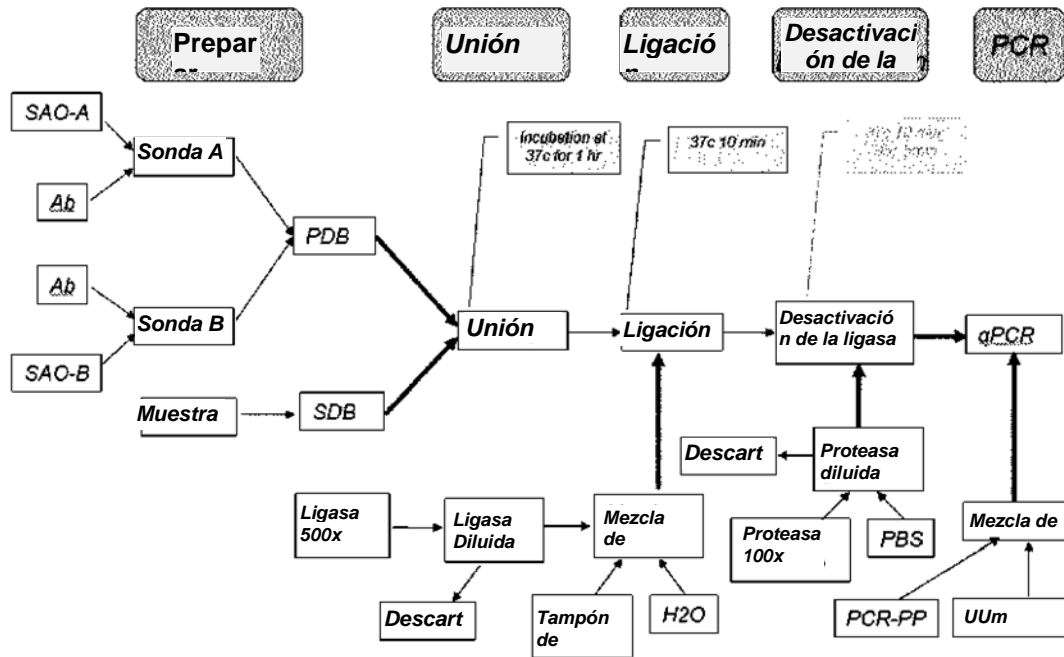


FIGURA 2

PLA mejorado

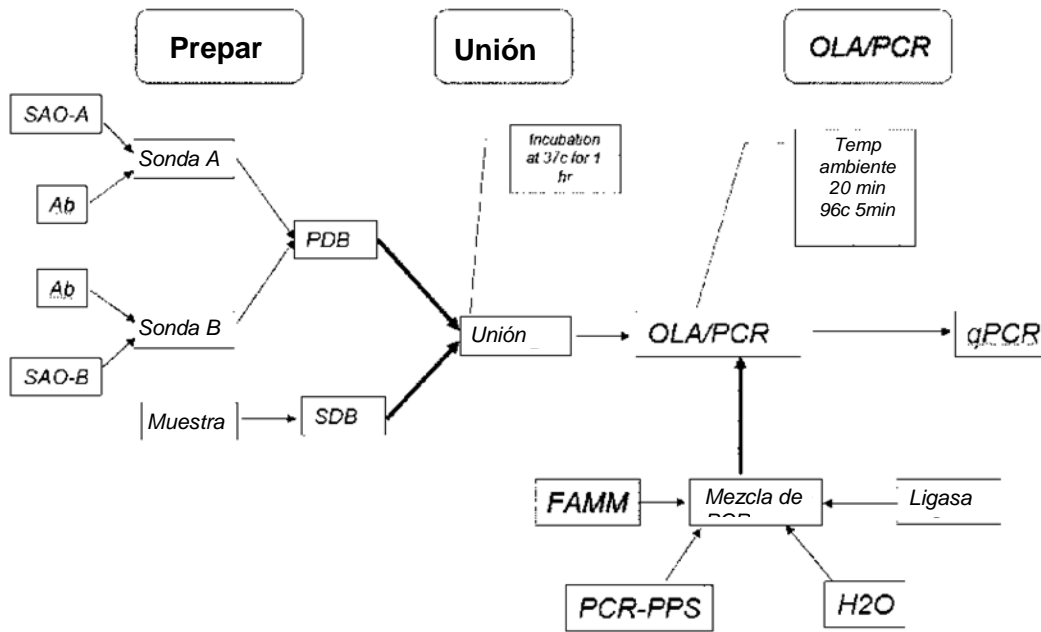
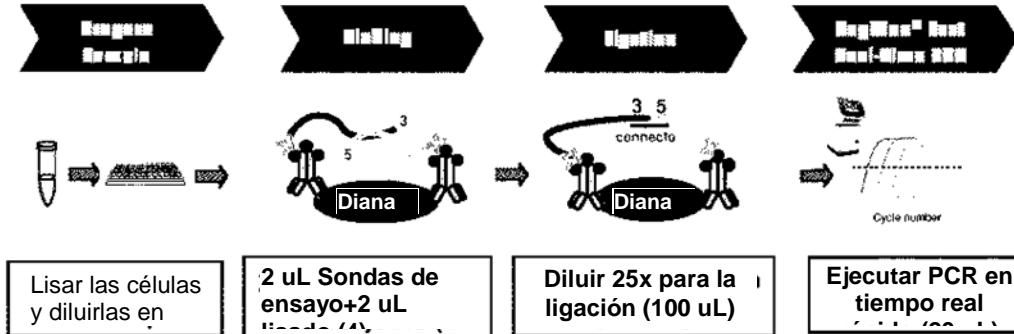
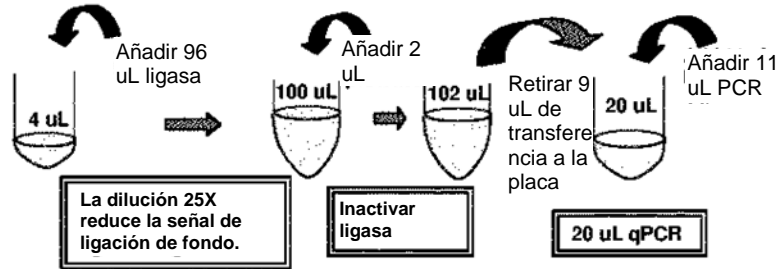


