

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 925**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2015** **PCT/US2015/027556**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015** **WO15164770**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2015** **E 15783787 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019** **EP 3134553**

54 Título: **Detección colorimétrica de amplificación de ácido nucleico**

30 Prioridad:

24.04.2014 US 201461983687 P

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

24.03.2020

73 Titular/es:

LUCIRA HEALTH, INC. (100.0%)
1412 62nd Street
Emeryville, CA 94608, US

72 Inventor/es:

MITRA, DEBKISHORE;
DIMOV, IVAN, KRASTEV y
WALDEISEN, JOHN, ROBERT

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 749 925 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Detección colorimétrica de amplificación de ácido nucleico

5 Listado de secuencias

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha presentado por vía electrónica en formato ASCII y que se incorpora por la presente por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 14 de abril de 2015, se denomina 28770PCT_CRF_sequencelisting.txt y tiene un tamaño de 5.524 bytes.

10

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

15

La invención se refiere a métodos y kits para la detección colorimétrica de productos de reacción de amplificación de ácido nucleico. En particular, la invención se refiere a la detección colorimétrica acelerada de productos de reacción de amplificación de ácido nucleico, usando una mezcla de reacción que incluye uno o más agentes halocrómicos.

Descripción de la técnica relacionada

20

Algunos métodos actuales para la detección de secuencias específicas de ácido nucleico y biomarcadores de ácido nucleico implican métodos de fluorescencia. Los cebadores de ADN están diseñados para amplificar secuencias de ácido nucleico de una muestra usando esquemas de amplificación de ácido nucleico tales como PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y LAMP (amplificación mediada por bucle). Por lo general, los amplicones resultantes se detectan y cuantifican mediante técnicas de fluorescencia usando un fluoróforo de intercalado o una sonda molecular. Sin embargo, estas técnicas requieren instrumentación sofisticada, que incluye componentes ópticos, una fuente de excitación y uno o más sensores para la detección de la emisión fluorescente. Estos instrumentos son potencialmente grandes, engorrosos y caros. De forma alternativa, los amplicones se pueden visualizar por vía colorimétrica usando geles de agarosa o ensayos de flujo lateral. Sin embargo, estas técnicas requieren etapas adicionales, que aumentan el tiempo hasta el resultado, y en algunos casos necesitan instrumentación tal como una caja de gel. El documento US 2014/057268 desde los métodos para detectar un producto de reacción de amplificación usando colorantes sensibles al pH.

25

30

Sumario de la invención

35

La protección buscada por la presente invención es como se definen las reivindicaciones. La presente invención se refiere a métodos y kits para la detección colorimétrica de un producto de la reacción de amplificación de ácido nucleico. Los métodos incluyen poner en contacto la muestra con una mezcla de reacción en condiciones tales que ocurre una reacción de amplificación de ácido nucleico y produce un producto de la reacción de amplificación de ácido nucleico si la muestra contiene una molécula molde de ácido nucleico diana. La mezcla de reacción incluye una enzima para catalizar la reacción de amplificación de ácido nucleico, y un agente halocrómico. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción incluye más de un agente halocrómico. La mezcla de reacción también incluye un tampón que tiene una capacidad de tamponamiento equivalente a la del tampón Tris a una concentración entre 1,5 mM-19 mM en una solución que tiene un pH de partida de 8,0. Si la molécula molde de ácido nucleico diana está presente, la reacción de amplificación de ácido nucleico cambia el pH de partida de la mezcla de reacción para producir un cambio colorimétrico detectable del agente halocrómico, indicando de ese modo la presencia del ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, el cambio colorimétrico detectable se cuantifica a una longitud de trayectoria óptica de 50 μ m. Si la molécula molde de ácido nucleico diana no está presente, la reacción de amplificación de ácido nucleico no genera un número de protones adecuado para cambiar lo suficiente el pH de partida de la mezcla de reacción para producir un cambio colorimétrico detectable del agente halocrómico, indicando de ese modo que el producto de la reacción de amplificación de ácido nucleico no se ha producido.

40

45

50

El kit incluye una enzima para catalizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, un agente halocrómico, and un tampón que tiene una capacidad de tamponamiento equivalente a la del tampón Tris a una concentración entre 1,5 mM-19 mM en una solución que tiene un pH de partida de 8,0. El kit además incluye instrucciones de uso que comprenden instrucciones para poner en contacto una muestra con una mezcla de reacción que incluye el tampón y la enzima y el agente halocrómico en condiciones en las que ocurre una reacción de amplificación de ácido nucleico y produce un producto de la reacción de amplificación de ácido nucleico si la muestra contiene una molécula molde de ácido nucleico diana, teniendo la mezcla de reacción un pH de partida. Si la molécula molde de ácido nucleico diana está presente, la reacción de amplificación de ácido nucleico cambia el pH de partida de la mezcla de reacción para producir un cambio colorimétrico detectable del agente halocrómico, indicando de ese modo la presencia del ácido nucleico diana. Si la molécula molde de ácido nucleico diana no está presente, la reacción de amplificación de ácido nucleico no genera un número de protones adecuado para cambiar lo suficiente el pH de partida de la mezcla de reacción para producir un cambio colorimétrico detectable del agente halocrómico, indicando de ese modo que el producto de la reacción de amplificación de ácido nucleico no se ha producido.

60

65

Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

Estas y otras características, aspectos, y ventajas de la presente invención se llegarán a entender mejor con respecto a la siguiente descripción, y los dibujos adjuntos, en los que:

La FIG. 1 muestra la secuencia de ADN de una región diana de molécula de ácido nucleico molde de *Schistosoma mansoni* (SEQ ID NO: 23), de acuerdo con una realización.

La FIG. 2 es un gráfico que indica mediciones de pH para reacciones de amplificación isotérmica positiva y negativa, de acuerdo con una realización.

La FIG. 3 es un gráfico que muestra la detección de color (tonalidad) de reacciones de amplificación isotérmica positiva y negativa en los puntos finales de la reacción, de acuerdo con una realización.

La FIG. 4 muestra los resultados de un ensayo de electroforesis en gel de productos de reacción de amplificación isotérmica positiva y negativa, de acuerdo con una realización.

La FIG. 5 muestra los valores de tonalidad normalizados para reacciones de amplificación usando diversas concentraciones de tampón Tris, de acuerdo con una realización.

La FIG. 6 muestra los valores de tonalidad normalizados para reacciones de amplificación usando cantidades variables de equivalentes de iones hidronio adicionales, de acuerdo con una realización.

Las FIGs. 7A, 7B, 7C, y 7D muestran los valores de tonalidad normalizados para reacciones de amplificación usando diversas concentraciones de agente halocrómico, de acuerdo con una realización.

La FIG. 8 muestra la compatibilidad de diferentes polimerasas con detección visual de la amplificación de LAMP, de acuerdo con una realización.

Las FIGs. 9A y 9B muestran los valores de tonalidad normalizados para reacciones de amplificación usando profundidades de canal variables, de acuerdo con una realización.

La FIG. 10 muestra los valores de tonalidad normalizados a lo largo del tiempo para SDA, de acuerdo con una realización.

La FIG. 11 muestra los valores de tonalidad normalizados a lo largo del tiempo para PCR, de acuerdo con una realización.

Las FIGs. 12A y 12B muestran los cambios de contraste normalizados para reacciones de amplificación usando combinaciones de agentes halocrómicos, de acuerdo con una realización.

La FIG. 13 muestra los cambios de contraste normalizados a lo largo del tiempo para diferentes concentraciones de molde de ADN, de acuerdo con una realización.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a kits y métodos para la detección colorimétrica de productos de reacción de amplificación de ácido nucleico. En algunas realizaciones, los productos de reacción de amplificación se detectan mediante una observación visual del cambio de color o midiendo la absorbancia o la fluorescencia del cambio de color de un agente halocrómico en la mezcla de reacción de amplificación.

Definiciones

Los términos usados en las reivindicaciones y en la memoria descriptiva se definen tal como se presenta a continuación a menos que se especifique de otro modo.

El término "colorimetría" o "colorimétrico" se refiere a técnicas de cuantificación u observación de otro modo de concentración de compuestos coloreados en solución. "Detección colorimétrica" se refiere a cualquier método de detección tal como de compuestos coloreados y/o el cambio de color de los compuestos en solución. Los métodos pueden incluir observación visual, mediciones de absorbancia, o mediciones de fluorescencia, entre otros.

La expresión "agente halocrómico" se refiere a una composición que cambia de color después de alguna reacción química. En particular, un agente halocrómico puede hacer referencia a una composición que cambia de color con un cambio de pH. Diferentes agentes halocrómicos pueden cambiar sus colores con respecto a diferentes intervalos de transición de pH.

La expresión "intervalo de pH de transición" o "intervalo de transición de pH" se refiere a un intervalo de pH con respecto al cual el color de una muestra o compuesto en particular cambia. Un intervalo de pH de transición específico para una muestra puede depender de un agente halocrómico en la muestra (véase anteriormente).

La expresión "amplificación de ácido nucleico" o "reacción de amplificación" se refiere a métodos de amplificación de ADN, ARN, o versiones modificadas de los mismos. La amplificación de ácido nucleico incluye varias técnicas, tal como una reacción isotérmica o una reacción de termociclado. De forma más específica, la amplificación de ácido nucleico incluye métodos tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), amplificación de polimerasa recombinasa (RPA), amplificación dependiente de helicasa (HDA), amplificación por desplazamientos múltiples (MDA), amplificación por círculo rodante (RCA), y amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos (NASBA). La expresión "amplificación isotérmica" se refiere a un método de amplificación que se lleva a cabo sin cambiar la

temperatura de la reacción de amplificación. Los protones se liberan durante una reacción de amplificación: para cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP) que se añade a un molde de ADN de una sola hebra durante una reacción de amplificación, se libera un protón (H^+).

- 5 La expresión "cantidad suficiente" se refiere a una cándida suficiente como para producir un efecto deseado, por ejemplo, una cantidad suficiente como para modular la agregación proteica en una célula.

La expresión porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o restos de aminoácido que son los mismos, cuando se comparan y se alinean para correspondencia máxima, tal como se mide usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias que se describen a continuación (por ejemplo, BLASTP y BLASTN u otros algoritmos disponibles para personas con experiencia) o mediante inspección visual. Dependiendo de la aplicación, el porcentaje de "identidad" puede existir con respecto a una región de la secuencia que se está comparando, por ejemplo, con respecto a un dominio funcional, o, de forma alternativa, existen con respecto a la longitud completa de las dos secuencias que se van a comparar.

Para comparación de secuencias, por lo general una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencias, si fuera necesario, y se diseñan parámetros del programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencias a continuación calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados.

El alineamiento óptimo de secuencias para comparación se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante la búsqueda con el método de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección visual (generalmente véase Ausubel *et al.*, mencionado a continuación).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y la similitud de secuencias es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). El software para llevar a cabo análisis con BLAST está disponible al público a través del National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Se debe indicar que, tal como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno" y "el" incluyen referentes en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo.

40 Composiciones de la invención

La presente invención se refiere a kits y métodos para la detección colorimétrica acelerada y eficaz de productos de reacción de amplificación de ácido nucleico. En una realización, se usa un ensayo colorimétrico para detectar por vía visual la presencia de un producto de ácido nucleico amplificado, que elimina la necesidad de instrumentación cara y sofisticada.

En algunas realizaciones, la detección colorimétrica de productos de amplificación se consigue mediante la amplificación de una molécula molde de ácido nucleico diana para obtener el producto de la reacción de amplificación de ácido nucleico. La reacción de amplificación incluye una mezcla de reacción. En una realización, la mezcla de reacción incluye una molécula molde de ácido nucleico, una o más enzimas para catalizar la reacción de amplificación, y uno o más agentes halocrómicos para detección colorimétrica. En una realización adicional, la mezcla de reacción también incluye un tampón que tiene una capacidad de tamponamiento equivalente a la del tampón Tris a una concentración entre 1,5 mM-19 mM en una solución que tiene un pH de partida de 8,0. En realizaciones adicionales, la mezcla de reacción también incluye una pluralidad de cebadores de ácido nucleico, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), sales adecuadas para la enzima, y otros compuestos químicos no tampón a los que permiten la amplificación de ácido nucleico.

