

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 463**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6851 (2008.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C12Q 1/6832 (2008.01)

C12Q 1/6853 (2008.01)

C12Q 1/6855 (2008.01)

C12Q 1/6858 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2013 PCT/US2013/068350**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14071322**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2013 E 13795633 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2914743**

54 Título: **Captura, detección y cuantificación de ARN pequeño**

30 Prioridad:

02.11.2012 US 201261721968 P

20.12.2012 US 201261740242 P

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

20.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WONG, LINDA;
CHEN, CAIFU;
WU, YALEI;
DONG, SHOULIAN y
LIU, CHUNMEI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 749 463 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

Captura, detección y cuantificación de ARN pequeño

Solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio en virtud de 35 U.S.C. 119(e) de la solicitud de patente provisional de EE.UU. N° 61/740,242, presentada el 20 de diciembre de 2012, y el beneficio en virtud de 35 U.S.C. 119(e) de la solicitud de patente provisional de EE.UU. N° 61/721,968, presentada el 2 de noviembre de 2012.

Campo

Las presentes enseñanzas están en el campo de la biología molecular y celular, específicamente en el campo de la detección de polinucleótidos diana tales como especies de ARN pequeño.

10 **Introducción**

Las especies de ARN reguladoras pequeñas, no codificantes, tales como el microARN (miARN), son una clase abundante de elementos reguladores que se ha mostrado que afectan a todos los aspectos de los procesos celulares normales tanto en plantas como en animales, incluyendo la muerte celular, la diferenciación y la proliferación. Los miARN también se han implicado en una serie de enfermedades, que incluyen cáncer, enfermedades cardíacas y enfermedades neurológicas, por lo tanto, los miARN se estudian como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico. Los ARN pequeños, incluyendo los miARN, son generados por complejos enzimáticos específicos a partir de precursores de ARN mucho más grandes. En general, un miARN maduro está compuesto por una secuencia central altamente conservada de 20-30 nucleótidos y típicamente tiene un monofosfato 5'-terminal y un grupo hidroxilo 3'-terminal. Los miARN generalmente inducen el silenciamiento génico mediante la unión a sitios diana dentro de la 3'-UTR de un ARNm al que se dirigen. Esta interacción suprime la síntesis de proteínas y/o inicia la degradación del ARNm.

Los intentos de detectar, cuantificar y analizar ARN pequeños maduros, tales como los miARN, se han visto obstaculizados por varios factores, que incluyen sus tamaños pequeños y su similitud entre especies relacionadas pero distintas. Los miembros de la familia de miARN estrechamente relacionados pueden diferir en un solo nucleótido, por lo tanto, se necesita una alta especificidad y la capacidad de discriminar entre apareamientos erróneos de un solo nucleótido.

Las micromatrices de ácido nucleico se han usado para cuantificar ARN pequeños maduros, pero este método requiere una alta concentración de diana de entrada para una hibridación eficiente. El pequeño tamaño de los ARN pequeños maduros impide su amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con transcriptasa inversa o cuantitativa, aunque los precursores más grandes se pueden amplificar por PCR. Se han desarrollado métodos para facilitar la amplificación por PCR de ARN pequeños maduros. Por ejemplo, los ARN pequeños maduros se han alargado mediante la adición de al menos un adaptador de oligonucleótidos. Alternativamente, las sondas que comprenden una parte que se hibrida con un ARN pequeño se ligan entre sí y después se usan para la amplificación por PCR. Estos métodos están lejos de ser ideales porque la unión de moléculas monocatenarias es ineficiente y/o el ARN pequeño no se detecta directamente. Por lo tanto, todavía se necesita un método de captura, detección y análisis de ARN pequeños que sea mejor con respecto a la técnica anterior con respecto a al menos uno de los siguientes atributos: sensibilidad, velocidad, eficiencia y rentabilidad. El documento WO2008097957 describe métodos, composiciones y kits para detectar moléculas de ARN pequeñas maduras desconocidas. El método fusiona los adaptadores por medio de férulas de ligadura (moldes de ligadura) a ambos lados del ARN pequeño maduro, requiere una etapa de purificación para separar las férulas y las moléculas de ARN no fusionadas a los adaptadores, seguido de transcripción inversa y amplificación. El documento US6706476 describe un método en donde se usan adaptadores y cebadores especiales para la amplificación de ADNc monocatenario. El método comprende poner en contacto el ARN con un cebador de síntesis de ADNc anclado que se puede reasociar con el ARN que ya está poliadenilado.

45 **Resumen**

Se proporcionan en el presente documento métodos, composiciones y kits para la captura y detección de ARN pequeños maduros. Las presentes enseñanzas proporcionan un método para capturar, detectar y cuantificar un ARN pequeño maduro, tal como un microARN (miARN), de una muestra que usa adaptadores de ligadura universales en los extremos tanto 5' como 3' del ARN pequeño maduro utilizando el grupo fosfato 5' terminal y el grupo hidroxilo 3' terminal de un ARN pequeño maduro (véase la Figura 1). La ligadura de doble extremo de un adaptador de ligadura a cada uno de los extremos 5' y 3' de un ARN pequeño maduro es catalizada por una ligasa dependiente de molde en presencia de férulas de ligadura semidegeneradas. El producto de ligadura resultante comprende el ARN pequeño maduro, un adaptador de ligadura universal 5' y un adaptador de ligadura universal 3' y se puede extender y amplificar para detectar y cuantificar directamente el ARN pequeño maduro. Después de la ligadura, todos los ARN pequeños maduros presentes en la muestra que se modificaron por la ligadura comprenderán una secuencia universal en los extremos tanto 5' como 3' de las regiones recién ligadas que permiten la transcripción inversa (RT) universal y la preamplificación (preamp) y/o amplificación universal. La digestión

posterior a la ligadura de los adaptadores de ligadura y las férulas de ligadura es opcional pero no es obligatoria. El método de la invención comprende: proporcionar una muestra que comprende una molécula de ARN pequeña que comprende aproximadamente 20-30 nucleótidos que se ha procesado de un precursor de ARN más grande (ARN pequeño maduro); poliadenilar el extremo 3' del ARN pequeño maduro; la transcripción inversa del ARN pequeño maduro poliadenilado usando un cebador de transcripción inversa universal, formando así un ADNc del ARN pequeño maduro, en donde el cebador de transcripción inversa universal comprende una parte de poli(T) y una parte de cola, en donde la parte de cola comprende una parte de cebador universal; ligar un adaptador de ligadura universal al extremo 3' del ADNc en presencia de una férula de ligadura, en donde la férula de ligadura comprende una región 3' terminal que contiene de aproximadamente 3 nucleótidos a aproximadamente 6 nucleótidos que se hibridan con el extremo 3' del ADNc del ARN pequeño maduro y una región 5' terminal que se hibrida con el extremo 5' del adaptador de ligadura, por lo que se forma un producto de ligadura de ADNc; amplificar el producto de ligadura de ADNc usando un par de cebadores universales directo e inverso para formar un producto de amplificación; y detectar el producto de amplificación. En ciertas realizaciones, las etapas de ligadura, transcripción inversa y preamplificación y/o amplificación se pueden llevar a cabo juntas en un único recipiente de reacción (un método de 1 etapa o 3 en 1). En ciertas realizaciones, las etapas de ligadura y extensión se llevan a cabo juntas en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (ligadura/RT en 1 etapa)). En ciertas realizaciones, las etapas de transcripción inversa y preamplificación y/o amplificación se llevan a cabo juntas en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (RT/preamplificador en 1 etapa)).

En ciertas realizaciones, las presentes enseñanzas proporcionan un método para capturar, detectar y cuantificar un ARN pequeño maduro, tal como un microARN (miARN), de una muestra mediante poliadenilación y transcripción inversa del ARN con un cebador de transcripción inversa universal para generar un ADNc con una parte de cebador universal en su extremo 5', y ligadura de un adaptador de ligadura universal en el extremo 3' del ADNc utilizando el grupo fosfato 5' terminal en el adaptador y el grupo hidroxilo 3' terminal del ADNc (véase la Figura 2). La ligadura de un adaptador de ligadura al extremo 3' del ADNc es catalizada por una ligasa en presencia de una férula de ligadura que abarca la unión de la ligadura. El producto de ligadura resultante comprende el ADNc del ARN pequeño maduro y un adaptador universal de ligadura 3', y comprende una secuencia universal en los extremos tanto 5' como 3' del producto de ligadura de ADNc que permite la preamplificación (preamp) y/o amplificación universal usando un solo par de cebadores universales directo e inverso. En ciertas realizaciones, la férula de ligadura es una férula de ligadura semidegenerada. En ciertas realizaciones, la muestra puede ser una preparación de ARN total, un extracto celular, una célula intacta, una reacción de transcripción in vitro o una síntesis química. La digestión posterior a la ligadura del adaptador de ligadura y la férula de ligadura es opcional pero no obligatoria. En ciertas realizaciones, las etapas de poliadenilación y transcripción inversa se llevan a cabo juntas en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (poliadenilación/RT en 1 etapa)). En ciertas realizaciones, las etapas de ligadura y preamplificación y/o amplificación se llevan a cabo juntas en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (ligadura/preamp en 1 etapa)).

En ciertas realizaciones, se puede usar un agente de bloqueo. La detección de los polinucleótidos diana se puede llevar a cabo utilizando métodos de amplificación tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como la PCR cuantitativa en tiempo real, PCR cuantitativa de punto final y PCR convencional. En ciertas realizaciones, los métodos de amplificación comprenden el uso de activación por reacciones de polifosforólisis (APP) y agentes de polifosforolización. Los métodos de 1 y 2 etapas que utilizan RT universal y preamp/amplificación que se proporcionan en este documento, ofrecen un flujo de trabajo simplificado que es muy deseable y mejora la detección, la sensibilidad y la reproducibilidad.

Mediante el uso de adaptadores de ligadura universales 5' y 3', se puede usar un solo cebador como cebador universal de transcripción inversa (p. ej., un cebador de RT/inverso universal) para las moléculas de ARN pequeño maduras en la muestra, que se han modificado con adaptadores de ligadura. De manera similar, el par de cebadores universales se puede usar para la preamplificación y/o amplificación (p. ej., cebadores directo universal y de RT/inverso universal) para las moléculas de ARN pequeño maduras en la muestra, que se han modificado con adaptadores de ligadura. Al poliadenilar moléculas de ARN pequeño maduras, se usa un único cebador como cebador de transcripción inversa universal y es compartido por todo el ADNc de los polinucleótidos diana de la muestra. De manera similar, se puede usar un par de cebadores universales para la preamplificación y/o amplificación (p. ej., cebadores directo universal e inverso universal) para las moléculas de ADNc del ARN pequeño que se han modificado con un adaptador de ligadura.

El uso de cebadores universales da una o más de las siguientes ventajas: 1) permite una reacción uniplex; 2) reduce los sesgos específicos de la diana; 3) elimina las mezclas fijas o personalizadas; 4) elimina la restricción del número de dianas; 5) elimina la necesidad de diseñar actualizaciones basadas en especies de ARN pequeño maduro recién descubiertas; 6) elimina la necesidad de desarrollo y validación de mezclas; y 7) simplifica la fabricación puesto que solo se requiere uno o dos adaptadores de ligadura universales y un conjunto de cebadores universales. Además, este sistema permite una mayor flexibilidad para el diseño del cebador específico del gen y el diseño de la sonda, puesto que el ARN pequeño maduro se puede detectar directamente mediante métodos de ensayo tales como la PCR. Además, los métodos de poliadenilación/RT universal combinadas (un método de 2 etapas), ligadura/preamp universal combinadas (un método de 2 pasos), ligadura/RT universal combinadas (un método de 2 etapas), RT universal/preamp universal combinadas (un método de 2 etapas) o ligadura/RT universal/preamp universal combinadas (un método de 1 etapa o 3 en 1) proporcionados en el presente documento proporcionan las siguientes

ventajas: 1) elimina la digestión posterior a la ligadura del adaptadores de ligadura y férulas de ligadura; 2) simplifica el flujo de trabajo; 3) disminuye el tiempo para los resultados; 4) reduce el tiempo práctico; y 5) reduce la variación entre ensayos.

5 En ciertas realizaciones, las presentes enseñanzas proporcionan un método para detectar un polinucleótido diana en una muestra, el método incluye: ligar un adaptador de ligadura 5' universal al extremo 5' del polinucleótido diana en presencia de una férula de ligadura semidegenerada 5' que abarca la unión de ligadura de 5', y ligar un adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del polinucleótido diana en presencia de una férula de ligadura semidegenerada 3' que abarca la unión de ligadura 3', de modo que se forma un producto de ligadura; extender o realizar la transcripción inversa del producto de ligadura para formar un producto de extensión usando un cebador de RT/inverso universal; amplificar el producto de extensión usando un par de cebadores directo y RT/inverso universales para formar un producto de amplificación; y detectar el polinucleótido diana. En ciertas realizaciones, el polinucleótido diana es un ARN pequeño maduro. En ciertas realizaciones, el polinucleótido diana es un miARN. En ciertas realizaciones, la muestra puede ser una preparación aislada de ARN total, un extracto celular, una célula intacta, una reacción de transcripción in vitro o una síntesis química. En ciertas realizaciones, las etapas de ligadura, transcripción inversa y preamplificación y/o amplificación se llevan a cabo juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 1 etapa o 3 en 1). En ciertas realizaciones, las etapas de ligadura y transcripción inversa se llevan a cabo juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (ligadura/RT en 1 etapa)). En ciertas realizaciones, las etapas de transcripción inversa y preamplificación y/o amplificación se llevan a cabo juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (RT/preamp en 1 etapa)). En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en la etapa de ligadura. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en la etapa de transcripción inversa. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en la etapa de amplificación. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en el método de 1 etapa. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en el método de 2 etapas. En ciertas realizaciones, la ligadura del adaptador de ligadura universal 5' al extremo 5' del polinucleótido diana se lleva a cabo esencialmente simultáneamente con la ligadura del adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del polinucleótido diana. En ciertas realizaciones, la ligadura del adaptador de ligadura universal 5' al extremo 5' del polinucleótido diana se lleva a cabo antes de ligar el adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del polinucleótido diana. En ciertas realizaciones, la ligadura del adaptador de ligadura universal 5' al extremo 5' del polinucleótido diana se lleva a cabo después de ligar el adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del polinucleótido diana. La detección de los polinucleótidos diana se puede llevar a cabo utilizando métodos de amplificación tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como la PCR cuantitativa en tiempo real, PCR cuantitativa de punto final y PCR convencional.

20

25

30

35 En ciertas realizaciones, las presentes enseñanzas proporcionan un método para detectar un ARN pequeño maduro en una muestra, el método incluye: ligar un adaptador de ligadura 5' universal al extremo 5' del ARN pequeño maduro en presencia de una férula de ligadura semidegenerada 5' que abarca la unión de ligadura de 5', y ligar un adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del ARN pequeño maduro en presencia de una férula de ligadura semidegenerada 3' que abarca la unión de ligadura 3', de modo que se forma un producto de ligadura; extender o realizar la transcripción inversa del producto de ligadura para formar un producto de extensión usando un cebador de RT/inverso universal; amplificar el producto de extensión usando un par de cebadores directo y de RT/inverso universales para formar un producto de amplificación; y detectar el ARN pequeño maduro. En ciertas realizaciones, el ARN pequeño maduro es un miARN. En ciertas realizaciones, la muestra puede ser una preparación aislada de ARN total, un extracto celular, una célula intacta, una reacción de transcripción in vitro o una síntesis química. En ciertas realizaciones, las etapas de ligadura, transcripción inversa y preamplificación y/o amplificación se llevan a cabo juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 1 etapa o 3 en 1). En ciertas realizaciones, las etapas de ligadura y transcripción inversa se llevan a cabo juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (ligadura/RT en 1 etapa)). En ciertas realizaciones, las etapas de transcripción inversa y preamplificación y/o amplificación se llevan a cabo juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (RT/preamp en 1 etapa)). En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en la etapa de ligadura. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en la etapa de transcripción inversa. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en la etapa de amplificación. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en el método de 1 etapa. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en el método de 2 etapas. En ciertas realizaciones, la ligadura del adaptador de ligadura universal 5' al extremo 5' del ARN pequeño maduro se lleva a cabo esencialmente simultáneamente con la ligadura del adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del ARN pequeño maduro. En ciertas realizaciones, la ligadura del adaptador de ligadura universal 5' al extremo 5' del ARN pequeño maduro se lleva a cabo antes de ligar el adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del ARN pequeño maduro. En ciertas realizaciones, la ligadura del adaptador de ligadura universal 5' al extremo 5' del ARN pequeño maduro se lleva a cabo después de ligar el adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del ARN pequeño maduro. La detección de los polinucleótidos diana se puede llevar a cabo utilizando métodos de amplificación tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como la PCR cuantitativa en tiempo real, PCR cuantitativa de punto final y PCR convencional.

40

45

50

55

60

En ciertas realizaciones, las presentes enseñanzas proporcionan un método para detectar un microARN (miARN) en una muestra, el método incluye: ligar un adaptador de ligadura 5' universal al extremo 5' del miARN en presencia de una férula de ligadura semidegenerada 5' que abarca la unión de ligadura de 5', y ligar un adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del miARN en presencia de una férula de ligadura semidegenerada 3' que abarca la unión de ligadura 3', de modo que se forma un producto de ligadura; extender o realizar la transcripción inversa del producto de ligadura para formar un producto de extensión usando un cebador de RT/inverso universal; amplificar el producto de extensión usando un par de cebadores universales para formar un producto de amplificación; y detectar el miARN. En ciertas realizaciones, la muestra puede ser una preparación aislada de ARN total, un extracto celular, una célula intacta, una reacción de transcripción in vitro o una síntesis química. En ciertas realizaciones, las etapas de ligadura, transcripción inversa y preamplificación y/o amplificación se realizan juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 1 etapa o 3 en 1). En ciertas realizaciones, las etapas de ligadura y transcripción inversa se realizan juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (ligadura/RT en 1 etapa)). En ciertas realizaciones, las etapas de transcripción inversa y preamplificación y/o amplificación se realizan juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (RT/preamp en 1 etapa)). En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en la etapa de ligadura. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en la etapa de transcripción inversa. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en la etapa de amplificación. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en el método de 1 etapa. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en el método de 2 etapas. En ciertas realizaciones, la ligadura del adaptador de ligadura universal 5' al extremo 5' del miARN se lleva a cabo esencialmente simultáneamente con la ligadura del adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del miARN. En ciertas realizaciones, la ligadura del adaptador de ligadura universal 5' al extremo 5' del miARN se lleva a cabo antes de ligar el adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del miARN. En ciertas realizaciones, la ligadura del adaptador de ligadura universal 5' al extremo 5' del miARN se lleva a cabo después de ligar el adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del miARN. La detección de los polinucleótidos diana se puede llevar a cabo utilizando métodos de amplificación tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como la PCR cuantitativa en tiempo real, PCR cuantitativa de punto final y PCR convencional.

En ciertas realizaciones, las presentes enseñanzas proporcionan un método para detectar un ARN pequeño maduro en una muestra, el método incluye: ligar un adaptador de ligadura universal 5' al extremo 5' del ARN pequeño maduro en presencia de una férula de ligadura semidegenerada 5' que abarca la unión de ligadura 5', de modo que se forma un producto de ligadura; poliadenilar el extremo 3' del ARN pequeño maduro; extender el producto de ligadura para formar un producto de extensión usando un cebador universal de poli(T), en donde el cebador universal de poli(T) comprende una parte de poli(T) y una parte de cola, en donde la parte de cola comprende un sitio de unión del cebador de RT universal (véase la Figura 6); amplificar el producto de extensión para formar un producto de amplificación; y detectar el ARN pequeño maduro. En ciertas realizaciones, el ARN pequeño maduro es un miARN. En ciertas realizaciones, la etapa de poliadenilación, la etapa de extensión y la etapa de amplificación se llevan a cabo juntas en el mismo recipiente de reacción (un método de 1 etapa). En ciertas realizaciones, las etapas de poliadenilación y extensión se llevan a cabo juntas en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas). En ciertas realizaciones, las etapas de transcripción inversa y preamplificación y/o amplificación se llevan a cabo juntas en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (RT/preamplificador en 1 etapa)). En ciertas realizaciones, la muestra puede ser una preparación aislada de ARN total, un extracto celular, una célula intacta, una reacción de transcripción in vitro o una síntesis química. La detección de los polinucleótidos diana se puede llevar a cabo utilizando métodos de amplificación tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como la PCR cuantitativa en tiempo real, PCR cuantitativa de punto final y PCR convencional.

En ciertas realizaciones, las presentes enseñanzas proporcionan un método para detectar un ARN pequeño maduro en una muestra, el método incluye: poliadenilar el extremo 3' del ARN pequeño maduro; transcripción inversa del ARN poliadenilado para formar un ADNc usando un cebador universal de transcripción inversa (RT) (Figura 2), en donde el cebador de RT universal comprende una parte de poli(T) y una parte de cola, comprendiendo la parte de cola una parte de cebador universal; ligar un adaptador de ligadura universal al extremo 3' del ADNc en presencia de una férula de ligadura que abarca la unión de ligadura, de modo que se forma un producto de ligadura de ADNc; amplificar el producto de ligadura de ADNc usando un par de cebadores universales directo e inverso y/o detectar el ARN pequeño maduro por PCR. En ciertas realizaciones, el ARN pequeño maduro es un miARN. En ciertas realizaciones, la férula de ligadura es una férula de ligadura semidegenerada. En ciertas realizaciones, la muestra puede ser una preparación aislada de ARN total, un extracto celular, una célula intacta, una reacción de transcripción in vitro o una síntesis química. En ciertas realizaciones, las etapas de poliadenilación y transcripción inversa se realizan juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (poliadenilación/RT en 1 etapa)). En ciertas realizaciones, las etapas de ligadura y preamplificación se realizan juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (ligadura/preamp en 1 etapa)). En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en la etapa de ligadura y/o la etapa de preamplificación. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en el método de 1 etapa. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en el método de 2 etapas. La detección de los polinucleótidos diana se puede llevar a cabo utilizando métodos de amplificación tales como la reacción en cadena

de la polimerasa (PCR), tal como la PCR cuantitativa en tiempo real, PCR cuantitativa de punto final y PCR convencional.

En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 5' y el adaptador de ligadura 3' son oligonucleótidos lineales (véase la Figura 3). En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 5' comprende una región complementaria de la férula de ligadura 5' en la región terminal 3' que es complementaria de la región 3' de la férula de ligadura 5' y un sitio de unión del cebador directo universal situado en la región terminal 5'. El sitio de unión del cebador directo universal en el adaptador de ligadura 5' es complementario o incluye la secuencia del cebador directo universal. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 3' comprende un grupo de bloqueo en el extremo 3', una región complementaria de la férula de ligadura 3' en la región terminal 5' que es complementaria de la parte 5' de la férula de ligadura 3' y un sitio de unión del cebador de RT/inverso universal situado en la región terminal 3'. El sitio de unión del cebador de RT/inverso universal es complementario del cebador inverso universal. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 3' es para ligar al extremo 3' del ADNc y comprende una región complementaria de la férula de ligadura 3' en la región terminal 5' que es complementaria de la parte 5' de la férula de ligadura 3' y un sitio de unión del cebador universal situado en la región terminal 3'. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 3' para ligar al extremo 3' del ADNc comprende un grupo de bloqueo en el extremo 3', una región complementaria de la férula de ligadura 3' en la región terminal 5' que es complementaria de la parte 5' de la férula de ligadura 3' y un sitio de unión del cebador directo universal situado en la región terminal 3'. El sitio de unión del cebador directo universal es complementario al cebador directo universal. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 5' es un oligonucleótido de ARN y el adaptador de ligadura 3' es un oligonucleótido de ADN.

En ciertas realizaciones, la férula de ligadura semidegenerada 5' comprende dos regiones distintas (véase la Figura 3): una región terminal 5' que contiene bases de nucleótidos degenerados que varían de aproximadamente 3 nucleótidos a aproximadamente 6 nucleótidos que se hibridan con el extremo 5' del ARN pequeño maduro y una región 3' que se hibrida con el extremo 3' del adaptador de ligadura 5'. En ciertas realizaciones, la férula de ligadura semidegenerada 5' comprende dos regiones distintas: una región terminal 5' que contiene de aproximadamente 3 nucleótidos a aproximadamente 6 nucleótidos que se hibrida con el extremo 5' del ARN pequeño maduro y una región 3' que se hibrida con el extremo 3' del adaptador de ligadura 5'. En ciertas realizaciones, la férula de ligadura 3' comprende dos regiones distintas: una región terminal 3' que contiene bases de nucleótidos degeneradas que varían de aproximadamente 3 nucleótidos a aproximadamente 6 nucleótidos que se hibridan con el extremo 3' del ARN pequeño maduro y una región 5' que se hibrida con el extremo 5' del adaptador de ligadura 3'. En ciertas realizaciones, la férula de ligadura 3' comprende dos regiones distintas: una región terminal 3' que contiene de aproximadamente 3 nucleótidos a aproximadamente 6 nucleótidos que se hibridan con el extremo 3' del ADNc del ARN pequeño maduro y una región 5' que se hibrida con el extremo 5' del adaptador de ligadura 3'. En ciertas realizaciones, la férula de ligadura 3' comprende dos regiones distintas: una región terminal 3' que contiene bases de nucleótidos degeneradas que varían de aproximadamente 3 nucleótidos a aproximadamente 6 nucleótidos que se hibridan con el extremo 3' del ADNc del ARN pequeño maduro y una región 5' que se hibrida con el extremo 5' del adaptador de ligadura 3'.

En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 5' y el adaptador de ligadura 3' contienen una estructura de horquilla (en el presente documento denominados "adaptadores de ligadura de horquilla 5' o 3'") (véase la Figura 4), en donde el adaptador de ligadura de horquilla 5' comprende un segmento saliente monocatenario 5', un tallo y un bucle, en donde el extremo 3' de la parte de tallo está ligado al extremo 5' del ARN pequeño maduro y el segmento saliente monocatenario 5' comprende de 3 a 6 bases degeneradas que se hibridan con la parte terminal 5' del ARN pequeño maduro y que sirve como una férula de ligadura. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura de horquilla 3' comprende un segmento saliente monocatenario 3', un tallo y un bucle, en donde el extremo 5' de la parte de tallo está ligado al extremo 3' del ADNc del ARN pequeño maduro y el segmento saliente monocatenario 3' comprende de 3 a 6 bases degeneradas que se hibridan con la región terminal 3' del ARN pequeño maduro y que sirve como una férula de ligadura. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura de horquilla 3' comprende un segmento saliente monocatenario 3', un tallo y un bucle, en donde el extremo 5' de la parte de tallo está ligado al extremo 3' del ADNc de un ARN pequeño maduro y el segmento saliente monocatenario 3' comprende de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 nucleótidos que se hibridan con la región terminal 3' del ADNc y que sirve como una férula de ligadura. En ciertas realizaciones, el saliente monocatenario 3' de este adaptador de ligadura de horquilla 3' comprende de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 bases degeneradas que se hibridan con la región terminal 3' del ADNc y que sirve como una férula de ligadura.

En ciertas realizaciones, los adaptadores de ligadura de horquilla tanto 5' como 3' son oligonucleótidos híbridos de ADN-ARN. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura de horquilla 3' es un oligonucleótido de ADN. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador directo universal está ubicado en la parte de tallo del adaptador de ligadura de horquilla 5'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador directo universal está ubicado en la parte de bucle del adaptador de ligadura de horquilla 5'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador directo universal está ubicado en las partes de tallo y bucle del adaptador de ligadura de horquilla 5'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador de RT/inverso universal está ubicado en la parte de tallo del adaptador de ligadura de horquilla 3'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador de RT/inverso universal está ubicado en la parte de bucle del adaptador de ligadura de horquilla 3'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador de RT/inverso universal está ubicado en las partes de tallo y bucle del adaptador de ligadura de horquilla 3'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador directo universal está ubicado en la parte de tallo del adaptador de

ligadura de horquilla 3'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador directo universal está ubicado en la parte de bucle del adaptador de ligadura de horquilla 3'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador directo universal está ubicado en las partes de tallo y bucle del adaptador de ligadura de horquilla 3'.

5 En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 5' es un oligonucleótido lineal y el adaptador de ligadura 3' es un adaptador de ligadura de horquilla (véase la Figura 5). En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 5' es un adaptador de ligadura de horquilla y el adaptador de ligadura 3' es un oligonucleótido lineal. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 3' es un oligonucleótido lineal y se usa para la ligadura al ADNc (véase la Figura 2). En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 3' es un adaptador de ligadura de horquilla y se usa para la ligadura al ADNc.

10 Las presentes enseñanzas proporcionan un kit para detectar una molécula de ARN pequeña madura, comprendiendo el kit: un adaptador de ligadura 5' universal para ligar al extremo 5' del ARN pequeño maduro, un adaptador de ligadura 3' universal para ligar al extremo 3' del ARN pequeño maduro, una férula de ligadura semidegenerada 5' que abarca la unión de ligadura 5', una férula de ligadura semidegenerada 3' que abarca la unión de ligadura 3' e instrucciones para usar el kit. El kit puede comprender además una o más de una ligasa, una transcriptasa inversa y una ADN polimerasa. El kit puede comprender además un cebador de RT/inverso universal y un cebador directo universal. Los adaptadores de ligadura 5' y 3' pueden ser lineales. Los adaptadores de ligadura 5' y 3' pueden ser adaptadores de ligadura de horquilla. El kit puede comprender además un oligonucleótido de bloqueo.

20 Las presentes enseñanzas proporcionan un kit que comprende un cebador de transcripción inversa (RT) universal, un adaptador de ligadura 3' y una férula de ligadura 3', donde el cebador de transcripción inversa comprende una parte de poli(T) y una parte de cola comprende una parte de cebador universal. El kit puede comprender además una o más de una ligasa, una transcriptasa inversa y una ADN polimerasa. El kit puede comprender además un cebador inverso universal y un cebador directo universal. El adaptador de ligadura 3' puede ser lineal. El adaptador de ligadura de 3' puede ser un adaptador de ligadura de horquilla. El kit puede comprender además un oligonucleótido de bloqueo.

25 En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones, tales como composiciones de reacción, que comprenden un ADNc de una molécula de ARN pequeño que comprende aproximadamente 20-30 nucleótidos que han sido procesados a partir de un precursor de ARN más grande que comprende un adaptador de ligadura 5' universal, un adaptador de ligadura 3', una férula de ligadura 3', en donde la férula de ligadura comprende una región terminal 3' que contiene de aproximadamente 3 nucleótidos a aproximadamente 6 nucleótidos que se hibridan con el extremo 3' del ADNc del ARN pequeño maduro y una región terminal 5' que se hibrida con el extremo 5' del adaptador de ligadura, una ligasa y un par de cebadores universales directo e inverso. En las composiciones de la invención, la férula de ligadura puede ser semidegenerada. En otra realización, el adaptador de ligadura 3' comprende la férula de ligadura y además comprende una estructura de horquilla en donde la parte de férula de ligadura es un segmento saliente monocatenario 3' que comprende aproximadamente 3 a aproximadamente 6 bases de nucleótidos que se hibridan con la región 3' de un ADNc del ARN pequeño maduro.

35 Se proporcionan composiciones que comprenden un oligonucleótido de bloqueo para bloquear la formación y/o amplificación del subproducto del adaptador de ligadura autoligado o subproducto de cebador-adaptador ligados (véase la Figura 15). En ciertos ejemplos, el oligonucleótido de bloqueo es ADN. En ciertos ejemplos, el oligonucleótido de bloqueo es ARN. En ciertos ejemplos, el oligonucleótido de bloqueo comprende una parte de poli(A). En ciertas realizaciones, el oligonucleótido de bloqueo comprende un agente de bloqueo, que incluye, pero no se limita a, 2'-O-metilo, acridina, un ligando del surco menor (MGB, por sus siglas en inglés *minor groove binder*) y un compuesto colorante intercalante. En ciertos ejemplos, el agente de bloqueo se encuentra en el extremo 3' del oligonucleótido de bloqueo. En ciertos ejemplos, el agente de bloqueo se encuentra en el extremo 5' del oligonucleótido de bloqueo.

45 Los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades, por ejemplo, cáncer, que incluyen pero no se limitan a cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de piel, cánceres del tracto reproductivo, cáncer de cerebro, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cánceres de la sangre (p. ej., leucemia y linfoma), sarcomas, melanomas y similares; enfermedades cardiovasculares; enfermedades y trastornos autoinmunitarios; y enfermedades y trastornos metabólicos. Otra descripción proporciona el uso de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento en el diagnóstico o determinación de la sensibilidad a fármacos y al tratamiento médico.