FIGURA 3

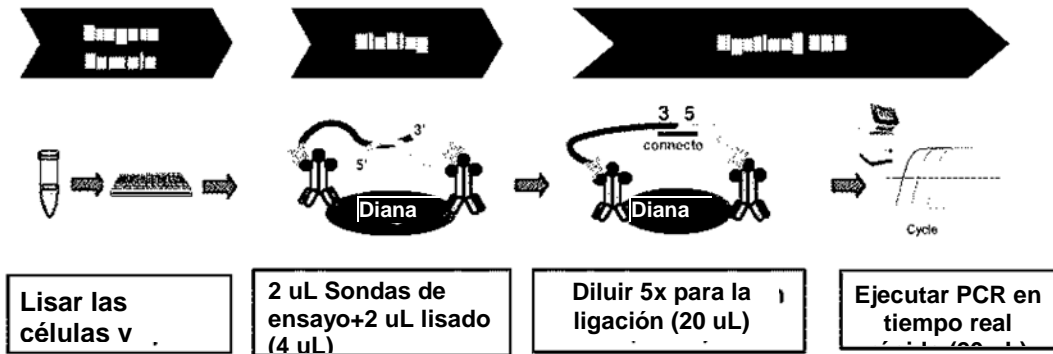
A. PLA típico



3 etapas principales y 4 transferencias de líquidos



B. PLA mejorado



2 etapas principales y 1 transferencia de líquidos

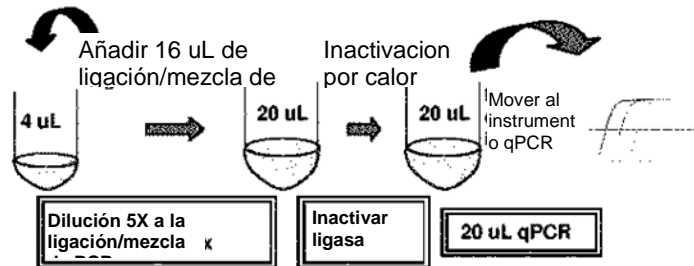
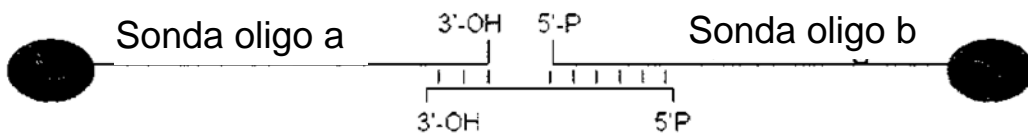