Durante la reacción de amplificación, se libera un protón para cada dNTP que se incorpora en una molécula molde de ácido nucleico. Por lo tanto, el pH de la mezcla de reacción disminuye a través de la reacción de amplificación. En una realización, si el ácido nucleico diana está presente, la reacción de amplificación cambia el pH de partida de la mezcla de reacción para producir un cambio colorimétrico detectable del agente halocrómico, indicando de ese modo la presencia del ácido nucleico diana, y si el ácido nucleico diana no está presente, la reacción de amplificación no genera un número suficiente de protones para cambiar el pH de partida de la mezcla de reacción suficiente para producir un cambio colorimétrico detectable del agente halocrómico, indicando de ese modo que el producto de la reacción de amplificación de ácido nucleico no se ha producido. En una realización, el agente halocrómico (o indicador de pH) en la mezcla de reacción tiene un intervalo de pH de transición para un cambio

colorimétrico del agente halocrómico que es más estrecho que un cambio de pH esperado entre (1) un pH de partida de la mezcla de reacción antes de llevar a cabo la reacción de amplificación, y (2) un pH final de la mezcla de reacción después de que se haya llevado a cabo la reacción de amplificación.

En una realización, el agente halocrómico es un agente colorimétrico o un agente fluorescente. Los agentes halocrómicos adecuados incluyendo rojo fenol, púrpura de bromocresol, azul de bromotimol, rojo neutro, naftoftaleína, rojo cresol, cresoltaleína, fenoltaleína, rojo de metilo, y timoltaleína, entre otros. En la mezcla de reacción se puede usar un amplio intervalo de concentraciones de estos agentes halocrómicos. Diferentes agentes halocrómicos tienen diferentes intervalos de pH de transición. En algunas realizaciones, el agente halocrómico tiene un intervalo de pH de transición entre pH 5-10, entre pH 6-9, o entre pH 6.5-8.8. En otra realización, el agente halocrómico está aún a concentración entre 25-100 mM en la mezcla de reacción. En otra realización, el agente halocrómico está a una concentración entre 50-260 mM. En algunas realizaciones, una combinación de dos o más agentes halocrómicos se usa en la mezcla de reacción, que aumenta el cambio de contraste de color normalizado de la mezcla de reacción al ser colores complementarios al comienzo y colores similares al final de la reacción de amplificación. En una realización adicional, la combinación de agentes halocrómicos comprende rojo fenol y azul de bromotimol. En una realización adicional, la combinación de agentes halocrómicos comprende rojo cresol y azul de bromotimol.

En un ejemplo, el rojo fenol es un agente halocrómico que tiene un intervalo de pH de transición de aproximadamente 6,4-8,0. En el límite superior del intervalo de pH de transición, el rojo fenol es de color rojo, and y en el límite inferior del intervalo de pH de transición, el rojo fenol es de color amarillo. Una mezcla de reacción que contiene rojo fenol cambiará de color de rojo a amarillo a través de la reacción de amplificación, siempre y cuando el pH de partida de la mezcla de reacción sea aproximadamente o por encima de 8,0, y el pH final de la mezcla de reacción esté dentro del intervalo de pH de transición o aproximadamente o por debajo de 6,4.

En algunas realizaciones, el pH de partida de la mezcla de reacción se establece añadiendo un ácido o una base a la mezcla de reacción hasta que se alcanza el pH de partida deseado. El pH final de la mezcla de reacción se determina usando una muestra reacción de amplificación y midiendo el pH final (por ejemplo, con un electrodo de micro-pH). En una realización, el agente halocrómico para una reacción de amplificación se selecciona de modo que el intervalo de pH de transición permanece entre el pH de partida y el pH final. En una realización adicional, el agente halocrómico se selecciona de modo que el intervalo de pH de transición esté más cerca al pH de partida que al pH final. El agente halocrómico también se puede seleccionar basándose en la enzima en particular usada para catalizar la reacción de amplificación. Cerca del pH final, la enzima en la mezcla de reacción termina la polimerización de la reacción de amplificación a medida que el pH disminuye hasta concentraciones de H^+ desfavorables. En una realización, los iones hidronio o equivalentes de iones hidronio adicionales se añaden a la mezcla de reacción mediante la muestra. Por ejemplo, entre $4,8 \times 10^{-9}$ y $4,8 \times 10^{-18}$ se pueden tolerar equivalentes de iones hidronio adicionales por 10 μ l de mezcla de reacción para que la reacción de amplificación evolucione. En una realización adicional, se puede tolerar entre $4,8 \times 10^{-10}$ y $4,8 \times 10^{-18}$, $4,8 \times 10^{-12}$ y $4,8 \times 10^{-18}$, o entre $4,8 \times 10^{-15}$ y $4,8 \times 10^{-18}$.

Generalmente, la enzima catalizar a reacciones de amplificación dentro del intervalo de pH que incluya o que esté cerca del intervalo de pH de transición del agente halocrómico seleccionado. Para la reacción se pueden usar diversas enzimas, y diferentes enzimas catalizan reacciones de amplificación a diferentes intervalos de pH. Por ejemplo se cree que la Bst polimerasa cataliza reacciones de amplificación dentro del intervalo de pH de 6,6-9,0. El pH de partida preferente para la Bst polimerasa es mayor que 7, más preferentemente mayor que 8,2, y más preferentemente es de 8,8. Otros ejemplos de un pH de partida preferente para la Bst polimerasa se encuentran en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.830.714, presentado el 17 de abril de 1996. En una realización, el rojo fenol se acopla con la Bst polimerasa en una mezcla de reacción, ya que el intervalo de pH en el que la Bst polimerasa es activa (6,6-9,0) incluye el intervalo de pH de transición del rojo fenol (6,4-8,0). En otra realización, el rojo de metilo se acopla con el fragmento U exo-Klenow (polimerasa para Amplificación Dependiente de Helicasa, HDA) en una mezcla de reacción, ya que un pH de partida al que es activo el fragmento U exo-Klenow (aproximadamente se 7,5) es mayor que el intervalo de pH de transición del rojo de metilo (4,8-6,2).

Además de la Bst o Bst 2.0 polimerasa, otras enzimas que se pueden usar para catalizar la reacción de amplificación incluyen la polimerasa de *Thermus aquaticus* (TAQ), ADN polimerasas I-IV, Kapa Polimerasa, ARN polimerasas I-V, T7 ARN Polimerasa, una transcriptasa inversa, cualquier ADN polimerasa o ARN polimerasa, una helicasa, una recombinasa, una ligasa, una endonucleasa de restricción, y una proteína de unión de una sola hebra. En algunas realizaciones, una reacción de amplificación isotérmica usa una enzima que es una polimerasa de desplazamiento de hebra, tal como phi29-ADN-Polimerasa, Klenow ADN-Polimerasa, Vent ADN Polimerasa, Deep Vent ADN Polimerasa, Bst ADN Polimerasa, 9oNm(TM) ADN Polimerasa, fragmento U exo-Klenow, o mutantes y variantes de los mismos. En algunas realizaciones, las aves adecuadas para la enzima también se añaden a la mezcla de reacción. En ciertas realizaciones, el pH de partida de la mezcla de reacción se establece basándose en un pH óptimo para la enzima especificada usada para catalizar la reacción de amplificación. En una realización, el pH de toda la muestra de ADN está entre pH 3 y pH 11.

En otras realizaciones, un agente halocrómico fluorescente se usa para detectar protones liberados durante la

amplificación. El agente halocrómico puede cambiar las propiedades ópticas (tales como amplitud y longitud de onda emitida) a medida que el pH de la mezcla de reacción cambia durante la reacción de amplificación. Los agentes halocrómicos fluorescentes incluyen los colorantes fluoresceína, piranina, y pHrodo (Life Technologies, Carlsbad CA).

La base y/o el ácido añadido a la mezcla de reacción mantiene el pH de partida de la mezcla de reacción aproximadamente o por encima de un límite superior del intervalo de pH de transición del agente halocrómico. Por ejemplo, un ácido tal como ácido clorhídrico (HCl) o ácido sulfúrico (H₂SO₄), o una base tal como hidróxido sódico (NaOH) o hidróxido potásico (KOH), se puede añadir a la mezcla de reacción. En algunas realizaciones, el ácido o la base ajusta el pH de partida de la mezcla de reacción entre pH 6-10, entre pH 7-8, o entre pH 8-8,6. En una realización, la mezcla de reacción es capaz de compensar el pH de partida de la mezcla de reacción en menos de 0,1 unidades de pH. En otra realización, la mezcla de reacción tiene un pH de partida inferior a 2 unidades de pH por encima del límite superior del intervalo de pH de transición del agente halocrómico. En realizaciones adicionales, la mezcla de reacción tiene un pH de partida inferior a 1 unidad de pH, 0,5 unidades de pH, o 0,1 unidades de pH por encima del límite superior del intervalo de pH de transición del agente halocrómico. En una realización adicional, el ruido de la amplificación no específica se minimiza ajustando el intervalo de transición de pH separado suficientemente del pH de partida de la mezcla de reacción, de modo que cualquier cambio de color solo se consigue mediante una amplificación específica y sostenida.

Como se describe en el presente documento, la mezcla de reacción no requiere ningún agente de tamponamiento adicional para la reacción de amplificación, un agente de tamponamiento podría evitar que se produjeran grandes cambios de pH durante la reacción de amplificación. En una realización, la mezcla de reacción contiene una cantidad mínima de agente de tamponamiento, de modo que la capacidad de tamponamiento de la mezcla de reacción es inferior al cambio de pH esperado durante la amplificación. Como se describe en el presente documento, el tampón está a una concentración entre 1 mM y 3 mM. Como se describe en el presente documento, el tampón está a una concentración de 1 mM. En la presente invención, el tampón usado es el tampón Tris (formulado para pH 8,8), HEPES (pH 7-9), o TAPS (pH 7-9). El tampón usado es un tampón que tiene una capacidad de tamponamiento equivalente a un tampón Tris a una concentración entre 1,5 mM-19 mM en una solución que tiene un pH de partida de 8,0. Este amplio intervalo de concentraciones de tampón adecuadas permite que la mezcla de reacción resista cambios de pH de partida no deseados durante el establecimiento de la reacción, a diferencia de los ajustes de la reacción con equivalentes de tampón (< 1 mM) Tris mínimos (véase el documento US 13/799.995, presentado el 13 de marzo de 2013). Estos cambios de pH no deseados se producen debido los equivalentes de ion hidronio o hidróxido añadidos a la reacción a través de reactivos de la muestra. Dado que la detección colorimétrica y la cinética enzimática dependen del pH de partida, la presencia de una capacidad de tamponamiento en la mezcla de reacción suficientemente elevada para evitar el cambio de pH de partida, pero suficientemente baja como para permitir el cambio de color después de la amplificación, llega a ser importante. En una realización adicional, el pH de la mezcla de reacción está entre un pH 7,5-8,8. La Tabla 1 muestra diversos tampones que tienen capacidades de tamponamiento equivalentes a un tampón Tris a una concentración entre 1 mM-19 mM en una solución que tiene un pH de partida de 8,0. La capacidad de tamponamiento (β) se define como los equivalentes de ácido o base necesarios para cambiar el pH de 1 litro de tampón en 1 unidad de pH. Esto se puede calcular con: $\beta = 2,3 \cdot C \cdot (K_a \cdot [H_3O^+]/(K_a + [H_3O^+])^2)$; en la que C es la concentración del tampón, K_a es la constante de disociación para el tampón y [H₃O⁺] es la concentración de iones hidronio del tampón (que se calcula a partir del pH de partida de la reacción). Se encontró que la capacidad del tampón de Tris 1 mM - 19 mM (en una solución que tiene un pH de partida de 8,0) variaba de 0,000575 a 0,010873. Se consideró que el pH de partida del tampón que estaba en el intervalo de 7,5 - 8,8 era compatible con la bioquímica de la reacción (función de polimerasa, fusión de ácido nucleico, etc.). En otras realizaciones, el tampón tiene una capacidad de tamponamiento equivalente a un tampón Tris a una concentración entre 1,5 mM - 19 mM, 2 mM - 19 mM, 3 mM - 19 mM, 4 mM - 19 mM, 5 mM - 19 mM, 6 mM - 19 mM, 7 mM - 19 mM, o de otro modo, en una solución que tiene un pH de partida de 8,0. En otras realizaciones, el tampón tiene una capacidad de tamponamiento equivalente a un tampón Tris a una concentración entre 1,92 mM - 36,29 mM, 3 mM - 36,29 mM, 4 mM - 36,29 mM, 5 mM - 36,29 mM, o de otro modo, en una solución que tiene un pH de partida de 8,8. En otras realizaciones, el tampón tiene una capacidad de tamponamiento equivalente a un tampón Tris a una concentración entre 1,48 mM - 27,92 mM, 2 mM - 27,92 mM, 3 mM - 27,92 mM, 4 mM - 27,92 mM, 5 mM - 27,92 mM, o de otro modo, en una solución que tiene un pH de partida de 7,5.