50 Otras realizaciones y aspectos ilustrativos, características y ventajas de la presente descripción serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas, se dan solo a modo de ilustración, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la presente descripción serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

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.

La Figura 1 representa esquemáticamente el flujo de trabajo para un ensayo de ARN pequeño de ligadura de doble extremo de acuerdo con una de las realizaciones de las presentes enseñanzas.

5 La Figura 2 representa esquemáticamente el flujo de trabajo para un ensayo de extensión de ARN pequeño por dos extremos de acuerdo con una de las realizaciones de las presentes enseñanzas.

La Figura 3 representa esquemáticamente adaptadores de ligadura lineales de acuerdo con una de las realizaciones de las presentes enseñanzas.

La figura 4 representa esquemáticamente adaptadores de ligadura de horquilla de acuerdo con una de las realizaciones de las presentes enseñanzas.

10 La figura 5 representa esquemáticamente una combinación de un adaptador de ligadura lineal y un adaptador de ligadura de horquilla de acuerdo con una de las realizaciones de las presentes enseñanzas.

La Figura 6 representa esquemáticamente la cola de poli(A) con un cebador oligo-dT de acuerdo con una de las realizaciones de las presentes enseñanzas.

15 La Figura 7 representa gráficamente la señal de fondo observada cuando la muestra se sustituyó con agua exenta de nucleasas en la reacción de ligadura en métodos de acuerdo con las realizaciones de las presentes enseñanzas.

La figura 8 representa gráficamente la sensibilidad y el intervalo dinámico lineal de los métodos de acuerdo con las realizaciones de las presentes enseñanzas.

La Figura 9 muestra un gráfico de amplificación del nivel de expresión de hsa-let7a en ARN total y una respuesta de valoración de muestra de acuerdo con realizaciones de las presentes enseñanzas.

20 La Figura 10 representa gráficamente la sensibilidad de los presentes métodos en relación con otros métodos.

La Figura 11 representa gráficamente el intervalo dinámico lineal y la sensibilidad de un método combinado de ligadura/RT de 2 etapas de acuerdo con realizaciones de las presentes enseñanzas.

La Figura 12 representa gráficamente el intervalo dinámico lineal y la sensibilidad de un método combinado de RT/preamplificación de 2 etapas de acuerdo con realizaciones de las presentes enseñanzas.

25 La Figura 13 representa gráficamente una comparación del método combinado 3 en 1 (es decir, ligadura, extensión (RT) y preamp/amplificación combinados; cuadrados) y un control de dos etapas (rombos) de acuerdo con realizaciones de las presentes enseñanzas.

La Figura 14 representa gráficamente la sensibilidad del método combinado 3 en 1 de acuerdo con realizaciones de las presentes enseñanzas que muestran Ct frente a ensayo.

30 La Figura 15 representa esquemáticamente cuatro estrategias para bloquear el subproducto de fondo de ligadura de adaptador-adaptador o adaptador-cebador utilizando: A) un oligonucleótido de bloqueo que tiene una molécula MGB unida a su extremo 3', b) un oligonucleótido de bloqueo URP de restricción de amplificación dirigida a la secuencia (STAR), C) un oligonucleótido de bloqueo que tiene un grupo 2'-O-metilo unido a su extremo 5' (en esta realización, el oligonucleótido de bloqueo es ARN), o D) un oligonucleótido de bloqueo con una estructura de horquilla y un poli(A) que contiene una parte saliente monocatenaria en su extremo 3'.

35 La Figura 16 representa gráficamente un gráfico de amplificación que muestra el subproducto de adaptador-adaptador de fondo después de la amplificación usando PCR cuantitativa (qPCR, curva más a la izquierda) o secuenciación de nueva generación (NGS, curva más a la derecha).

40 La Figura 17 representa gráficamente la cuantificación por qPCR del efecto de los oligonucleótidos de bloqueo en el subproducto de adaptador-adaptador de fondo y la amplificación del miARN objetivo.

La Figura 18 representa gráficamente el aumento de sensibilidad de la detección por qPCR del miARN diana utilizando varios oligonucleótidos de bloqueo: oligonucleótido de bloqueo 3'-MGB (línea de rombos), oligonucleótido de bloqueo de 2'-O-metil-ARN (línea de cuadrados), oligonucleótido de bloqueo URP STAR (línea de triángulos) y oligonucleótido de bloqueo URP STAR + MGB (línea de x).

45 La Figura 19 representa gráficamente la reducción porcentual en el subproducto de adaptador-adaptador de fondo (gráfico izquierdo) y el número de veces de aumento de la sensibilidad (gráfico derecho) usando oligonucleótidos de bloqueo en la amplificación por qPCR.

50 La Figura 20 representa gráficamente la reducción del subproducto de adaptador-adaptador de fondo y el aumento de la sensibilidad de detección de miARN en la secuenciación de nueva generación (NGS) usando varios oligonucleótidos de bloqueo: oligonucleótido de bloqueo 3'-MGB 2 μ M (línea de rombos), oligonucleótido de bloqueo

3'-MGB 4 μ M (línea de cuadrados) y oligonucleótido de bloqueo 2'-O-metil-ARN 4 μ M (línea de triángulos).

La Figura 21 representa gráficamente la reducción porcentual en el subproducto adaptador-adaptador de fondo usando oligonucleótidos de bloqueo en el análisis de NGS de miARN.

5 La Figura 22 representa gráficamente el número de veces de aumento de la sensibilidad usando oligonucleótidos de bloqueo en el análisis de NGS de miARN.

La Figura 23 representa gráficamente el intervalo dinámico lineal y la sensibilidad de un método combinado de 2 etapas de poliadenilación/RT seguido de una reacción de ligadura de ADNc, con (línea de cuadrados) o sin (línea de rombos) una etapa de preamplificación de acuerdo con realizaciones de las presentes enseñanzas.

10 La Figura 24 representa gráficamente el aumento de la sensibilidad de la detección por qPCR de miARN diana con un oligonucleótido bloqueador (línea de cuadrados) en la reacción de ligadura en comparación con la reacción de ligadura sin el oligonucleótido bloqueador (línea de rombos).

Descripción de realizaciones de ejemplo

15 Se proporcionan en el presente documento métodos, composiciones y kits para la captura y detección de ARN pequeños maduros. En ciertas realizaciones, las presentes enseñanzas proporcionan un método para capturar, detectar y cuantificar un ARN pequeño maduro, tal como un microARN (miARN), de una muestra que usa adaptadores de ligadura universales en los extremos tanto 5' como 3' del ARN pequeño maduro utilizando el grupo fosfato 5' terminal y el grupo hidroxilo 3' terminal de un ARN pequeño maduro (véase la Figura 1). La ligadura de doble extremo de un adaptador de ligadura a cada uno de los extremos 5' y 3' de un ARN pequeño maduro es catalizada por una ligasa dependiente de molde en presencia de férulas de ligadura semidegeneradas 5' y 3'. El producto de ligadura resultante comprende el ARN pequeño maduro, un adaptador de ligadura universal 5' y un adaptador de ligadura universal 3' y se puede extender y amplificar para detectar y cuantificar directamente el ARN pequeño maduro. Después de la ligadura, todos los ARN pequeños maduros presentes en la muestra que se modificaron por la ligadura comprenderán una secuencia universal en los extremos tanto 5' como 3' de las regiones recién ligadas que permiten la transcripción inversa universal (RT) y la preamplificación (preamp) y/o amplificación universal. En ciertas realizaciones, la muestra puede ser una preparación de ARN total, un extracto celular, una célula intacta, una reacción de transcripción in vitro o una síntesis química. La digestión posterior a la ligadura de los adaptadores de ligadura y las férulas de ligadura es opcional pero no es obligatoria. En ciertas realizaciones, las etapas de ligadura, transcripción inversa y preamplificación y/o amplificación se pueden llevar a cabo juntas en un único recipiente de reacción (un método de 1 etapa o 3 en 1). En ciertas realizaciones, las etapas de ligadura y extensión se llevan a cabo juntas en el único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (ligadura/RT en 1 etapa)). En ciertas realizaciones, las etapas de transcripción inversa y preamplificación y/o amplificación se llevan a cabo juntas en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (RT/preamp en 1 etapa)).

35 En ciertas realizaciones, las presentes enseñanzas proporcionan un método para capturar, detectar y cuantificar un ARN pequeño maduro, tal como un microARN (miARN), de una muestra mediante poliadenilación y transcripción inversa del ARN con un cebador de transcripción inversa universal para generar un ADNc con una parte de cebador universal en su extremo 5', y ligadura de un adaptador de ligadura universal en el extremo 3' del ADNc utilizando el grupo fosfato terminal 5' en el adaptador y el grupo hidroxilo terminal 3' del ADNc (véase la Figura 2). La ligadura de un adaptador de ligadura al extremo 3' del ADNc es catalizada por una ligasa dependiente de molde en presencia de una férula de ligadura que abarca la unión de la ligadura. El producto de ligadura resultante comprende el ADNc del ARN pequeño maduro y un adaptador universal de ligadura 3', y comprende una secuencia universal en los extremos tanto 5' como 3' del producto de ligadura de ADNc que permite la preamplificación (preamp) y/o amplificación universal usando un solo par de cebadores universales directo e inverso. En ciertas realizaciones, la férula de ligadura es una férula de ligadura semidegenerada. En ciertas realizaciones, la muestra puede ser una preparación de ARN total, un extracto celular, una célula intacta, una reacción de transcripción in vitro o una síntesis química. La digestión posterior a la ligadura del adaptador de ligadura y la férula de ligadura es opcional pero no obligatoria. En ciertas realizaciones, las etapas de poliadenilación y transcripción inversa se pueden llevar a cabo juntas en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (poliadenilación/RT en 1 etapa)). En ciertas realizaciones, las etapas de ligadura y preamplificación y/o amplificación se llevan a cabo juntas en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (ligadura/preamp en 1 etapa)).

50 En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en las etapas de ligadura y/o preamplificación. La detección de los polinucleótidos diana se puede llevar a cabo utilizando métodos de amplificación tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como la PCR cuantitativa en tiempo real, PCR cuantitativa de punto final y PCR convencional. Los métodos de 1 y 2 etapas que utilizan RT universal y preamp/amplificación que se proporcionan en el presente documento, ofrecen un flujo de trabajo simplificado que es muy deseable y mejora la detección, la sensibilidad y la reproducibilidad.

Mediante el uso de adaptadores de ligadura universales 5' y 3', se usa un solo cebador como cebador universal de transcripción inversa (p. ej., un cebador inverso universal) y es compartido por todas las moléculas de ARN pequeño

5 maduras en la muestra, que se han modificado con adaptadores de ligadura. De manera similar, el par de cebadores universales se puede usar para la preamplificación y/o amplificación (p. ej., cebadores universal directo y universal RT/inverso) para las moléculas de ARN pequeño maduras en la muestra, que se han modificado con adaptadores de ligadura. Al poliadenilar moléculas de ARN pequeño maduras, se usa un único cebador que comprende una parte de poli(T) como cebador universal de transcripción inversa y es compartido por todo el ADNc de los polinucleótidos diana de la muestra. De manera similar, se puede usar un par de cebadores universales para la preamplificación y/o amplificación (p. ej., cebadores universal directo y universal inverso) para las moléculas de ADNc del ARN pequeño que se han modificado con un adaptador de ligadura.

10 El uso de cebadores universales da una o más de las siguientes ventajas: 1) permite una reacción uniplex; 2) reduce los sesgos específicos de la diana; 3) elimina las mezclas fijas o personalizadas; 4) elimina la restricción del número de dianas; 5) elimina la necesidad de diseñar actualizaciones basadas en especies de ARN pequeño maduro recién descubiertas; 6) elimina la necesidad de desarrollo y validación de mezclas; y 7) simplifica la fabricación puesto que solo se requiere uno o dos adaptadores de ligadura y un conjunto de cebadores universales. Además, este sistema permite una mayor flexibilidad para el diseño del cebador específico del gen y el diseño de la sonda, puesto que el ARN pequeño maduro se puede detectar directamente mediante métodos de ensayo tales como la PCR. Además, los métodos de poliadenilación/RT universal combinadas (un método de 2 etapas), ligadura/preamp universal combinadas (un método de 2 pasos), ligadura/RT universal combinadas (un método de 2 etapas), RT universal/preamp universal combinadas (un método de 2 etapas) o ligadura/RT universal/preamp universal combinadas (un método de 1 etapa o 3-en-1), proporcionados en el presente documento proporcionan las siguientes ventajas: 1) elimina la digestión posterior a la ligadura del adaptadores de ligadura y férulas de ligadura; 2) simplifica el flujo de trabajo; 3) disminuye el tiempo para los resultados; 4) reduce el tiempo práctico; y 5) reduce la variación entre ensayos.

25 En ciertas realizaciones, las presentes enseñanzas proporcionan un método para detectar un polinucleótido diana en una muestra, el método incluye: ligar un adaptador de ligadura 5' universal al extremo 5' del polinucleótido diana en presencia de una férula de ligadura semidegenerada 5' que abarca la unión de ligadura de 5', y ligar un adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del polinucleótido diana en presencia de una férula de ligadura semidegenerada 3' que abarca la unión de ligadura 3', de modo que se forma un producto de ligadura; extender o realizar la transcripción inversa del producto de ligadura para formar un producto de extensión usando un cebador de RT/inverso universal; amplificar el producto de extensión usando un par de cebadores universales directo y RT/inverso para formar un producto de amplificación; y detectar el polinucleótido diana. En ciertas realizaciones, el polinucleótido diana es un ARN pequeño maduro. En ciertas realizaciones, el polinucleótido diana es un miARN. En ciertas realizaciones, la muestra puede ser una preparación aislada de ARN total, un extracto celular, una célula intacta, una reacción de transcripción in vitro o una síntesis química. En ciertas realizaciones, las etapas de ligadura, transcripción inversa y preamplificación y/o amplificación se llevan a cabo juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 1 etapa o 3 en 1). En ciertas realizaciones, las etapas de ligadura y transcripción inversa se llevan a cabo juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (ligadura/RT en 1 etapa)). En ciertas realizaciones, las etapas de transcripción inversa y preamplificación y/o amplificación se llevan a cabo juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (RT/preamp en 1 etapa)). En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en la etapa de ligadura. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en la etapa de transcripción inversa. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en la etapa de amplificación. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en el método de 1 etapa. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en el método de 2 etapas. En ciertas realizaciones, la ligadura del adaptador de ligadura universal 5' al extremo 5' del polinucleótido diana se lleva a cabo esencialmente simultáneamente con la ligadura del adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del polinucleótido diana. En ciertas realizaciones, la ligadura del adaptador de ligadura universal 5' al extremo 5' del polinucleótido diana se lleva a cabo antes de ligar el adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del polinucleótido diana. En ciertas realizaciones, la ligadura del adaptador de ligadura universal 5' al extremo 5' del polinucleótido diana se lleva a cabo después de ligar el adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del polinucleótido diana. La detección de los polinucleótidos diana se puede llevar a cabo utilizando métodos de amplificación tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como la PCR cuantitativa en tiempo real, PCR cuantitativa de punto final y PCR convencional.

55 En ciertas realizaciones, las presentes enseñanzas proporcionan un método para detectar un ARN pequeño maduro de una muestra, el método incluye: ligar un adaptador de ligadura 5' universal al extremo 5' del ARN pequeño maduro en presencia de una férula de ligadura semidegenerada 5' que abarca la unión de ligadura de 5', y ligar un adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del ARN pequeño maduro en presencia de una férula de ligadura semidegenerada 3' que abarca la unión de ligadura 3', de modo que se forma un producto de ligadura; extender o realizar la transcripción inversa del producto de ligadura para formar un producto de extensión usando un cebador de RT/inverso universal; amplificar el producto de extensión usando un par de cebadores universales directo y RT/inverso para formar un producto de amplificación; y detectar el ARN pequeño maduro. En ciertas realizaciones, el ARN pequeño maduro es un miARN. En ciertas realizaciones, la muestra puede ser una preparación aislada de ARN total, un extracto celular, una célula intacta, una reacción de transcripción in vitro o una síntesis química. En ciertas

realizaciones, las etapas de ligadura, transcripción inversa y preamplificación y/o amplificación se llevan a cabo juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 1 etapa o 3 en 1). En ciertas realizaciones, las etapas de ligadura y transcripción inversa se llevan a cabo juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (ligadura/RT en 1 etapa)). En ciertas realizaciones, las etapas de transcripción inversa y preamplificación y/o amplificación se llevan a cabo juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (RT/preamp en 1 etapa)). En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en la etapa de ligadura. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en la etapa de transcripción inversa. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en la etapa de amplificación. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en el método de 1 etapa. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en el método de 2 etapas. En ciertas realizaciones, la ligadura del adaptador de ligadura universal 5' al extremo 5' del ARN pequeño maduro se lleva a cabo esencialmente simultáneamente con la ligadura del adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del ARN pequeño maduro. En ciertas realizaciones, la ligadura del adaptador de ligadura universal 5' al extremo 5' del ARN pequeño maduro se lleva a cabo antes de ligar el adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del ARN pequeño maduro. En ciertas realizaciones, la ligadura del adaptador de ligadura universal 5' al extremo 5' del ARN pequeño maduro se lleva a cabo después de ligar el adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del ARN pequeño maduro. La detección de los polinucleótidos diana se puede llevar a cabo utilizando métodos de amplificación tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como la PCR cuantitativa en tiempo real, PCR cuantitativa de punto final y PCR convencional.

En ciertas realizaciones, las presentes enseñanzas proporcionan un método para detectar un microARN (miARN) en una muestra, el método incluye: ligar un adaptador de ligadura 5' universal al extremo 5' del miARN en presencia de una férula de ligadura semidegenerada 5' que abarca la unión de ligadura de 5', y ligar un adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del miARN en presencia de una férula de ligadura semidegenerada 3' que abarca la unión de ligadura 3', de modo que se forma un producto de ligadura; extender o realizar la transcripción inversa del producto de ligadura para formar un producto de extensión usando un cebador de RT/inverso universal; amplificar el producto de extensión usando un par de cebadores universales directo y RT/inverso para formar un producto de amplificación; y detectar el miARN. En ciertas realizaciones, la muestra puede ser una preparación aislada de ARN total, un extracto celular, una célula intacta, una reacción de transcripción in vitro o una síntesis química. En ciertas realizaciones, las etapas de ligadura, transcripción inversa y preamplificación y/o amplificación se llevan a cabo juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 1 etapa o 3 en 1). En ciertas realizaciones, las etapas de ligadura y transcripción inversa se llevan a cabo juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (ligadura/RT en 1 etapa)). En ciertas realizaciones, las etapas de transcripción inversa y preamplificación y/o amplificación se llevan a cabo juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (RT/preamp en 1 etapa)). En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en la etapa de ligadura. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en la etapa de transcripción inversa. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en la etapa de amplificación. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en el método de 1 etapa. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en el método de 2 etapas. En ciertas realizaciones, la ligadura del adaptador de ligadura universal 5' al extremo 5' del miARN se lleva a cabo esencialmente simultáneamente con la ligadura del adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del miARN. En ciertas realizaciones, la ligadura del adaptador de ligadura universal 5' al extremo 5' del miARN se lleva a cabo antes de ligar el adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del miARN. En ciertas realizaciones, la ligadura del adaptador de ligadura universal 5' al extremo 5' del miARN se lleva a cabo después de ligar el adaptador de ligadura universal 3' al extremo 3' del miARN. La detección de los polinucleótidos diana se puede llevar a cabo utilizando métodos de amplificación tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como la PCR cuantitativa en tiempo real, PCR cuantitativa de punto final y PCR convencional.

En ciertas realizaciones, las presentes enseñanzas proporcionan un método para detectar un ARN pequeño maduro en una muestra, el método incluye: ligar un adaptador de ligadura universal 5' al extremo 5' del ARN pequeño maduro en presencia de una férula de ligadura semidegenerada 5' que abarca la unión de ligadura de 5', de modo que se forma un producto de ligadura; poliadenilar el extremo 3' del ARN pequeño maduro; extender el producto de ligadura para formar un producto de extensión usando un cebador universal de poli(T), en donde el cebador universal de poli(T) comprende una parte de poli(T) y una parte de cola, en donde la parte de cola comprende un sitio de unión del cebador de RT universal (véase la Figura 6); amplificar el producto de extensión para formar un producto de amplificación; y detectar el ARN pequeño maduro. En ciertas realizaciones, el ARN pequeño maduro es un miARN. En ciertas realizaciones, la muestra puede ser una preparación aislada de ARN total, un extracto celular, una célula intacta, una reacción de transcripción in vitro o una síntesis química. En ciertas realizaciones, la etapa de poliadenilación, la etapa de extensión y la etapa de amplificación se llevan a cabo juntas en el mismo recipiente de reacción (un método de 1 etapa). En ciertas realizaciones, la etapa de poliadenilación y la etapa de extensión se llevan a cabo juntas en el mismo recipiente de reacción (un método de 2 etapas). En ciertas realizaciones, la etapa de extensión y la etapa de amplificación se llevan a cabo juntas en el mismo recipiente de reacción (un método de 2 etapas (RT/preamp en 1 etapa)). La detección de los polinucleótidos diana se puede llevar a cabo utilizando métodos de amplificación tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como la PCR cuantitativa en

tiempo real, PCR cuantitativa de punto final y PCR convencional.

En ciertas realizaciones, las presentes enseñanzas proporcionan un método para detectar un ARN pequeño maduro en una muestra, el método incluye: poliadenilar el extremo 3' del ARN pequeño maduro; transcripción inversa del ARN poliadenilado para formar un ADNc usando un cebador universal de transcripción inversa (RT) (Figura 2), en donde el cebador de RT universal comprende una parte de poli(T) y una parte de cola, comprendiendo la parte de cola una parte de cebador universal; ligar un adaptador de ligadura universal al extremo 3' del ADNc en presencia de una férula de ligadura que abarca la unión de ligadura, de modo que se forma un producto de ligadura de ADNc; amplificar el producto de ligadura de ADNc usando un par de cebadores universales directo e inverso y/o detectar el ARN pequeño maduro por PCR. En ciertas realizaciones, el ARN pequeño maduro es un miARN. En ciertas realizaciones, la férula de ligadura es una férula de ligadura semidegenerada. En ciertas realizaciones, la muestra puede ser una preparación aislada de ARN total, un extracto celular, una célula intacta, una reacción de transcripción in vitro o una síntesis química. En ciertas realizaciones, las etapas de poliadenilación y transcripción inversa se llevan a cabo juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (poliadenilación/RT en 1 etapa)). En ciertas realizaciones, las etapas de ligadura y preamplificación se llevan a cabo juntas o esencialmente simultáneamente en un único recipiente de reacción (un método de 2 etapas (ligadura/preamp en 1 etapa)). En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en la etapa de ligadura y/o la etapa de preamplificación. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en el método de 1 etapa. En ciertas realizaciones, se puede usar un oligonucleótido de bloqueo en el método de 2 etapas. La detección de los polinucleótidos diana se puede llevar a cabo utilizando métodos de amplificación tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como la PCR cuantitativa en tiempo real, PCR cuantitativa de punto final y PCR convencional.

En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 5' y el adaptador de ligadura 3' son oligonucleótidos lineales (véase la Figura 3). En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 5' comprende una región complementaria de la férula de ligadura 5' en la región terminal 3' que es complementaria de la región 3' de la férula de ligadura 5', y un sitio de unión del cebador directo universal situado en la región terminal 5'. El sitio de unión del cebador directo universal en el adaptador de ligadura 5' es complementario o incluye la secuencia del cebador directo universal. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 3' comprende un grupo de bloqueo en el extremo 3', una región complementaria de la férula de ligadura 3' en la región terminal 5' que es complementaria de la parte 5' de la férula de ligadura 3', y un sitio de unión del cebador de RT/inverso universal situado en la región terminal 3'. El sitio de unión del cebador de RT/inverso universal es complementario del cebador inverso universal. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 3' es para ligar al extremo 3' del ADNc y comprende una región complementaria de la férula de ligadura 3' en la región terminal 5' que es complementaria de la parte 5' de la férula de ligadura 3', y un sitio de unión del cebador universal situado en la región terminal 3'. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 3' es para ligar al extremo 3' del ADNc y comprende un grupo de bloqueo en el extremo 3', una región complementaria de la férula de ligadura 3' en la región terminal 5' que es complementaria de la parte 5' de la férula de ligadura 3' y un sitio de unión del cebador directo universal situado en la región terminal 3'. El sitio de unión del cebador directo universal es complementario al cebador directo universal. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 5' es un oligonucleótido de ARN y el adaptador de ligadura 3' es un oligonucleótido de ADN.

En ciertas realizaciones, la férula de ligadura semidegenerada 5' comprende dos regiones distintas (véase la Figura 3): una región terminal 5' que contiene bases de nucleótidos degenerados que varían de aproximadamente 3 nucleótidos a aproximadamente 6 nucleótidos que se hibridan con el extremo 5' del ARN pequeño maduro y una región 3' que se hibrida con el extremo 3' del adaptador de ligadura 5'. En ciertas realizaciones, la férula de ligadura 3' comprende dos regiones distintas: una región terminal 3' que contiene bases de nucleótidos degenerados que varían de aproximadamente 3 nucleótidos a aproximadamente 6 nucleótidos que se hibridan con el extremo 3' del ARN pequeño maduro y una región 5' que se hibrida con el extremo 5' del adaptador de ligadura 3'. En ciertas realizaciones, la férula de ligadura 3' comprende dos regiones distintas: una región terminal 3' que contiene de aproximadamente 3 nucleótidos a aproximadamente 6 nucleótidos que se hibridan con el extremo 3' del ADNc del ARN pequeño maduro y una región 5' que se hibrida con el extremo 5' del adaptador de ligadura 3'. En ciertas realizaciones, la férula de ligadura 3' comprende dos regiones distintas: una región terminal 3' que contiene bases de nucleótidos degenerados que varían de aproximadamente 3 nucleótidos a aproximadamente 6 nucleótidos que se hibridan con el extremo 3' del ADNc del ARN pequeño maduro y una región 5' que se hibrida con el extremo 5' del adaptador de ligadura 3'.

En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 5' y el adaptador de ligadura 3' contienen una estructura de horquilla (en el presente documento denominados "adaptadores de ligadura de horquilla 5' o 3'") (véase la Figura 4), en donde el adaptador de ligadura de horquilla 5' comprende un segmento saliente monocatenario 5', un tallo y un bucle, en donde el extremo 3' de la parte de tallo está ligado al extremo 5' del ARN pequeño maduro y el segmento saliente monocatenario 5' comprende de 3 a 6 bases degeneradas que se hibridan con la región terminal 5' del ARN pequeño maduro y que sirve como una férula de ligadura. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura de horquilla 3' comprende un segmento saliente monocatenario 3', un tallo y un bucle, en donde el extremo 5' de la parte del tallo está ligado al extremo 3' del ARN pequeño maduro y el segmento saliente monocatenario 3' comprende de 3 a 6 bases degeneradas que se hibridan con la región terminal 3' del ARN pequeño maduro y que sirve como una férula de ligadura. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura de horquilla 3' comprende un

segmento saliente monocatenario 3', un tallo y un bucle, en donde el extremo 5' de la parte de tallo está ligado al extremo 3' del ADNc de un ARN pequeño maduro y el segmento saliente monocatenario 3' comprende de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 nucleótidos que se hibridan con la región terminal 3' del ADNc y que sirve como una férula de ligadura. En ciertas realizaciones, el saliente monocatenario 3' de este adaptador de ligadura de horquilla 3' comprende de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 bases degeneradas que se hibridan con la región terminal 3' del ADNc y que sirve como una férula de ligadura.

En ciertas realizaciones, las férulas de ligadura y los adaptadores de ligadura pueden comprender bases de nucleótidos naturales (p. ej., A, C, G, T, U) o bases de nucleótidos degenerados en regiones diseñadas para hibridar con los ARN pequeños maduros o sus ADNc. Las férulas de ligadura semidegeneradas y los adaptadores de ligadura pueden comprender bases de nucleótidos naturales y bases de nucleótidos degenerados en regiones diseñadas para hibridar con los ARN pequeños maduros o sus ADNc. En ciertas realizaciones, las férulas y adaptadores de ligadura comprenden una región terminal que contiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 13 bases de nucleótidos que se hibridan con el extremo 3' o 5' del ARN pequeño maduro o con el extremo 3' del ADNc del ARN pequeño maduro. En ciertas realizaciones, dichas regiones terminales de las férulas y adaptadores de ligadura comprenden de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 nucleótidos, de aproximadamente 3 a aproximadamente 8 nucleótidos, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 nucleótidos que se hibridan con el ARN pequeño maduro o su ADNc. En ciertas realizaciones, las férulas y adaptadores de ligadura comprenden una región terminal que contiene de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 bases de nucleótidos degenerados que se hibridan con el extremo 3' o 5' del ARN pequeño maduro o con el extremo 3' del ADNc del ARN pequeño y maduro. En ciertas realizaciones, las férulas y adaptadores de ligadura comprenden una región terminal que contiene aproximadamente 6 bases de nucleótidos degenerados. En ciertas realizaciones, las férulas y adaptadores de ligadura comprenden una región terminal que contiene aproximadamente 5 bases de nucleótidos degenerados. En ciertas realizaciones, las férulas y adaptadores de ligadura comprenden una región terminal que contiene aproximadamente 4 bases de nucleótidos degenerados. En ciertas realizaciones, las férulas y adaptadores de ligadura comprenden una región terminal que contiene aproximadamente 3 bases de nucleótidos degenerados. En ciertas realizaciones, las bases de nucleótidos degenerados de las férulas y adaptadores de ligadura se seleccionan del grupo que consiste en desoxiinosina, 5-nitroindol y 2-amino purina. En realizaciones particulares, las bases de nucleótidos degenerados de las férulas y adaptadores de ligadura son desoxiinosina.

En ciertas realizaciones, los adaptadores de ligadura de horquilla 5' y 3' son oligonucleótidos híbridos de ADN-ARN. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura de horquilla 3' es un oligonucleótido de ADN. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador universal está ubicado en la parte de tallo del adaptador de ligadura de horquilla 5'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador directo universal está ubicado en la parte de bucle del adaptador de ligadura de horquilla 5'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador directo universal está ubicado en las partes de tallo y bucle del adaptador de ligadura de horquilla 5'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador de RT/inverso universal está ubicado en la parte de tallo del adaptador de ligadura de horquilla 3'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador de RT/inverso universal está ubicado en la parte de bucle del adaptador de ligadura de horquilla 3'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador de RT/inverso universal está ubicado en las partes de tallo y bucle del adaptador de ligadura de horquilla 3'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador directo universal está ubicado en la parte de tallo del adaptador de ligadura de horquilla 3'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador directo universal está ubicado en la parte de bucle del adaptador de ligadura de horquilla 3'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador directo universal está ubicado en las partes de tallo y bucle del adaptador de ligadura de horquilla 3'.

En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 5' es un oligonucleótido lineal y el adaptador de ligadura 3' es un adaptador de ligadura de horquilla (véase la Figura 5). En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 5' es un adaptador de ligadura de horquilla y el adaptador de ligadura 3' es un oligonucleótido lineal. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 3' es un oligonucleótido lineal y se usa para la ligadura al ADNc (véase la Figura 2). En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 3' es un adaptador de ligadura de horquilla y se usa para la ligadura al ADNc.

En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden un oligonucleótido de bloqueo para bloquear el subproducto autoligado del adaptador de ligadura o la formación y/o amplificación del subproducto ligado con cebador-adaptador (ver Figura 15). En ciertas realizaciones, el oligonucleótido de bloqueo es ADN. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido de bloqueo es ARN. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido de bloqueo comprende una parte de poli(A). En ciertas realizaciones, el oligonucleótido de bloqueo comprende un agente de bloqueo, que incluye, pero no se limita a, 2'-O-metilo, acridina, un ligando del surco menor (MGB) y un compuesto colorante intercalante.

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 memoria descriptiva, la ejemplificación de términos específicos debe considerarse como ejemplos no limitantes.