FIGURA 4

Férulas de oligo asimétricas y simétricas

A. Férula asimétrica (p. ej., 3+6)



B. Férula simétrica (p. ej., 4+4)

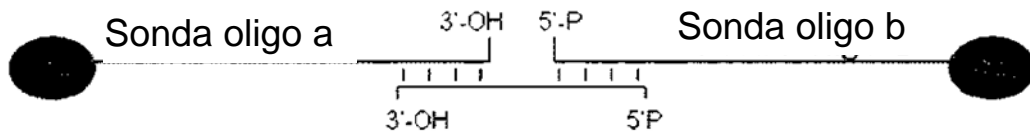


FIGURA 5

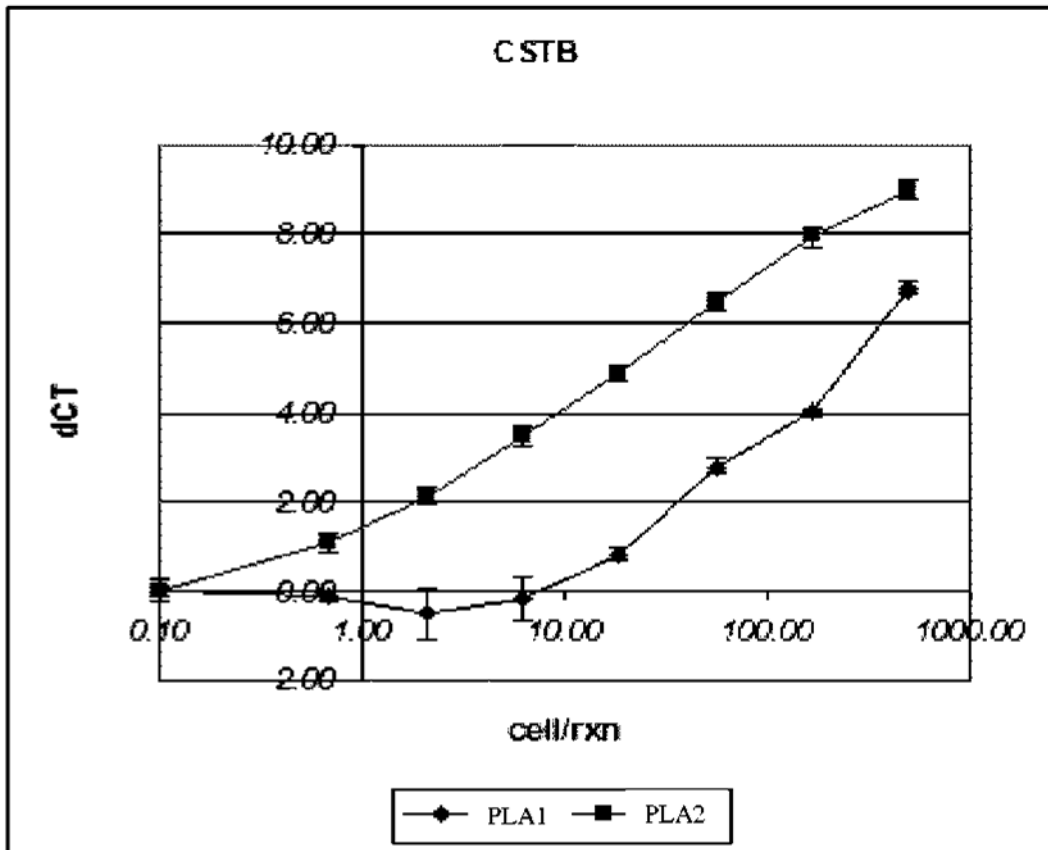


FIGURA 6

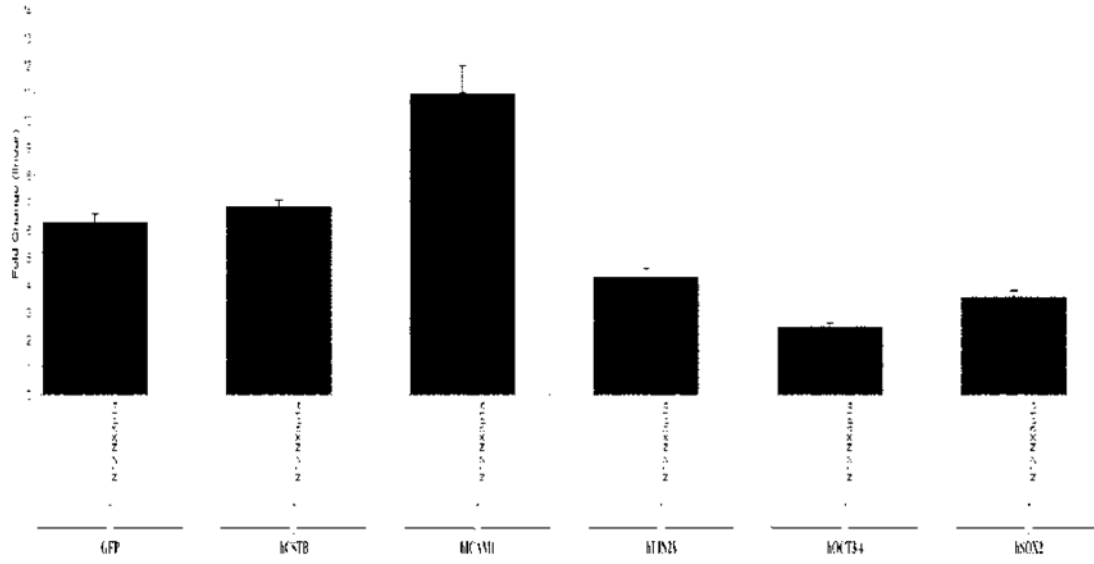


FIGURA 7

Efecto de la concentración de la férula en el rendimiento de 4
PLA con ADN ligasa T4