Tabla 1: Tabla de Capacidad de Tamponamiento

Tampón	Nombre Químico Completo	pKa a 25 °C	pH de la Reacción de Partida	Conc Mín (mM)	Conc Máx (mM)
Tris	tris(hidroximetil)metilamina	8,06	8,8	1,92	36,29
			8,0	1,00	19,00
			7,5	1,48	27,92
TAPS	ácido N-Tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico	8,43	8,8	1,19	22,55
			8,0	1,27	23,94
			7,5	2,66	50,25

(continuación)

Tampón	Nombre Químico Completo	pKa a 25 °C	pH de la Reacción de Partida	Conc Mín (mM)	Conc Máx (mM)
Bicina	N,N-bis(2-hidroxietil)glicina	8,35	8,8	1,29	24,46
			8,0	1,17	22,15
			7,5	2,31	43,59
Tricina	N-tris(hidroximetil)metilglicina	8,15	8,8	1,67	31,63
			8,0	1,03	19,48
			7,5	1,67	31,63
TAPSO	ácido 3-[N-Tris(hidroximetil)metilamino]-2-hidroxipropanosulfónico	7,635	8,8	4,17	78,90
			8,0	1,19	22,45
			7,5	1,02	19,37
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico	7,48	8,8	5,74	108,45
			8,0	1,40	26,54
			7,5	1,00	18,92
TES	ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico	7,4	8,8	6,79	128,39
			8,0	1,56	29,46
			7,5	1,01	19,16
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico	7,2	8,8	10,46	197,77
			8,0	2,12	40,03
			7,5	1,12	21,26
PIPES	ácido 1,4-piperazinadietanosulfónico	6,76	8,8	27,91	500,00
			8,0	4,86	91,88
			7,5	1,92	36,29
SSC	Citrato de Sodio Salino	7,0	8,8	16,28	300,00
			8,0	3,03	57,20
			7,5	1,37	25,90

En una realización, un compuesto de magnesio se añade a la mezcla de reacción, porque el magnesio estimula la incorporación de nucleótidos en el molde y influye en la actividad de la polimerasa. En una realización adicional, la concentración de un compuesto de magnesio (tal como sulfato de magnesio) en la mezcla de reacción es de al menos 0,5 mM, al menos 1 mM, al menos 2 mM, o al menos 4 mM. En una realización, la concentración de iones de magnesio añadidos depende de la concentración de dNTP, molde de ácido nucleico, y cebadores. En una realización, la proporción de dNTPs con respecto a sulfato de magnesio en la mezcla de reacción es menor que 1:2, menor que 1:3, menor que 1:4 o menor que 1:5.

En algunas realizaciones, se añaden cationes monovalentes a la mezcla de reacción. Los cationes monovalentes incluyen potasio, amonio y amonio cuaternario, entre otros. Los cationes monovalentes pueden influir en las características de fusión del molde de ácido nucleico y mejorar la eficacia de la enzima. En una realización, el potasio está en la mezcla de reacción a una concentración de menos de 50 mM, o de menos de 15 mM. En otra realización, las sales de amonio cuaternario se encuentran en la mezcla de reacción a una concentración mayor que 2 mM, mayor que 5 mM, o mayor que 8 mM. En otra realización, un compuesto de amonio (tal como cloruro de amonio) se encuentra en la mezcla de reacción a una concentración inferior a 15 mM, o inferior a 10 mM. El amonio (NH_4^+) tiene cierta capacidad de tamponamiento, por lo que la concentración final de compuestos de amonio en la mezcla de reacción se debería minimizar a la vez que se mantiene un rendimiento de amplificación óptimo.

En una realización, las concentraciones de otros reactivos de la mezcla de reacción se mantienen en cantidades como las usadas generalmente en la reacción de amplificación. Véase Notomi T *et al.* Nucleic Acids Res. 15 de junio de 2000; 28 (12): E63; Nature Protocols 2008, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products, 2008 3 (5): pg 880. En una realización, se usa la enzima Bst o Bst 2.0, y la cantidad de enzima es al menos 0,8 Unidades por microlitro de fluido combinado. En esta realización, la Betaína también está presente en la mezcla de reacción a una concentración entre 0-1,5 M o 0,8 M-1 M, y la concentración total de cebadores está entre 3,6 μM y 6,2 μM . En algunas realizaciones en la mezcla de reacción está presente, cualquiera de los siguientes reactivos: tampón Tris (pH 8,8) a 20 mM, KCl a 10 mM, MgSO_4 a 8 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 10 mM, Tween 20 a un 0,1 %, Betaína a 0,8 M, dNTPs a 1,4 mM cada uno, MnCl_2 a 0,5 mM, FIP a 1,6 μM , F3 a 0,2 μM , B3 a 0,2 μM , cebadores a una concentración total de 5,2 μM ($2 \times (1,6+0,8+0,2)$), y Bst / Bst 2.0 a 8 U por 10 μl .

Se ha encontrado que las concentraciones de reactivo mencionadas anteriormente proporcionan un buen rendimiento de amplificación y una baja capacidad de tamponamiento, de modo que se puede usar un sensor de pH halocrómico para detectar protones liberados durante la reacción de amplificación. En algunas realizaciones, las concentraciones de los reactivos de la mezcla de reacción dependen de la selección de la enzima. En realizaciones adicionales, los fabricantes de la enzima ofrecen orientación con respecto a las concentraciones apropiadas de reactivos. En una realización, la proporción del volumen de la muestra con respecto al volumen de la mezcla de

reacción es tal que la muestra se diluye entre un 5 % y un 40 % cuando se añade la mezcla de reacción.

En algunas realizaciones, los reactivos de la reacción de amplificación se almacenan por separado antes de ser añadidos a una mezcla de reacción, ya que algunos reactivos tienen condiciones específicas requeridas para la estabilidad. Por ejemplo, la enzima se puede almacenar a largo plazo en una solución moderadamente tamponada separada de los otros reactivos para garantizar la estabilidad de la enzima. Al mezclar con los reactivos restantes en la mezcla de reacción, el agente de tamponamiento se diluye lo suficiente como para no enmascarar de forma significativa un cambio de pH. Además, los cebadores para genes específicos de interés se pueden proporcionar en una solución separada o en forma liofilizada.

En algunas realizaciones, la reacción de amplificación se lleva a cabo dentro de un microtubo. En otras realizaciones, la reacción de amplificación se lleva a cabo dentro de una estructura fluida o microfluida. En algunas realizaciones, la estructura fluida o microfluida es un pocillo, cámara o canal que recibe los reactivos y la muestra de ácido nucleico por separado, y a continuación mezcla los componentes en conjunto. En otra realización, la estructura fluida o microfluida es un pocillo, cámara o canal que recibe la mezcla de reacción mezclada previamente. En una realización adicional, la estructura fluida o microfluida posee una larga trayectoria óptica para observación colorimétrica, o una fuente y detector de excitación fluorescente / de absorbancia. En otra realización, la estructura fluida o microfluida recibe los reactivos en forma liofilizada, y posteriormente recibe la muestra de ácido nucleico y la solución de hidratación. En una realización, una estructura de cámara fluida o microfluida tiene una profundidad de canal que varía entre 50 μm -400 μm o más. En una realización adicional, la observación colorimétrica se consigue para profundidades de canal (longitud de la trayectoria) de 50 μm , 50 μm -400 μm , o 50 μm o más.

Algunas realizaciones incluyen un kit para la detección colorimétrica de un producto de amplificación. El kit incluye uno o más agentes halocrómicos, una o más enzimas para catalizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, un tampón que tiene una capacidad de tamponamiento equivalente a la del tampón Tris a una concentración entre 1,5 mM-19 mM en una solución que tiene un pH de partida de 8,0, e instrucciones para poner en contacto una muestra con una mezcla de reacción que incluye el tampón y la enzima y el agente halocrómico en condiciones en las que ocurre una reacción de amplificación de ácido nucleico y produce un producto de la reacción de amplificación de ácido nucleico si la muestra contiene una molécula molde de ácido nucleico diana, teniendo la mezcla de reacción un pH de partida, y si la molécula molde de ácido nucleico diana está presente, la reacción de amplificación de ácido nucleico cambia el pH de partida de la mezcla de reacción para producir un cambio colorimétrico detectable del agente halocrómico, indicando de ese modo la presencia del ácido nucleico diana, y si la molécula molde de ácido nucleico diana no está presente, la reacción de amplificación de ácido nucleico no genera un número eficiente de protones para cambiar el pH de partida de la mezcla de reacción eficiente para producir un cambio colorimétrico detectable del agente halocrómico, indicando de ese modo que el producto de la reacción de amplificación de ácido nucleico no se ha producido. Como se describe en el presente documento, las instrucciones son para poner en contacto una molécula molde de ácido nucleico con el agente halocrómico y la enzima en una mezcla de reacción, en condiciones que dan como resultado (1) una reacción de amplificación que amplifica la molécula molde de ácido nucleico para producir un producto de reacción de amplificación, y (2) generación de un número suficiente de protones de modo que el pH final de la mezcla de reacción es lo suficientemente bajo como para producir un cambio colorimétrico detectable del agente halocrómico, indicando de ese modo que el producto de la reacción de amplificación se ha producido. En realizaciones adicionales, el kit también incluye un ácido o una base, dNTPs, cebadores, y cationes monovalentes. En una realización adicional, el kit incluye los siguientes reactivos a las siguientes concentraciones:

- Bst o Bst 2.0 polimerasa, al menos 0,8 Unidades por microlitro;
- Betaína a 0,8 M;
- Cebadores a 3,6 μM en total;
- Cebadores FIP y BIP a 1,6 μM
- F3 y B3 a 0,2 μM
- Sulfato de magnesio a 8 mM;
- Sulfato de amonio a 10 mM;
- Cloruro potásico a 10 mM;
- Hidróxido sódico para establecer el pH de partida de la mezcla de reacción;
- Tween 20 a un 0,1 %;
- Los dNTP a 1,4 mM cada uno;
- Rojo fenol a 50 μM .

En una realización adicional, el kit incluye los cebadores LoopF y LoopB a 0,8 μM cada uno.

Métodos de la invención

La reacción de amplificación amplifica nucleótidos de un molde de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación es una reacción de amplificación isotérmica, tal como una reacción por desplazamiento de

hebra. En una realización adicional, una reacción por desplazamiento de hebra se proporciona mediante una polimerasa con una actividad de desplazamiento de hebra en condiciones de reacción de modo que el desplazamiento de la hebra es posible. Los ejemplos de reacciones por desplazamiento de hebra incluyen amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), amplificación por desplazamientos múltiples (MDA), amplificación por círculo rodante (RCA) o amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP). En otras realizaciones, la reacción de amplificación incluye otras reacciones de amplificación no isotérmicas tal como reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En ciertas realizaciones, la reacción de amplificación realizada es LAMP. En una reacción LAMP, una molde de ADN de dos hebras o de una sola hebra en equilibrio dinámico a una temperatura elevada se amplifica usando dos o tres pares de cebadores. Los cebadores se diseñan basándose en el molde de ADN, usando un software de diseño de cebadores tal como LAMP Designer (Premier Biosoft, Palo Alto, CA). En la primera etapa de la reacción LAMP, la región F2 del FIP (Cebador Interno Directo) se hibrida con el ADN monocatenario en la posición complementaria respectiva (F2c). A continuación, una polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra incorpora dNTP a lo largo del molde desde el extremo en la posición 3' de F2. La incorporación de nucleótidos libera protones, reduciendo el pH de la mezcla de reacción. A continuación, el cebador directo F3 se une a la región F3c cadena arriba de la región F2 y en el molde. El cebador directo F3 comienza a amplificar la era del molde, que libera más protones y desplaza la cadena incorporada en FIP que se sintetizó previamente. Esta hebra única contiene una secuencia F1 (dentro de la secuencia diana) junto con su secuencia complementaria F1c (dentro del FIP). Esto forma un tallo-lazo cuando F1c se une a F1 en el extremo en la posición 5'. Al mismo tiempo, el BIP (Cebador Interno Inverso) se hibrida con el otro extremo de la hebra y los nucleótidos se extienden desde B2, liberando más protones. El cebador inverso B3 se une a la región B3c, cadena abajo de la región B2, desplaza las hebras amplificadas por BIP y estimula la extensión para crear la doble hebra. Esta hebra desplazada ahora contiene una secuencia B1 (dentro de la secuencia diana) junto con su secuencia B1c complementaria (dentro del BIP), formando otro tallo-lazo en el extremo la posición 3'. La estructura ahora tiene dos estructuras de tallo-lazo en cada extremo desde las cuales se produce un desplazamiento continuo y una extensión para amplificar el molde. La reacción LAMP se puede amplificar añadiendo cebadores de bucle directo e inverso para producir más amplicones con estructuras de tallo-lazo.