Como se usa en esta memoria descriptiva, las palabras "un" o "una" significan al menos uno, a menos que se indique específicamente lo contrario. En esta memoria descriptiva, el uso del singular incluye el plural a menos que

se indique específicamente lo contrario. Por ejemplo, pero no como una limitación, "un ácido nucleico diana" significa que puede estar presente más de un ácido nucleico diana; por ejemplo, una o más copias de una especie de ácido nucleico diana particular, así como dos o más especies diferentes de ácido nucleico diana. El término "y/o" significa que los términos antes y después de la barra se pueden considerar juntos o por separado. Con fines ilustrativos, pero no como una limitación, "X y/o Y" puede significar "X" o "Y" o "X" e "Y".

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

A menos que se indique específicamente en la memoria descriptiva anterior, las realizaciones en la memoria descriptiva anterior que mencionan "que comprende" varios componentes también están contempladas como "que consiste en" o "que consiste esencialmente en" los componentes citados; las realizaciones en la memoria descriptiva que mencionan "que consiste en" varios componentes también están contempladas como "que comprende" o "que consiste esencialmente en" los componentes citados; y las realizaciones en la memoria descriptiva que mencionan "que consiste esencialmente en" varios componentes también están contempladas como "que consiste en" o "que comprende" los componentes citados (esta intercambiabilidad no se aplica al uso de estos términos en las reivindicaciones).

La expresión "o combinaciones de los mismos", como se usa en el presente documento, se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los términos citados que preceden al término. Por ejemplo, "A, B, C o combinaciones de los mismos" pretende incluir al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, ACB, CBA, BCA, BAC o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, tales como BB, AAA, AAB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, etc. El experto en la materia entenderá que, por lo general, no hay límite en el número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que el contexto lo demuestre de otra manera.

Los encabezados de sección utilizados en el presente documento son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes del tema deseado de ninguna manera. En el caso de que alguna bibliografía contradiga cualquier término definido en esta memoria descriptiva, esta memoria descriptiva controla. Si bien las presentes enseñanzas se describen junto con diversas realizaciones, no se pretende que las presentes enseñanzas se limiten a dichas realizaciones. Por el contrario, las presentes enseñanzas abarcan diversas alternativas, modificaciones y equivalentes, como apreciarán los expertos en la técnica.

El término "hibridación", que incluye, sin limitación, variaciones de las palabras raíz "hibridar", se usa indistintamente y significa la interacción de emparejamiento de bases de nucleótidos complementarias de un ácido nucleico con otro ácido nucleico que da como resultado la formación de un dúplex, triplex u otra estructura de orden superior. La interacción primaria es típicamente específica de bases de nucleótidos, p. ej., A:T, A:U y G:C, mediante enlaces de hidrógeno de tipo Watson-Crick y Hoogsteen. En ciertas realizaciones, el apilamiento de bases y las interacciones hidrófobas también pueden contribuir a la estabilidad del dúplex. Las condiciones en las cuales los cebadores y las sondas se reasocian con secuencias complementarias son bien conocidas en la técnica, p. ej., como se describe en *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, Hames and Higgins, eds., IRL Press, Washington, DC (1985) y *Wetmur y Davidson Mol. Biol.* 31: 349 (1968).

En general, el que esta reasociación tenga lugar depende, entre otras cosas, de la longitud de los polinucleótidos y la complementariedad, el pH, la temperatura, la presencia de cationes mono y divalentes, la proporción de nucleótidos G y C en la región de hibridación, la viscosidad del medio y la presencia de desnaturalizantes. Dichas variables influyen en el tiempo requerido para la hibridación. Por lo tanto, las condiciones de reasociación preferidas dependerán de la aplicación particular. Sin embargo, dichas condiciones las pueden determinar de forma rutinaria los expertos en la técnica, sin experimentación indebida. Se apreciará que la complementariedad no necesita ser perfecta; puede haber un pequeño número de apareamientos erróneos de pares de bases que interferirán mínimamente con la hibridación entre la secuencia diana y los ácidos nucleicos monocatenarios de las presentes enseñanzas. Sin embargo, si el número de apareamientos erróneos de pares de bases es tan grande que no puede producirse la hibridación en condiciones mínimamente restrictivas, entonces la secuencia generalmente no es una secuencia diana complementaria. Por lo tanto, "complementariedad" en el presente documento significa que las sondas o cebadores son suficientemente complementarios con la secuencia diana para hibridar en las condiciones de reacción seleccionadas para lograr los fines de las presentes enseñanzas. Preferiblemente, las condiciones de reasociación se seleccionan para permitir que los cebadores y/o las sondas se hibriden selectivamente con una secuencia complementaria en la secuencia flanqueante o amplicón diana correspondiente, pero no se hibriden en ningún grado significativo con diferentes ácidos nucleicos diana o secuencias no diana en la composición de reacción a la segunda temperatura de reacción.

El término "ligando del surco menor" o "MGB", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula

pequeña que encaja en el surco menor de ADN bicatenario, a veces de una manera específica de secuencia. En general, los ligandos del surco menor son moléculas largas y planas que pueden adoptar una forma de media luna y, por lo tanto, encajan perfectamente en el surco menor de una doble hélice, a menudo desplazando el agua. Las moléculas de unión al surco menor típicamente comprenden varios anillos aromáticos conectados por enlaces con libertad de torsión, por ejemplo, pero no limitado a anillos de furano, benceno o pirrol.

Como se usa en el presente documento, los términos "polinucleótido", "oligonucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente y se refieren a polímeros monocatenarios y bicatenarios de monómeros nucleótidos, que incluyen, pero no se limitan a 2'-desoxirribonucleótidos (ADN) y ribonucleótidos (ARN) unidos por conexiones de enlace fosfodiéster internucleótidos, o análogos de internucleótidos, y contraiones asociados, p. ej., H⁺, NH₄⁺, trietilamonio, Mg²⁺, Na⁺ y similares. Un polinucleótido puede estar compuesto enteramente de desoxirribonucleótidos, enteramente de ribonucleótidos, o mezclas químicas de los mismos y puede incluir análogos de nucleótidos. Las unidades de monómeros nucleótidos pueden comprender cualquiera de los nucleótidos descritos en el presente documento, incluyendo, pero no limitado a nucleótidos y/o análogos de nucleótidos. Los polinucleótidos varían típicamente en tamaño desde unas pocas unidades monoméricas, p. ej., 5-40 cuando se denominan a veces en la técnica oligonucleótidos, hasta varios miles de unidades de nucleótidos monoméricos. A menos que se indique lo contrario, siempre que se represente una secuencia de polinucleótidos, se entenderá que los nucleótidos están en el orden 5' a 3' de izquierda a derecha y que "A" indica desoxiadenosina, "C" indica desoxicitosina, "G" indica desoxiguanosina, "T" indica desoxitimidina y "U" indica desoxuridina, a menos que se indique lo contrario.

El término "nucleótido" se refiere a un éster fosfato de un nucleósido, p. ej., ésteres trifosfato, en donde el sitio más común de esterificación es el grupo hidroxilo unido en la posición C-5 de la pentosa.

El término "nucleósido" se refiere a un compuesto que consiste en una base de nucleósido de purina, desazapurina o pirimidina, p. ej., adenina, guanina, citosina, uracilo, timina, desazaadenina, desazaguanosina y similares, unida a una pentosa en la posición 1', incluyendo las formas 2'-desoxi y 2'-hidroxilo. Cuando la base de nucleósidos es purina o 7-desazapurina, la pentosa se une a la nucleobase en la posición 9 de la purina o desazapurina, y cuando la nucleobase es pirimidina, la pentosa se une a la nucleobase en la posición 1 de la pirimidina.

El término nucleótido o base de nucleósido "degenerado" se refiere a la capacidad de la base para emparejarse indiscriminadamente con más de una base, por ejemplo, con todas las pirimidinas, con todas las purinas o con cualquier nucleótido natural. Típicamente, una base degenerada tiene la capacidad de reemplazar cualquiera de las cuatro bases naturales sin desestabilizar significativamente la interacción entre pares de bases vecinas o alterar la capacidad funcional esperada del oligonucleótido modificado resultante. Los ejemplos de bases degeneradas incluyen, pero no se limitan a, desoxinosina, iso-desoxiguanosina, 5-nitroindol, 5-metil-isodesoxicitosina y 2-aminopurina.

El término "análogo" incluye análogos sintéticos que tienen restos de base modificados, restos de azúcar modificados y/o restos de éster fosfato modificados. Los análogos de fosfato en general comprenden análogos de fosfato en donde el átomo de fósforo está en el estado de oxidación +5 y uno o más de los átomos de oxígeno se sustituye por un resto sin oxígeno, p. ej., azufre. Los análogos de fosfato de ejemplo incluyen: fosfortioato, fosforditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosfoanilitioato, fosforanilidato, fosforamidato, boronofosfatos, incluyendo los contraiones asociados, p. ej., H⁺, NH₄⁺, Na⁺. Los análogos de base de ejemplo incluyen: 2,6-diaminopurina, hipoxantina, pseudouridina, C-5-propino, isocitosina, isoguanina, 2-tiopirimidina. Los análogos de azúcares de ejemplo incluyen: modificaciones 2' o 3' donde la posición 2' o 3' es hidrógeno, hidroxilo, alcoxi, p. ej., metoxi, etoxi, aliloxi, isopropoxi, butoxi, isobutoxi y fenoxi, azido, amino o alquilamino, fluoro, cloro y bromo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "polinucleótido diana" se refiere a una secuencia de polinucleótido que se quiere detectar. El polinucleótido diana se puede obtener de cualquier fuente y puede comprender cualquier número de componentes de composición diferentes. Por ejemplo, la diana puede ser un ácido nucleico (p. ej., ADN o ARN), ARN de transferencia (ARNt), ARN interferente pequeño (ARNip), microARN (miARN) u otro ARN pequeño maduro, y puede comprender análogos de ácido nucleico u otras moléculas miméticas de ácidos nucleicos. La diana puede estar metilada, no metilada o ambos. La diana pueden ser citosinas tratadas con bisulfito y no metiladas convertidas en uracilo. Además, se apreciará que "polinucleótido diana" se puede referir al propio polinucleótido diana, así como a sus sustitutos, por ejemplo, productos de amplificación y secuencias naturales. En ciertas realizaciones, el polinucleótido diana es una molécula de miARN. En ciertas realizaciones, el polinucleótido diana carece de una cola de poli-A. En ciertas realizaciones, el polinucleótido diana es una molécula de ARN pequeño maduro. Los polinucleótidos diana de las presentes enseñanzas pueden derivar de cualquiera de una variedad de fuentes, que incluyen, sin limitación virus, arqueas, protistas, procariotas y eucariotas, por ejemplo, pero sin limitarse a, plantas, hongos y animales. Estas fuentes pueden incluir, pero no están limitadas a sangre completa, una biopsia de tejido, linfa, médula ósea, líquido amniótico, cabello, piel, semen, agentes de guerra biológica, secreciones anales, secreciones vaginales, transpiración, saliva, hisopos bucales, diferentes muestras ambientales (por ejemplo, agrícola, agua y suelo), muestras de investigación en general, muestras purificadas en general, células cultivadas y células lisadas. Se apreciará que los polinucleótidos diana se pueden aislar de muestras usando cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, el Applied Biosystems ABI Prism® 6100 Nucleic Acid PrepStation (Life Technologies, Foster City, CA) y la Estación de trabajo

automatizada de ácidos nucleicos ABI Prism® 6700 (Life Technologies, Foster City, CA), kit de aislamiento de ARN Ambion® mirVana™ (Life Technologies, Austin, TX), y similares. Se apreciará que los polinucleótidos diana se pueden partir o cortar antes del análisis, incluyendo el uso de procedimientos tales como fuerza mecánica, ultrasonidos, escisión con endonucleasa de restricción o cualquier método conocido en la técnica. En general, los polinucleótidos diana de las presentes enseñanzas serán monocatenarios, aunque en algunas realizaciones el polinucleótido diana puede ser bicatenario, y puede resultar de la desnaturalización una cadena simple.

Como se usa en el presente documento, el término "ARN pequeño maduro" se refiere a una molécula de ARN pequeña que generalmente comprende aproximadamente 20-30 nucleótidos que ha sido procesada a partir de un precursor de ARN más grande. Típicamente, un ARN pequeño maduro tiene un grupo fosfato terminal 5' y un grupo hidroxilo terminal 3'. Se pueden detectar varios tipos diferentes de moléculas de ARN pequeño mediante los métodos proporcionados en el presente documento. Los ejemplos de ARN pequeños maduros que se pueden detectar incluyen, pero no se limitan a, microARN (miARN), ARN interferente corto (ARNip), ARN de horquilla corto (o pequeño) (ARNhp), ARNip asociado a repeticiones (ARNipar), ARNip de acción en trans (ARNipat), ARN que interacciona con Piwi (piARN) y ARN 21U. El ARN pequeño puede ser codificado en el genoma o se puede originar a partir de una molécula de ARN bicatenario exógeno. La longitud del ARN pequeño maduro que se puede detectar por los métodos descritos en el presente documento puede variar. En ciertas realizaciones, el ARN pequeño maduro puede variar de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, el ARN pequeño maduro puede variar de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, el ARN pequeño maduro puede tener aproximadamente 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32 nucleótidos de longitud.

La cantidad de ARN maduro pequeño en la muestra añadida a la reacción de ligadura o a la reacción de poliadenilación puede variar dependiendo de la fuente de la muestra que contiene ARN. En general, se puede usar cualquier cantidad de ARN maduro pequeño que se pueda ligar a un adaptador de ligadura en una etapa de ligadura y se puede usar cualquier cantidad de ARN maduro pequeño que se pueda poliadenilar en la etapa de poliadenilación. Típicamente, la cantidad de ARN maduro pequeño purificado usado por volumen de reacción será menor que la cantidad de ARN total usado por volumen de reacción. En ciertas realizaciones, la cantidad de ARN total varía de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 20 pg. En ciertas realizaciones, la cantidad de ARN total varía de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 2.5 ng.

Como se usa en el presente documento, los términos "adaptador" y "adaptador de ligadura" son equivalentes y se usan indistintamente y se refieren a un oligonucleótido que se une al extremo 5' del ARN pequeño maduro (es decir, un adaptador de ligadura 5') o al extremo 3' del ARN pequeño maduro o del ADNc del mismo (es decir, un adaptador de ligadura 3'). Los nucleótidos del adaptador de ligadura 5' y el adaptador de ligadura 3' pueden ser nucleótidos convencionales o naturales (es decir, adenosina, guanosina, citidina, timidina y uridina) así como no convencionales. Ejemplos no limitantes de nucleótidos no convencionales incluyen inosina, xantosina, isoguanosina, isocitidina, diaminopirimidina y desoxiuridina. Los adaptadores de ligadura pueden comprender nucleótidos modificados o derivatizados. Los ejemplos no limitantes de modificaciones en los restos ribosa o base incluyen la adición o eliminación de grupos acetilo, grupos amino, grupos carboxilo, grupos carboximetilo, grupos hidroxilo, grupos metilo, grupos fosforilo y grupos tiol. En particular, se incluyen 2'-O-metilo y nucleótidos de ácidos nucleicos bloqueados (LNA). Los ejemplos adecuados de nucleótidos derivatizados incluyen aquellos con colorantes unidos covalentemente, tales como colorantes fluorescentes o colorantes de atenuación, u otras moléculas tales como biotina, digoxigenina, o partículas magnéticas o microesferas. Los adaptadores de ligadura también pueden comprender análogos de nucleótidos sintéticos tales como morfolinós o ácidos nucleicos peptídicos (PNA). Los enlaces fosfodiéster o los enlaces fosfotioato pueden unir los nucleótidos o análogos de nucleótidos de los conectores.

En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 5' y el adaptador de ligadura 3' son oligonucleótidos lineales (véase la Figura 3). En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 5' comprende una región complementaria de férula de ligadura 5' en la región terminal 3' que es complementaria de la región 3' de la férula de ligadura 5', y un sitio de unión del cebador directo universal ubicado en la dirección 5' de la región complementaria de la férula de ligadura 5'. El sitio de unión del cebador directo universal en el adaptador de ligadura 5' es complementario al cebador directo universal. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 3' comprende un grupo de bloqueo en el extremo 3', una región complementaria de férula de ligadura 3' en la región terminal 5' que es complementaria de la parte 5' de la férula de ligadura 3' y un sitio de unión del cebador de RT/inverso universal situado en la dirección 3' de la región complementaria de la férula de ligadura 3'. El sitio de unión del cebador de RT/inverso universal es complementario del cebador de RT/inverso universal. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 5' es un oligonucleótido de ARN y el adaptador de ligadura 3' es un oligonucleótido de ADN.

En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 3' es para ligar al extremo 3' del ADNc y comprende una región complementaria de la férula de ligadura 3' en la región terminal 5' que es complementaria de la parte 5' de la férula de ligadura 3', y un sitio de unión del cebador directo universal situado en la región terminal 3'. El sitio de unión del cebador directo universal es complementario del cebador directo universal. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 3' comprende además un grupo de bloqueo en el extremo 3'. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 3' es un oligonucleótido de ADN.

La longitud de los adaptadores de ligadura 5' y 3' variará dependiendo, por ejemplo, de la longitud deseada del producto de ligadura y las características deseadas de los conectores. En general, el adaptador de ligadura 5' puede variar de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de aproximadamente 19 nucleótidos a aproximadamente 26 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 5' puede tener aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud. En general, el adaptador de ligadura 3' puede variar de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de aproximadamente 19 nucleótidos a aproximadamente 26 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 3' puede tener aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, la Tm de los adaptadores de ligadura varía de aproximadamente 30°C a aproximadamente 60°C, más preferiblemente de aproximadamente 33°C a aproximadamente 55°C.

En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura 5' y el adaptador de ligadura 3' contienen una estructura de horquilla (en el presente documento denominados "adaptadores de ligadura de horquilla 5' o 3'"), en donde el adaptador de ligadura de horquilla 5' comprende un segmento saliente monocatenario 5', un tallo y un bucle, en donde el extremo 3' de la parte de tallo está ligado al extremo 5' del ARN pequeño maduro y el segmento saliente monocatenario 5' comprende de 3 a 6 bases de nucleótidos degenerados que se hibridan con la región terminal 5' del ARN pequeño maduro y que sirve como una férula de ligadura (véase la Figura 4). En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura de horquilla 3' comprende un segmento saliente monocatenario 3', un tallo y un bucle, en donde el extremo 5' de la parte del tallo está ligado al extremo 3' del ARN pequeño maduro y el segmento saliente monocatenario 3' comprende de 3 a 6 bases de nucleótidos degenerados que se hibridan/se reasocian con la región terminal 3' del ARN pequeño maduro y que sirve como una férula de ligadura. En ciertas realizaciones, los adaptadores de ligadura de horquilla tanto 5' como 3' son oligonucleótidos híbridos de ADN-ARN. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura de horquilla 3' es un oligonucleótido de ADN. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador directo universal está ubicado en la parte de tallo del adaptador de ligadura de horquilla 5'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador directo universal está ubicado en la parte de bucle del adaptador de ligadura de horquilla 5'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador directo universal está ubicado en las partes de tallo y bucle del adaptador de ligadura de horquilla 5'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador de RT/inverso universal está ubicado en la parte de tallo del adaptador de ligadura de horquilla 3'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador de RT/inverso universal está ubicado en la parte de bucle del adaptador de ligadura de horquilla 3'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador de RT/inverso universal está ubicado en las partes de tallo y bucle del adaptador de ligadura de horquilla 3'.

En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura de horquilla 3' comprende un segmento saliente monocatenario 3', un tallo y un bucle, en donde el extremo 5' de la parte de tallo está ligado al extremo 3' del ADNc de un ARN pequeño maduro y el segmento saliente monocatenario 3' comprende de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 bases de nucleótidos que se hibridan con la región terminal 3' del ADNc y que sirve como una férula de ligadura. En ciertas realizaciones, el segmento saliente monocatenario 3' comprende de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 bases degeneradas. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura de horquilla 3' es un oligonucleótido híbrido de ADN-ARN. En ciertas realizaciones, el adaptador de ligadura de horquilla 3' es un oligonucleótido de ADN. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador universal está ubicado en la parte de tallo del adaptador de ligadura de horquilla 3'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador universal está ubicado en la parte de bucle del adaptador de ligadura de horquilla 3'. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del cebador universal está ubicado en las partes de tallo y bucle del adaptador de ligadura de horquilla 3'.

Como se usa en este documento, el término "tallo" se refiere a la región bicatenaria del adaptador de ligadura de horquilla que se encuentra entre el segmento saliente degenerado 3' (en el caso del adaptador de ligadura de horquilla 3') o el segmento saliente degenerado 5' (en el caso del adaptador de ligadura de horquilla 5') y el bucle. Generalmente, el tallo tiene entre aproximadamente 10 nucleótidos y aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, más preferiblemente el tallo tiene entre 12 y aproximadamente 15 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, el tallo tiene aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de longitud. Como cuestión general, en aquellas realizaciones en las que una parte del cebador universal es codificada en el tallo, el tallo puede ser más largo. En aquellas realizaciones en las que una parte del cebador universal no es codificada en el tallo, el tallo puede ser más corto. Los expertos en la materia apreciarán que los tallos más cortos que aproximadamente 10 nucleótidos y más largos que aproximadamente 20 nucleótidos se pueden identificar en el curso de la metodología de rutina y sin experimentación indebida, de modo que las enseñanzas presentes contemplan tallos más cortos y más largos.

Como se usa en el presente documento, el término "bucle" se refiere a la región monocatenaria del adaptador de ligadura de horquilla que se encuentra entre las dos cadenas complementarias del tallo y típicamente el bucle comprende nucleótidos monocatenarios, aunque también son posibles otros restos tales como ADN o ARN modificado, espaciadores de carbono tales como C18 y/o polietilenglicol (PEG). Generalmente, el bucle tiene entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, más preferiblemente el bucle tiene entre 17 nucleótidos y 19 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, el bucle tiene aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de longitud. Como cuestión general, en aquellas realizaciones en las que un cebador universal es codificado en el bucle, el bucle en general puede ser más largo. En aquellas realizaciones en las que un cebador universal no es codificado en el bucle, el bucle en general puede ser más corto. Los expertos en

la técnica apreciarán que los bucles más cortos de aproximadamente 10 nucleótidos y más largos de aproximadamente 20 nucleótidos se pueden identificar en el curso de la metodología de rutina sin experimentación indebida y que las presentes enseñanzas contemplan bucles más cortos y más largos.

5 Como se usa en el presente documento, el término "producto de ligadura" se refiere a una molécula híbrida que comprende al menos un adaptador de ligadura y un ARN pequeño maduro o una molécula híbrida que comprende al menos un adaptador de ligadura y un ADNc.

10 En ciertas realizaciones, la ligadura del ARN pequeño maduro se realiza en presencia de féculas de ligadura semidegeneradas 5' y 3' (véase la Figura 3). La fécula de ligadura 5' comprende dos regiones distintas: una región terminal 5' que contiene bases de nucleótidos degeneradas que varían de aproximadamente 3 nucleótidos a aproximadamente 6 nucleótidos que se hibridan con el extremo 5' del ARN pequeño maduro y una región 3' que se hibrida con el extremo 3' del adaptador de ligadura 5'. La fécula de ligadura 3' comprende dos regiones distintas: una región terminal 3' que contiene bases de nucleótidos degeneradas que varían de aproximadamente 3 nucleótidos a aproximadamente 6 nucleótidos que se hibridan con el extremo 3' del ARN pequeño maduro y una región 5' que se hibrida con el extremo 5' del adaptador de ligadura 3'. La parte no degenerada de la fécula de ligadura 5' puede ser un complemento exacto o puede ser un complemento casi exacto de la secuencia del adaptador de ligadura 5'. La parte no degenerada de la fécula de ligadura 3' puede ser un complemento exacto o puede ser un complemento casi exacto de la secuencia del adaptador de ligadura 3'. Dado que las féculas de ligadura hibridan con los adaptadores de ligadura y el ARN pequeño maduro, abarcan las uniones de ligadura de tal manera que para la fécula de ligadura 5', el extremo 3' del adaptador de ligadura 5' se lleva cerca del extremo 5' del ARN pequeño maduro y para la fécula de ligadura 3', el extremo 5' del conector de ligadura 3' se lleva cerca del extremo 3' del ARN pequeño maduro.

20 En ciertas realizaciones, la ligadura del ADNc de un ARN pequeño maduro se lleva a cabo en presencia de una fécula de ligadura 3' (véase la Figura 2). La fécula de ligadura 3' comprende dos regiones distintas: una región terminal 3' que contiene bases de nucleótidos, que varían por ejemplo de aproximadamente 3 nucleótidos a aproximadamente 6 nucleótidos, que se hibridan con el extremo 3' del ADNc y una región 5' que se hibrida con el extremo 5' del adaptador de ligadura 3'. En algunas realizaciones, la fécula de ligadura 3' es semidegenerada y la región terminal 3' contiene bases de nucleótidos degeneradas, que varían, por ejemplo, de aproximadamente 3 nucleótidos a aproximadamente 6 nucleótidos, que se hibridan con el extremo 3' del ADNc. Dado que la fécula de ligadura hibrida con el adaptador de ligadura y el ADNc, abarca la unión de la ligadura de modo que el extremo 5' del conector de ligadura 3' se lleva cerca del extremo 3' del ADNc.

30 En general, las féculas de ligadura pueden variar de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 19 nucleótidos de longitud, siendo de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 nucleótidos degenerados con el fin de interactuar con una variedad de moléculas de ARN pequeñas maduras o sus moléculas de ADNc y el resto de los nucleótidos son complementarios de la parte 3' del adaptador de ligadura 5' o de la parte 5' del adaptador de ligadura 3'. Un experto en la técnica apreciará que la fécula de ligadura puede ser más larga de 20 nucleótidos o más corta de aproximadamente 10 nucleótidos, siempre que hibride con el adaptador de ligadura 5' o 3'.

40 En ciertas realizaciones, la fécula de ligadura puede ser un oligonucleótido de ARN. En ciertas realizaciones, la fécula de ligadura puede ser un oligonucleótido de ADN/ARN quimérico. En ciertas realizaciones, la fécula de ligadura puede ser un oligonucleótido de ADN. En una realización preferida, la fécula de ligadura 5' es un oligonucleótido de ADN y la fécula de ligadura 3' es un oligonucleótido de ADN. En otra realización más, la fécula de ligadura es un oligonucleótido de ADN que comprende al menos un agente de bloqueo de manera que el molde de ligadura no puede servir como cebador para la amplificación por PCR o como sustrato para la ligadura no específica (o falsa). Los ejemplos no limitantes de grupos de bloqueo incluyen didesoxinucleótidos, grupos amina, grupos metilo, grupos fosfato o espaciadores de carbono. Los grupos de bloqueo preferidos incluyen 2'-O-metilo y fosfotioato. Las féculas de ligadura 5' y 3' pueden comprender nucleótidos o análogos de nucleótidos estándar, no estándar, modificados o derivatizados como se ha descrito antes en el presente documento. Los enlaces fosfodiéster o los enlaces fosfotioato pueden unir los nucleótidos de las féculas de ligadura.

50 Las secuencias del adaptador de ligadura universal facilitan la síntesis de ADNc en la transcripción inversa y/o la preamplificación del ADNc en la PCR usando cebadores universales. Para conducir la ligadura de los adaptadores de ligadura a miARN, se usa una cantidad en exceso de adaptadores de ligadura; por lo tanto, se puede producir la ligadura entre los dos conectores de ligadura como un subproducto de fondo no específico en los métodos descritos en este documento. En otras realizaciones, la ligadura entre cebadores de transcripción inversa universales libres (no reasociados) y adaptadores de ligadura 3' se puede producir como un subproducto durante la etapa de ligadura en los métodos proporcionados, dichos subproductos conducen a un fondo no específico durante la detección. Este fondo compromete la detección de transcripciones poco abundantes tanto en qPCR como en el análisis de secuenciación de nueva generación (NGS) y detección. Para reducir el fondo, se desarrollaron oligonucleótidos de bloqueo para suprimir selectivamente la amplificación y/o ligadura del subproducto adaptador-adaptador o subproducto adaptador-cebador. Los oligonucleótidos de ADN marcados en el extremo 5' o 3' con grupos de bloqueo, tales como acridina, MGB, 2'-O-metilo, bloqueadores restrictivos de la amplificación dirigida por secuencia (STAR) y oligonucleótidos de bloqueo que comprenden una secuencia de poli(A), se pueden usar en las etapas de ligadura, extensión y/o amplificación. Se encontró que la adición de dicho oligonucleótido de bloqueo reduce

drásticamente la amplificación de fondo y aumenta la sensibilidad de la detección de miARN por qPCR con los ensayos de qPCR de TaqMan® (véase el Ejemplo 4).

Un oligonucleótido bloqueador STAR comprende una secuencia de marcador STAR en el extremo 5' del oligonucleótido, siendo la secuencia del marcador STAR complementaria a toda o una parte de otra secuencia de cebador que se usa en la reacción de amplificación (véase la Figura 15). Cuando se extiende el cebador bloqueador STAR, el producto de extensión comprende tanto la secuencia de marcador STAR en el extremo 5' como el complemento de la secuencia de marcador STAR en la región 3' del producto de extensión. Por lo tanto, el producto de extensión del cebador STAR puede volver a plegarse para auto-reasociarse formando así una estructura de horquilla. La estructura de horquilla del cebador STAR extendido excluye la unión del otro cebador utilizado para amplificar la molécula objetivo, inhibiendo así la amplificación del objetivo no deseado (por ejemplo, un producto de ligadura adaptador-adaptador). En ciertas realizaciones, la secuencia del marcador STAR puede comprender una parte de la secuencia interna del amplicón para bloquear la reasociación de otro cebador o la extensión de una ADN polimerasa. Los cebadores STAR se pueden usar para la supresión de amplificación selectiva de adaptadores de ligadura ligados en la preamplificación del ARN maduro pequeño o ADNc ligado al adaptador en los métodos proporcionados. Los cebadores STAR se describen en la solicitud de patente provisional de EE.UU., Copropietaria, n° 61/740,242, presentada el 20 de diciembre de 2012.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido de bloqueo comprende una parte de poli(A) y está presente durante la reacción de ligadura. En los métodos en los que se realiza la transcripción inversa de un ARN pequeño maduro poliadenilado usando un cebador universal de transcripción inversa para generar un ADNc y un adaptador de ligadura se liga al extremo 3' del ADNc, la inclusión de un oligonucleótido de bloqueo durante la reacción de ligadura puede suprimir selectivamente la formación del subproducto de adaptador-cebador de RT universal. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido de bloqueo tiene una estructura de horquilla y un poli(A) que contiene una parte de segmento saliente monocatenario en su extremo 3' (véase la Figura 15 D). En otras realizaciones, el oligonucleótido de bloqueo es un oligonucleótido lineal y tiene una parte de poli(A) en su extremo 5' y secuencias complementarias al cebador de transcripción inversa universal en su extremo 3'. En ciertas realizaciones, la parte no poli(A) del oligonucleótido de bloqueo comprende desoxiuridina. La hibridación de dicho oligonucleótido de bloqueo con un cebador de RT universal libre (no reasociado, no extendido) evita que la férula de ligadura hibride con el cebador y facilita la ligadura del adaptador de ligadura, suprimiendo así la formación no deseada del subproducto de adaptador-cebador de RT universal. En ciertas realizaciones, la T_m del cebador de RT y bloqueadores que comprende una parte de poli(A) varía de aproximadamente 30°C a aproximadamente 60°C, de aproximadamente 35°C a aproximadamente 50°C, o de aproximadamente 38°C a aproximadamente 42°C.

Un "grupo de bloqueo" es un resto químico que se puede añadir a un nucleótido o un ácido nucleico para prevenir o minimizar la adición de nucleótidos por una ADN polimerasa. Al añadir un grupo de bloqueo al 3'-OH terminal, el nucleótido ya no puede participar en la formación de enlaces fosfodiéster catalizados por la ADN polimerasa. Algunos ejemplos no limitantes incluyen, un grupo alquilo, conectores no nucleótidos, fosforotioato, restos alcanodiol, PNA, LNA, análogos de nucleótidos que comprenden un grupo 3'-amino en lugar del grupo 3'-OH, análogos de nucleótidos que comprenden un grupo 5'-OH en lugar del grupo 5'-fosfato, derivados de nucleótidos que carecen de un grupo 3'-OH, biotina, intercaladores de ácido nucleico, acridina y ligandos del surco menor. Un grupo de bloqueo de alquilo es un hidrocarburo saturado que puede ser de cadena lineal, ramificada, cíclica o combinaciones de los mismos. Algunos ejemplos no limitantes de nucleótidos no extensibles incluyen nucleótidos que tienen un grupo 3'-hidroxilo que se ha modificado, tal como por sustitución con hidrógeno o flúor o por formación de un éster, amida, sulfato o glucósido. Estos nucleótidos en general no son extensibles en cadena. Otros ejemplos de nucleótidos no extensibles que se pueden usar incluyen nucleótidos que tienen restos de ribosa modificados. En ciertas realizaciones, los ribonucleótidos pueden servir como nucleótidos no extensibles porque los oligonucleótidos que terminan en ribonucleótidos no pueden ser extendidos por ciertas ADN polimerasas. La ribosa se puede modificar para incluir derivados 3'-desoxi que incluyen aquellos en los que el 3'-hidroxi se reemplaza por un grupo funcional distinto del hidrógeno, por ejemplo, como un grupo azida. En ciertas realizaciones, un nucleótido no extensible comprende un didesoxinucleótido (ddN), por ejemplo, pero no limitado a una didesoxiadenosina (ddA), una didesoxicitosina (ddC), una didesoxiguanosina (ddG), una didesoxitimidina (ddT) o una didesoxiuridina (ddU). En una realización preferida, el grupo de bloqueo se selecciona del grupo que consiste en un ligando del surco menor, un grupo 2'-O-metilo, una biotina, una acridina y un grupo fosfotioato.