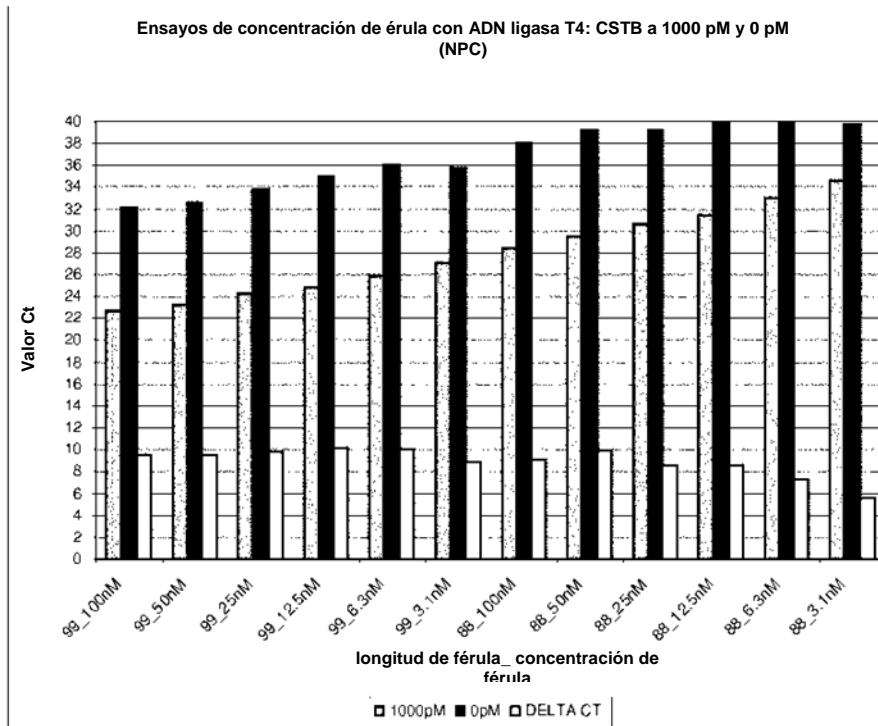


FIGURA 8

Efecto de la longitud de la férula con SF ligasa

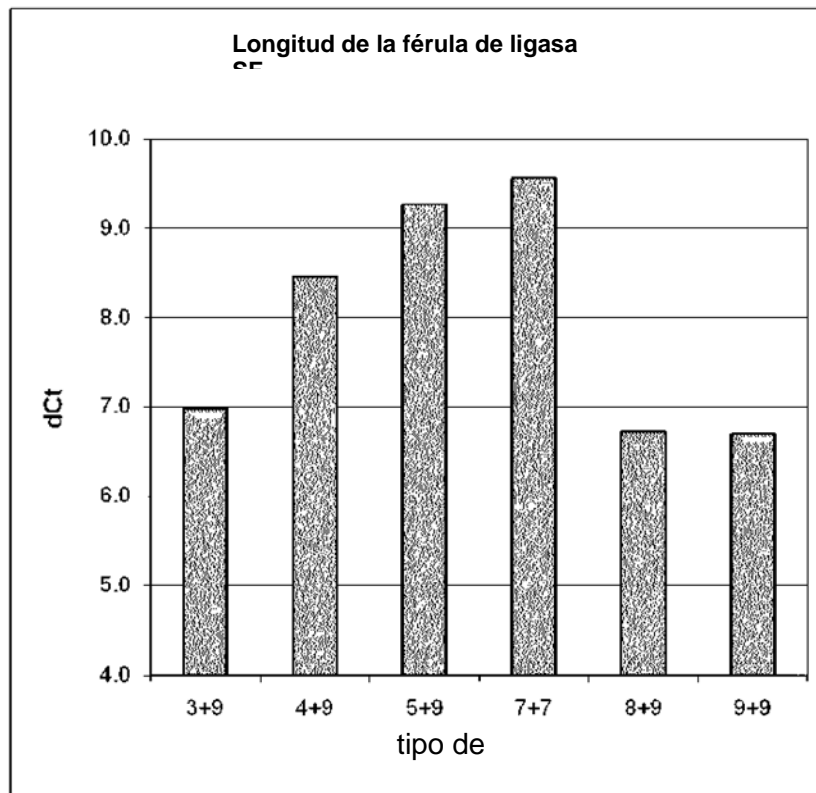


FIGURA 9

3 Ligasas Comparadas