El procedimiento LAMP se puede llevar a cabo a una temperatura fija, minimizando la necesidad de equipos de termociclado caros. Por lo general, los métodos isotérmicos requieren una temperatura establecida, que se determina mediante los reactivos seleccionados. Por ejemplo, en los métodos LAMP las enzimas funcionan mejor entre 60-65 °C.

La detección colorimétrica del producto de la reacción de amplificación de ácido nucleico se puede llevar a cabo en tiempo real durante toda la reacción de amplificación, o después de la realización de la reacción de amplificación. La detección del cambio colorimétrico de la mezcla de reacción se puede asociar con una indicación digital de una presencia o ausencia del producto de la reacción de amplificación. En otras palabras, una observación visual del cambio de color de la mezcla de reacción puede proporcionar información sobre si el producto de la reacción de amplificación está presente o ausente. En ciertas realizaciones, la detección de un cambio colorimétrico de la mezcla de reacción que se ha obtenido la fase exponencial o meseta de la reacción de amplificación.

En algunas realizaciones, la detección del producto de la reacción de amplificación se acelera con respecto a una reacción de amplificación que usa una mezcla de reacción sin un agente halocrómico. En realizaciones adicionales, el cambio colorimétrico de la mezcla de reacción se detecta en menos de 60 minutos desde la hora de inicio de la reacción de amplificación. La detección acelerada del producto de la reacción de amplificación se obtiene porque el agente halocrómico (un ácido o base débil) en la mezcla de reacción absorbe los protones generados durante la reacción de amplificación, y la recombinación de los protones libres actúa para acelerar la detección de la reacción de amplificación. La reacción se puede diseñar de modo que se requiera una amplificación mínima para generar una transición de pH suficiente para que el agente halocrómico cambie de color. Las técnicas de amplificación convencionales que usan colorantes fluorescentes de intercalado, balizas moleculares, sondas de hibridación, detección basada en colorantes, UV-Vis u otros métodos de detección requieren que se produzca una cierta cantidad umbral de amplificación antes de que se detecte una señal de amplificación. Sin embargo, los métodos de la presente invención requieren una cantidad umbral de amplificación relativamente menor antes de que se detecte un cambio de color del agente halocrómico y, por lo tanto, la detección de un producto de reacción de amplificación se acelera con respecto a los métodos de amplificación convencionales.

En algunas realizaciones, el producto de la reacción de amplificación se detecta visualmente mediante la observación de un cambio de color de la mezcla de reacción. En una realización adicional, para la detección visual se usa el ojo humano. En otra realización, se usa una cámara, un ordenador o algún otro dispositivo óptico para la detección visual o para la formación de imagen la mezcla de reacción. Los programas de formación de imágenes incluyen Photoshop (Adobe, San Jose CA), ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda MD), y MATLAB (MathWorks, Natick MA). En otra realización, el producto de la reacción de amplificación se detecta midiendo la fluorescencia de la mezcla de reacción, usando métodos de espectroscopía de fluorescencia. En otra realización, el producto de la reacción de amplificación se detecta midiendo la absorbancia de la mezcla de reacción, usando métodos de espectroscopía de absorción. En una realización adicional, el punto final o el cambio general en la

absorbancia o fluorescencia de la mezcla de reacción se mide a una longitud de onda dada o un conjunto de longitudes de onda.

Ejemplos

A continuación se presentan ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, se deberían permitir algunos errores y desviaciones experimentales.

La práctica de la presente invención usará, a menos que se indique de otro modo, métodos convencionales de química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de la experiencia en la materia. Las técnicas de ese tipo se explican totalmente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman y Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., edición actual); Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Edición, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18ª Edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey y Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 3ª Ed. (Plenum Press) Vols A y B (1992).

Ejemplo 1: Detección Colorimétrica de un Producto de Reacción de Amplificación de Ácido Nucleico

En un ensayo para la detección colorimétrica de un producto de reacción de amplificación de ácido nucleico, los siguientes reactivos se mezclaron en conjunto para producir una mezcla de reactivos 2X:

- Sulfato de Magnesio (Sigma Aldrich) a 16 mM
- Sulfato de Amonio (Sigma Aldrich) a 20 mM
- Cloruro Potásico (Sigma Aldrich) a 20 mM
- Hidróxido sódico (Sigma Aldrich) a una concentración que establece el pH de partida de la mezcla de reactivo en un pH de 8,8.

La mezcla de reactivos se ajustó hasta un pH inicial de 8,8 para permitir una polimerización inicial eficaz. La mezcla de reactivos se trató en autoclave durante 1 hora para su esterilización. Los siguientes ingredientes se añadieron a continuación (en una forma estéril) a la mezcla de reactivos para generar la mezcla de reacción:

- Tween 20 (Sigma Aldrich) a un 0,1 % (v/v)
- dNTPs (NEB) a 1,4 mM cada uno
- Rojo Fenol (Sigma Aldrich) a 50 µM
- Bst polimerasa (NEB) a 0,8 Unidades por microlitro (el tampón de almacenamiento enzimático enzima contribuyendo a tampón Tris 1 mM, KCl 5 mM, EDTA 0,01 mM, DTT 0,1 mM, Triton X-100 al 0,01 % (v/v) y Glicerol al 5 % (p/v) a la mezcla de reacción)
- Betaína (Sigma Aldrich) a 0,8 M

Los cebadores y un molde de ácido nucleico se añadieron a la mezcla de reacción. Los cebadores se diseñaron para LAMP e incluían dos pares de cebadores (solubilizados en tampón Tris EDTA 1X) a una concentración total de 3,6 mM como se ha descrito anteriormente. El cebador F3 tiene la secuencia: GATCTGAATCCGACCAACCG (SEQ ID NO: 1); el cebador B3 tiene la secuencia: AACGCCACGCTCTCGCA (SEQ ID NO: 2); el cebador FIP tiene la secuencia: AAATCCGTCCAGTGTTTGTGAAATCGTTGTATCTCCG (SEQ ID NO: 3); and el cebador BIP tiene la secuencia: CCGAAACCACTGGACGGATTTTATTTTAATCTAAACAAACATC (SEQ ID NO: 4). La molécula molde de ácido nucleico se purificó a partir de *Schistosoma mansoni*. La FIG. 1 muestra la región diana SM1-7 de la molécula molde de ácido nucleico (véase Hamburger *et al.*, *Detection of Schistosoma mansoni y Schistosoma haematobium DNA by Loop-Mediated Isothermal Amplification: Identification of infected Snails from Early Prepatency*, *Am J Trop Med Hyg*, 2010). Las reacciones de ensayo positivas contenían ADN molde, y las reacciones de control negativo contenían agua. Las mezclas de reacción tenían un pH de partida en el intervalo de 7,5 – 8,5. Las mezclas de reacción se calentaron en microtubos a 63 °C en un aparato de termociclado para permitir la amplificación del molde. Después de un periodo de reacción determinado previamente de 45 minutos, durante el cual se produjo una amplificación de molde suficiente, se observó visualmente el color resultante de la mezcla de reacción.

Durante el proceso de amplificación, el pH de la mezcla de reacción se redujo de 7,5-8,5 a aproximadamente 6,6 de manera repetible. La FIG. 2 es un gráfico que muestra las mediciones de pH para reacciones de amplificación positivas (ensayo) y negativas (control negativo) repetidas. El agente halocrómico usado fue el rojo fenol, que tiene un intervalo de pH de transición de 6,8 -8,2. El rojo fenol cambia de color en este intervalo de pH de transición de rojo a amarillo (cuando el pH baja del límite superior de pH al límite inferior de pH). En el ensayo, la mezcla de reacción cambió el color de rojo (a pH 8,0) a amarillo (a pH 6,6) como respuesta al cambio de pH durante la amplificación de ácido nucleico. La FIG. 3 es un gráfico que muestra la diferencia en el valor de contraste usando

HSV (tonalidad, saturación, valor) de imágenes de las mezclas de reacción de una reacción de amplificación positiva y negativa en los puntos finales de la reacción. El cambio de color se demuestra cuantitativamente en la variable de tonalidad. Para confirmar que el cambio de color se debió a la amplificación de ADN diana, las reacciones de punto final se analizaron usando electroforesis en gel para verificar la presencia de amplicones (FIG. 4).

Usando este método, la amplificación de un molde de ADN se puede observar fácilmente, ya sea en el punto final de la reacción o en tiempo real durante la reacción, observando visualmente el cambio de color en la mezcla de reacción, o midiendo la absorbancia o fluorescencia de la mezcla de reacción. Este mecanismo genera un contraste mucho mayor en comparación con otras técnicas de detección colorimétrica y se puede obtener imágenes sin la necesidad de instrumentos ópticos de coste elevado.

Ejemplo 2: Detección de Amplificación LAMP Usando un Agente Halocrómico Visual

Las reacciones de LAMP se llevaron a cabo con una mezcla de reacción que comprendía: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM, KCl 15 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM, Triton X-100 al 0,01 % (v/v), Glicerol al 5 %, MgSO_4 8 mM, 1,4 mM de cada dNTPs, Tween-20 al 0,1 % en v/v, Betaína 0,8 M. Tres pares de cebadores, específicos para diferentes dianas, se añadieron a una concentración final de 1,6 μM cada uno para FIP/BIP, 0,2 μM cada uno para F3 /B3, 0,4 μM cada uno para LoopB/F. El volumen final de la reacción es de 10 μl y se mantuvo a 63 °C para diferentes tiempos de incubación.

En La FIG. 5, la concentración final del tampón Tris de la mezcla de reacción se valió de 0,34 mM a 19 mM (variando la cantidad de tampón Tris formulado a pH 8,8). Las reacciones se llevaron a cabo con cebadores para ADN del fago lambda, 5 ng de ADN lambda (New England Biolabs), 0,8 U/ μl de Bst 2.0 ADN polimerasa (New England Biolabs) y 0,2 mM de Rojo Neutro (Sigma Aldrich). A continuación se formaron imágenes de los tubos de reacción y el valor de la Tonalidad Normalizado se calculó para el color de la mezcla de reacción. El valor de la Tonalidad Normalizado se definió como la diferencia de los valores de Tonalidad entre una reacción positiva y una reacción negativa que no era del molde. Un cambio de color, indicado por un cambio en el valor de la Tonalidad Normalizado por encima del umbral de visualización (línea discontinua), se observó para concentraciones de tampón tan elevadas como Tris 19 mM. Esto indica que la mezcla de reacción con capacidades de tampón equivalentes a Tris > 1 mM y < 19 mM permite un cambio de pH suficiente para una detección visual del cambio de color.

En la FIG. 6, la tolerancia de este método de detección visual al exceso de iones hidronio añadidos a la mezcla de reacción se evaluó. Esta tolerancia es importante para permitir el uso de una amplia diversidad de muestras de ADN que pueden añadir un intervalo de equivalentes de iones hidronio o hidróxido a la reacción. Las reacciones se llevaron a cabo con una concentración final de tampón Tris 2 mM, 5 ng de diana de ADN lambda, 0,8 U/ μl de Bst ADN polimerasa y agente halocrómico Rojo Neutro 0,2 mM. El cambio en el valor de la Tonalidad Normalizado indica que está química de detección visual funciona con $4,8 \times 10^{-9}$ hasta $4,8 \times 10^{-18}$ equivalentes de iones hidronio adicionales por 10 μl de reacción.

En las FIGs. 7A-7D, la compatibilidad de diferentes indicadores de pH y dianas de amplificación con la detección visual de amplificación LAMP se evaluó. Las reacciones llevaron a cabo con una concentración final de tampón Tris en el intervalo de 1,2 - 1,3 mM y 0,8 U/ μl de Bst ADN polimerasa. Tres indicadores diferentes se sometieron a ensayo con 5 ng de diana de ADN lambda: Rojo Fenol 50 μM , Rojo Cresol 260 μM y Azul de Bromotimol 160 μM (FIG. 7A). Un cambio de contraste elevado en el valor de tonalidad normalizado observó para todos los indicadores sometidos a ensayo.

También se llevaron a cabo búsquedas de concentración para estos indicadores, Azul de Bromotimol (FIG. 7B parte superior izquierda), Rojo Cresol (FIG. 7B parte superior derecha), Rojo Neutro (FIG. 7B parte inferior izquierda) y Rojo Fenol (FIG. 7B parte inferior derecha) con diana Lambda, que demostró el amplio intervalo de concentraciones que son compatibles con la química. Los ensayos LAMP usando 130 ng de ADN de *Schistosoma mansoni* con Rojo Fenol 50 μM (FIG. 7C) y ARNm de GAPDH Humano con Rojo Neutro 0,2 mM (FIG. 7D) también se sometieron a ensayo pararse la detección visual de estas dianas que se demostró en el punto final.