La ligadura de los adaptadores de ligadura al ARN pequeño maduro o su ADNc es catalizada por una ligasa, por ejemplo, una ADN ligasa dependiente de molde. Las ligasas de ejemplo usadas en los métodos, kits y composiciones proporcionados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a ADN ligasa T4, ADN ligasa Tfi, ADN ligasa I, ADN ligasa II, ADN ligasa III, ADN ligasa IV y ADN ligasas de huella pequeña. En una realización preferida, se usa ADN ligasa T4.

Las condiciones de la reacción de ligadura se ajustan típicamente para que la ligasa funcione cerca de su nivel de actividad óptimo. Se puede utilizar un agente de tamponamiento para ajustar y mantener el pH al nivel deseado. Ejemplos representativos de tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a tampón de MOPS, HEPES, TAPS, Bicina, Tricina, TES, PIPES, MES, acetato de sodio y Tris.

La mezcla de ligadura puede comprender además un catión divalente. Los cationes divalentes adecuados incluyen,

pero no se limitan a calcio, magnesio y manganeso. La mezcla de reacción puede comprender además un agente reductor. Ejemplos no limitantes incluyen ditioneitol y β -mercaptoetanol. También se puede añadir un inhibidor de ribonucleasa (RNasa) a la mezcla de ligadura. La mezcla de ligadura puede comprender además ATP.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "reacción de extensión" se refiere a una reacción de alargamiento en la que el adaptador de ligadura 3' ligado al extremo 3' del ARN pequeño maduro se extiende para formar un "producto de reacción de extensión" que comprende una cadena complementaria del polinucleótido diana. Como se usa en el presente documento, la reacción de extensión también se denomina "transcripción inversa". En algunas realizaciones, la reacción de alargamiento comprende extender la parte poliadenilada del extremo 3' del ARN pequeño maduro. En algunas realizaciones, el polinucleótido diana es una molécula de miARN y la reacción de extensión es una reacción de transcripción inversa que comprende una transcriptasa inversa, mediante la cual se hace una copia de ADN del producto de ligadura. En ciertas realizaciones, la reacción de extensión es una reacción de transcripción inversa que comprende una polimerasa, tal como una transcriptasa inversa.

15 Las transcriptasas inversas incluyen cualquier enzima que tenga actividad de transcriptasa inversa. Dichas enzimas incluyen, entre otras, la transcriptasa inversa retroviral (p. ej., transcriptasas inversas del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV), virus de la mieloblastosis aviar (AMV) o virus del sarcoma de Rous (RSV)), Superscript I®, Superscript II®, Superscript III®, transcriptasa inversa de retrotransposón, transcriptasa inversa de hepatitis B, transcriptasa inversa del virus del mosaico de la coliflor, transcriptasa inversa bacteriana, ADN polimerasa Tth, ADN polimerasa Tq, ADN polimerasa Tne, ADN polimerasa Tma y mutantes, variantes o derivados de los mismos.

20 En una realización, las transcriptasas inversas incluyen aquellas que tienen actividad de RNasa H reducida, sustancialmente reducida o eliminada. Por enzima con "actividad de RNasa H sustancialmente reducida" se entiende que la enzima tiene menos de aproximadamente 20%, 15%, 10%, 5% o 2% de la actividad de la RNasa H de la correspondiente RNasa de tipo natural o H+, tales como las transcriptasas inversas del virus de la leucemia murina Moloney de tipo natural (M-MLV), virus de la mieloblastosis aviar (AMV) o el virus del sarcoma de Rous (RSV). La actividad de RNasa H de cualquier enzima se puede determinar por una variedad de ensayos, tales como los descritos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 5,244,797, en Kotewicz, M.L., et al., *Nucl. Acids Res.* 16:265 (1988) y en Gerard, G. F., et al., *FOCUS* 14:91 (1992). Los polipéptidos adecuados para usar en las composiciones y métodos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, transcriptasa inversa H de M-MLV, transcriptasa inversa H de RSV, transcriptasa inversa H de AMV, transcriptasa inversa H de RAV (virus asociado a Rous), transcriptasa inversa H de MAV (virus asociado a mieloblastosis), transcriptasa inversa H de HIV y Superscript III®, y mutantes, variantes o derivados de los mismos. Sin embargo, un experto en la técnica entenderá que cualquier enzima capaz de producir una molécula de ADN a partir de una molécula de ácido ribonucleico (es decir, que tiene actividad de transcriptasa inversa) se puede usar de manera equivalente en las composiciones, métodos y kits descritos en el presente documento.

35 Las enzimas que tienen actividad de transcriptasa inversa y/o polimerasa se pueden obtener en el mercado, por ejemplo en Life Technologies Corp. (Carlsbad, CA), Perkin-Elmer (Branchburg, NJ), New England BioLabs (Beverly, MA) o Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, IN). Alternativamente, las polimerasas o las transcriptasas inversas que tienen actividad de polimerasa se pueden aislar de sus fuentes virales o bacterianas naturales de acuerdo con procedimientos convencionales para aislar y purificar proteínas naturales que son bien conocidos por un experto en la técnica (véase, p. ej., Houts, G.E. et al., *J. Virol.* 29: 517 (1979)). Además, dichas polimerasas y/o transcriptasas inversas se pueden preparar mediante técnicas de ADN recombinante rutinarias bien conocidas por los expertos en la técnica (véase, p. ej., Kotewicz, ML, et al., *Nucl. Acids Res.* 16:265 (1988); Patente de EE.UU. N° 5,244,797; publicación de solicitud de patente PCT N° WO 98/47912; Soltis, D. A., y Skalka, A. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3372-3376 (1988)).

45 En algunas realizaciones, los dúplex de ácido nucleico recién formados no se desnaturalizan inicialmente, sino que se usan en su forma bicatenaria en una o más etapas posteriores. Una reacción de extensión es una técnica de amplificación que comprende alargar un producto de ligadura que se reasocia con un molde en la dirección de 5' a 3' usando un medio de amplificación tal como una polimerasa y/o transcriptasa inversa (y un cebador de RT/inverso universal). De acuerdo con algunas realizaciones, con tampones, sales, pH, temperatura y trifosfatos de nucleótidos adecuados, incluyendo análogos de los mismos, es decir, en condiciones adecuadas, una polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a la cadena molde que comienza en el extremo 3' de un producto de ligadura reasociado, para generar una cadena complementaria. En algunas realizaciones, la polimerasa utilizada para la extensión carece o carece sustancialmente de actividad de exonucleasa 5'. En algunas realizaciones de las presentes enseñanzas, se pueden introducir bases de nucleótidos no convencionales en los productos de reacción de amplificación y los productos tratados por enzimas (p. ej., glicosilasas) y/o medios fisicoquímicos con el fin de hacer que el producto sea incapaz de actuar como molde para amplificaciones posteriores. En algunas realizaciones, se puede incluir uracilo como una nucleobase en la mezcla de reacción, lo que permite reacciones posteriores para descontaminar el arrastre de productos previos que contienen uracilo mediante el uso de uracil-N-glicosilasa (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud PCT N° WO 92/01814A2). En algunas realizaciones de las presentes enseñanzas, se puede usar cualquiera de una variedad de técnicas antes de la amplificación con el fin de facilitar el éxito de la amplificación, como se describe, por ejemplo, en Radstrom et al., *Mol Biotechnol.* 26: 133-46 (2004). En algunas realizaciones, la amplificación se puede lograr en un enfoque integrado independiente que comprende la preparación y detección de muestras, como se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N°

6,153,425 y 6,649,378. Las enzimas modificadas de forma reversible, por ejemplo, pero sin limitarse a las descritas en la patente de EE.UU. N° 5,773,258, también están dentro del alcance de las enseñanzas descritas. Las presentes enseñanzas también contemplan diferentes estrategias de descontaminación basadas en uracilo, en donde, por ejemplo, el uracilo se puede incorporar en una reacción de amplificación, y los productos de arrastre subsiguientes se pueden eliminar con diversos tratamientos con glicosilasa (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5,536,649). Los expertos en la técnica entenderán que se puede usar cualquier proteína con la actividad enzimática deseada en los métodos y kits descritos.

En ciertas realizaciones, el polinucleótido diana es un miARN u otra molécula de ARN pequeño maduro y, como tal, se apreciará que el uso de polimerasas que también comprenden propiedades de transcripción inversa puede permitir que algunas realizaciones de las presentes enseñanzas comprendan una primera reacción de transcripción inversa seguida a continuación de una reacción de amplificación, permitiendo así la consolidación de dos reacciones en esencialmente una reacción única. En ciertas realizaciones, está contemplada además por las presentes enseñanzas la consolidación de la reacción de extensión y la posterior reacción de amplificación.

Como se usa en el presente documento, la expresión "parte de cebador universal" se refiere a una región de un adaptador de ligadura o un cebador de transcripción inversa (RT) universal que puede servir directamente, o en virtud de su complemento, como el molde sobre el cual un cebador universal puede hibridar para cualquiera de una variedad de reacciones de extensión de nucleótidos cebadores conocidas en la técnica (por ejemplo, PCR o RT-PCR). Los expertos en la técnica apreciarán que cuando dos partes de cebador están presentes en un único polinucleótido, la orientación de las dos partes de cebador en general es diferente. Por ejemplo, un cebador de PCR puede hibridar directamente con una primera parte de cebador, mientras que el otro cebador de PCR puede hibridar con el complemento de la segunda parte de cebador. Además, los cebadores "universales" y las partes de cebador como se usan en el presente documento generalmente se eligen para que sean lo más únicos posibles dados los ensayos particulares y los genomas del hospedante para asegurar la especificidad del ensayo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cebador universal" se refiere a un cebador que se puede usar en una pluralidad de reacciones diferentes que consultan diferentes polinucleótidos diana e hibrida con la parte de cebador universal del adaptador de ligadura o cebador de RT universal. En general, la región del cebador universal que se hibrida con el adaptador de ligadura o cebador de RT tiene entre aproximadamente 15 y aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, más preferiblemente entre aproximadamente 18 nucleótidos y aproximadamente 22 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, la región que se hibrida con el adaptador de ligadura o cebador de RT tiene aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de longitud. Los expertos en la técnica apreciarán que las longitudes de la parte del adaptador de ligadura o del cebador de RT del cebador universal pueden ser más cortas que aproximadamente 15 nucleótidos y más largas que aproximadamente 25 nucleótidos de longitud y se pueden identificar en el curso de la metodología rutinaria y sin experimentación excesiva y que dichas partes más largas o más cortas del adaptador de ligadura o cebador de RT del cebador universal están contempladas en las presentes enseñanzas. El cebador universal puede comprender nucleótidos estándar, no estándar, derivatizados y modificados como se describe en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cebador de transcripción inversa (RT) universal" se refiere a un cebador que se puede usar en una pluralidad de reacciones diferentes que consultan polinucleótidos diana diferentes. El cebador de RT universal comprende una parte de poli(T) y una parte de cola, en donde la parte de cola comprende una parte de cebador universal. Típicamente, la parte de poli(T) está en el extremo 3' del cebador de RT universal. En ciertas realizaciones, la secuencia de poli(T) en el extremo 3' del cebador es seguida por una base de nucleótidos adicional que no es una T. En general, el cebador de RT universal tiene entre 15 y 25 nucleótidos de longitud, más preferiblemente entre aproximadamente 18 nucleótidos y aproximadamente 22 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, el cebador de RT universal tiene aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de longitud. El cebador de RT universal puede comprender nucleótidos estándar, no estándar, derivatizados y modificados como se ha descrito antes en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cebador directo universal" se refiere a un cebador que se puede usar en una pluralidad de reacciones diferentes que consultan polinucleótidos diana diferentes. Como se usa en el presente documento, la expresión "cebador de RT/inverso universal" se refiere a un cebador que se puede usar en una pluralidad de reacciones diferentes que consultan polinucleótidos diana diferentes. Como se usa en el presente documento, la expresión "cebador inverso universal" se refiere a un cebador que se puede usar en una pluralidad de reacciones diferentes que consultan polinucleótidos diana diferentes. En una amplificación por PCR típica, los cebadores directo e inverso se usan para dirigir y amplificar preferiblemente una secuencia de ADN de interés. Como se usa en los métodos proporcionados, un solo par de cebadores directo e inverso universales permite la amplificación de diferentes polinucleótidos diana, ya que los polinucleótidos diana se modifican para incluir partes de cebador universal que sirven directamente, o en virtud de su complemento, como un molde sobre el cual puede hibridar un cebador directo o inverso universal.

En ciertas realizaciones, el cebador directo universal hibrida con la parte de cebador universal del adaptador de ligadura 5'. En general, la región del cebador directo universal que se hibrida con el adaptador de ligadura 5' tiene entre aproximadamente 15 y aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, más preferiblemente entre aproximadamente 18 nucleótidos y aproximadamente 22 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, la región

que se hibrida con el adaptador de ligadura 5' tiene aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de longitud. Los expertos en la técnica apreciarán que las longitudes de la parte del adaptador de ligadura 5' del cebador directo universal pueden ser más cortas que aproximadamente 15 nucleótidos y más largas que aproximadamente 25 nucleótidos de longitud y se pueden identificar en el curso de la metodología rutinaria y sin experimentación excesiva y que dichas partes del adaptador de ligadura 5' más largas o más cortas o partes de cebador directo universal están contempladas en las presentes enseñanzas. El cebador directo universal puede comprender nucleótidos estándar, no estándar, derivatizados y modificados como se ha descrito antes en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cebador de RT/inverso universal" se refiere a un cebador que se puede usar en una pluralidad de reacciones diferentes que consultan polinucleótidos diana diferentes. En algunas realizaciones, un cebador de RT/inverso universal hibrida con una parte del adaptador de ligadura 3' que comprende la parte de cebador universal del adaptador de ligadura 3'. Después de la reacción de extensión, el cebador directo universal se puede extender para formar un segundo producto de cadena. El cebador universal de RT/inverso puede hibridar con esta segunda cadena y se puede extender para continuar la reacción de amplificación. En general, el cebador de RT/inverso universal tiene entre aproximadamente 15 y 25 nucleótidos de longitud, más preferiblemente entre aproximadamente 18 nucleótidos y aproximadamente 22 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, el cebador de RT/inverso universal tiene aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de longitud. El cebador de RT/inverso universal puede comprender nucleótidos estándar, no estándar, derivatizados y modificados como se ha descrito antes en el presente documento.

La expresión "secuencia arriba" como se usa en el presente documento adquiere su significado habitual en biología molecular, y se refiere a la ubicación de una región de un polinucleótido que está en el lado 5' de una región "secuencia abajo". De forma correspondiente, la expresión "secuencia abajo" se refiere a la ubicación de un polinucleótido que está en el lado 3' de una región "secuencia arriba".

En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen además ensayar el producto de ligadura que comprende el ARN pequeño maduro y los adaptadores de ligadura 5' y 3', de modo que se detecta el ARN pequeño maduro. En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen además ensayar el producto de ligadura que comprende el ADNc del ARN pequeño maduro y el adaptador de ligadura 3', de modo que se detecta el ARN pequeño maduro. Los ensayos pueden ser cuantitativos, de modo que se pueda determinar la cantidad o copias del ARN pequeño maduro en una muestra. Alternativamente, los ensayos pueden ser cualitativos, de modo que se puede determinar en la muestra la presencia de un ARN pequeño maduro, pero su nivel no se puede medir. Además, los ensayos pueden ser tales que el ARN pequeño maduro o su ADNc se pueden aislar de la muestra para su posterior estudio.

En ciertas realizaciones, se puede usar un método de amplificación para ensayar el producto de ligadura. Ejemplos no limitantes de métodos de amplificación adecuados incluyen PCR cuantitativa en tiempo real, PCR cuantitativa de punto final y PCR estándar. En ciertas realizaciones, el ARN maduro pequeño se poliadenila y se realiza la transcripción inversa a una copia de ADN usando una transcriptasa inversa y un cebador de RT universal que comprende una parte de poli(T). Después de la transcripción inversa, se liga un adaptador de ligadura que comprende una parte de cebador universal al extremo 3' del ADNc, de modo que el producto de ligadura de ADNc se puede preamplificar y/o amplificar por métodos adecuados. La preamplificación del ADNc se puede lograr usando cebadores directos e inversos universales. Para ensayar el producto de ligadura de ADNc en ciertas realizaciones, el método de amplificación puede usar un cebador directo específico de ARN pequeño y un cebador inverso universal, y la detección del ADNc amplificado puede ser mediante el uso de una sonda universal (véase, por ejemplo, la Figura 2 en (A)). En ciertas realizaciones, el método de amplificación del ensayo puede usar cebadores directos e inversos universales, y la detección del ADNc amplificado puede ser mediante el uso de una sonda específica de ARN pequeño (véase, por ejemplo, la Figura 2 en (B)). Los cebadores directos e inversos universales y los cebadores directos e inversos específicos de ARN pequeño pueden comprender nucleótidos estándar, no estándar, derivatizados y modificados como se ha detallado antes. Los cebadores directo e inverso pueden variar cada uno de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, y en ciertas realizaciones, de aproximadamente 18 nucleótidos a aproximadamente 22 nucleótidos de longitud.

En otras realizaciones, para amplificar el producto de ligadura que comprende un ARN maduro pequeño, el producto de ligadura en general se convierte en una copia de ADN. En ciertas realizaciones, se puede sintetizar una copia de ADN del producto de ligadura durante la PCR usando un cebador de RT/inverso universal que se hibrida con el extremo 3' del producto de ligadura, de modo que una ADN polimerasa termoestable extiende el cebador usando el producto de ligadura como molde. El cebador de RT/inverso universal es complementario de la parte de cebador de RT/inverso universal del adaptador de ligadura 3'. El cebador de RT/inverso universal usado para generar una copia de ADN del producto de ligadura generalmente también se usará para amplificar el producto, junto con un cebador directo universal. En general, el cebador directo universal corresponde a una secuencia del adaptador de ligadura 5'. Los cebadores tanto directos como inversos universales pueden comprender nucleótidos estándar, no estándar, derivatizados y modificados como se ha detallado antes. Los cebadores directos e inversos universales pueden variar cada uno de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de aproximadamente 18 nucleótidos a aproximadamente 22 nucleótidos de longitud.

En ciertas realizaciones, se puede usar la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para ensayar el producto de ligadura. En este método, la cantidad de producto de PCR se sigue ciclo por ciclo en tiempo real. Para medir la cantidad de producto de PCR, la reacción se puede llevar a cabo en presencia de un colorante fluorescente cuya fluorescencia aumenta considerablemente cuando se une al ADN bicatenario. Ejemplos no limitantes de colorantes fluorescentes adecuados incluyen SYBR® Green I, PicoGreen® I, EvaGreen™, bromuro de etidio y naranja de acridina. La reacción también se puede llevar a cabo con una sonda indicadora fluorogénica que es específica para el ADN que se está amplificando. Los ejemplos no limitantes de sondas indicadoras incluyen sondas TaqMan®, balizas moleculares y cebadores Scorpion®. Las sondas mencionadas antes dependen de la transferencia de energía de resonancia Förster (FRET) para atenuar la señal de fluorescencia a través del acoplamiento de una molécula de colorante fluorogénico y un resto atenuador en el mismo o diferentes sustratos de oligonucleótidos. La señal de fluorescencia se genera cuando la molécula de colorante fluorogénico y el atenuador se desacoplan por medios enzimáticos o físicos. Los valores de fluorescencia generalmente se registran durante cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado hasta ese punto en la reacción de amplificación. El ciclo durante el cual la fluorescencia supera un valor umbral definido se define como el ciclo umbral (Ct). En general, la cantidad de materia de partida se puede calcular determinando el valor del Ct de la muestra y comparándolo con el valor del Ct de las muestras de control.

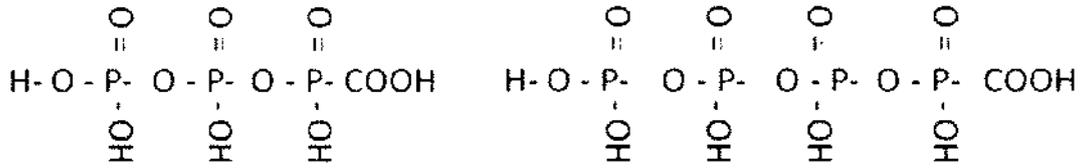
En ciertas realizaciones, también se puede usar la PCR cuantitativa de punto final para analizar el producto de ligadura. Este método es similar a la qPCR en cuando que la reacción en general se lleva a cabo en presencia de un colorante fluorescente o una sonda y/o cebador fluorogénico, pero la cantidad de producto de la PCR no se sigue ciclo por ciclo. En cambio, el producto de la PCR se analiza al final de la reacción resolviendo el producto amplificado por electroforesis en un chip de ADN, un gel de agarosa o un capilar, y luego midiendo la fluorescencia del producto. La reacción típicamente incluye un control interno coamplificado o un ácido nucleico sintético coamplificado para la normalización de la muestra.

En ciertas realizaciones, también se puede usar un método de PCR estándar para ensayar el producto de ligadura. Los procedimientos de PCR convencionales son bien conocidos en la técnica y se puede encontrar información relacionada con estos en Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, NY, 1998; Ausubel et al, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, NY, 1990, o Sambrook et al. *Molecular Protocols: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Press, NY, 2001.

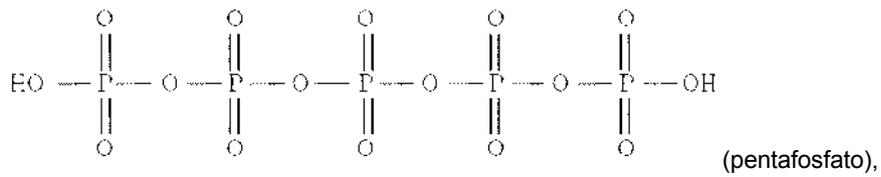
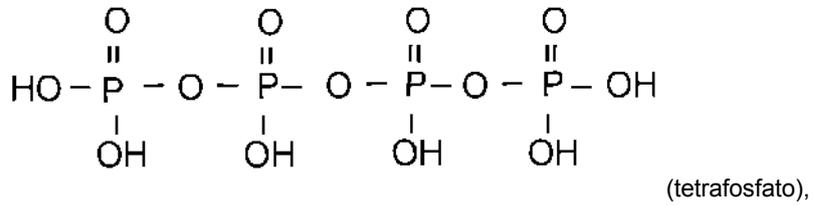
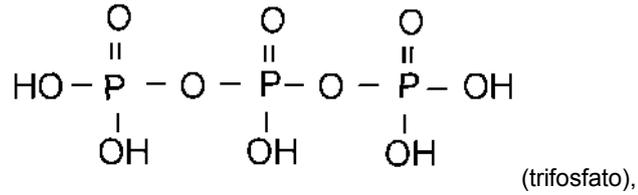
Los términos "amplicón" y "producto de amplificación" como se usan en el presente documento generalmente se refieren al producto de una reacción de amplificación. Un amplicón puede ser bicatenario o monocatenario, y puede incluir las cadenas componentes separadas obtenidas por desnaturalización de un producto de amplificación bicatenario. En ciertas realizaciones, el amplicón de un ciclo de amplificación puede servir como un molde en un ciclo de amplificación posterior.

Como se usa en el presente documento, el término "amplificar" se refiere a cualquier medio por el cual se reproduce al menos una parte de un polinucleótido diana, sustituto de polinucleotídico diana o combinaciones de los mismos, típicamente de una manera dependiente del molde, que incluye, sin limitación, una amplia variedad de técnicas para amplificar secuencias de ácido nucleico ya sea lineal o exponencialmente. Se puede usar cualquiera de varios métodos para amplificar el polinucleótido diana. 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 amplificación. Los métodos de ejemplo incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; véase, p. ej., patentes de EE.UU. N° 4,683,202; 4,683,195; 4,965,188; y 5,035,996), procedimientos isotérmicos (que usan una o más ARN polimerasas (véase, p. ej., la publicación de solicitud PCT N° WO 2006/081222), desplazamiento de cadena (véase, p. ej., patente de EE. UU. N° RE39,007), destrucción parcial de moléculas cebadoras (véase, p. ej., publicación de solicitud PCT N° publicación de solicitud PCT N° WO 2006/087574), reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase, p. ej., Wu, et al. *Genomics* 4: 560-569 (1990) y Barany, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 189-193 (1991)), sistemas de ARN replicasa Q β (véase, p. ej., WO 1994/016108), sistemas basados en transcripción de ARN (p. ej., TAS, 3SR), amplificación de círculo rodante (RCA) (véase, p. ej., patente de EE.UU. N° 5,854,033; publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2004/265897; Lizardi et al., *Nat. Genet.* 19: 225-232 (1998); y 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. Muchos sistemas son adecuados para usar en la amplificación de ácidos nucleicos diana y están contemplados en este documento como entendería un experto en la técnica.

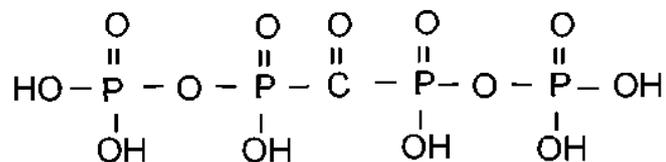
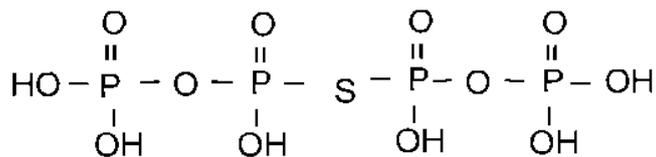
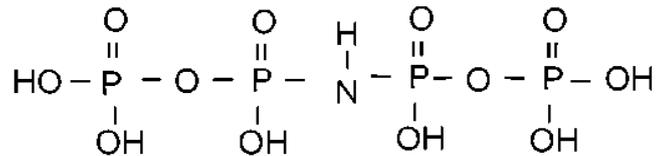
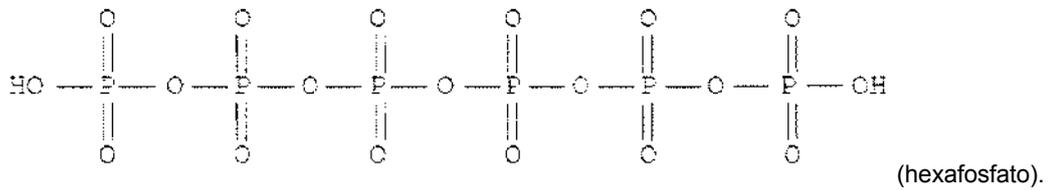
En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados se pueden usar para detectar un ARN pequeño maduro raro en una muestra y/o distinguir un ARN pequeño de otros ARN pequeños similares o muy homólogos en la muestra. En ciertas realizaciones, los métodos para amplificar los ácidos nucleicos diana usan la activación por reacciones de polifosforolisis (APP) para proporcionar una amplificación muy específica del ARN maduro pequeño diana o su cADN. La polifosforolisis se refiere a la eliminación de un nucleótido no extensible de un ácido nucleico (p. ej., un oligonucleótido) en presencia de uno o más agentes de polifosforilación y una enzima que presenta actividad de polifosforilación. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido activable por polifosforolisis (oligonucleótido APP) es un oligonucleótido específico diana con un didesoxinucleótido en el extremo 3'. El didesoxinucleótido terminal 3' inhibe la extensión directa por la polimerasa, pero se puede eliminar por polifosforolisis en presencia de un agente de polifosforilación y la cadena complementaria de la diana. En general, el didesoxinucleótido no se elimina si hay un apareamiento erróneo entre el oligonucleótido APP y su pareja de hibridación. Típicamente, el oligonucleótido APP

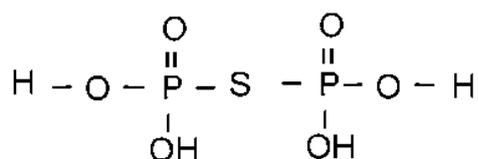
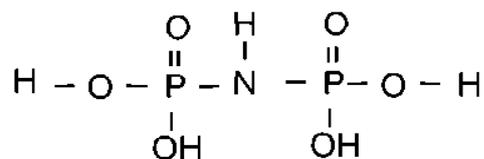


En algunas realizaciones, el uno o más agentes de polifosforilación pueden ser:

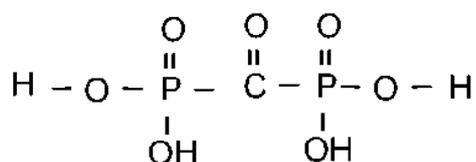


5





y/o



- 5 Cualquiera de los agentes de polifosforilación descritos en este documento puede combinarse con cualquier otro agente de polifosforilación. En algunas realizaciones, el uno o más agentes de polifosforilación pueden ser pirofosfato (PP_i) en combinación con al menos uno o más de otros agentes de polifosforilación. Cualquiera de los uno o más agentes de polifosforilación se puede usar en forma de sal (p. ej., sodio). Típicamente, las reacciones de APP descritas en el presente documento incluyen además uno o más biocatalizadores (p. ej., enzima(s)) que tienen actividad de polifosforolisis para generar uno o más trifosfatos de nucleósidos. Como se ha mostrado antes, por ejemplo, el imidodifosfato (IDP) une los restos fosfato usando nitrógeno; compuestos de difosfato similares pueden sustituir el nitrógeno por azufre. En algunas realizaciones, un polifosfato puede ser cualquier éster fosfato que tenga dos o más restos fosfato. En algunas realizaciones, un polifosfato puede ser cualquier éster fosfato que tenga tres o más restos fosfato.
- 10
- 15 Un ejemplo de uno o más biocatalizadores que se pueden usar en APP es una ADN polimerasa que cataliza la polimerización de trifosfatos de nucleósidos y la polifosforolisis de dúplex de ADN en presencia de uno o más agentes de polifosforilación como se describe en el presente documento. Los ejemplos de ADN polimerasas que tienen actividad de polifosforolisis incluyen, pero no se limitan a, Tfl, Taq y/o ADN polimerasas genéticamente modificadas termoestables (p. ej., AMPLITAQFS, TERMOSEQUENASE), las que tienen la mutación del sitio activo F667Y o el equivalente de F667Y (p. ej., en Tth) que muestra afinidad mejorada por didesoxinucleótido como nucleótido entrante (p. ej., K_m más pequeña para ddNTP)), RQ1 como se describe en la patente de EE.UU. N° 7.422.872 y sus mutantes (p. ej., RQY en el que 669 se sustituye por tirosina, que puede proporcionar transcripción inversa y/o secuenciación directa de ARN), THERMINATOR I (NEB), THERMINATOR II, THERMINATOR III y/o THERMINATOR GAMMA (todos disponibles en NEB), entre otros. Estas y otras ADN polimerasas potencialmente adecuadas pueden estar descritas, por ejemplo, en la Pub. de EE.UU. 2008/0254525A1, pub. de EE.UU. 2007/0020622A1, pub. de EE.UU. 2007/0009924A1, patente de EE.UU. N° 4,889,818, patente de EE.UU. N° 4,965,188, patente de EE.UU. N° 5,047,342, patente de EE.UU. N° 5,079,352, patente de EE.UU. N° 5,270,179, patente de EE.UU. N° 5,374,553, patente de EE.UU. N° 5,436,149, patente de EE.UU. N° 5,512,462, patente de EE.UU. N° 5,614,365, y/o patente de EE.UU. N° 6,228,628B1. Se ha encontrado que el uso de dichas ADN polimerasas genéticamente modificadas puede mejorar la eficiencia de la APP.
- 20
- 25
- 30

La APP proporciona la extensión de oligonucleótidos mediante conversión de un oligonucleótido no extensible en un oligonucleótido extensible, extensión del oligonucleótido para producir una cadena de ácido nucleico deseada (p. ej., una copia complementaria de un ácido nucleico diana), y opcionalmente amplificación y detección de la cadena de ácido nucleico deseado. Un nucleótido no extensible se refiere a un nucleótido, que tras la incorporación en un ácido nucleico evita una mayor extensión del ácido nucleico, p. ej., al menos por un biocatalizador (p. ej., enzima). Un nucleótido puede ser extensible mediante una enzima, pero no extensible mediante otra enzima. Un nucleótido no extensible para una enzima podría hacerse extensible o parcialmente extensible en diferentes condiciones. Un nucleótido extensible se puede referir a un nucleótido al que se puede añadir o unir covalentemente al menos otro nucleótido en una posición 3' del resto de azúcar del nucleótido extensible por un biocatalizador (p. ej., enzima) presente en la reacción. La extensión también puede comenzar desde 2'-OH de un nucleótido que puede tener o no un 3'-OH extensible. Extender un ácido nucleico se refiere a la adición o incorporación de uno o más nucleótidos a o en un ácido nucleico dado. Un oligonucleótido extendido es típicamente un oligonucleótido (p. ej., un ácido nucleico

35

40

cebador) al que se han añadido o incorporado de otro modo uno o más nucleótidos adicionales (p. ej., unidos covalentemente). La APP se lleva a cabo típicamente usando las etapas de: (a) reasociación con un ácido nucleico de un primer oligonucleótido que tiene un extremo 3' no extensible ("P*") que se puede eliminar por polifosforólisis (es decir, activable); (b) eliminar ese extremo 3' no extensible usando un agente de polifosforilación y un biocatalizador (es decir, una ADN polimerasa) que tiene actividad de polifosforólisis para producir un oligonucleótido no bloqueado; y (c) extender el oligonucleótido no bloqueado para producir una cadena de ácido nucleico deseada. También se pueden incluir etapas adicionales para detectar la cadena de ácido nucleico deseada como se describe a continuación.

El uno o más agentes de polifosforilación se pueden incluir en la mezcla de reacción a cualquier concentración adecuada. Por ejemplo, una concentración adecuada puede ser de aproximadamente 1-500 μM . Otros intervalos adecuados de concentraciones de agentes de polifosforilación pueden incluir, pero no se limitan a aproximadamente 1-10 μM , 10-20 μM , 20-30 μM , 30-40 μM , 40-50 μM , hasta 50 μM , 50-60 μM , 60-70 μM , 70-80 μM , 90-100 μM , hasta 100 μM , 100-150 μM , 150-200 μM , hasta 200 μM , 200-250 μM , 250-300 μM , hasta 300 μM , 300-350 μM , 350-400 μM , hasta 400 μM , 400-450 μM , 450-500 μM . Adicionalmente, las concentraciones adecuadas de agente de polifosforilación incluyen, pero no se limitan a, 1 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM , 35 μM , 40 μM , 45 μM , 50 μM , 55 μM , 60 μM , 65 μM , 70 μM , 75 μM , 80 μM , 85 μM , 90 μM , 95 μM , 100 μM , 125 μM , 150 μM , 175 μM , 200 μM , 225 μM , 250 μM , 275 μM , 300 μM , 325 μM , 350 μM , 375 μM , 400 μM , 425 μM , 450 μM , 475 μM y 500 μM . Las concentraciones particularmente adecuadas de agente(s) de polifosforilación pueden incluir, pero no se limitan a aproximadamente 25 μM , 40 μM , 50 μM y 100 μM , 150 μM , 200 μM y 250 μM . Otras concentraciones adecuadas de agente de polifosforilación también pueden ser adecuadas, como entendería un experto en la técnica, y también están contempladas como parte de esta descripción.

Los métodos que usan APP descritos en el presente documento se pueden llevar a cabo en cualquiera de varias formas diferentes. En algunas realizaciones, el método comprende las siguientes etapas llevadas a cabo en serie:

(a) Reasociación de la cadena molde con un oligonucleótido activable complementario "P*". Este oligonucleótido activable tiene un nucleótido no extensible en su extremo 3'. No tiene nucleótidos en o cerca de su extremo 3' que se emparejen mal con los nucleótidos correspondientes en la cadena molde. Por lo tanto, el nucleótido terminal hibrida con la cadena molde cuando el oligonucleótido P* se reasocia.

(b) Polifosforilación del oligonucleótido activable reasociado P* con al menos un agente de polifosforilación descrito en el presente documento y una enzima que tiene actividad de polifosforólisis. Esto activa el oligonucleótido P* por eliminación del nucleótido terminal hibridado.

(c) Polimerización extendiendo el oligonucleótido P* activado en la cadena molde en presencia de cuatro trifosfatos de nucleósidos y una polimerasa de ácido nucleico para sintetizar la cadena de ácido nucleico deseada.

El método APP también se puede usar para amplificar una cadena de ácido nucleico deseada, por ejemplo, añadiendo las siguientes etapas adicionales: (d) separación de la cadena de ácido nucleico deseada de la etapa (c) de la cadena molde, y (e) repetición de las etapas (a) - (d) hasta que se logre un nivel deseado de amplificación de la cadena de ácido nucleico deseada. Las etapas (a) a (c) de la APP se pueden realizar secuencialmente como etapas de dos o más temperatura en un termociclador, o se pueden realizar como una etapa de una temperatura en un termociclador.

Como se ha descrito antes, la APP se puede usar para amplificar moléculas de ácido nucleico, que incluyen pero no se limitan a ácido ribonucleico (p. ej., ARN) y/o ácido desoxirribonucleico (p. ej., ADN). Cuando se usa para amplificar el ADN, el oligonucleótido P* activable no extensible es típicamente un 2'-desoxi oligonucleótido, el desoxinucleótido terminal puede ser un 2',3'-didesoxinucleótido, los cuatro trifosfatos de nucleósidos son trifosfatos de 2'-desoxinucleósidos y la polimerasa de ácido nucleico es una ADN polimerasa. La ADN polimerasa usada en la etapa (c) también puede ser la enzima que tiene actividad de polifosforólisis usada en la etapa (b). La amplificación por APP puede ser lineal o exponencial. La amplificación lineal se obtiene cuando el oligonucleótido activable P* es el único oligonucleótido complementario utilizado. La amplificación exponencial se obtiene cuando está presente un segundo oligonucleótido que es complementario de la cadena de ácido nucleico deseada (p. ej., como en la PCR). El segundo oligonucleótido puede ser un oligonucleótido extensible o no extensible activable. El oligonucleótido activable P* y el segundo oligonucleótido flanquean la región que es el objetivo de la amplificación. En la etapa (a), el segundo oligonucleótido se reasocia con el producto de cadena de ácido nucleico deseado separado de la etapa (d). En la etapa (c), la polimerización extiende el segundo oligonucleótido en la cadena de ácido nucleico deseada para sintetizar una copia de la cadena molde de ácido nucleico. En la etapa (d), la cadena molde de ácido nucleico sintetizada se separa de la cadena de ácido nucleico deseada. Las etapas (a) a (d) se pueden repetir hasta alcanzar el nivel deseado de amplificación exponencial.

En ciertas realizaciones, el método de APP se usa para la amplificación específica de miARN. La cadena molde de ácido nucleico es típicamente una cadena de ADNc homosentido o antisentido de una especie de miARN y está presente en mezcla con la cadena de ADNc correspondiente (homosentido o antisentido) de otras especies de miARN. El oligonucleótido P* activable (p. ej., no extensible) no tiene apareamientos erróneos cerca del extremo 3' de la secuencia de ADNc del miARN diana y tiene al menos un nucleótido en o cerca de su extremo 3' que no se

empareja con el nucleótido correspondiente de especies de ADNc de miARN no diana. Debido al apareamiento erróneo, en la etapa (a) del método de APP, el nucleótido terminal no extensible del oligonucleótido P* no hibrida con el ADNc del miARN no diana. En la etapa (b), la polifosforolisis no elimina sustancialmente el nucleótido terminal o casi terminal no hibridado del oligonucleótido activable P* reasociado con el miARN no diana. Por lo tanto, en la etapa (c), el oligonucleótido P* no se extiende sustancialmente por polimerización en el ADNc de miARN no diana. Como resultado, la cadena de ácido nucleico deseada de ADNc del miARN diana sintetizada en la cadena molde se amplifica con preferencia frente a cualquier cadena de ácido nucleico sintetizada en el ADNc del miARN no diana. En una realización, el método de APP se usa para la amplificación exponencial de una especie de miARN específica (diana) en una mezcla que contiene una o más de otras especies de miARN (no diana). Después de la generación de un producto de ligadura de ADNc a partir de un miARN poliadenilado como se describe en el presente documento o la generación de un producto de ligadura de miARN y posterior transcripción inversa para crear un ADNc, las cadenas de los ADNc se pueden separar para proporcionar ADN monocatenario, seguido de la serie etapas (a) - (e):

(a) Reasociación con las cadenas homsentido o antisentido del ADNc diana y no diana de un 2'-desoxioligonucleótido P* activable complementario que tiene un 2',3'-didesoxinucleótido no extensible en su extremo 3'. P* no tiene nucleótidos en o cerca de su extremo 3' que tengan apareamiento erróneo con los 2'-desoxinucleótidos correspondientes en el ADNc diana, pero tiene al menos un nucleótido en o cerca de su extremo 3' que tiene apareamiento erróneo con el 2'-desoxinucleótido correspondiente en el ADNc que no es diana. Por consiguiente, el 2',3'-didesoxinucleótido terminal hibrida con la cadena diana pero no con la cadena que no es diana cuando el oligonucleótido P* se reasocia. Simultáneamente, un segundo 2'-desoxioligonucleótido que es complementario de las cadenas antiparalelas de cada ADNc se reasocia con las cadenas antiparalelas. El 2'-desoxioligonucleótido P* activable y el segundo 2'-desoxioligonucleótido flanquean la región del ADNc que se va a amplificar.

(b) Polifosforilación de P* activable que está reasociado con una cadena de ADNc diana con al menos un agente de polifosforilación y una enzima que tiene actividad de polifosforolisis. Esto activa el P* que se reasocia con la cadena diana mediante la eliminación del 2',3'-didesoxinucleótido terminal hibridado. No activa sustancialmente el P* que está reasociado con la cadena de ADNc que no es diana porque la polifosforolisis no elimina sustancialmente el 2',3'-didesoxinucleótido terminal no hibridado.

(c) Polimerización extendiendo el oligonucleótido P* activado en la cadena diana en presencia de cuatro trifosfatos de nucleósidos y una ADN polimerasa y extendiendo simultáneamente el segundo 2'-desoxioligonucleótido en cadenas antiparalelas de ADNc tanto diana como que no son diana.

(d) Separación de los productos de extensión de la etapa (c);

(e) Repetición de las etapas (a) - (d) hasta que se haya alcanzado el nivel deseado de amplificación exponencial del ADNc diana.

En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados para detectar y/o cuantificar el miARN comprenden la etapa de amplificación del ácido nucleico diana usando la activación por polifosforolisis (APP) en presencia de al menos un agente de fosforilación. En ciertas realizaciones, el al menos un agente de polifosforilación es un difosfato, un trifosfato, un tetrafosfato, un pentafofato o un hexafofato. En ciertas realizaciones de los métodos proporcionados, el agente de polifosforilación es trifosfato. En ciertas realizaciones de los métodos proporcionados, el agente de polifosforilación es hexafofato.

En ciertas realizaciones, los métodos para amplificar ácidos nucleicos diana usan la activación por reacciones de polimerización activada por pirofosforolisis (PAP). La PAP se puede usar para polimerizar y/o amplificar moléculas de ácido nucleico, que incluyen pero no se limitan a ácido ribonucleico (p. ej., ARN) y/o ácido desoxirribonucleico (p. ej., ADN), o híbridos de los mismos. Las reacciones de PAP y sus usos en reacciones de polimerización y amplificación se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 7 033 763. En la PAP, el oligonucleótido activable P* reasociado se pirofosforila con pirofosfato y una enzima que presenta actividad de polifosforilación. Esto activa el oligonucleótido P* mediante la eliminación del extremo 3' no extensible hibridado. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la amplificación del ADNc del miARN diana usa PAP y pirofosfato como agente de pirofosforilación.

En ciertas realizaciones, para reacciones de amplificación de ácido nucleico diana que usan APP o PAP, un cebador directo o un cebador inverso comprende un nucleótido no extensible en el extremo 3'. En ciertas realizaciones, para reacciones de amplificación de ácido nucleico diana que usan APP o PAP, tanto un cebador directo como un cebador inverso comprenden un nucleótido no extensible en el extremo 3'.

En una realización, la reacción de amplificación es un ensayo de 5'-nucleasa (también conocido comercialmente como ensayos TaqMan®) realizado usando una polimerasa de ácido nucleico, tal como ADN polimerasa, ARN polimerasa y transcriptasa inversa, al menos un cebador oligonucleótido capaz de hibridar específicamente con un polinucleótido diana (a partir del cual se amplifica el ácido nucleico diana amplificado), al menos una sonda detectable que se hibrida con el ácido nucleico diana amplificado, y que se puede incorporar en el al menos un cebador), y al menos un agente de unión de ácido nucleico detectable (p. ej., un colorante intercalante o no

intercalante) que se puede introducir antes, durante o después de la amplificación. La sonda típicamente contiene un marcador detectable que emite una señal que puede ser vigilada para determinar si el ácido nucleico diana ha sido amplificado. En algunas realizaciones, la sonda es un oligonucleótido que se hibrida con el ácido nucleico diana 3' con respecto a el al menos un cebador. En algunas realizaciones, la polimerasa tiene actividad de nucleasa (es decir, actividad de nucleasa 5' a 3') para liberar la sonda del ácido nucleico amplificado. En algunas realizaciones, la liberación del ácido nucleico amplificado hace que la sonda sea detectable. En algunas realizaciones, la sonda comprende un marcador detectable y una molécula atenuadora que atenúa el marcador detectable cuando está libre pero no atenúa cuando la sonda hibrida con el ácido nucleico amplificado. En algunas realizaciones, se pueden usar dos o más sondas donde al menos una sonda tiene un marcador detectable y al menos otra sonda tiene una molécula atenuadora. Cuando están lo suficientemente cerca uno de otro, la molécula atenuadora normalmente suprime la señal del marcador detectable en la otra sonda. En algunas realizaciones, se pueden usar dos o más sondas, cada una con un marcador detectable diferente, sin moléculas atenuadoras. En dichas realizaciones, las sondas se vuelven detectables, ya sea de forma nueva o presentando una señal diferente de cualquiera de las sondas solas, cuando están suficientemente cerca una de la otra. En ciertas realizaciones, el marcador detectable y la molécula atenuadora 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 atenuadora. El marcador detectable (p. ej., fluorescencia) se puede vigilar durante la reacción, donde la detección del marcador corresponde a la aparición de la amplificación de ácido nucleico (p. ej., cuanto mayor es la señal, mayor es la cantidad de amplificación). Las variaciones de los ensayos TaqMan®, tales como el ensayo TaqMan® enriquecido con LNA™, son conocidas en la técnica y serían adecuadas para su uso en los métodos descritos en el presente documento.

Se puede usar cualquiera de varios métodos para detectar ácidos nucleicos diana amplificados usando cebadores o sondas. Se pueden usar muchos reactivos, sistemas o marcadores detectables diferentes en los métodos descritos en el presente documento. Estos incluyen, por ejemplo, sistemas TaqMan®, sistemas de marcador detectable-atenuador (p. ej., FRET, sistemas de ligandos de salicilato/DTPA (véase, por ejemplo, Oser, et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29:1167-1169 (1990), hibridación por desplazamiento, sondas homólogas, ensayos descritos en el documento EP 070685), balizas moleculares (p. ej., NASBA®), bases de ácido nucleico bloqueado (LNA) (Singh, et al. *Chem. Commun.* 4: 455-456 (1998)), sondas de ácido nucleico peptídico (PNA) (Pellestor, et al. *Eur. J. Hum. Gen.* 12: 694-700 (2004)), sondas Eclipse (Afonina, et al. *Biotechniques* 32: 940-949 (2002)), sondas de encendido (*light-up*) (Svanvik, et al. *Anal. Biochem.* 281:26-35 (2000)), balizas moleculares (Tyagi, et al. *Nat. Biotechnol.* 14:303-308 (1996)), balizas moleculares tripartitas (Nutiu, et al. *Nucleic Acids Res.* 30: E94 (2002)), 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8790-8794 (1988)), MGB Alert (www.nanogen.com), Q-PNA (Fiandaca, et al. *Genome Res.* 11: 609-613 (2001)), Plexor (www.Promega.com), Cebadores LUX™ (Nazarenko, et al. *Nucleic Acids Res.* 30: E37 (2002)), cebadores Scorpion® (Whitcombe, et al. *Nat. Biotechnol.* 17: 804-807 (1999)), cebadores AmpliFluor® (Sunrise) (Nazarenko, et al. *Nucleic Acids Res.* 25: 2516-2521 (1997)), cebadores DzyNA (Todd, et al. *Clin. Chem.* 46: 625-630 (2000)), y similares. En cada uno de estos ensayos, se puede vigilar la generación de productos de amplificación mientras la reacción avanza. Se puede usar un aparato para detectar la señal generada por el marcador detectable para detectar, medir y cuantificar la señal antes, durante o después de la amplificación. El tipo particular de señal puede dictar la elección del método de detección. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los colorantes fluorescentes se usan para marcar sondas o productos amplificados. Las sondas se unen a productos amplificados monocatenarios o bicatenarios, o los colorantes se intercalan en los productos amplificados bicatenarios y, en consecuencia, la fluorescencia resultante aumenta a medida que aumenta la cantidad de producto amplificado. El uso de otros métodos o reactivos también está contemplado en el presente documento como entendería un experto en la técnica.

Otro sistema ilustrativo usa sondas bicatenarias en métodos de hibridación por desplazamiento (véase, p. ej., Morrison et al. *Anal. Biochem.* 183: 231-244 (1989); y Li et al. (véase antes)). En dichos métodos, la sonda normalmente incluye dos oligonucleótidos complementarios de diferentes longitudes, donde uno incluye un marcador detectable y el otro incluye una molécula atenuadora. Cuando no está unido a un ácido nucleico diana, el atenuador suprime la señal del marcador detectable. La sonda se vuelve detectable tras la hibridación por 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 implican "balizas moleculares", que son sondas de oligonucleótidos en forma de horquilla monocatenarias. En presencia de la secuencia diana, 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 de la secuencia diana; 2) dos "tallos" 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', una molécula atenuadora que evita que el marcador detectable emita un solo fotón 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 de "tallo" de la baliza se separa, lo que da como resultado que la sonda hibrida con la diana. También se conocen otros tipos de balizas moleculares y pueden ser adecuadas para usar en los métodos descritos en el presente documento. Las balizas moleculares se pueden usar en una variedad de sistemas de ensayo. Uno de dichos 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 oligonucleótidos. 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 el presente documento.

El sistema Scorpion® es otro formato de ensayo ilustrativo que se puede usar en los métodos descritos en el presente documento. Los cebadores Scorpion® 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 atenuador. En presencia de un ácido nucleico diana, el marcador detectable y el atenuador se separan, lo que conduce a un aumento de la señal emitida del 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" (tal como un monómero de HEG) al inicio del bucle de horquilla. La sonda normalmente incluye una secuencia de tallo autocomplementaria con un marcador detectable en un extremo y un atenuador en el otro. En los ciclos de amplificación iniciales, el cebador 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 con diferentes marcadores para distinguir entre las sondas. Usando la PCR como ejemplo, después de completar un ciclo de extensión, la región diana recién sintetizada se une a la misma cadena que la sonda. Después del segundo ciclo de desnaturalización y reasociación, la sonda y la diana se hibridan. La secuencia de horquilla después se hibrida con una parte del producto de PCR recién producido. Esto da como resultado la separación del marcador detectable del atenuador y produce la emisión de la señal. Otros usos para cebadores Scorpion® son conocidos en la técnica y serían adecuados para uso en los métodos descritos en el presente documento.

Normalmente uno o más marcadores detectables o agentes de atenuación están unidos a un cebador o sonda. 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 atenuadoras, de modo que la señal solo sea detectable cuando no esté lo suficientemente cerca de la molécula atenuadora. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sistema de ensayo puede hacer que el marcador detectable se libere de la molécula atenuadora. Se puede usar cualquiera de varios marcadores detectables para marcar los cebadores y las sondas usadas en los métodos descritos en el presente documento. Como se ha mencionado antes, en algunas realizaciones, el marcador detectable se puede unir a una sonda, que se puede incorporar a un cebador, o se puede unir de otra manera al ácido nucleico diana amplificado (por ejemplo, un agente de unión a ácido nucleico detectable, tal como un colorante intercalante o no intercalante). Cuando se usa más de un marcador detectable, cada marcador 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, pero no se limitan a un colorante fluorescente o fluoróforo (es decir, un grupo químico que puede ser excitado por luz para emitir fluorescencia o fosforescencia), "colorantes aceptores" capaces de atenuar una señal fluorescente de un colorante donador fluorescente, y similares.

Los marcadores detectables adecuados incluyen, por ejemplo, fluoresceínas (p. ej., 5-carboxi-2,7-diclorofluoresceína; 5-carboxifluoresceína (5-FAM); 5-HAT (hidroxitriptamina); 6-HAT; 6-JOE; 6-carboxifluoresceína (6-FAM); FITC); Alexa Fluor (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-Ceramide, R6G SE, TMR, conjugado de 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 de faloidina, hidroxicumarina, CMFDA, metoxicumarina), calceína, calceína AM, azul calceína, colorantes de calcio (p. ej., crismo calcio, verde calcio, naranja calcio, blanco calcofluor), azul Cascade, amarillo Cascade; colorantes CyTM (p. ej., 3, 3.18, 3.5, 5, 5.18, 5.5, 7), cian GFP, AMP cíclico Fluorosensor (FiCRhR), proteínas fluorescentes (p. ej., proteína verde fluorescente (p. ej., GFP, EGFP), proteína azul fluorescente (p. ej., BFP, EBFP, EBFP2, Azurite, mKalamal), proteína fluorescente cian (p. ej., ECFP, Cerulean, CyPet), proteína fluorescente amarilla (p. ej., YFP, Citrine, Venus, YPet), pares donador/aceptor de FRET (p. ej., fluoresceína/tetrametilrodamina, IAEDANS/fluoresceína, EDANS/Dabcyl, fluoresceína/fluoresceína, BODIPY® FL/BODIPY® FL, Fluoresceína/QSY7 y QSY9), LysoTracker® y LysoSensor™ (p. ej., LysoTracker® azul DND-22, LysoTracker® 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 MW 10 000), verde Oregon (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-carboxi rodamina 6G, Lisamina, Lisamina Rodamina B, Falicina, Faloidina, Rojo, Rhod-2, 5-ROX (carboxi-X-rodamina), Sulforodamina B can C, Sulforodamina G Extra, Tetrametilrodamina (TRITC), WT), rojo Texas, rojo-X Texas, VIC y otros marcadores descritos, p. ej., en US Pub. N° 2009/0197254), entre otros, como conocerían los expertos en la técnica. También se pueden usar otros marcadores detectables (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2009/0197254), como conocerán los expertos en la técnica.

Como se usa en el presente documento, "polimerasa" se refiere a cualquier enzima que tiene una actividad de polimerización de nucleótidos. Las polimerasas (incluyendo las ADN polimerasas y las ARN polimerasas) útiles de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen, pero no se limitan a, ADN polimerasas dirigidas por ADN naturales

o disponibles en el mercado, ARN polimerasas dirigidas por ADN, ADN polimerasas dirigidas por ARN y ARN polimerasas dirigidas por ARN. Las polimerasas usadas de acuerdo con la invención pueden ser cualquier enzima que pueda sintetizar una molécula de ácido nucleico a partir de un molde de ácido nucleico, típicamente en la dirección 5' a 3'.

5 Los ejemplos de ADN polimerasas que se pueden usar en los métodos, kits y composiciones proporcionados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a: ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth), ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq), ADN polimerasa de *Thermotoga neopolitana* (Tne), ADN polimerasa de *Thermotoga maritima* (Tma), ADN polimerasa de *Thermococcus litoralis* (Tli o VENT™), ADN polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu), ADN polimerasa DEEPVENT™, ADN polimerasa de *Pyrococcus woosii* (Pwo), ADN polimerasa de *Bacillus sterothermophilus* (Bst), ADN polimerasa de *Bacillus caldophilus* (Bca), ADN polimerasa de *Sulfolobus acidocaldarius* (Sac), ADN polimerasa de *Thermoplasma acidophilum* (Tac), ADN polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl/Tub), ADN polimerasa de *Thermus ruber* (Tru), ADN polimerasa de *Thermus brockianus* (DYNAZYME™), ADN polimerasa de *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Mth), ADN polimerasa de *Mycobacterium* (Mtb, Mlep), y mutantes, variantes y derivados de las mismas. Las ARN polimerasas tales como T3, T5 y SP6 y mutantes, variantes y derivados de las mismas también se pueden usar de acuerdo con las presentes enseñanzas. En general, se puede usar cualquier ADN polimerasa de tipo I de acuerdo con las presentes enseñanzas, aunque se pueden usar otras ADN polimerasas que incluyen, pero no se limitan a, ADN polimerasas de tipo III o de la familia A, B, C, etc.

Las polimerasas de ácido nucleico utilizadas en los métodos, kits y composiciones proporcionadas en el presente documento pueden ser mesófilas o termófilas. Las ADN polimerasas mesófilas de ejemplo incluyen la ADN polimerasa T7, ADN polimerasa T5, ADN polimerasa del fragmento Klenow, ADN polimerasa III y similares. Las ADN polimerasas termoestables de ejemplo incluyen Taq, Tne, Tma, Pfu, Tfl, Tth, fragmento Stoffel, ADN polimerasas VENT™ y DEEPVENT™, y mutantes, variantes y derivados de las mismas (patentes de EE.UU. N° 5,436,149; 4,889,818; 4,965,188; 5,079,352; 5,614,365; 5,374,553; 5,270,179; 5,047,342; y 5,512,462; publicaciones de solicitud PCT N° WO 92/06188, WO 92/06200, y WO 96/10640; Barnes, *Gene* 112: 29-35 (1992); Lawyer, et al., *PCR Meth. Appl.* 2:275-287 (1993); Flaman, et al., *Nucl. Acids Res.* 22:3259-3260 (1994)). Los ejemplos de ADN polimerasas que carecen sustancialmente de actividad de exonucleasa 3' incluyen, pero no se limitan a ADN polimerasas Taq, Tne (exo-), Tma (exo-), Pfu (exo-), Pwo (exo-) y Tth, y mutantes, variantes y derivados de los mismos.

Las ADN polimerasas para usar en las presentes enseñanzas se pueden obtener en el mercado, por ejemplo, en Life Technologies Corp. (Carlsbad, CA), Pharmacia (Piscataway, N.J.), Sigma (St. Louis, Missouri) y Boehringer Mannheim. Las ADN polimerasas de ejemplo disponibles en el mercado para usar en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, ADN polimerasa Tsp de Life Technologies Corp.

También se puede usar un método de hibridación para ensayar el producto de ligadura. Ejemplos no limitativos de métodos de hibridación adecuados incluyen micromatriz de ácido nucleico. Los análisis de micromatrices se pueden llevar a cabo utilizando equipos disponibles en el mercado y siguiendo los protocolos del fabricante. Típicamente, los ácidos nucleicos monocatenarios están unidos (en matrices) a una superficie de microchip. Las secuencias en matrices después se hibridan (sonda) con ácidos nucleicos, que se pueden marcar con fluorescencia. Después de un lavado riguroso para eliminar los ácidos nucleicos no unidos específicamente, en general se hace un barrido de la superficie del chip por microscopía láser confocal o por otro método de detección, tal como una cámara CCD. Los métodos de análisis de los datos originales de fluorescencia son conocidos en la técnica. Se puede usar una variedad de combinaciones de ácido nucleico y sonda en matrices para detectar el producto de ligadura de las presentes enseñanzas.

Los adaptadores de ligadura 5' y 3' pueden estar libres en disolución, de modo que el ARN pequeño maduro se detecte en disolución. Alternativamente, el adaptador de ligadura 5' o el adaptador de ligadura 3' se pueden unir a un soporte sólido, de modo que el extremo terminal 3' del adaptador de ligadura 5' o el extremo terminal 5' del adaptador de ligadura de 3' está libre. Por lo tanto, en esta realización, el ARN pequeño maduro o su ADNc está unido al adaptador de ligadura que está unido al soporte sólido. El ARN pequeño maduro o su ADNc se puede hibridar con el adaptador de ligadura inmovilizado y se puede ligar cuando se une indirectamente al soporte sólido. En otras realizaciones, el cebador de RT universal que comprende una parte de poli(T) puede estar unido a un soporte sólido, de modo que el extremo 3'-terminal del cebador de RT universal está libre. Por lo tanto, en esta realización, el ADNc del ARN pequeño extendido a partir del cebador universal está unido al soporte sólido. Los ejemplos no limitantes de un soporte sólido adecuado incluyen una superficie de vidrio, una superficie de sílice, una superficie de plástico, una superficie de polímero, una superficie de copolímero o una superficie de metal.

Como se usa en el presente documento, la expresión "secuenciación de nueva generación" o "NGS" en general se refiere a tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, que incluyen, pero no se limitan a, secuenciación de firma masiva paralela, secuenciación de alto rendimiento, secuenciación por ligadura (p. ej., secuenciación SOLiD), secuenciación por iones semiconductores - protones, secuenciación por nanobolas de ADN, secuenciación de una sola molécula y secuenciación por nanoporos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "recipiente de reacción" generalmente se refiere a cualquier recipiente en el que puede ocurrir una reacción de acuerdo con las presentes enseñanzas. En algunas realizaciones, un recipiente de reacción puede ser un tubo de microcentrífuga y otros recipientes del tipo de la práctica común en

los laboratorios modernos de biología molecular. En algunas realizaciones, un recipiente de reacción puede ser un pocillo en una placa de microvaloración, una mancha en un portaobjetos de vidrio o una mancha en una Array Card TaqMan® de Applied Biosystems (Life Technologies, Foster City, CA). Por ejemplo, una pluralidad de recipientes de reacción puede residir en el mismo soporte. En algunas realizaciones, los dispositivos tipo laboratorio en un chip, disponibles por ejemplo de Caliper y Fluidigm, pueden proporcionar recipientes de reacción. En algunas realizaciones, se pueden emplear diversos enfoques microfluídicos. Se reconocerá que una variedad de recipientes de reacción está disponible en la técnica y cae dentro del alcance de las presentes enseñanzas.

En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden un adaptador de ligadura universal 5', un adaptador de ligadura universal 3', una férula de ligadura semidegenerada 5' y una férula de ligadura semidegenerada 3'. En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden además un par de cebadores directo y RT/inverso universales. En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden además un oligonucleótido de bloqueo. En ciertas realizaciones, dichas composiciones son composiciones de reacción.

En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden un cebador de RT universal que comprende una parte de poli(T), un adaptador de ligadura 3' universal y una férula de ligadura semidegenerada 3'. En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden además un par de cebadores directo e inverso universales. En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden un adaptador de ligadura 3' universal, una férula de ligadura 3' y un par de cebadores directo e inverso universales. En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden además un oligonucleótido de bloqueo. En ciertas realizaciones, dichas composiciones son composiciones de reacción.

En ciertas realizaciones, las presentes enseñanzas también proporcionan kits diseñados para acelerar la realización de ciertos métodos. En algunas realizaciones, los kits sirven para acelerar la realización de los métodos de interés al ensamblar dos o más componentes utilizados para llevar a cabo los métodos. En algunas realizaciones, los kits pueden contener componentes en cantidades unitarias previamente medidas para minimizar la necesidad de mediciones por parte de los usuarios finales. En algunas realizaciones, los kits pueden incluir instrucciones para realizar uno o más métodos de las presentes enseñanzas. En ciertas realizaciones, los componentes del kit están optimizados para funcionar conjuntamente entre sí.