En la FIG. 8, la compatibilidad de diferentes polimerasas con detección visual de amplificación de LAMP se evaluó. Las reacciones llevaron a cabo con una concentración final de tampón Tris 1,3 mM, 5 ng de diana de ADN lambda y Rojo Neutro 0,2 mM. Se usaron 0,8 U/ μl de diferentes polimerasas, Bst 2.0 y Gspn 2.0 (OptiGene). Después de 60 minutos de incubación se observó un cambio de color del contraste elevado para ambas polimerasa (FIG. 8).

Tabla 2: Secuencias Usadas

Lambda FIP	SEQ ID NO: 5
Lambda BIP	SEQ ID NO: 6
Lambda F3	SEQ ID NO: 7
Lambda B3	SEQ ID NO: 8
Lambda Loop F	SEQ ID NO: 9

(continuación)

Lambda Loop B	SEQ ID NO: 10
Schistosoma F3	SEQ ID NO: 1
Schistosoma B3	SEQ ID NO: 2
Schistosoma FIP	SEQ ID NO: 3
Schistosoma BIP	SEQ ID NO: 4
GAPDH F3	SEQ ID NO: 11
GAPDH B3	SEQ ID NO: 12
GAPDH FIP	SEQ ID NO: 13
GAPDH BIP	SEQ ID NO: 14
GAPDH Loop F	SEQ ID NO: 15
GAPDH Loop B	SEQ ID NO: 16

Ejemplo 3: Detección Visual de Amplificación LAMP en Longitudes de Trayectoria Sub-Milimétricas

- 5 Las reacciones de LAMP se llevaron a cabo como en el Ejemplo 1 con una concentración final de tampón Tris 1,3 mM (tampón formulado a pH 8,8), 0,8 U/μl de Bst 2.0 ADN Polimerasa, 5 ng de molde de ADN lambda y Rojo Neutro 0,2 mM o Azul de Bromotimol 160 μM. Las reacciones tanto positiva como la negativa que no era de molde se añadieron después de la amplificación a cámaras de flujo con profundidades de canal variables (FIG. 9A para Rojo Neutro y FIG. 9B para Azul de Bromotimol). Estas cámaras de flujo se mecanizaron en acrílico con profundidades de canal que variaban 50 μm a 400 μm. Se observó una diferencia de color de alto contraste (por encima del umbral de detección visual; línea de puntos) entre las reacciones positivas y negativas para profundidades de canal de 50 μm y superiores. Esto demuestra que esta química de detección visual es adecuada para su uso en cámaras de reacción con longitudes de trayectoria submilimétricas (profundidades) y superiores. Las cámaras de reacción de ese tipo se pueden usar para reducir la cantidad de reactivos usados y para permitir que tengan lugar múltiples reacciones en una determinada huella (por ejemplo, en un cartucho de microfluidos).

Ejemplo 4: Detección de Amplificación de Desplazamiento de Hebra (SDA) Usando un Agente Halocrómico Visual

- 20 Las reacciones de SDA se llevaron a cabo usando una mezcla de reacción que comprendía: concentración final de tampón Tris 1,3 mM (tampón formulado a pH 8,8), (NH₄)₂SO₄ 10 mM, KCl 50 mM (ajustado a pH 8,5), MgSO₄ 8 mM, 4,4 mM cada uno de dATP, dGTP, dTTP, dCTP-αS 0,8 mM (TriLink Biotechnologies), Tween-20 al 0,1 % en v/v, Betaína 0,8 M, 0,32 U/μl de Bst ADN polimerasa (New England Biolabs), 0,2 U/μl de BSoBI (New England Biolabs) y agente halocrómico Rojo Neutro 0,2 mM. Los cebadores diseñados para BRCA1 humano (SDAf: SEQ ID NO: 17; SDAr: SEQ ID NO: 18; BF: SEQ ID NO: 19; BR: SEQ ID NO: 20) se añadieron a la reacción a una concentración final de 0,5 μM cada uno. 5 ng de ADN gde HeLa se añadió a un volumen de reacción final de 25 μl y se mantuvo a 65 °C para diferentes tiempos de incubación. Un cambio en el valor de la Tonalidad Normalizada a lo largo del tiempo (FIG. 10) indica que esta química de detección visual funciona con SDA.

Ejemplo 5: Detección de Amplificación de PCR Usando un Agente Halocrómico Visual

- 30 Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando una mezcla de reacción que comprendía: KCl 50 mM y MgCl₂ 2 mM (pH ajustado a 8,5), 0,5 mM de cada dNTP, 5 U de Taq ADN polimerasa (New England Biolabs) y agente halocrómico Rojo Neutro 0,2 mM. La concentración total de Tris-HCl remanente del tampón de almacenamiento enzimático y cebadores (Directo: SEQ ID NO: 21; Inverso: SEQ ID NO: 22) fue 1,15 mM en la mezcla de reacción final. Se diseñaron cebadores para el gen 16s ARNr de *Escherichia coli* y se añadieron a la reacción a una concentración final de 0,5 μM cada uno. Se añadieron 10 ng de ADN gde *E. coli* a un volumen final de reacción de 25 μl y se mantuvo inicialmente a 95 °C mantenido durante 2 min, seguido por 50 ciclos de 95 °C durante 10 s, 55 °C durante 30 s, 68 °C durante 30 s. Un cambio en el valor de la Tonalidad Normalizada a lo largo del tiempo (FIG. 11) indica que esta química de detección visual funciona con PCR.

Ejemplo 6: Aumento del Contraste de Detección Visual con una Combinación de Agentes Halocrómicos

- 45 Las reacciones de LAMP se llevaron a cabo como en el Ejemplo 1 con una concentración final de tampón Tris 1,3 mM (tampón formulado a pH 8,8), 0,8 U/μl de Bst 2.0 ADN Polimerasa y 5 ng de molde de ADN lambda. El contraste del cambio de color se evaluó para Rojo Fenol a una concentración de 50 μM y la combinación de Rojo Fenol y Azul de Bromotimol a concentraciones de 50 μM y 160 μM respectivamente (FIG. 12A). El contraste del cambio de color también se evaluó para Rojo Cresol a una concentración de 260 μM y la combinación de Rojo Cresol y Azul de Bromotimol a concentraciones de 260 μM y 160 μM respectivamente (FIG. 12B). Los valores de contraste se calcularon a partir de los valores de RGB de imágenes de la mezcla de reacción usando la fórmula: 0,299R + 0,587G + 0,114B. El cambio de contraste normalizado se definió como la diferencia entre los valores de contraste de la reacción positiva y la negativa normalizados con respecto al fondo. El aumento del cambio del contraste normalizado con el uso de la combinación de agente halocrómico demuestra la utilidad de las combinaciones de ese tipo.

Ejemplo 7: Monitorización del Color en tiempo Real de la Amplificación para Cuantificación Usando Agentes Halocrómicos Visuales

Las reacciones de LAMP se llevaron a cabo como en el Ejemplo 1 con una concentración final de tampón Tris 1,3 mM (tampón formulado a pH 8,8), 0,8 U/μl de Bst 2.0 ADN Polimerasa, Rojo Fenol y Azul de Bromotimol a concentraciones de 50 μM y 160 μM respectivamente y concentraciones variables de molde de ADN lambda. El contraste del cambio de color se evaluó para la diana de ADN lambda a concentraciones finales de 0,5 fg/μl, 0,05 pg/μl y 0,5 pg/μl. Los valores de contraste se calcularon a partir de los valores de RGB de imágenes de la mezcla de reacción como se describe en el Ejemplo 5. Los resultados (FIG. 13) indican que las concentraciones de ADN más elevadas conducían a un cambio detectable del contraste visual antes que las concentraciones de ADN más bajas. Por lo tanto, los inventores demuestran la capacidad para distinguir entre diferentes concentraciones de diana con la monitorización de color en tiempo real de esta química.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DIASSESS INC.

<120> DETECCIÓN COLORIMÉTRICA DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO

<130> 31210-28770 PCT

<140>

<141>

<150> 61/983.687

<151> 24-04-2014

<160> 23

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 1

gatctgaatc cgaccaaccg 20

<210> 2

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 2

aacgcccacg ctctcgca 18

<210> 3

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 3

aaatccgtcc agtggtttt ttgaaaatcg ttgtatctcc g 41

<210> 4

<211> 46

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético
 5
 <400> 4
 ccgaaaccac tggacggatt ttattttta atctaaaaca aacatc 46
 <210> 5
 10 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético
 <400> 5
 cgaactgttt cgggattgca ttctggaact ccaaccatcg ca 42
 <210> 6
 20 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético
 <400> 6
 30 ggagctgca taacggtttc gtcgactcaa tgctcttacc tgt 43
 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético
 <400> 7
 40 gttggtcact tcgacgtatc g 21
 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético
 <400> 8
 50 gctcgccgac tcttcacgat 20
 <210> 9
 <211> 18
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético
 60 <400> 9
 ttgcagacc tctctgcc 18
 <210> 10
 65 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético
 5
 <400> 10
 ggattttta tatctgcaca 20
 <210> 11
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético
 <400> 11
 tctctgattt ggtcgtattg g 21
 20 <210> 12
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético
 <400> 12
 30 ctctggaag atggtgatg 19
 <210> 13
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético
 <400> 13
 40 gttgaggtca atgaaggggt caaccagggc tgctttaac 40
 <210> 14
 <211> 42
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético
 50 <400> 14
 ttccacccat ggcaaattcc aggatttcca ttgatgacaa gc 42
 <210> 15
 <211> 22
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético
 60 <400> 15
 ggcaacaata tccactttac ca 22
 <210> 16
 65 <211> 18
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético
 5
 <400> 16
 accgtcaagg ctgagaac 18
 <210> 17
 10 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético
 <400> 17
 accgcatga atgcatgtct cgggcaaaat gctgggatta tagatgt 47
 20 <210> 18
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético
 <400> 18
 30 ggattccgct ccagacttct cgggcagttg gtaagtaa ggaaga 46
 <210> 19
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético
 <400> 19
 40 tccttgaact ttgtctcc 19
 <210> 20
 <211> 23
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético
 50 <400> 20
 cagttcataa aggaattgat agc 23
 <210> 21
 <211> 24
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético
 60 <400> 21
 agcggggagg aaggagtaa agtt 24
 <210> 22
 65 <211> 25
 <212> ADN

ES 2 749 925 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

5

<400> 22

cagtatcaga tgcagttccc aggtt 25

10

<210> 23

<211> 121

<212> ADN

<213> *Schistosoma mansoni*

<400> 23

gatctgaatc cgaccaaccg ttctatgaaa atcggtgtat ctccgaaacc actggacgga 60

tttttatgat gtttgtttta gattatttgc gagagcgtgg gcgttaatat aaaacaagaa 120

15

t 121

REIVINDICACIONES

1. Un método para detección colorimétrica de un producto de reacción de amplificación de ácido nucleico en una muestra, comprendiendo el método:

poner en contacto la muestra con una mezcla de reacción en condiciones tales que ocurre una reacción de amplificación de ácido nucleico y produce un producto de reacción de amplificación de ácido nucleico si la muestra contiene una molécula molde de ácido nucleico diana, teniendo la mezcla de reacción un pH de partida y comprendiendo:

un tampón que tiene una capacidad de tamponamiento equivalente a la del tampón Tris a una concentración entre 1,5 mM-19 mM en una solución que tiene un pH de partida de 8,0;
una enzima para catalizar la reacción de amplificación de ácido nucleico; y
un agente halocrómico;

en el que si la molécula molde de ácido nucleico diana está presente, la reacción de amplificación de ácido nucleico cambia el pH de partida de la mezcla de reacción para producir un cambio colorimétrico detectable del agente halocrómico, indicando de ese modo la presencia del ácido nucleico diana, y en el que si la molécula molde de ácido nucleico diana no está presente, la reacción de amplificación de ácido nucleico no genera un número de protones adecuado para cambiar lo suficiente el pH de partida de la mezcla de reacción para producir un cambio colorimétrico detectable del agente halocrómico, indicando de ese modo que el producto de la reacción de amplificación de ácido nucleico no se ha producido.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el cambio colorimétrico detectable es capaz de ser cuantificado a una longitud de trayectoria óptica de 50 μ m.

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la mezcla de reacción comprende al menos dos agentes halocrómicos.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cambio colorimétrico de la mezcla de reacción se detecta mediante la realización de la reacción de amplificación, o se detecta después de la realización de la reacción de amplificación.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la detección del cambio colorimétrico de la mezcla de reacción está asociada con una indicación digital de una presencia del producto de la reacción de amplificación.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la detección del cambio colorimétrico de la mezcla de reacción indica que se ha obtenido una fase exponencial o una fase de meseta de la reacción de amplificación.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la reacción de amplificación es una reacción isotérmica, tal como una amplificación por desplazamiento de hebra, una amplificación por desplazamientos múltiples, una amplificación por polimerasa recombinasa, una amplificación dependiente de helicasa, una amplificación por círculo rodante, o una amplificación isotérmica mediada por bucle.

8. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que el o al menos un agente halocrómico está a una concentración entre 50 μ M-260 μ M.

9. El método de cualquier reivindicación precedente en el que una solución que contiene la molécula molde de ácido nucleico es capaz de compensar el pH de partida de la mezcla de reacción en menos de 0,1 unidades de pH y en el que la muestra contribuye entre $4,8 \times 10^{-9}$ y $4,8 \times 10^{-18}$ equivalentes de iones hidronio a la mezcla de reacción, por 10 μ l de mezcla de reacción.

10. Un kit para la detección colorimétrica de un producto de reacción de amplificación de ácido nucleico, comprendiendo el kit:

un tampón que tiene una capacidad de tamponamiento equivalente a la del tampón Tris a una concentración entre 1,5 mM-19 mM en una solución que tiene un pH de partida de 8,0;
una enzima para catalizar una reacción de amplificación de ácido nucleico;
un agente halocrómico; e
instrucciones de uso que comprenden instrucciones para poner en contacto una muestra con una mezcla de reacción que comprende el tampón y la enzima y el agente halocrómico en condiciones en las que ocurre una reacción de amplificación de ácido nucleico y produce un producto de reacción de amplificación de ácido nucleico si la muestra contiene una molécula molde de ácido nucleico diana, teniendo la mezcla de reacción un pH de partida, y en el que si la molécula molde de ácido nucleico diana está presente, la reacción de amplificación de

- ácido nucleico cambia el pH de partida de la mezcla de reacción para producir un cambio colorimétrico detectable del agente halocrómico, indicando de ese modo la presencia del ácido nucleico diana, y si la molécula molde de ácido nucleico diana no está presente, la reacción de amplificación de ácido nucleico no genera un número de protones adecuado para cambiar lo suficiente el pH de partida de la mezcla de reacción para producir un cambio colorimétrico detectable del agente halocrómico, indicando de ese modo que el producto de la reacción de amplificación de ácido nucleico no se ha producido.
- 5
11. El kit de la reivindicación 10, que además comprende un ácido o base.
- 10
12. El kit de la reivindicación 10, que además comprende al menos uno de: dNTPs, cebadores, y un catión monovalente.
13. El kit de la reivindicación 12, en el que la enzima es una transcriptasa inversa, una ADN polimerasa, una ARN polimerasa, una RNasa, una helicasa, una recombinasa, una ligasa, una endonucleasa de restricción, una TAQ polimerasa, o una proteína de unión de una sola hebra.
- 15
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o el kit de la reivindicación 10 en el que el agente halocrómico es rojo fenol, púrpura de bromocresol, azul de bromotimol, rojo neutro, naftoftaleína, rojo cresol, cresolftaleína, o fenolftaleína, opcionalmente en el que cuando el método comprende dos agentes halocrómicos, y cuando el primer agente halocrómico es rojo fenol, el segundo agente halocrómico es azul de bromotimol.
- 20
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cambio colorimétrico detectable se detecta basándose en una formación de imagen de la mezcla de reacción, en el que la formación de imagen comprende determinar un cambio de contraste en una imagen de la mezcla de reacción, y en el que la formación de imagen comprende determinar un cambio en HSV y RGB de una imagen de la mezcla de reacción.
- 25