En ciertas realizaciones, las presentes enseñanzas proporcionan un kit que comprende un adaptador de ligadura 5', un adaptador de ligadura 3', una férula de ligadura 5' y una férula de ligadura 3'. En ciertas realizaciones, las presentes enseñanzas proporcionan un kit que comprende un cebador RT universal que comprende una parte de poli(T), un adaptador de ligadura 3' y una férula de ligadura 3'. En ciertas realizaciones, los kits pueden comprender además una o más de una ligasa, una transcriptasa inversa y una ADN polimerasa. En algunas realizaciones, los kits pueden comprender un par de cebadores universales. En algunas realizaciones, los kits pueden comprender además pares de cebadores específicos para uno o más ARN pequeños maduros. En algunas realizaciones, los kits pueden comprender una pluralidad de pares de cebadores, en donde cada par de cebadores está en un recipiente de reacción de una pluralidad de recipientes de reacción. En algunas realizaciones, los kits pueden comprender una sonda detectora. En algunas realizaciones, la sonda detectora comprende un nucleótido del conector 5' o el conector 3' en el producto de amplificación o un nucleótido del complemento del conector 5' o 3' en el producto de amplificación y la sonda detectora además comprende un nucleótido de la región del extremo 3' del ARN pequeño maduro o un nucleótido de la región del extremo 5' del ARN pequeño maduro en el producto de amplificación o un nucleótido de la región del extremo 3' del ARN pequeño maduro o un nucleótido de la región del extremo 5' del complemento de ARN pequeño maduro en el producto de amplificación. En ciertas realizaciones, el kit puede comprender además un oligonucleótido de bloqueo.

Los métodos proporcionados en el presente documento son útiles para detectar o cuantificar ARN pequeño maduro en una muestra. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados se pueden usar para detectar y/o distinguir una especie específica de ARN pequeño maduro de entre otras especies de ARN pequeños en la muestra. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados se pueden usar para distinguir varios miARN entre sí en una muestra esencialmente de forma simultánea en un único ensayo. En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados pueden detectar cantidades muy bajas de ARN maduro pequeño en una muestra. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los métodos proporcionados pueden detectar menos de aproximadamente 1500 copias de un miARN en una muestra. En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados pueden detectar menos de aproximadamente 1000 copias, menos de aproximadamente 800 copias, menos de aproximadamente 600 copias, menos de aproximadamente 400 copias, menos de aproximadamente 300 copias, menos de aproximadamente 200 copias, menos de aproximadamente 100 copias, menos de aproximadamente 60 copias, menos de aproximadamente 30 copias de un miARN en una muestra. En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados pueden detectar tan poco como aproximadamente 20 copias hasta aproximadamente 1500 copias de un miARN en una muestra. Los intervalos de sensibilidad adicionales de ciertas realizaciones de los métodos proporcionados incluyen, pero no se limitan a, detección de aproximadamente 20 copias a aproximadamente 1000 copias, de aproximadamente 20 copias a aproximadamente 600 copias, de aproximadamente 20 copias a aproximadamente 300 copias, de aproximadamente 20 copias a aproximadamente 100 copias, y de aproximadamente 20 copias a aproximadamente 60 copias de un miARN en una muestra. En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados pueden detectar tan poco como: de aproximadamente 1000 copias a aproximadamente 1500 copias, de

aproximadamente 500 copias a aproximadamente 1000 copias, de aproximadamente 50 copias a aproximadamente 500 copias, de aproximadamente 50 copias a aproximadamente 200 copias, o de aproximadamente 50 copias a aproximadamente 100 copias de un miARN en una muestra. En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados pueden detectar tan poco como aproximadamente 600 copias de un miARN en una muestra. En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados pueden detectar tan poco como aproximadamente 60 copias de un miARN en una muestra.

En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados pueden detectar menos de aproximadamente 0.01 pM de un miARN en una muestra. En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados pueden detectar menos de aproximadamente 0.001 pM de un miARN en una muestra. En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados pueden detectar menos de aproximadamente 0.0001 pM de un miARN en una muestra. En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados pueden detectar en el intervalo de aproximadamente 0.0001 pM a aproximadamente 0.01 pM de miARN en una muestra. En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados pueden detectar en el intervalo de aproximadamente 0.0001 pM a aproximadamente 0.001 pM de miARN en una muestra. En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados pueden detectar en el intervalo de aproximadamente 0.001 pM a aproximadamente 0.01 pM de miARN en una muestra. En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados pueden detectar aproximadamente 0.01 pM de miARN en una muestra. En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados pueden detectar aproximadamente 0.001 pM de miARN en una muestra. En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados pueden detectar aproximadamente 0.0001 pM de miARN en una muestra. Según otra realización de las presentes enseñanzas, los métodos descritos en el presente documento se pueden usar en métodos de diagnóstico y/o pronóstico para identificar enfermedades y/o determinar la respuesta del paciente al tratamiento con ciertos fármacos, medicamentos o métodos de terapia. Una afección de ejemplo que se puede asociar con ARN pequeños maduros como el miARN es el cáncer. Por lo tanto, las presentes enseñanzas proporcionan un método para diagnosticar la susceptibilidad a un cáncer, el pronóstico del resultado para el tratamiento del cáncer o la etapa y/o identidad del cáncer basado en el perfil de miARN de la muestra.

Los métodos de pronóstico de las presentes enseñanzas son útiles para determinar si un paciente está en riesgo de recaída. La recaída del cáncer es una preocupación relacionada con una variedad de tipos de cáncer. Por ejemplo, de los pacientes sometidos a extirpación quirúrgica completa de cáncer de colon, 25-40% de los pacientes con carcinoma de colon en estadio II y aproximadamente 50% de los pacientes con carcinoma de colon en estadio III experimentan recaída del cáncer. Una explicación para la recaída del cáncer es que los pacientes con enfermedad en estadio relativamente temprano, por ejemplo, etapa II o etapa III, ya tienen pequeñas cantidades de cáncer diseminadas fuera del órgano afectado que no fueron extirpadas mediante cirugía. Estas células cancerosas, denominadas micrometástasis, generalmente no se pueden detectar con las pruebas disponibles actualmente.

Los métodos de pronóstico descritos en el presente documento se pueden usar para identificar pacientes tratados quirúrgicamente que tienen probabilidad de experimentar recaída del cáncer, de modo que se les pueden ofrecer opciones terapéuticas adicionales, incluyendo complementos preoperatorios o posoperatorios tales como quimioterapia, radiación, modificadores biológicos y otras terapias adecuadas. Los métodos son especialmente efectivos para determinar el riesgo de metástasis en pacientes que no demuestran metástasis medibles en el momento del examen o la cirugía.

Los métodos de pronóstico de acuerdo con ciertas realizaciones también son útiles para determinar un curso de tratamiento adecuado para un paciente que tiene cáncer. Un curso de tratamiento se refiere a las medidas terapéuticas tomadas para un paciente después del diagnóstico o después del tratamiento para el cáncer. Por ejemplo, una determinación de la probabilidad de recaída del cáncer, diseminación o supervivencia del paciente puede ayudar a determinar si se debe adoptar un enfoque más conservador o más radical de la terapia, o si se deben combinar las modalidades de tratamiento. Por ejemplo, cuando es probable la recaída del cáncer, puede ser ventajoso preceder o seguir el tratamiento quirúrgico con quimioterapia, radiación, inmunoterapia, terapia con modificadores de la respuesta biológica, terapia génica, vacunas y similares, o ajustar el período de tiempo durante el cual el paciente es tratado.

Los cánceres de ejemplo que se pueden evaluar usando un método como se describe en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, neoplasias hematopoyéticas, leucemia/linfoma de células T del adulto, neoplasias linfoides, linfoma anaplásico de células grandes, neoplasias mieloides, histiocitosis, enfermedades de Hodgkin (HD), leucemia/linfoma linfoblástico B (LLA) de precursores, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia/linfoma linfoblástico T (LLA) de precursores, síndromes mielodisplásicos, trastornos mieloproliferativos crónicos, leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño (SLL), leucemia mieloide crónica (CML), linfoma linfoplasmacítico, policitemia vera, linfoma de células del manto, trombocitosis esencial, linfoma folicular, mielofibrosis con metaplasia mieloide, linfoma de la zona marginal, leucemia de células pilosas, hemangioma, plasmacitoma/mieloma de células plasmáticas, linfangioma, glomangioma, linfoma difuso de células B grandes, sarcoma de Kaposi, hemanioendotelioma, linfoma de Burkitt, angiosarcoma, leucemia linfocítica crónica de células T, hemangiopericitoma, leucemia de linfocitos grandes granulares, cánceres de cabeza y cuello, carcinoma de células basales, micosis fungoides y síndrome de sezary, carcinoma de células escamosas, ceruminoma, linfoma de células T periféricas, osteoma, paraganglioma no cromafínico, linfoma angioinmunoblástico de células T, neurinoma acústico, carcinoma cístico adenoide, linfoma angiocéntrico, carcinoma mucopidermoide, linfoma de células NK/T, tumores mixtos malignos, linfoma intestinal de células T, adenocarcinoma, mesotelioma maligno, fibrosarcoma,

cáncer de pulmón tipo sarcomatoide, osteosarcoma, cáncer de pulmón tipo epitelial, condrosarcoma, melanoma, cáncer del tracto gastrointestinal, neuroblastoma olfatorio, carcinoma de células escamosas, plasmocitoma aislado, adenocarcinoma, papilomas invertidos, carcinoide, carcinoma indiferenciado, melanoma maligno, carcinoma mucoepidermoide, adenocarcinoma, carcinoma de células acinares, carcinoma gástrico, tumor mixto maligno, linfoma gástrico, tumores gástricos de células estromales, ameboblastoma, linfoma, odontoma, tumores intestinales de células estromales, cánceres de timo, timoma maligno, carcinoides, tipo I (timoma invasivo), mesoteliooma maligno, tipo II (carcinoma tímico), adenocarcinoma no productor de mucina, carcinoma de células escamosas, epiteliooma linfático, cánceres de hígado y vías biliares, carcinoma de células escamosas, carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma, colangiocarcinoma, hepatoblastoma, cáncer papilar, angiosarcoma, cáncer bronquioalveolar sólido, carcinoma fibrolamelar, carcinoma de células pequeñas, carcinoma de vesícula biliar, carcinoma de células intermedias, carcinoma de células grandes, carcinoma de células escamosas, cáncer indiferenciado, cáncer de páncreas, cáncer del tracto genital femenino, carcinoma de células escamosas, cistadenocarcinoma, carcinoma de células basales, insulinoma, melanoma, gastrinoma, fibrosarcoma, glucagonoma, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma embrionario, cáncer de riñón, rhabdomyosarcoma, carcinoma de células renales, carcinoma de células grandes, nefroblastoma (tumor de Wilm), carcinoma neuroendocrino o de células de avena, cáncer del tracto urinario inferior, carcinoma adenoescamoso, tumores uroteliales, carcinoma indiferenciado, carcinoma de células escamosas, carcinoma del tracto genital femenino, carcinoma mixto, adenoacantoma, sarcoma, carcinoma de células pequeñas, carcinosarcoma, leiomyosarcoma, sarcoma del estroma endometrial, cáncer del tracto genital masculino, cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, sarcoma, tumores endometrioides, sarcoma espermatocítico, carcinoma embrionario, celioblastoma, coriocarcinoma, teratoma, carcinoma de células claras, tumor de células de Leydig, carcinoma no clasificado, tumor de células de Sertoli, tumores de teca-granulosa, tumor de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma, carcinoma prostático indiferenciado, teratoma, carcinoma ductal transitorio, cáncer de mama, tumor filodes, cáncer de huesos, articulaciones y tejidos blandos, enfermedad de Paget, mieloma múltiple, carcinoma in situ, linfoma maligno, carcinoma invasivo, condrosarcoma, condrosarcoma mesenquimal, cáncer del sistema endocrino, osteosarcoma, adenoma, tumor de Ewing, carcinoma endocrino, tumor de células gigantes malignas, meningioma, adamantinoma, craneofaringioma, histiocitoma fibroso maligno, carcinoma papilar, histiocitoma, carcinoma folicular, fibroma dermoplásico, carcinoma medular, fibrosarcoma, carcinoma anoplásico, cordoma, adenoma, hemangioteliooma, memangiospericitoma, feocromocitoma, liposarcoma, neuroblastoma, paraganglioma, histiocitoma, cáncer pineal, rhabdomyosarcoma, pineoblastoma, leiomyosarcoma, pineocitoma, angiosarcoma, cáncer de piel, cáncer del sistema nervioso, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de estómago, melanoma, schwannoma, carcinoma de células escamosas, neurofibroma, carcinoma de células basales, tumor maligno de la vaina del nervio periférico, carcinoma de células de Merkel, tumor de la vaina, enfermedad de Paget extramamaria, astrocitoma, enfermedad de Paget del pezón, astrocitoma fibrilar, glioblastoma multiforme, glioma del tallo cerebral, linfoma cutáneo de células T, astrocitoma pilocítico, xantastrocitoma, histiocitosis, oligodendroglioma, ependimoma, gangliocitoma, neuroblastoma cerebral, neurocitoma central, tumor neuroepitelial disembrionoplásico, meduloblastoma, meningioma maligno, linfoma cerebral primario, tumor de células germinales cerebrales primarias, cánceres del ojo, carcinoma de células escamosas, carcinoma mucoepidermoide, melanoma, retinoblastoma, glioma, meningioma, cáncer del corazón, mixoma, fibroma, lipoma, fibroelastoma papilar, rasoiooma o angiosarcoma, entre otros.

Si bien las presentes enseñanzas se han descrito en términos de estas realizaciones de ejemplo, el experto en la técnica comprenderá fácilmente que son posibles numerosas variaciones y modificaciones de estas realizaciones de ejemplo sin experimentación excesiva. Todas esas variaciones y modificaciones están dentro del alcance de las enseñanzas actuales. Los aspectos de las presentes enseñanzas se pueden entender mejor a la luz de los siguientes ejemplos, que no deben considerarse como limitantes del alcance de las enseñanzas de ninguna manera.

Ejemplos

Ejemplo 1: análisis de miARN utilizando RT-qPCR basado en ligadura de doble extremo (método de 3 etapas)

Los ARN totales del cerebro humano se obtuvieron de Ambion® (Carlsbad, CA). El adaptador de ligadura, cebador y oligonucleótidos sintéticos se adquirieron en Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA). Los ensayos TaqMan® se obtuvieron del Laboratorio de expresión génica personalizada de Applied Biosystems®.

Reacción de ligadura

La reacción de ligadura se llevó a cabo para ligar los adaptadores de ligadura 5' y 3' al miARN en presencia de las férulas de ligadura 5' y 3' con segmentos salientes semidegenerados. La reacción de ligadura se llevó a cabo combinando los siguientes componentes:

2 µl 5 X mezcla de adaptador
5 µl 2 X tampón de ligadura
1 µl 10 X mezcla de enzimas de ligadura
2 µl de ARN total que varía de 2 pg a 20 ng
10 µl de volumen de reacción de ligadura total

La mezcla de reacción de ligadura se mezcló, se centrifugó brevemente y se incubó en un termociclador a 37°C durante 30 min.

Reacción de transcripción inversa

- 5 La etapa de transcripción inversa (RT) permite la síntesis de la primera cadena del ADNc a partir del producto de ligadura como molde. La reacción de RT se llevó a cabo combinando los siguientes componentes:

2 µl 10 X tampón de RT
4 µl de MgCl ₂ 25 mM
2 µl de DTT 0.1 M
1 µl de RNaseOUT™ 40 U/µl
0.2 µl de dNTP 100 mM
0.2 µl 100 x cebador de RT universal
0.5 µl de SuperScript™ III 200 U/µl
0,1 µl de agua exenta de nucleasas
10 µl de reacción de ligadura
20 µl de volumen de reacción de RT total

La reacción de RT se mezcló, se centrifugó brevemente y se incubó en un termociclador a 50°C durante 50 min, 85°C durante 5 min, mantenimiento a 4°C.

- 10 Reacción de preamplificación

La preamplificación (preamp) es una etapa opcional para aumentar la sensibilidad para la detección. La reacción de preamp se llevó a cabo combinando los siguientes componentes:

12.5 µl 2 X Mezcla maestra de preamp TaqMan®
2.5 µl 10 X cebadores universales de preamp
7.5 µl de agua exenta de nucleasas
2.5 µl de ADNc de la mezcla de reacción de RT
25 µl de volumen de reacción de preamp total

- 15 La reacción de preamp se mezcló, se centrifugó brevemente y se incubó en un termociclador a 95°C durante 10 min, seguido de 12 ciclos de (95°C durante 15 s, 60°C durante 2 min), seguido de 99°C durante 10 min y mantenimiento a 4°C.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- 20 Se llevó a cabo la PCR en tiempo real para la detección del miARN objetivo. Las reacciones de RT o preamp se diluyeron a 1:10, 1:50 o 1:100 en agua exenta de nucleasas. La reacción de PCR se preparó combinando los siguientes componentes:

10 µl 2x Mezcla maestra universal II de TaqMan®
1 µl 20x Ensayo de TaqMan®
4 µl de agua exenta de nucleasas
5 µl de reacción de RT o preamp diluida
20 µl de volumen de reacción de PCR total

La reacción de PCR se mezcló y se centrifugó brevemente. Las reacciones se realizaron con un sistema de PCR en tiempo real, tal como el Sistema de detección de secuencia ABI PRISM® 7900HT o el Sistema de PCR en tiempo real Viia™7. Los datos se analizaron de acuerdo con las especificaciones y directrices del instrumento.

- 25 Como se puede ver en la Figura 7, no se detectó o se detectó señal de fondo mínima cuando la muestra de miARN se sustituyó por agua exenta de nucleasas en la reacción de ligadura.

Como se puede ver en la Figura 8, la valoración del conjunto de moldes sintéticos que varía de 6×10^7 a 60 copias en la reacción de ligadura mostró al menos un intervalo dinámico lineal de 6 log y un límite de detección de 60 copias que es distinguible de la reacción que no es con molde.

5 Como se puede ver en la Figura 9, el gráfico de amplificación muestra el nivel de expresión de hsa-let-7a en el ARN total del cerebro humano, y una respuesta de valoración de la muestra que varía de 20 ng a 2 pg de ARN total en la reacción de ligadura.

10 La especificidad de la reacción se evaluó con experimentos de reactividad cruzada en los que se ensayó un ensayo con el miARN deseado, así como con el homólogo de miARN no deseado con solo un único apareamiento erróneo. Los datos mostraron una reactividad cruzada mínima para el ensayo hsa-let-7b TaqMan® con el molde hsa-let-7c y el ensayo hsa-let-7c TaqMan® con el molde hsa-let-7b. La alineación de la secuencia se muestra en la Tabla 1 a continuación para hsa-let-7b y hsa-let-7c (los nucleótidos variables se muestran en negrita):

Tabla 1

Secuencia	Ensayo	Molde	Reactividad cruzada
hsa-let-7b: UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEQ ID NO:1)	let-7b	let-7c	0%
hsa-let-7c: UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU (SEQ ID NO:2)	let-7c	let-7b	0.70%

15 Como se puede ver en la Figura 10, los datos de detección de miARN usando los ensayos y métodos descritos en el presente documento se compararon con los métodos de detección de miARN de una fuente interna (Proveedor 2) y dos fuentes externas (Proveedores 1 y 3). Cada método se llevó a cabo de acuerdo con las especificaciones y directrices del producto. La mayor sensibilidad se obtuvo utilizando los métodos de acuerdo con las presentes enseñanzas en relación con los otros métodos observados con 2.5 ng de ARN total (gráfico derecho), con la menor cantidad de variación (gráfico izquierdo).

20 Ejemplo 2: análisis de miARN utilizando RT-qPCR basado en ligadura de doble extremo (método de 2 etapas)

Los métodos de dos etapas se llevaron a cabo esencialmente como se describe en el Ejemplo 1, excepto que se combinaron las etapas de ligadura y RT o las etapas de RT y preamplificación.

25 El método combinado de ligadura/RT "2 en 1" se realizó combinando el miARN con los siguientes componentes: adaptador de ligadura 5', férula de ligadura 5', adaptador de ligadura 3', férula de ligadura 3', cebador RT/inverso universal, ligasa T4, tampón de reacción, SuperScript®III y agua exenta de nucleasas. La preamplificación y la PCR se llevaron a cabo como en el Ejemplo 1 con el producto de ligadura-RT. Como se puede ver en la Figura 11 en el método combinado de ligadura/RT de 2 etapas, la valoración del molde sintético mostró al menos un intervalo dinámico lineal de 4 a 5 log utilizando un ensayo de hsa-let-7a con oligonucleótido de bloqueo (rombos negros) o sin oligonucleótidos de bloqueo (cuadrados negros).

30 El método combinado de RT/preamp "2 en 1" se llevó a cabo combinando el producto de ligadura (reacción de ligadura como en el Ejemplo 1) con los siguientes componentes: cebador directo universal, cebador RT/inverso universal, SuperScript®III, mezcla maestra de reacción y agua exenta de nucleasas. La PCR se llevó a cabo como en el Ejemplo 1 con el producto RT/preamp. Como se puede ver en la Figura 12 en el método combinado de RT/preamplificación de 2 etapas, la valoración del molde sintético mostró al menos un rango dinámico lineal de 6 log utilizando un ensayo de hsa-let-7a.

35 Ejemplo 3: análisis de miARN utilizando RT-qPCR basado en ligadura de doble extremo (método de 1 etapa)

40 Se llevó a cabo un método "3 en 1" combinando el miARN con los siguientes componentes: un adaptador de ligadura de 5', una férula de ligadura de 5', un adaptador de ligadura de 3', una férula de ligadura de 3', cebador directo universal, cebador de RT/inverso universal, ligasa (ligasa T4), transcriptasa inversa (SuperScript® III) y ADN polimerasa AmpliTaq®Gold. La reacción se detuvo después de la RT calentando la mezcla a 99°C durante 10 minutos. Para la comparación, se usó un protocolo separado de ligadura y transcripción inversa (según los métodos convencionales) como control (Figura 13, rombos) para comparar el rendimiento del método 3 en 1 (Figura 13, cuadrados) usando 45 moldes de miARN. Como se puede ver en la Figura 13, ambos métodos son comparables.

45 Se usaron diluciones seriadas de 48 miARN molde para ensayar el método 3 en 1 en cuanto a la sensibilidad y el intervalo dinámico (véase la Figura 14). La preamp n° 1, 2 y 3 indicada a lo largo del eje x indica la cantidad diferente de cebadores de RT/inversos universales incluidos en la reacción 3 en 1. Una concentración de 0.5 µM de cebador de RT/inverso es la que mejor funciona. El intervalo dinámico lineal del método 3 en 1 tiene un intervalo dinámico lineal de 6 a 7 log.

Ejemplo 4: Bloqueo selectivo de la amplificación de fondo utilizando oligonucleótidos de bloqueo

50 Las secuencias del adaptador de ligadura universal facilitan la síntesis de ADNc en la RT y la preamplificación del

ADNc en la PCR utilizando cebadores universales. Para conducir la ligadura de los adaptadores de ligadura a miARN, se usa una cantidad en exceso de adaptadores de ligadura; por lo tanto, se puede producir la ligadura entre los dos conectores de ligadura como un subproducto de fondo no específico en los métodos descritos en el presente documento. Este fondo compromete la detección de transcripciones poco abundantes tanto en la qPCR como en el análisis de NGS y detección. Para reducir el fondo, se desarrollaron oligonucleótidos de bloqueo para suprimir selectivamente la amplificación del subproducto adaptador-adaptador en la etapa de preamplificación. Se usaron oligonucleótidos de ADN marcados en el extremo 5' o 3' con MGB, 2'-O-metil ARN y bloqueadores restrictivos de la amplificación dirigida a la secuencia (STAR) en las reacciones de preamplificación (véase la Figura 15). Se descubrió que la adición de dichos oligonucleótidos de bloqueo reduce drásticamente la amplificación de fondo y aumenta la sensibilidad de la detección del miARN por qPCR con los ensayos de qPCR de TaqMan®. Se espera que la aplicación de oligonucleótidos de bloqueo en la preparación de la biblioteca de secuenciación de nueva generación (NGS) para el análisis de ARN pequeños reduzca en gran medida el fondo y aumente la proporción de análisis de secuencia de miARN y los números efectivos de cobertura para secuencias de miARN.

El análisis de ARNm de ligadura de doble extremo se llevó a cabo esencialmente como se describe en el Ejemplo 1. Como se puede ver en la Figura 16, se generó una cantidad en exceso de subproducto de adaptador-adaptador de fondo en la qPCR (curva más a la izquierda) y secuenciación de nueva generación (curva más a la derecha). El ΔCt del miARN diana y el subproducto de fondo era de aproximadamente 18, lo que se traduce en que se introdujo más de 100 000 veces más fondo en el proceso.

Como se puede ver en la Figura 17, se mezcló un fondo artificial (53) o C. Lin 4 con adaptadores de ligadura 5' y 3' en una proporción de 10 000:1. Se añadieron oligonucleótidos de bloqueo durante la etapa de preamplificación. Se comparó el ΔCt de muestras con o sin bloqueadores. La línea superior (rombos sólidos) representa el desplazamiento del Ct de fondo: cuanto mayor sea el desplazamiento, mejor será la reducción del fondo. La línea inferior (cuadrados sólidos) muestra el cambio de Ct con oligonucleótidos de bloqueo: cuanto menor es el cambio, es mejor para mejorar la sensibilidad.

Las Figuras 17-18 muestran que los oligonucleótidos de bloqueo aumentan la sensibilidad de la detección de la qPCR a través de la reducción del fondo en muestras biológicas. Se usó el ARN total del cerebro humano en el ensayo de ligadura de doble extremo esencialmente como se describe en el Ejemplo 1. Se añadieron tres bloqueadores diferentes (oligonucleótido de bloqueo 3'-MGB, oligonucleótido de bloqueo 2'-O-metil ARN y oligonucleótido de bloqueo STAR) durante la preamplificación. La qPCR se realizó utilizando 45 ensayos TaqMan® contra 45 miARN. La Figura 18 muestra el aumento de la sensibilidad de cada ensayo de miARN con cada oligonucleótido de bloqueo. La Figura 19, el panel izquierdo muestra el porcentaje de reducción de la amplificación del subproducto de fondo usando los oligonucleótidos de bloqueo. La Figura 19, el panel derecho muestra el aumento promedio de la sensibilidad de detección en los 45 ensayos de miARN.

Las Figuras 20-22 muestran que los oligonucleótidos de bloqueo aumentan la sensibilidad de la secuenciación de nueva generación a través de la reducción en la formación de subproductos de fondo en muestras biológicas. El ARN total del cerebro humano se utilizó en el flujo de trabajo de NGS de RNASeq de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadieron dos oligonucleótidos de bloqueo diferentes (oligonucleótido de bloqueo 3'-MGB y oligonucleótido de bloqueo de 2'-O-metil ARN) a 2 μM o 4 μM durante la preamplificación de la biblioteca de ADNc. La qPCR se realizó utilizando 48 ensayos TaqMan® contra 48 miARN. La Figura 20 muestra el aumento de la sensibilidad de cada miARN con los diversos oligonucleótidos de bloqueo. La Figura 21 muestra el porcentaje de reducción en la formación de subproductos de fondo con cada oligonucleótido de bloqueo. La Figura 22 muestra el aumento promedio de la sensibilidad de detección en los 48 ensayos de miARN.

Tanto el análisis de miARN de ligadura de doble extremo usando qPCR como el análisis de secuenciación de nueva generación de miARN usaron oligonucleótidos de bloqueo para reducir la formación de subproducto de adaptador-adaptador ligado. Para el análisis de qPCR, tanto el oligonucleótido de bloqueo MGB como el oligonucleótido de bloqueo STAR mostraron mayor reducción de fondo (> 90%), pero el oligonucleótido de bloqueo de 2'-O-metil ARN mostró un aumento de sensibilidad mayor (media = 2.7 veces). Sin embargo, para el análisis de secuenciación de nueva generación, el oligonucleótido de bloqueo de 2'-O-metil ARN mostró la mayor reducción del fondo, mientras que el oligonucleótido de bloqueo de MGB (4 μM) mostró el mayor aumento en la sensibilidad (media = 9 veces) para la detección del miARN diana.

Ejemplo 5: análisis de miARN usando un ensayo basado en extensión de dos extremos

Se adquirieron adaptadores, cebadores y oligonucleótidos de miARN sintéticos de Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA). Los ensayos TaqMan® se obtuvieron del Laboratorio de expresión génica personalizada de Applied Biosystems®.

Reacciones de transcripción inversa y colas poliA

La primera cadena del ADNc se generó mediante una reacción de transcripción inversa (RT) y cola de poli A de un solo etapa. La reacción de poliadenilación y RT se realizó combinando 2 μl de 5x tampón de RT, 1 μl de SuperScript™ III 200 U/ μl , 3 μl de agua exenta de nucleasas y 4 μl de moldes de miARN sintético en el intervalo de 60 a 60

millones de copias en un volumen de reacción total de 10 µl. La mezcla de reacción se mezcló, se centrifugó brevemente y se incubó en un termociclador a 37°C durante 60 minutos, 95°C durante 5 min, mantenimiento a 4°C.

Reacción de ligadura

5 La reacción de ligadura se llevó a cabo para ligar el ADNc al adaptador de ligadura en presencia de férula de ligadura oligo con segmento saliente semidegenerado. La reacción de ligadura se llevó a cabo combinando los siguientes componentes: 1.5 µl de 10x mezcla de adaptador, 1.5 µl de 10x tampón de ligadura, 1.5 µl de 10x enzima de ligadura, 0.5 µl de agua exenta de nucleasas y 10 µl de ADNc de la reacción de RT y cola de poli A para un volumen total de reacción de ligadura de 15 µl. La reacción de ligadura se mezcló, se centrifugó brevemente y se incubó en un termociclador a 25°C durante 60 minutos, 65°C durante 10 min, mantenimiento de 4°C.

10 Reacción de preamplificación

La preamplificación (preamp) es una etapa opcional para aumentar la sensibilidad para la detección. La reacción de preamp se llevó a cabo combinando los siguientes componentes: 25 µl de 2x mezcla master de preamp de TaqMan®, 2.5 µl de 20x cebadores universales de preamp, 7.5 µl de agua exenta de nucleasas y 15 µl de ADNc ligado de la reacción de ligadura para una reacción total de preamp de 50 µl. La reacción de preamp se mezcló, se centrifugó brevemente y se incubó en un termociclador a 95°C durante 10 min, seguido de 12 ciclos de (95°C durante 15 s, 60°C durante 2 min), seguido de 99°C durante 10 min, y un mantenimiento a 4°C.

PCR

20 Se llevó a cabo la PCR en tiempo real (qPCR) para la detección de los miARN. Las reacciones de ligadura o reacciones de preamp se diluyeron a 1:4, 1:10, 1:50 o 1:100 en agua exenta de nucleasas. La reacción de PCR se preparó combinando los siguientes componentes: 10 µl de 2x mezcla master universal II de TaqMan®, 1 µl de 20x ensayo de TaqMan®, 4 µl de agua exenta de nucleasas y 5 µl de reacción de ligadura o preamp diluida para un total de 20 µl de volumen de PCR. La reacción de PCR se mezcló y se centrifugó brevemente. Las reacciones se realizaron con un sistema de PCR en tiempo real, tal como el Sistema de detección de secuencia ABI PRISM® 7900HT o el Sistema de PCR en tiempo real ViiA™7. Los datos se analizaron de acuerdo con las especificaciones y directrices del instrumento.

Como se puede ver en la Figura 23, la valoración del molde de miARN sintético que varía de 6×10^7 a 60 copias en la reacción de poliadenilación/RT mostró al menos un intervalo dinámico lineal de 6 log con sensibilidad de detección de 60 copias. La señal de fondo no era un problema, como se muestra en las reacciones sin molde. La inclusión de una etapa de preamplificación mejoró la sensibilidad de detección (véase la Figura 23, cuadrados cerrados).

30 Este método de análisis de miARN también se realizó con un bloqueador oligonucleótido presente en la reacción de ligadura. El bloqueador oligonucleótido tiene una estructura de horquilla y un poli(A) que contiene la parte de segmento saliente monocatenario en su extremo 3' como se representa en la Figura 15D. El bloqueador se puede hibridar con cualquier cebador de RT universal que no esté reasociado o no esté extendido. En consecuencia, el bloqueador oligonucleótido suprimiría la ligadura del adaptador de ligadura para liberar el cebador de RT universal.

35 Como se puede ver en la Figura 24, el uso de un bloqueador oligonucleótido en la reacción de ligadura aumentó la eficiencia de la amplificación para un número de copias bajo al reducir el subproducto de ligadura no específico.

Listado de secuencias

<110> WONG, Linda CHEN, Caifu WU, Yalei DONG, Shoulian Liu, Chunmei

40 <120> Captura, detección y cuantificación de ARN pequeño

<130> LT00641

<150> 61/721,968

<151> 02-11-2012

45

<150> 61/740,242

<151> 20-12-2012

<160> 2

50

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 22

55

<212> ARN

<213> Homo Sapien

<400> 1

	ugagguagua gguugugg uu	22
	<210> 2	
	<211> 22	
5	<212> ARN	
	<213> Homo Sapien	
	<400> 2	
10	ugagguagua gguuguaugg uu	22

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar un ARN pequeño maduro, comprendiendo el método:
proporcionar una muestra que comprende una molécula de ARN pequeño que comprende aproximadamente 20-30 nucleótidos que se ha procesado a partir de un precursor de ARN más grande (ARN pequeño maduro);
- 5 poliadenilar el extremo 3' del ARN pequeño maduro;
realizar la transcripción inversa del ARN pequeño maduro poliadenilado usando un cebador de transcripción inversa universal, de modo que se forma así un ADNc del ARN pequeño maduro, en donde el cebador de transcripción inversa universal comprende una parte de poli(T) y una parte de cola, en donde la parte de cola comprende una parte de cebador universal;
- 10 ligar un adaptador de ligadura universal al extremo 3' del ADNc en presencia de una férula de ligadura, en donde la férula de ligadura comprende una región terminal 3' que contiene de aproximadamente 3 nucleótidos a aproximadamente 6 nucleótidos que se hibridan con el extremo 3' del ADNc del ARN pequeño maduro y una región terminal 5' que se hibrida con el extremo 5' del adaptador de ligadura, de modo que se forma un producto de ligadura de ADNc;
- 15 amplificar el producto de ligadura de ADNc usando un par de cebadores directo e inverso universales para formar un producto de amplificación; y
detectar el producto de amplificación.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de poliadenilación y la etapa de transcripción inversa se llevan a cabo juntas en el mismo recipiente de reacción.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de ligadura y la etapa de amplificación se llevan a cabo juntas en el mismo recipiente de reacción.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el adaptador de ligadura universal se selecciona del grupo que consiste en un oligonucleótido de ADN y un oligonucleótido de ADN que comprende al menos un agente bloqueante.
- 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el adaptador de ligadura universal comprende la férula de ligadura y además comprende una estructura de horquilla en donde la parte de férula de ligadura es un segmento saliente monocatenario 3' que comprende de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 bases de nucleótidos que se hibridan con la región 3' del ADNc.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además añadir un oligonucleótido de bloqueo a la etapa de ligadura y/o amplificación.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la ligadura es catalizada por una ligasa, preferiblemente, en donde la ligasa es una ligasa dependiente de molde.
8. El método de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la férula de ligadura es semidegenerada.
9. Una composición que comprende:
35 un ADNc de una molécula de ARN pequeño que comprende aproximadamente 20-30 nucleótidos que se han procesado a partir de un precursor de ARN más grande (ARN pequeño maduro) que comprende una secuencia de cebador de transcripción inversa universal en el extremo 5', un adaptador de ligadura 3', una férula de ligadura 3', en donde la férula de ligadura comprende una región terminal 3' que contiene de aproximadamente 3 nucleótidos a aproximadamente 6 nucleótidos que se hibridan con el extremo 3' del ADNc del ARN pequeño maduro y una región
40 terminal 5' que se hibrida con el extremo 5' del adaptador de ligadura, una ligasa y un par de cebadores directo e inverso universales.
10. La composición de la reivindicación 9, en donde la férula de ligadura es semidegenerada.
11. La composición de la reivindicación 9 o 10, en donde el adaptador de ligadura 3' comprende la férula de ligadura y además comprende una estructura de horquilla en donde la parte de férula de ligadura es un segmento saliente monocatenario 3' que comprende de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 bases de nucleótidos que se
45 hibridan con la región 3' de un ADNc del ARN pequeño maduro.

Ensayo de ARN pequeño de ligadura de doble extremo

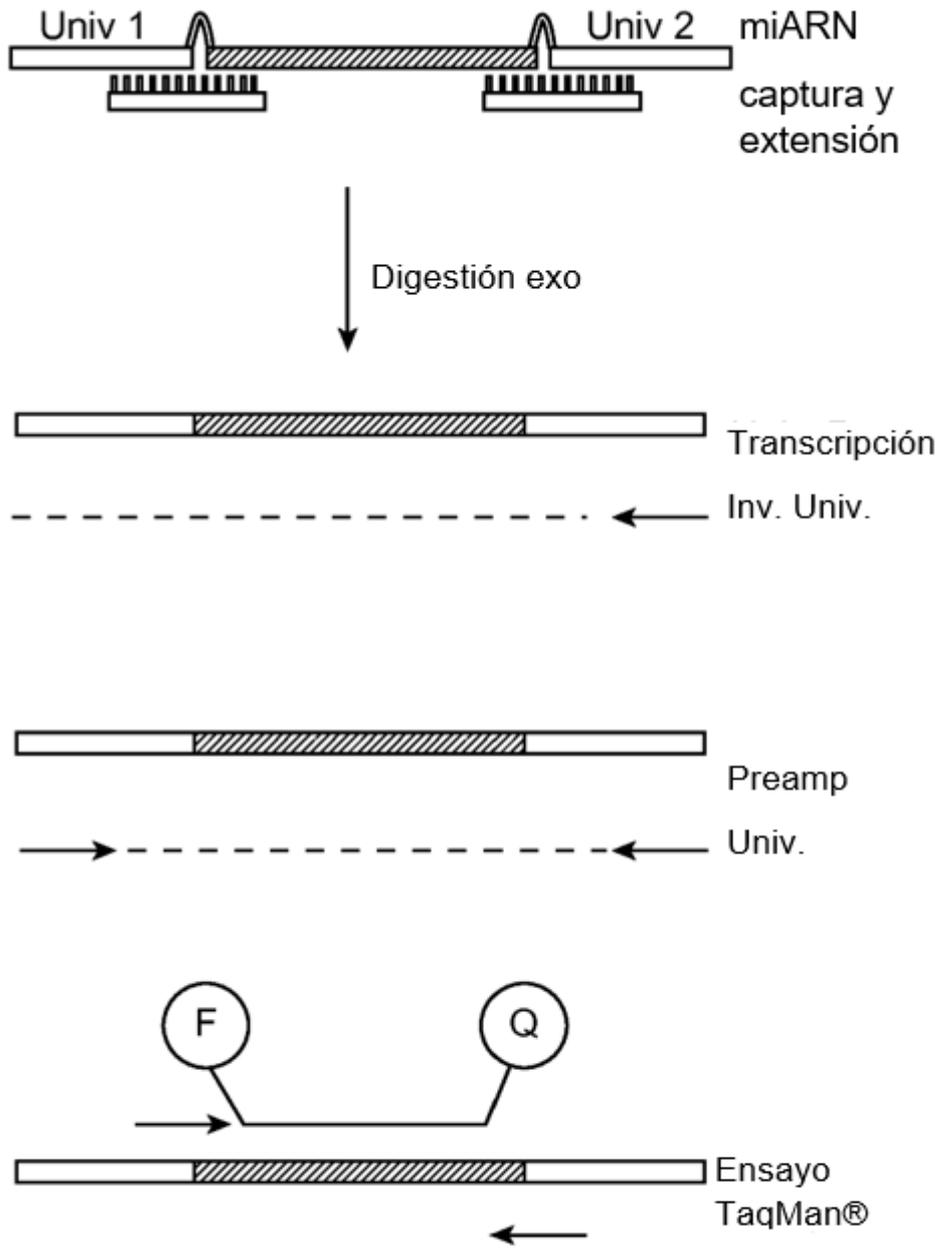


FIG. 1

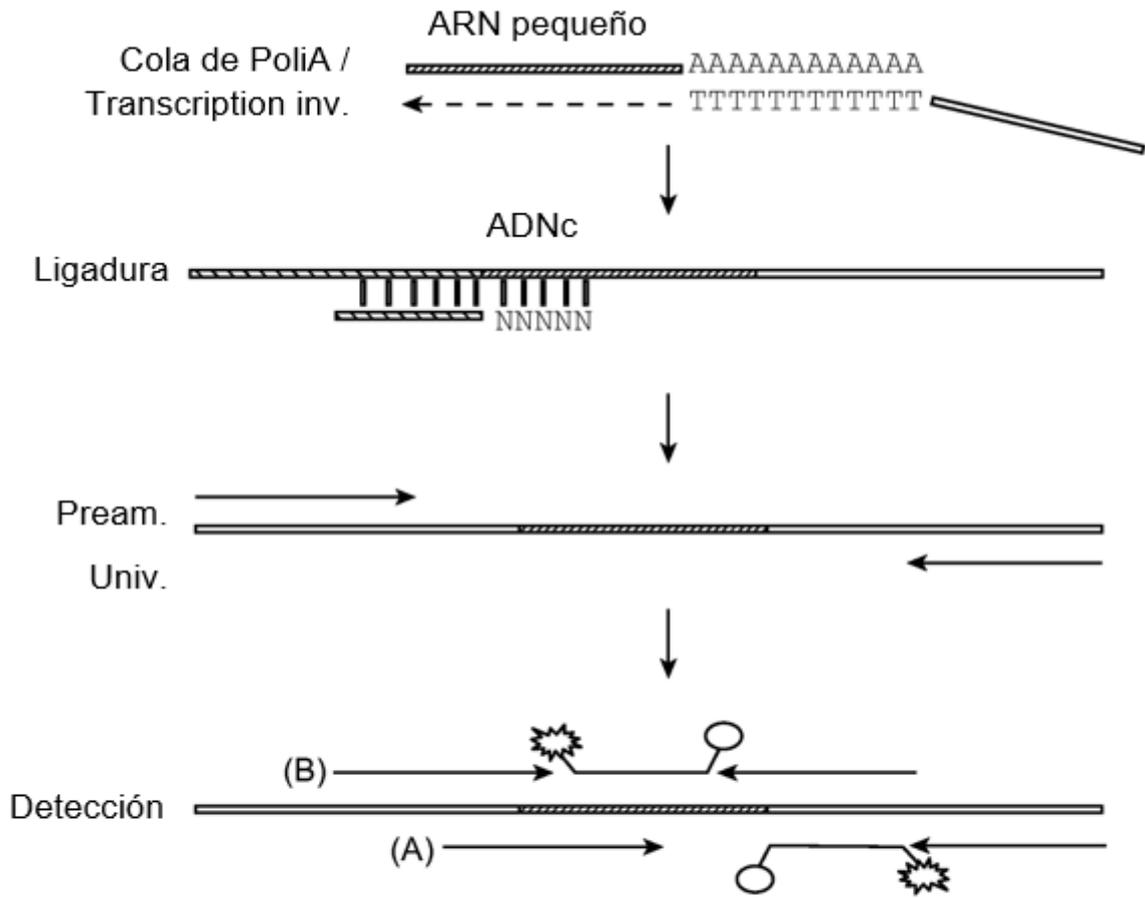


FIG. 2

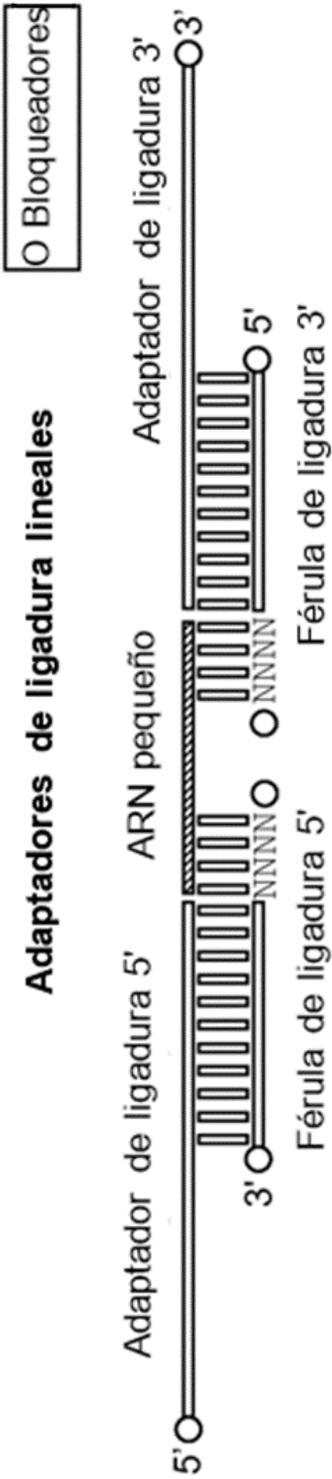


FIG. 3

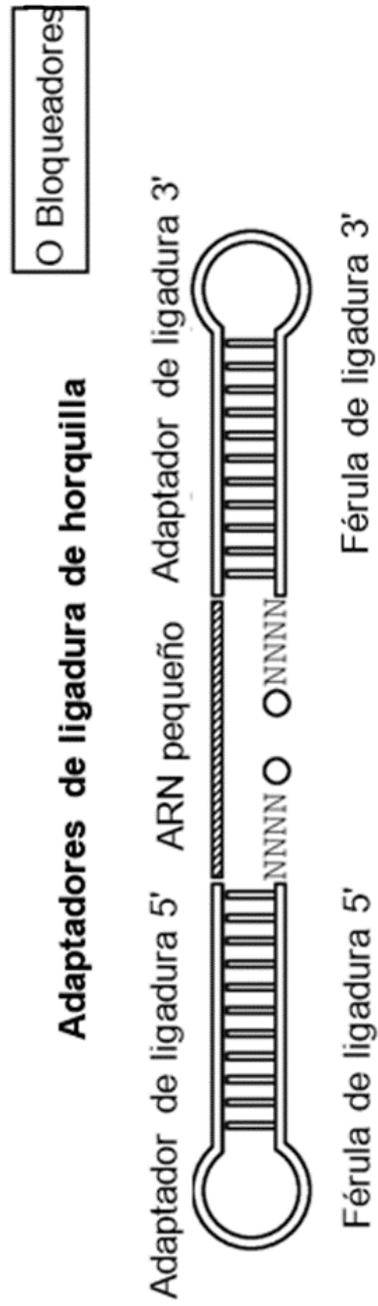


FIG. 4

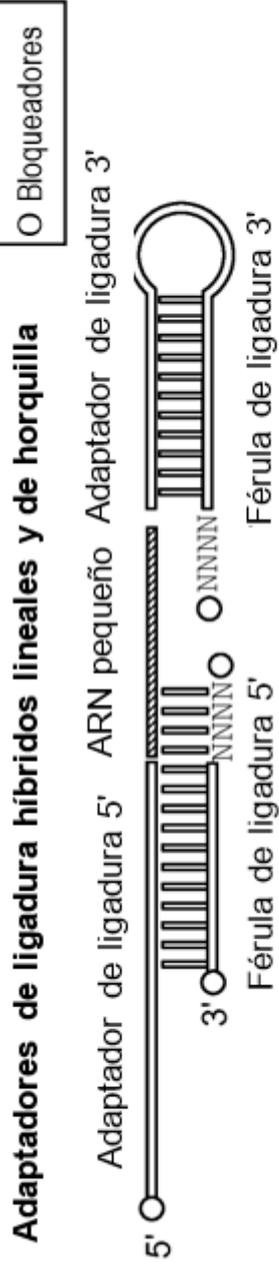


FIG. 5

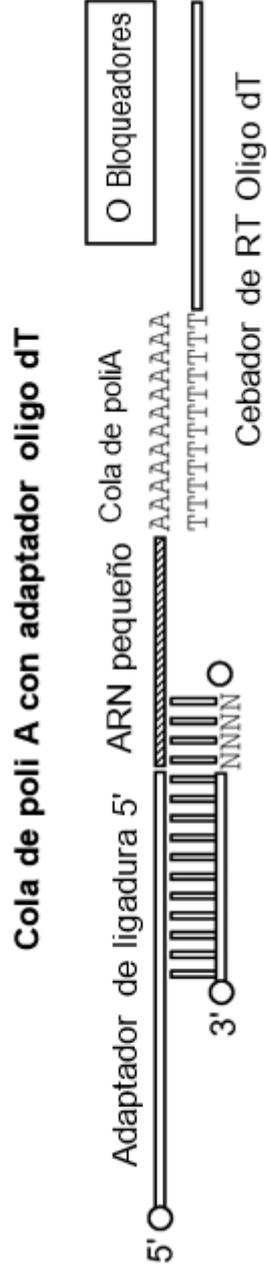


FIG. 6

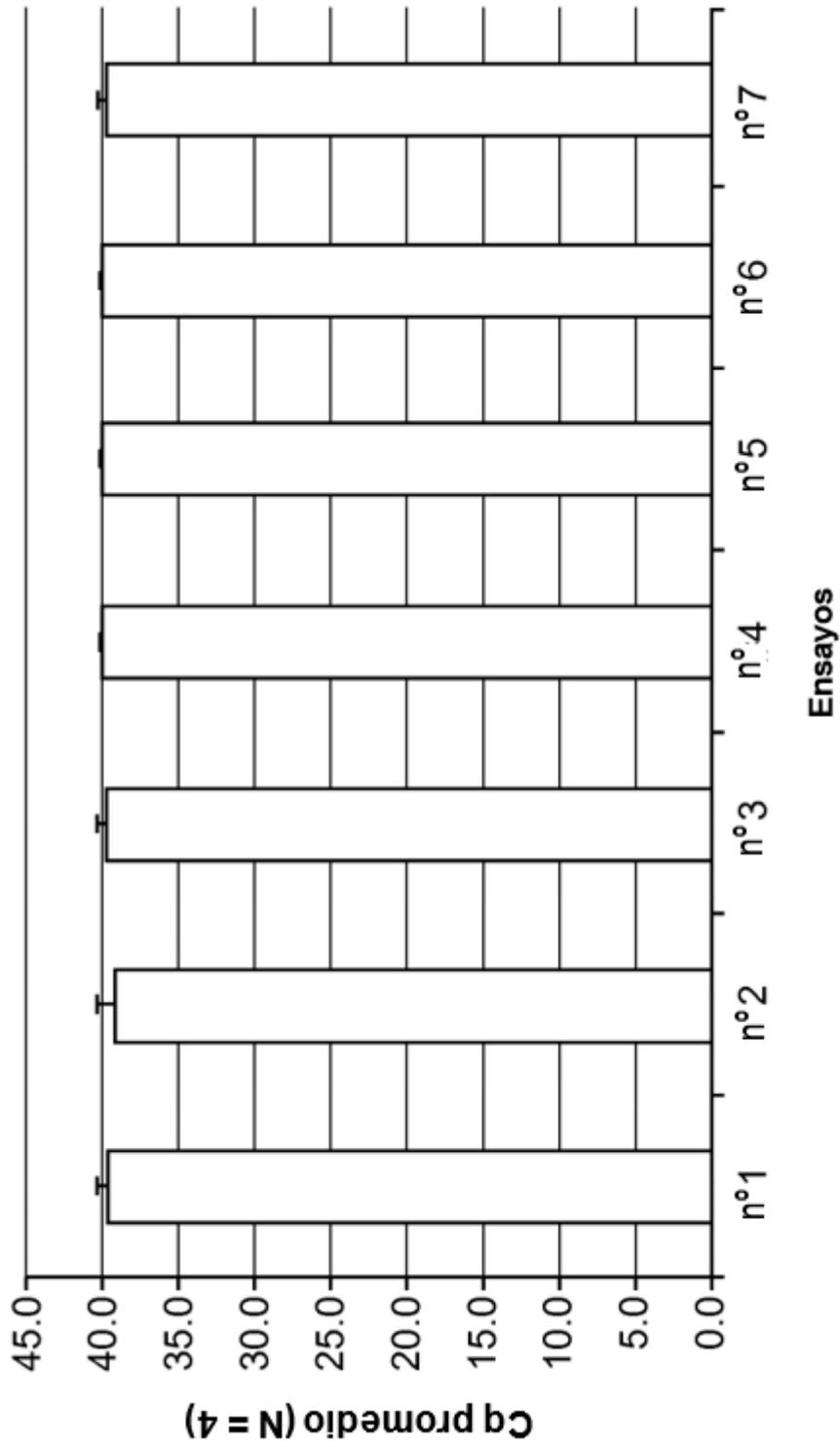


FIG. 7

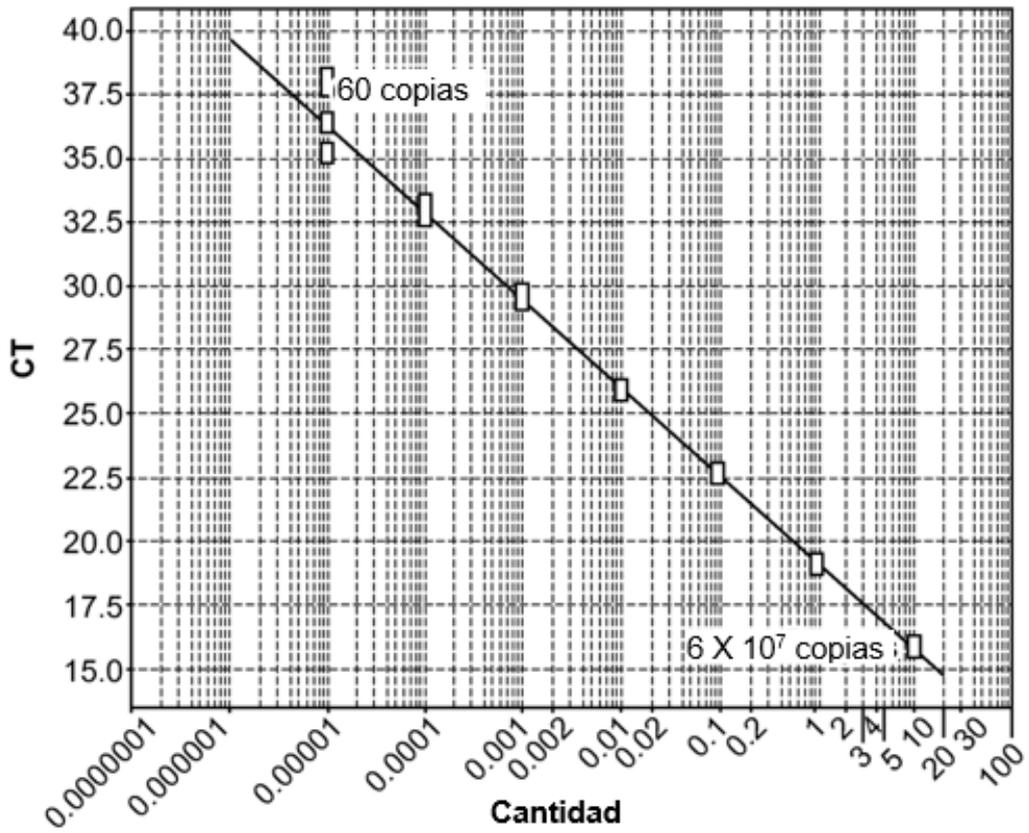
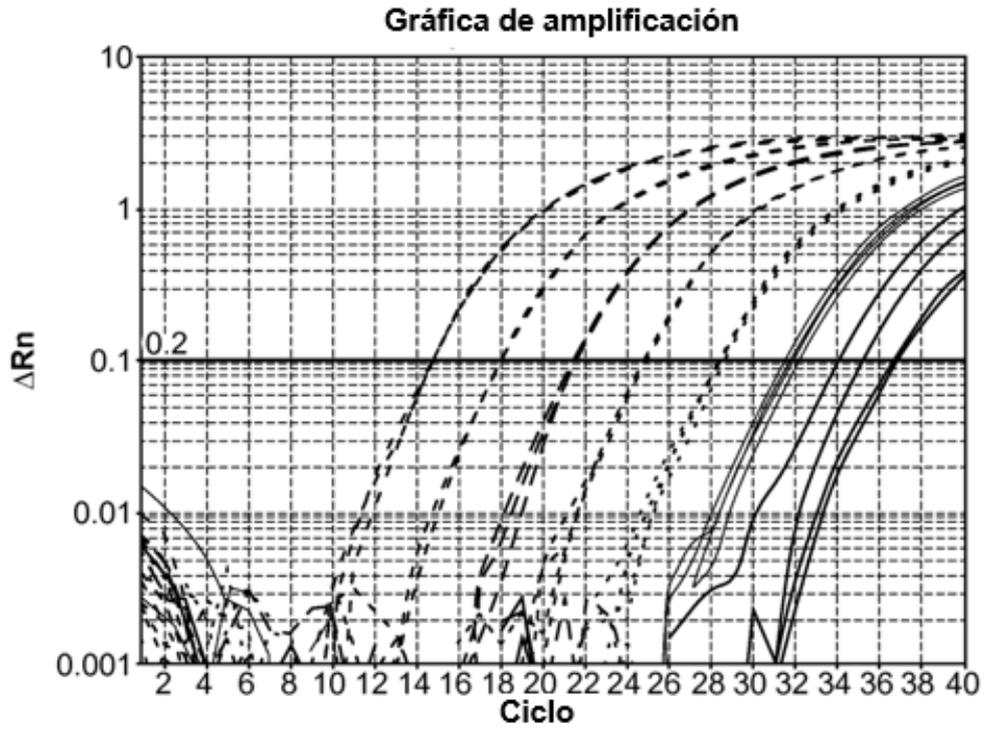