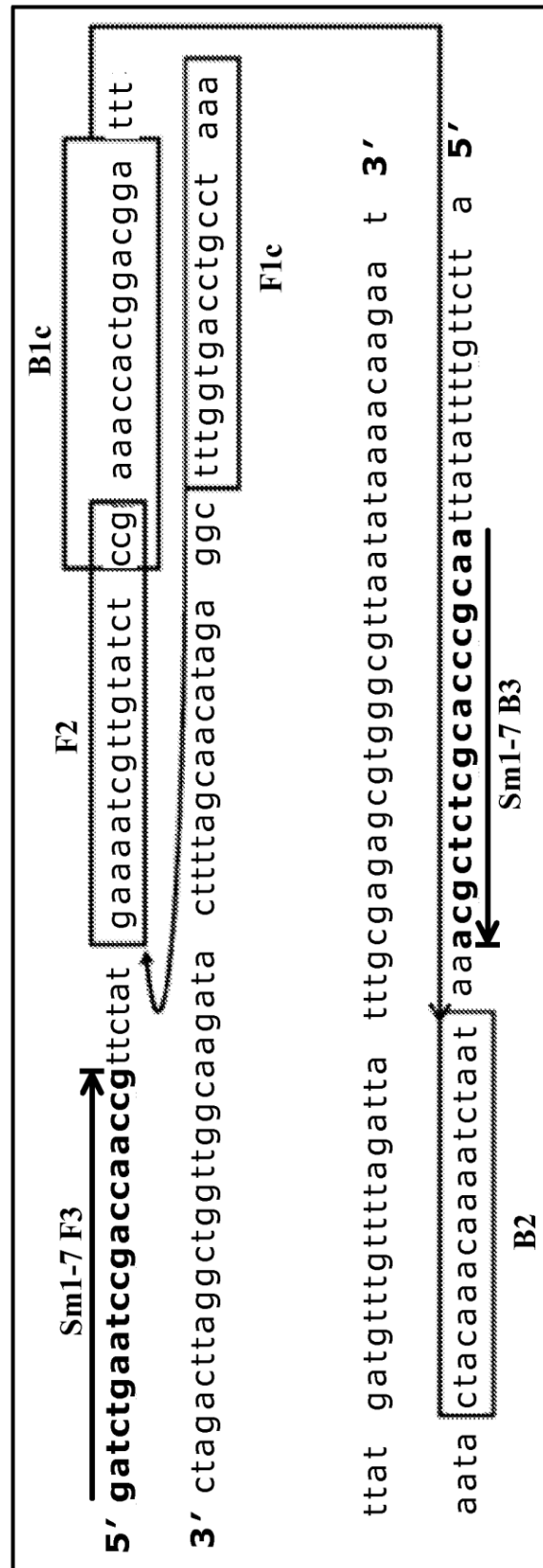


FIG. 1

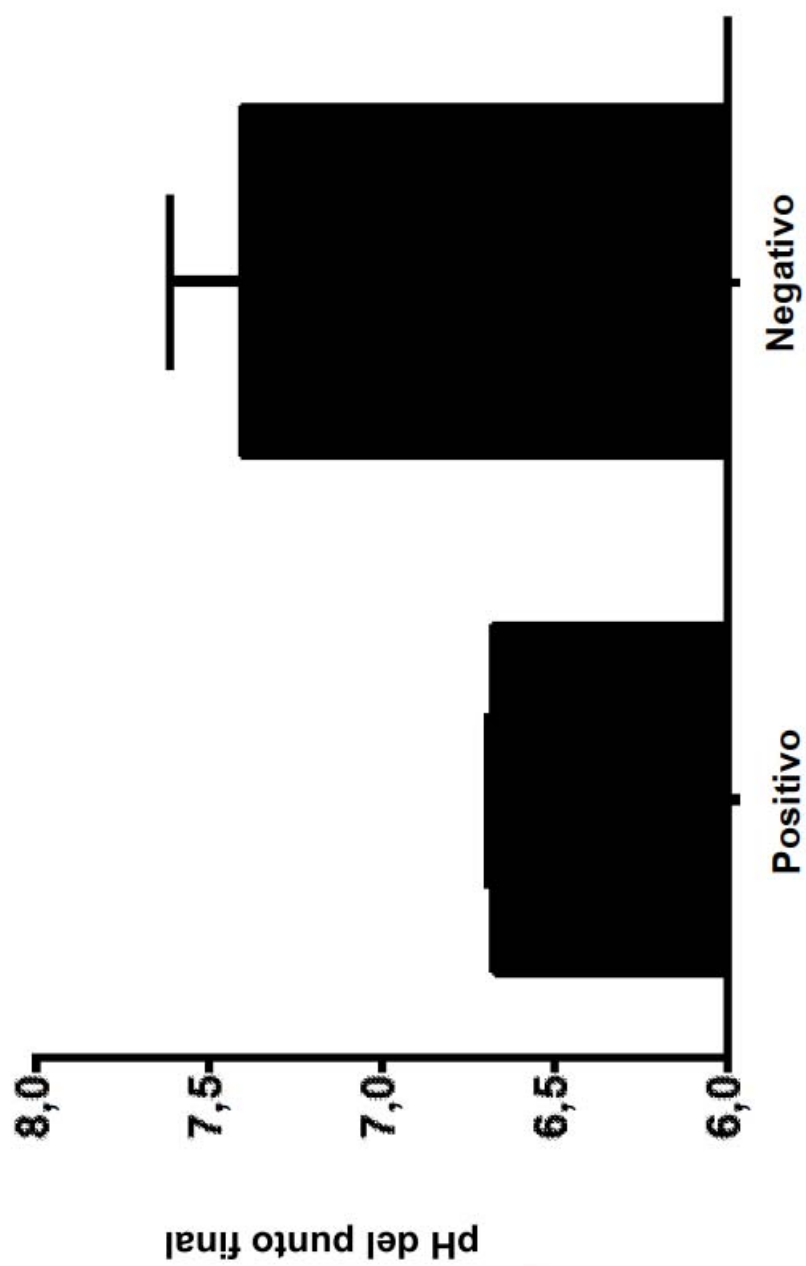


FIG. 2

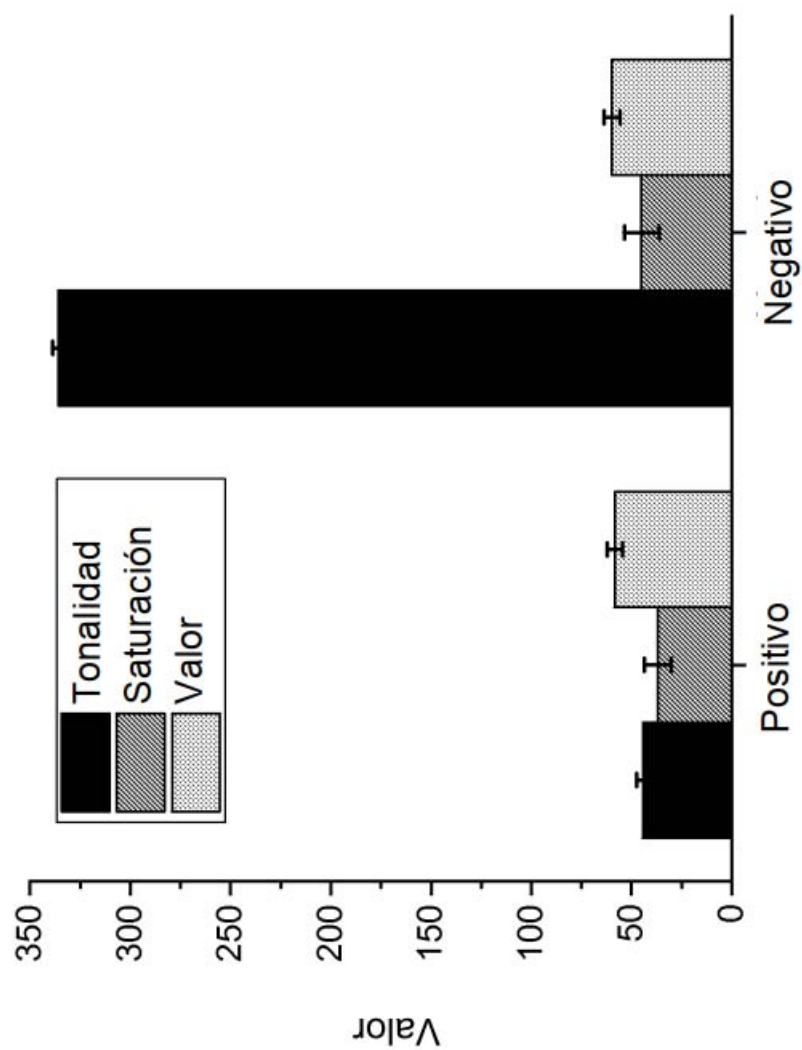


FIG. 3

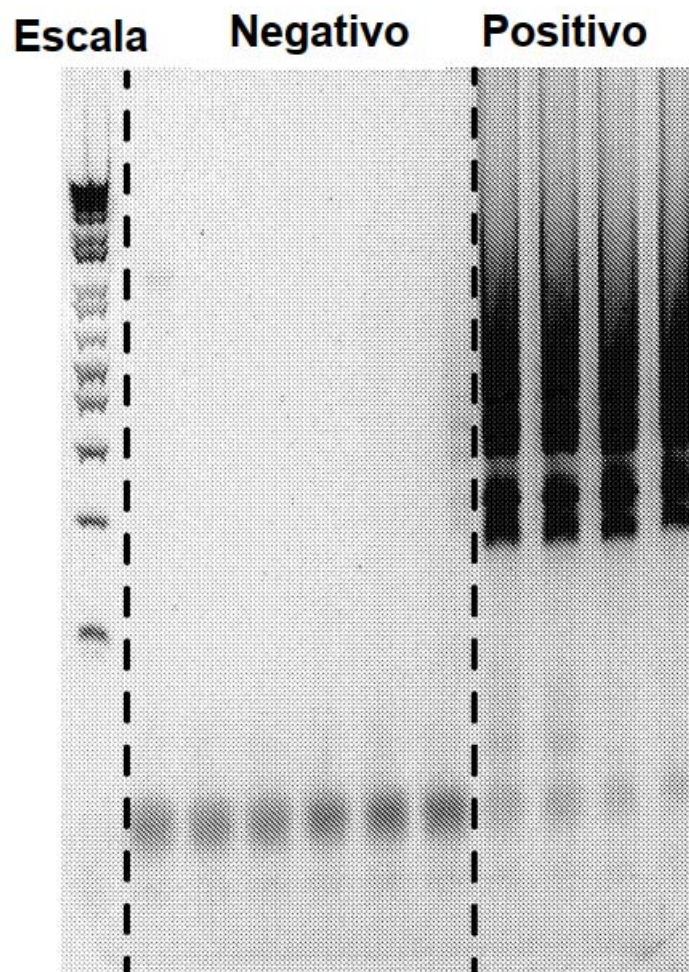


FIG. 4

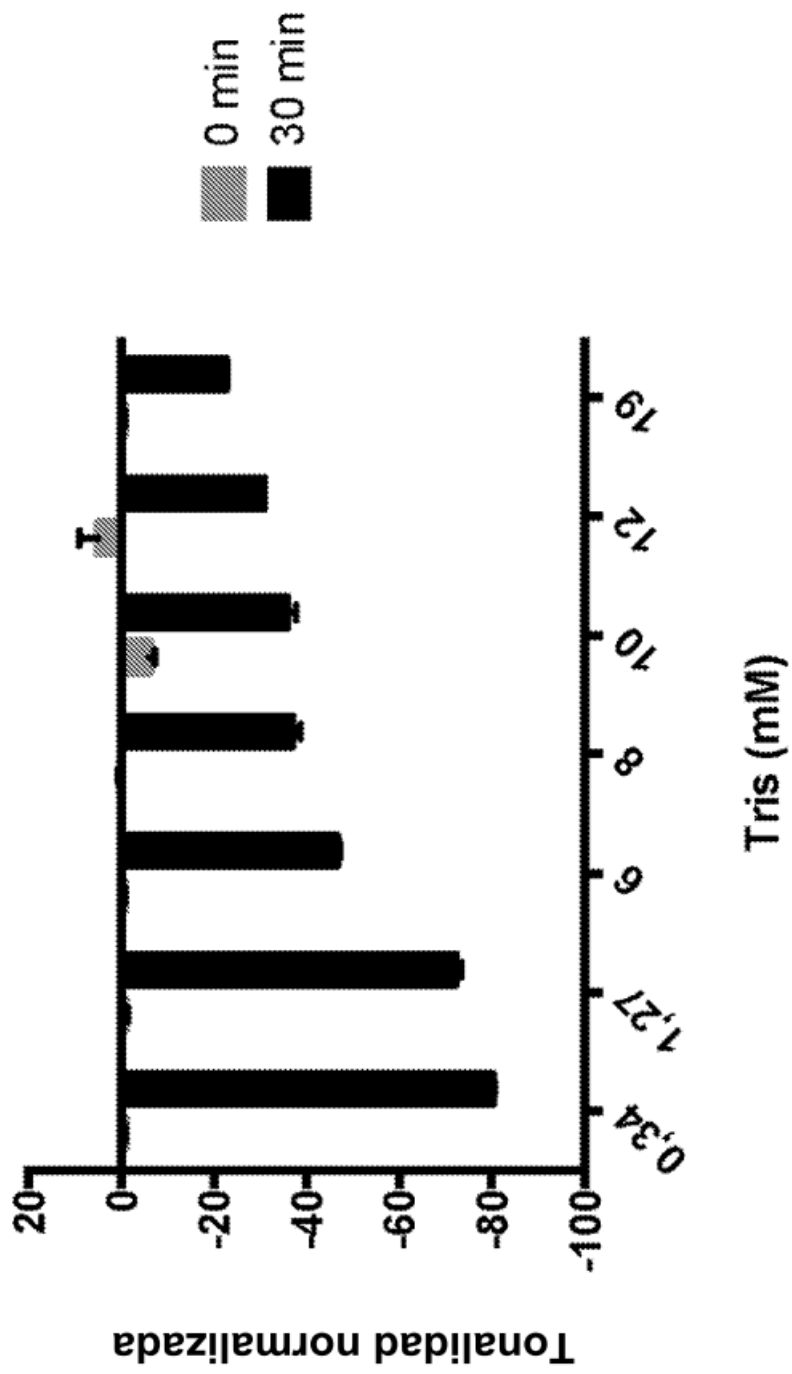


FIG. 5

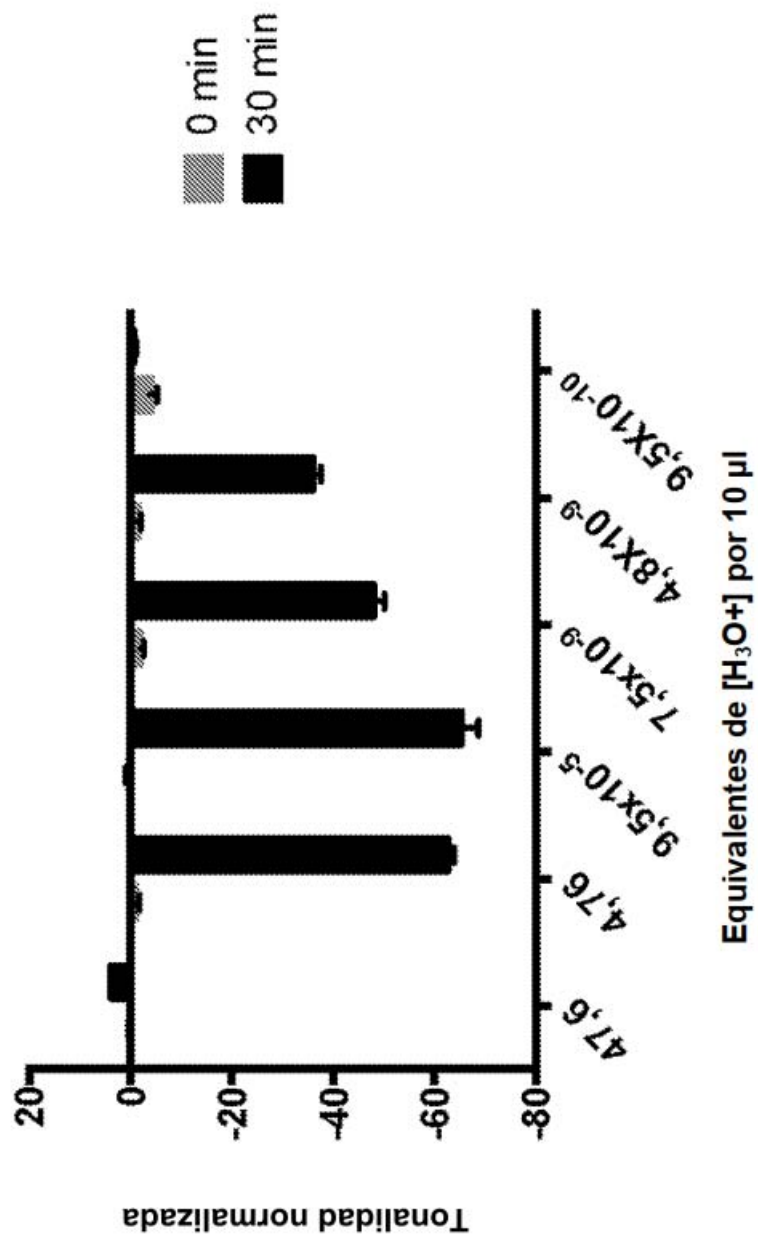


FIG. 6