FIG. 8

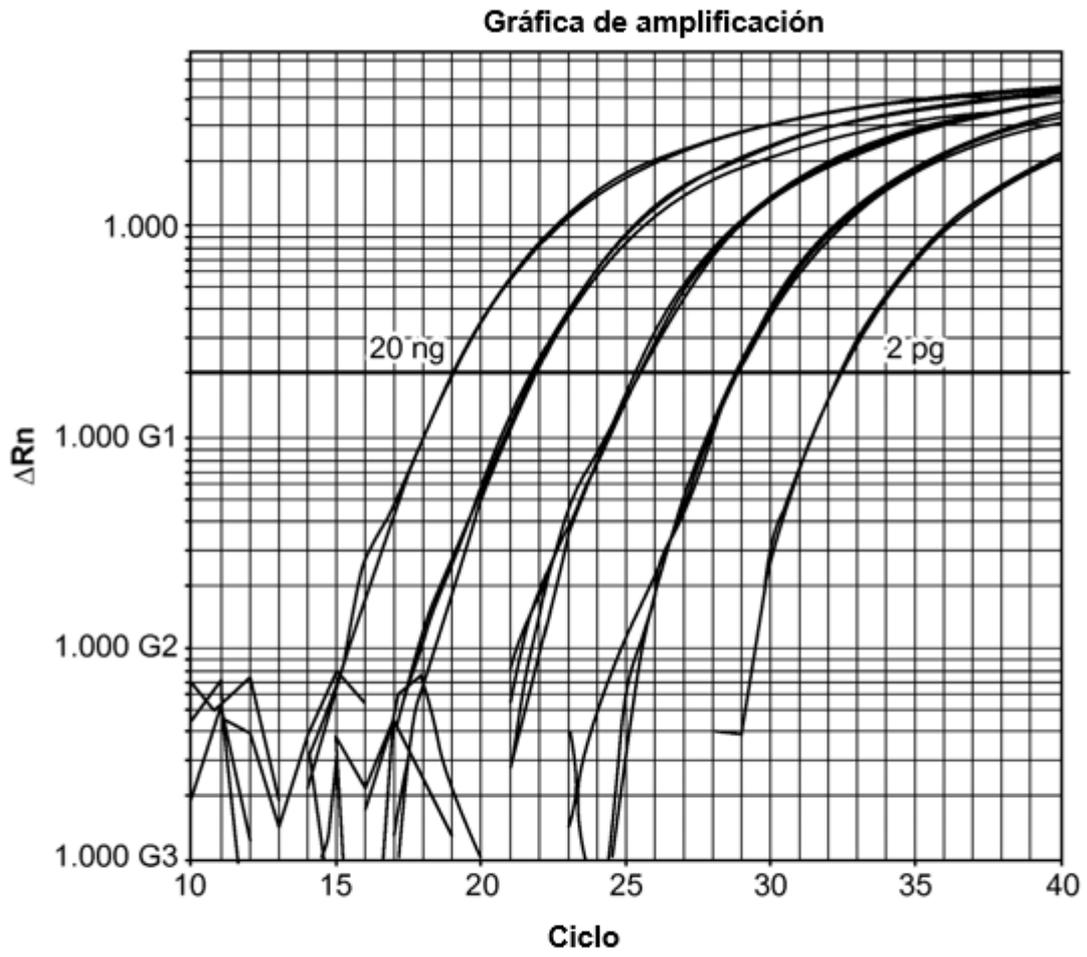


FIG. 9

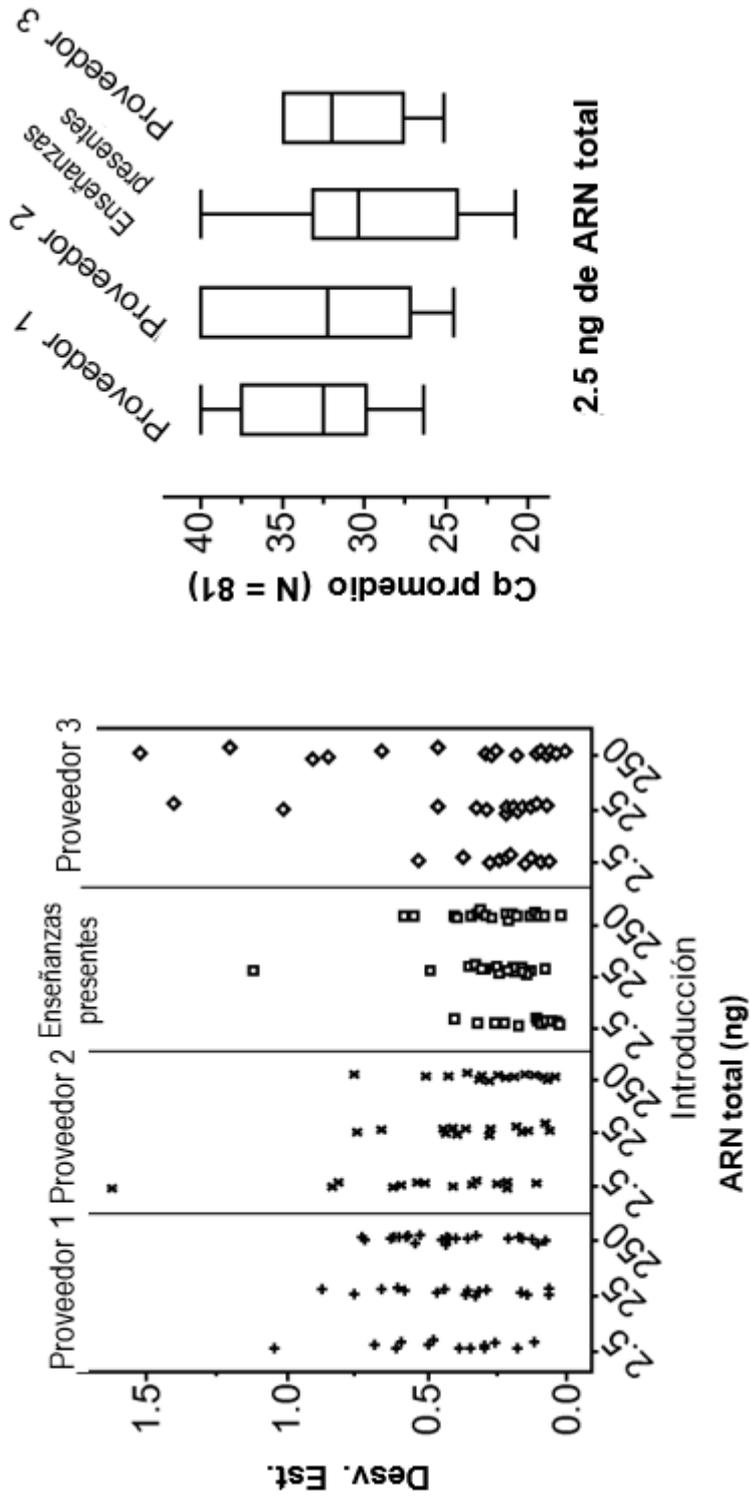


FIG. 10

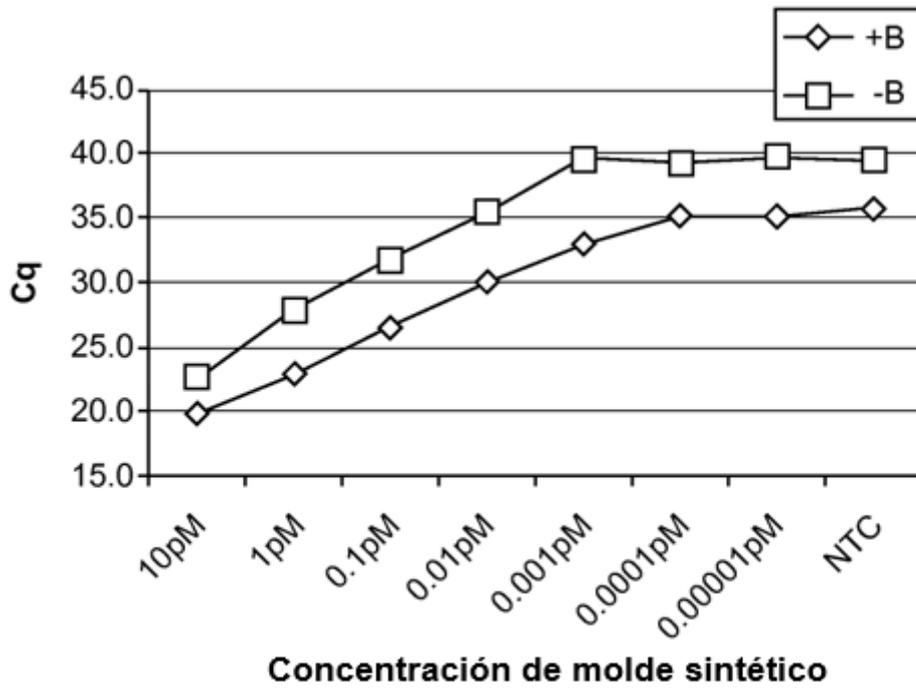


FIG. 11

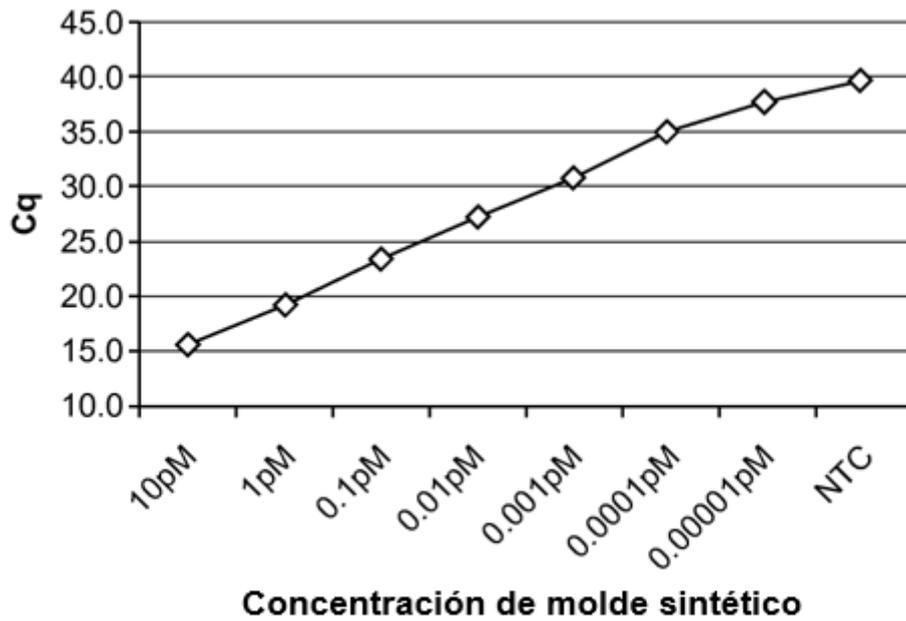


FIG. 12

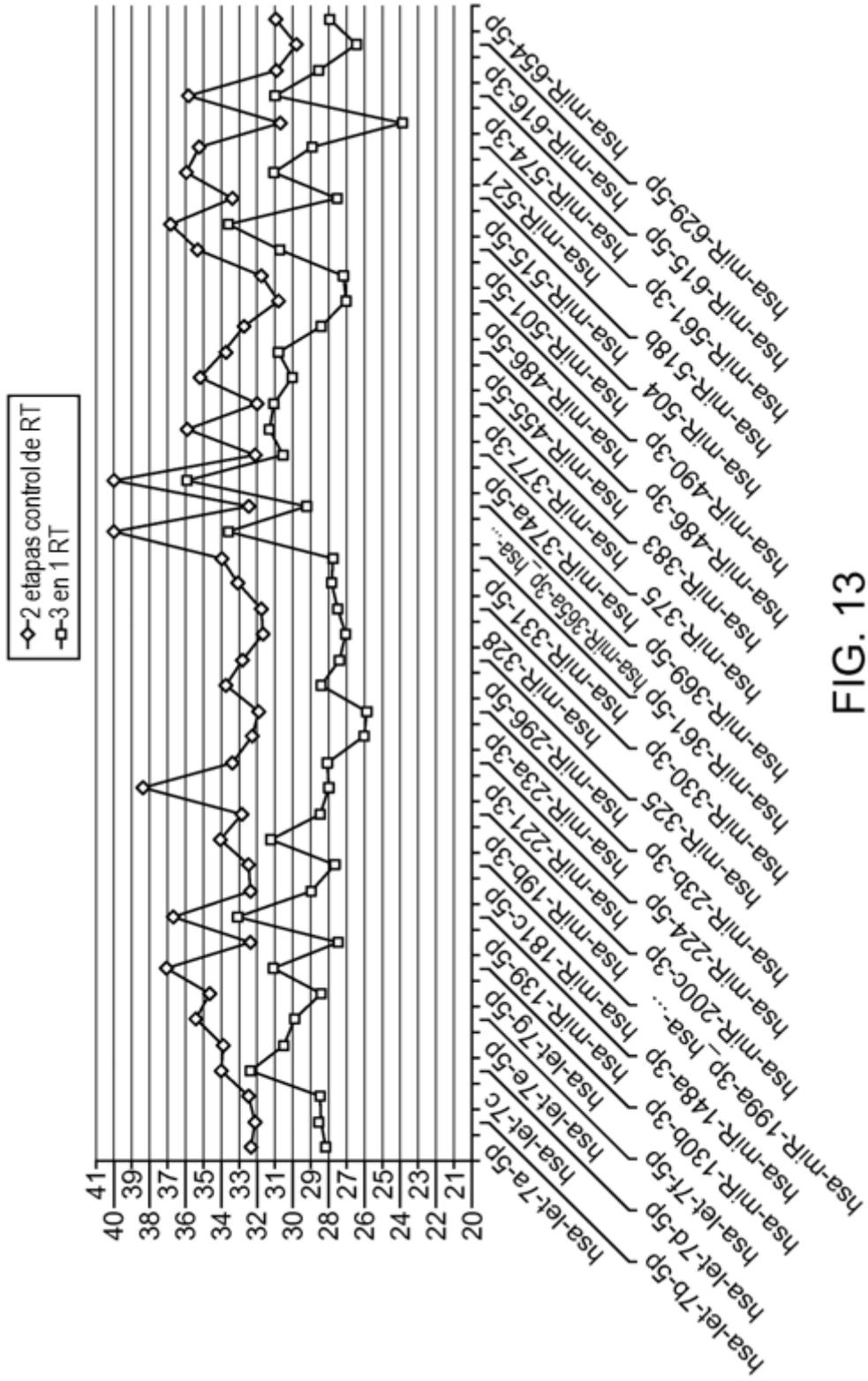
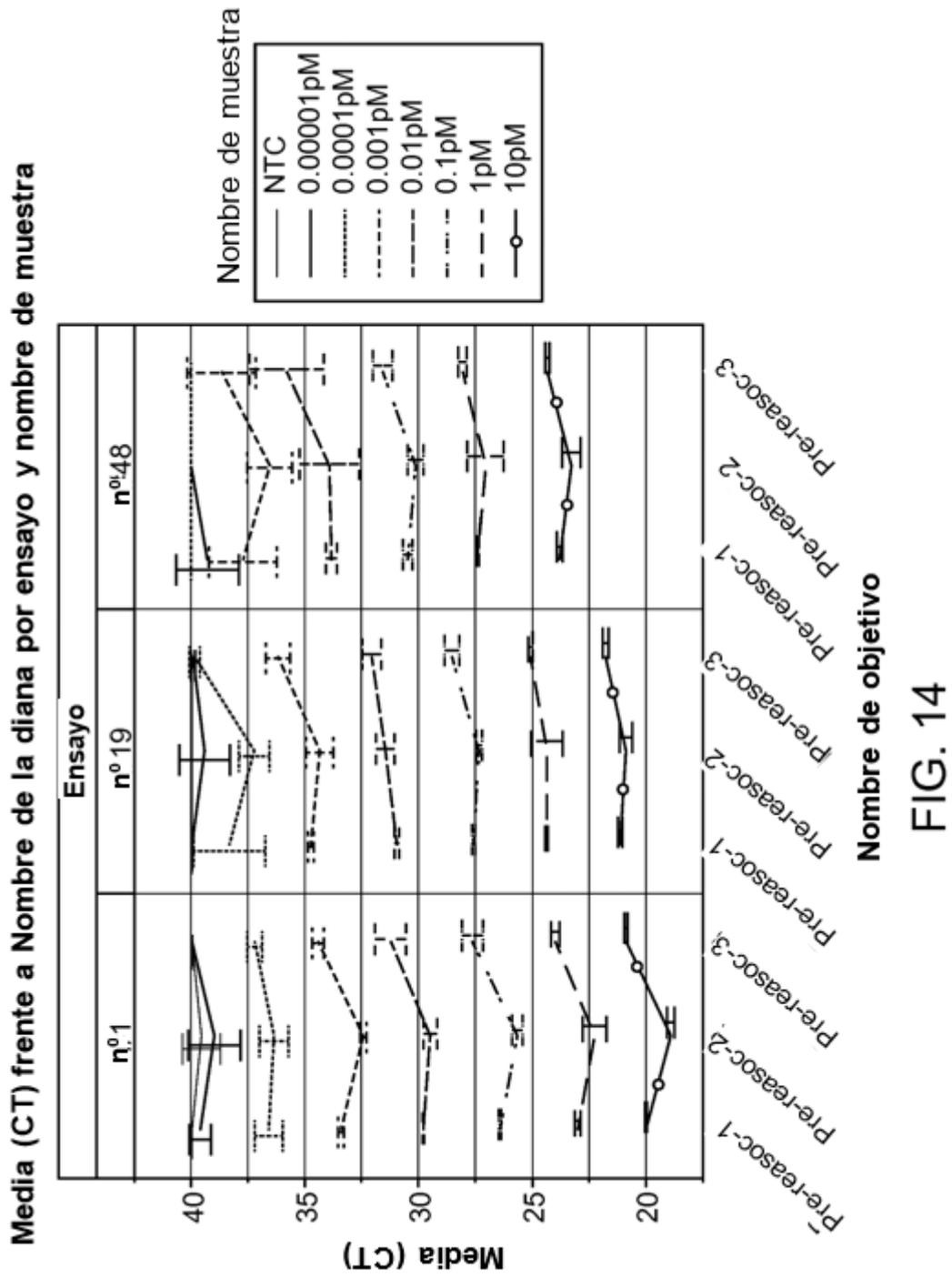
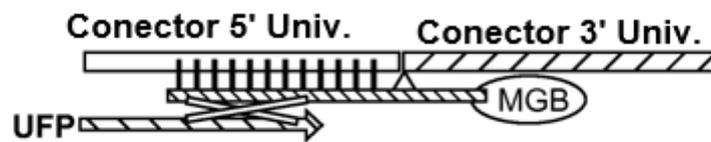


FIG. 13

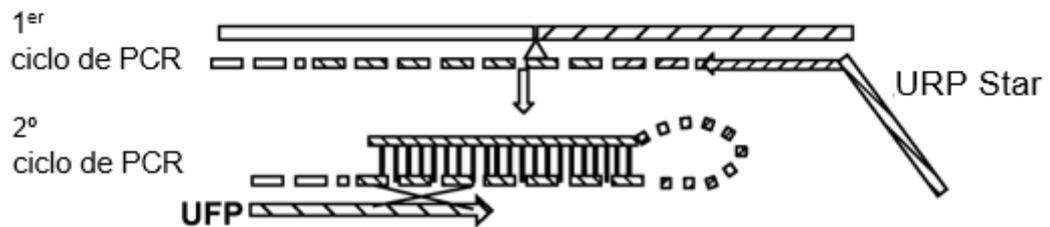


Estrategias de bloqueo de la señal de fondo

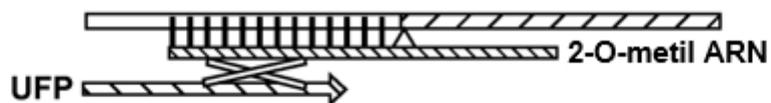
A. MGB



B. STAR (restricción de amplificación dirigida a la secuencia) URP/bloqueadores



C. 2-O-Metil ARN



D. Bloqueador de horquilla Poli(A)

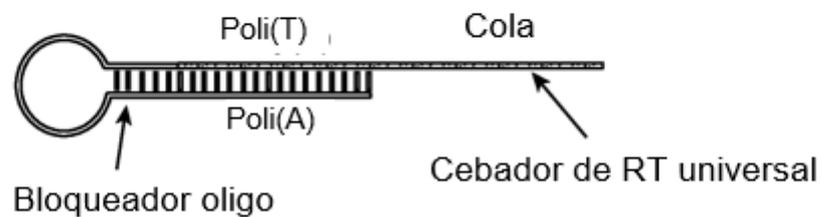


FIG. 15

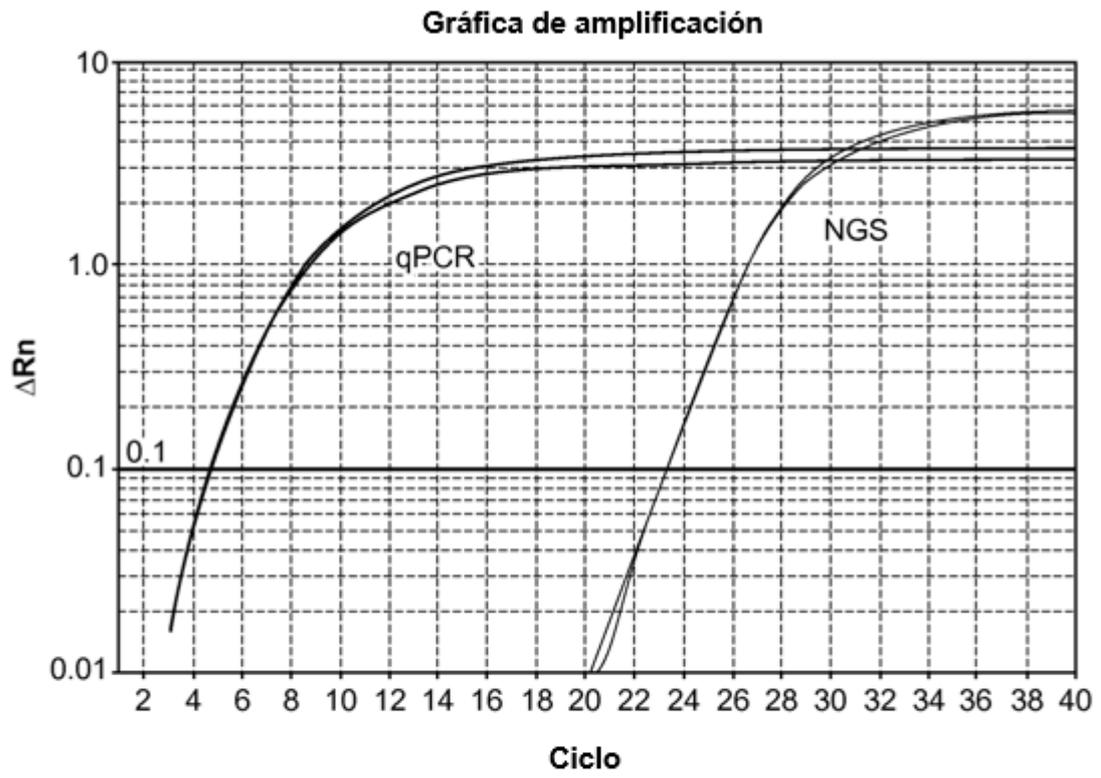


FIG. 16

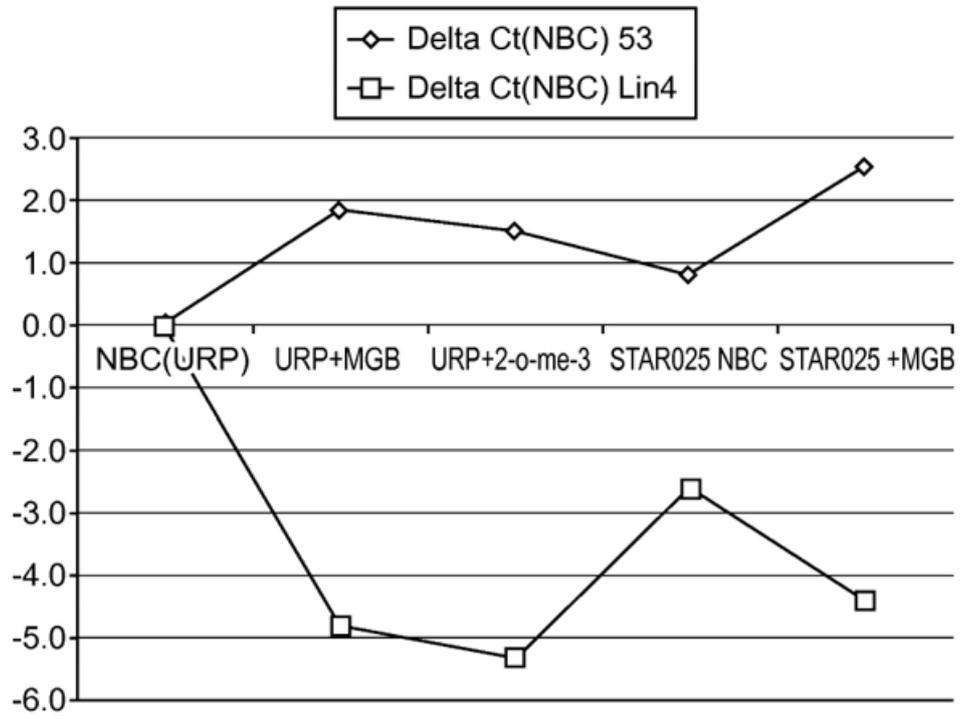


FIG. 17

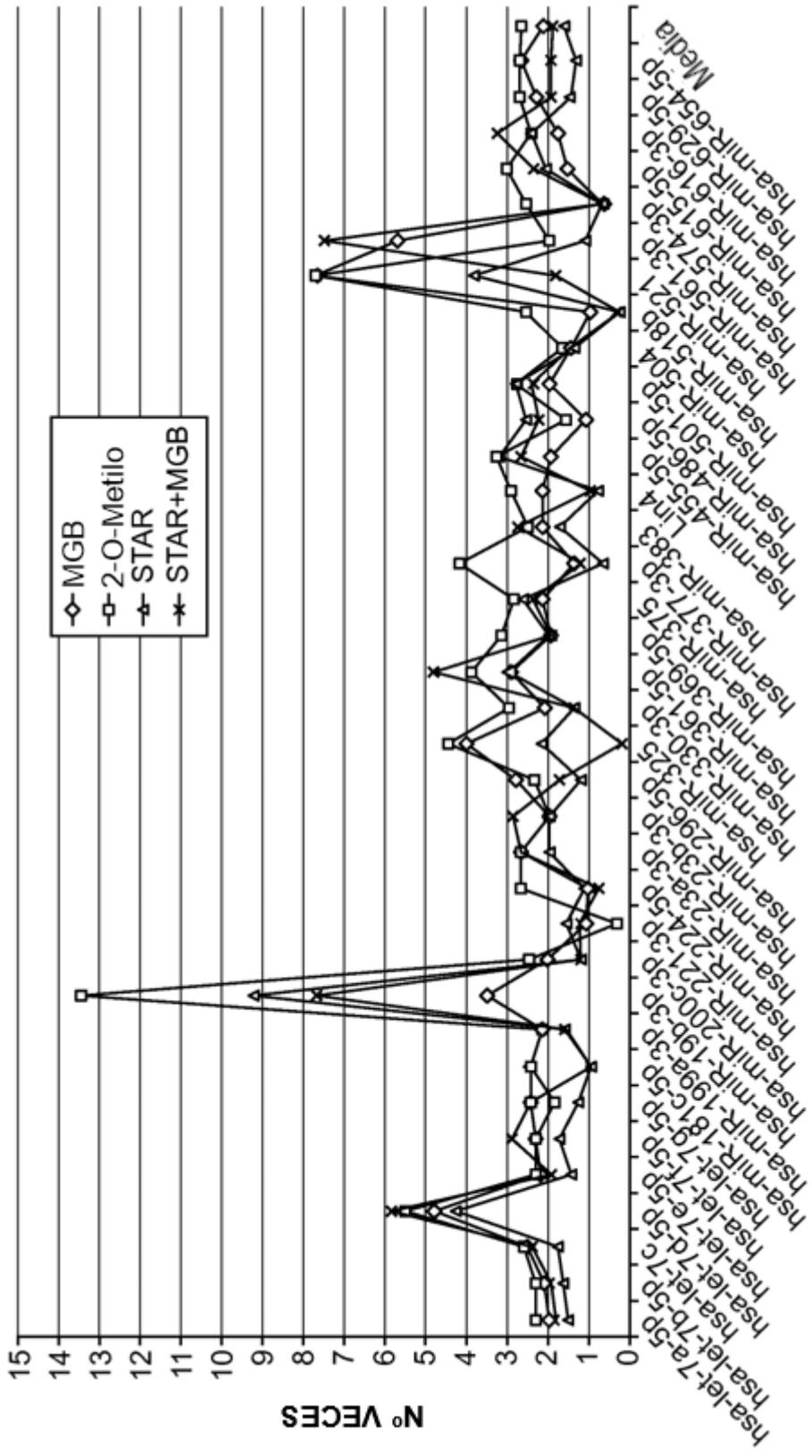


FIG. 18

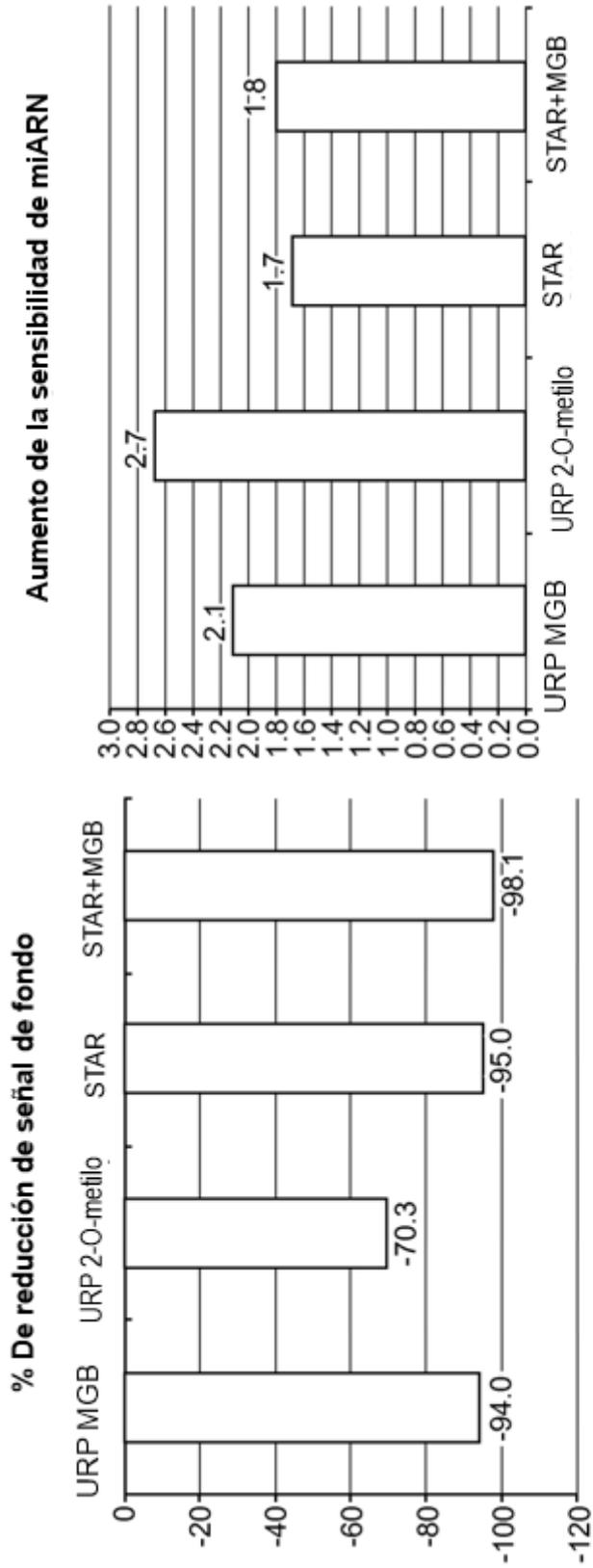


FIG. 19

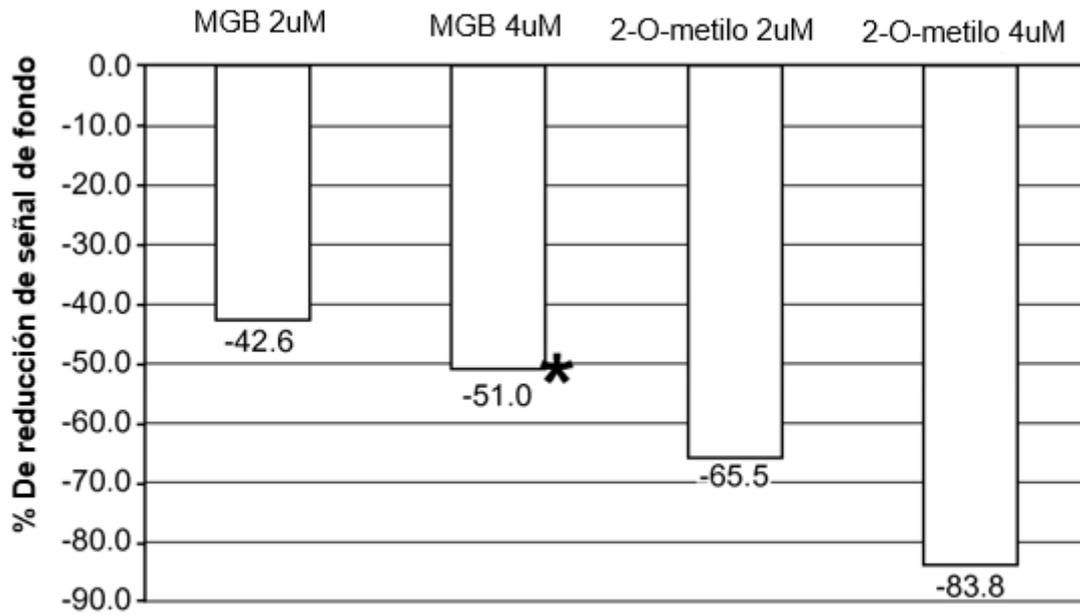


FIG. 21

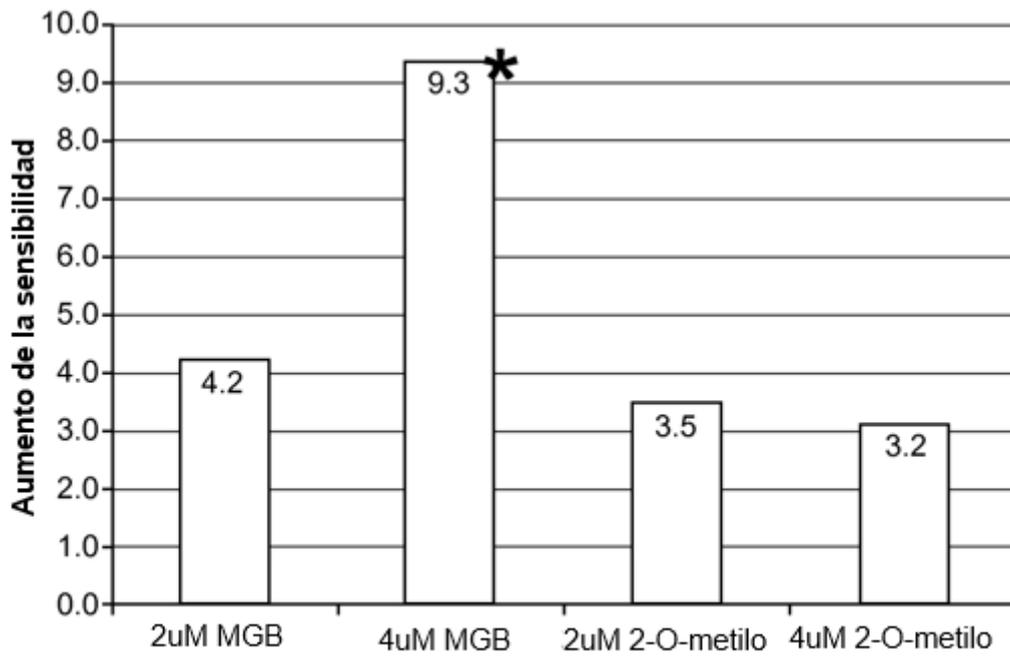


FIG. 22

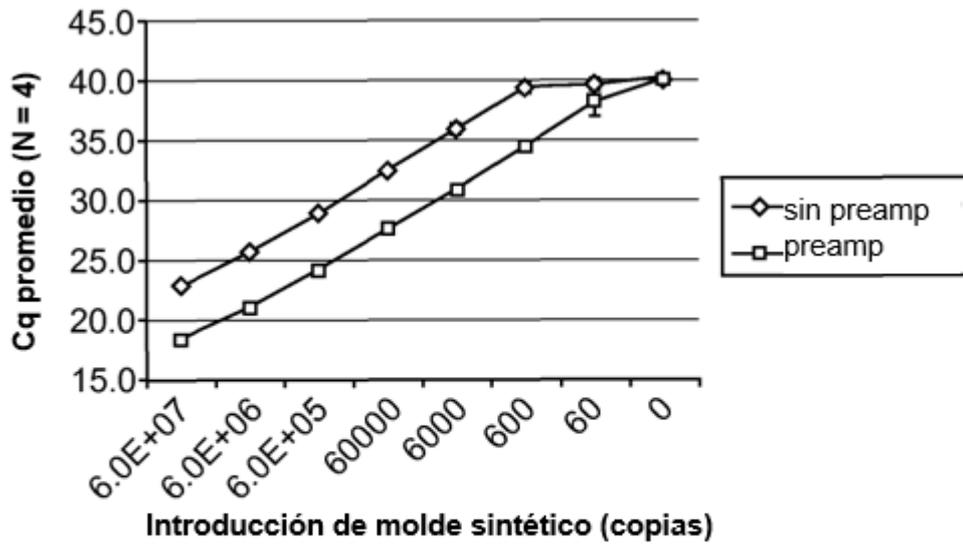


FIG. 23

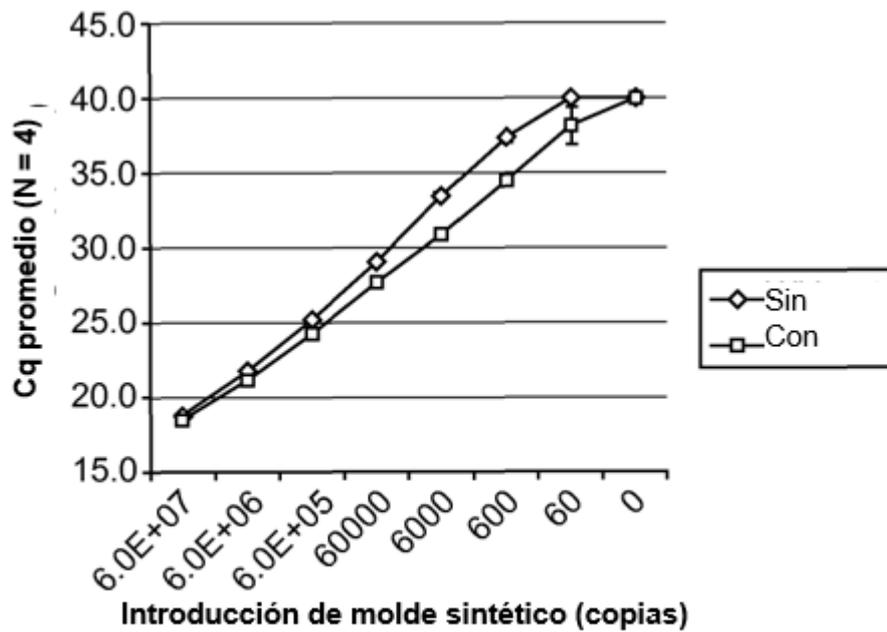


FIG. 24