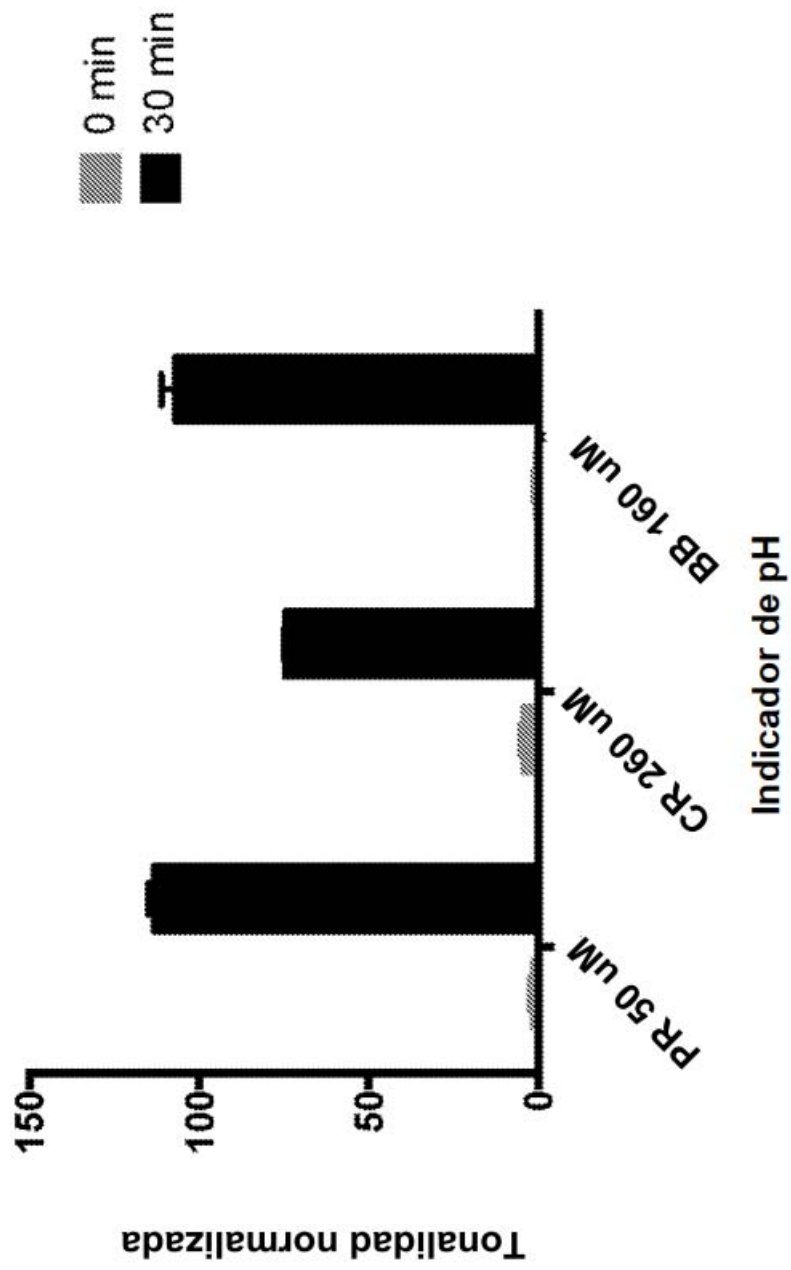


FIG. 7A

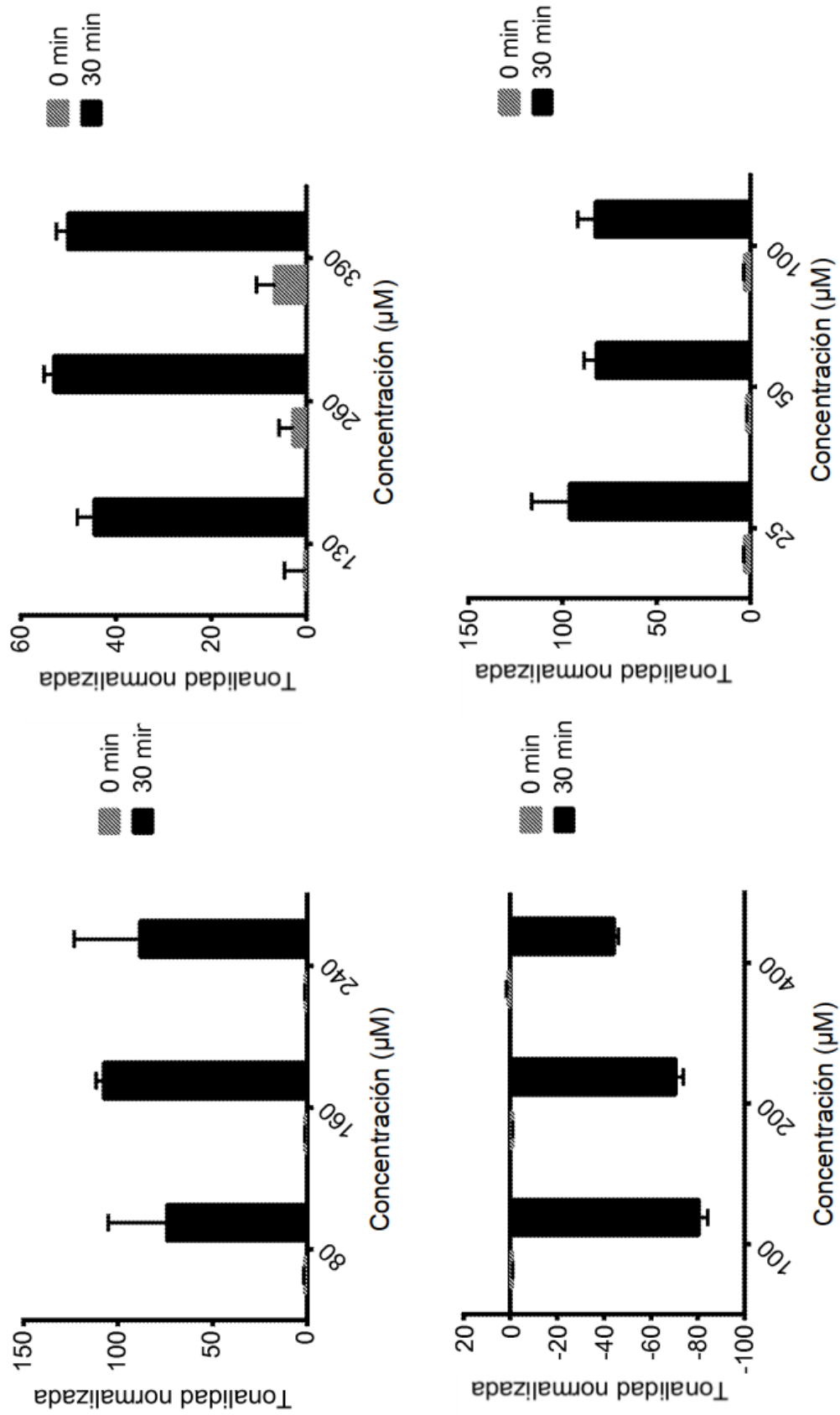


FIG. 7B

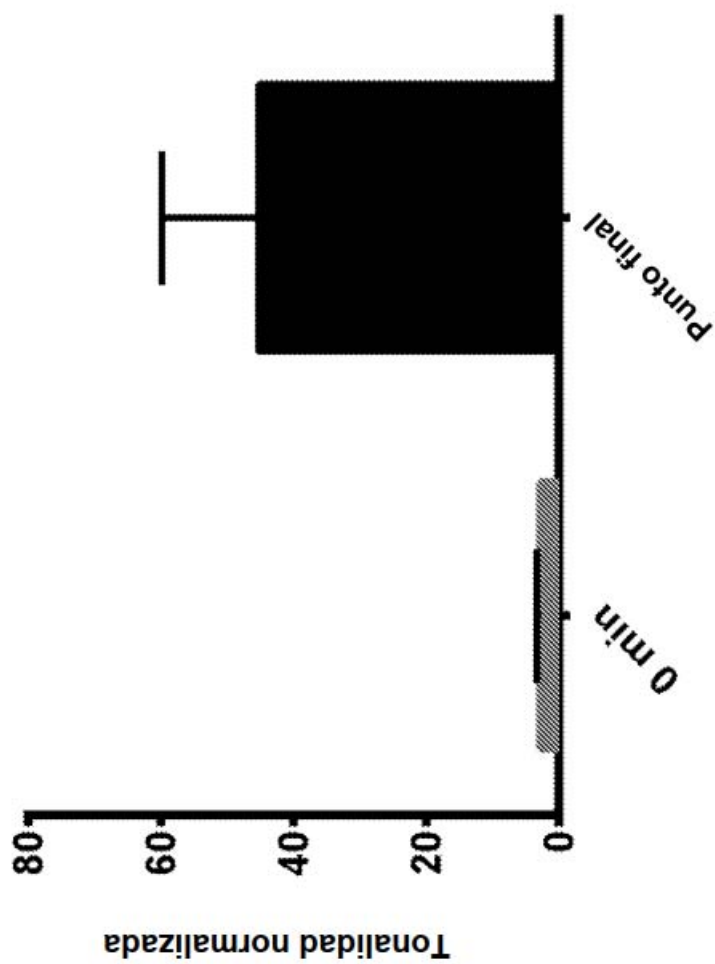


FIG. 7C

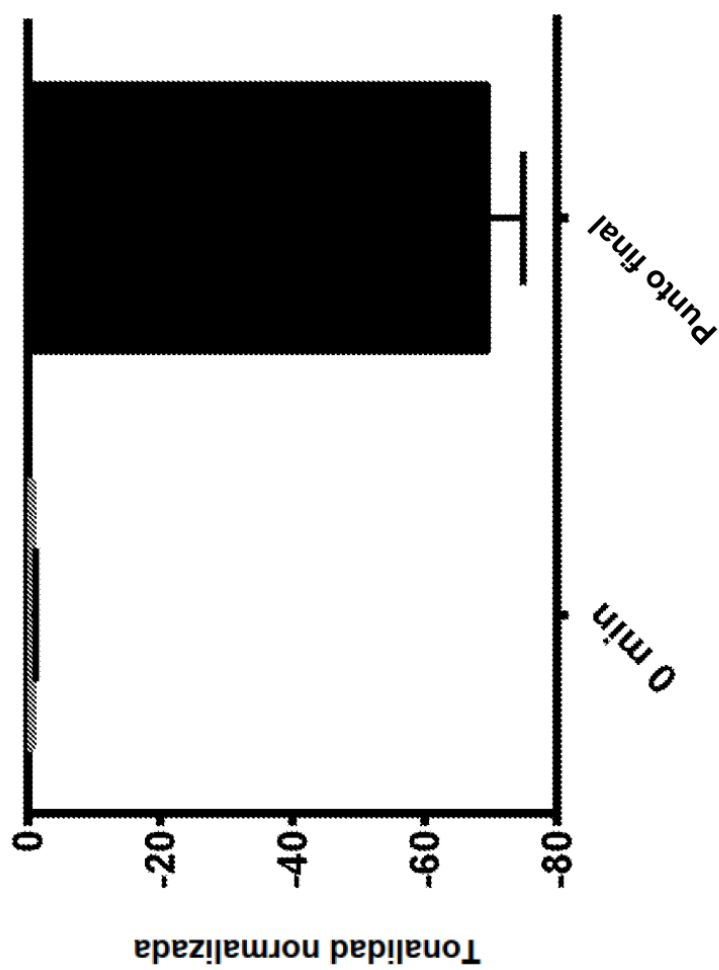


FIG. 7D

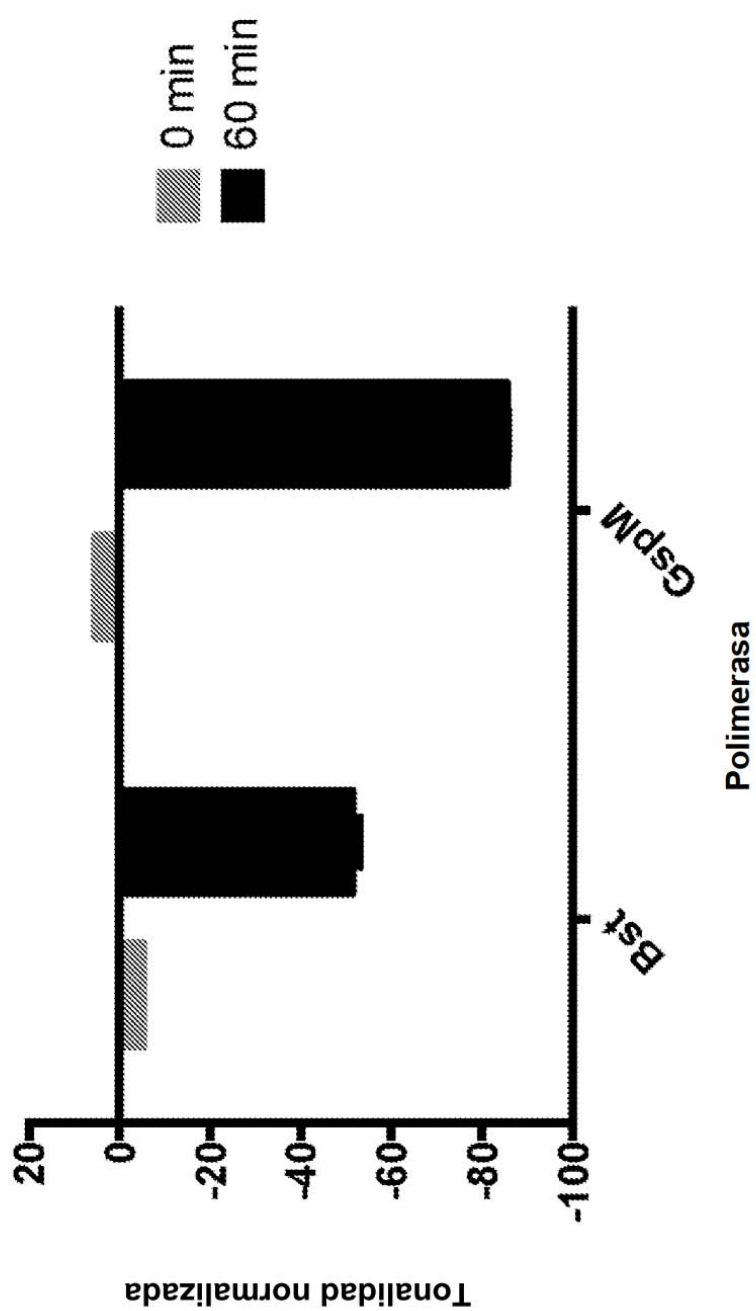


FIG. 8

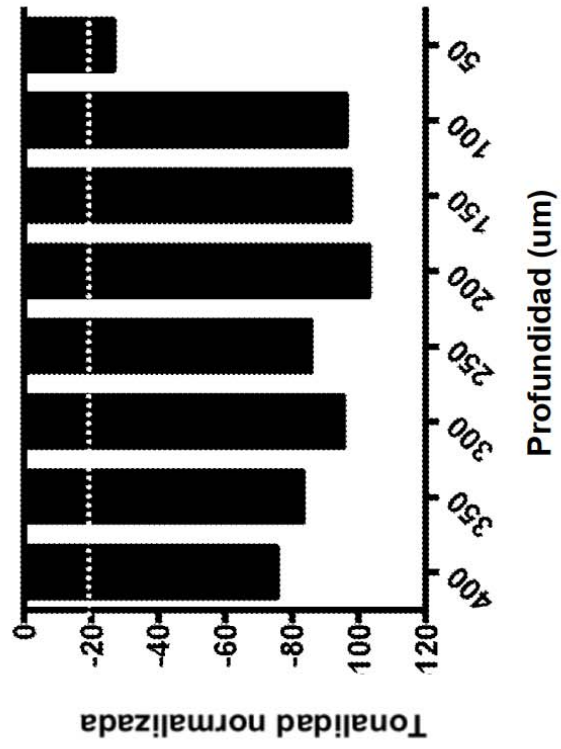


FIG. 9B

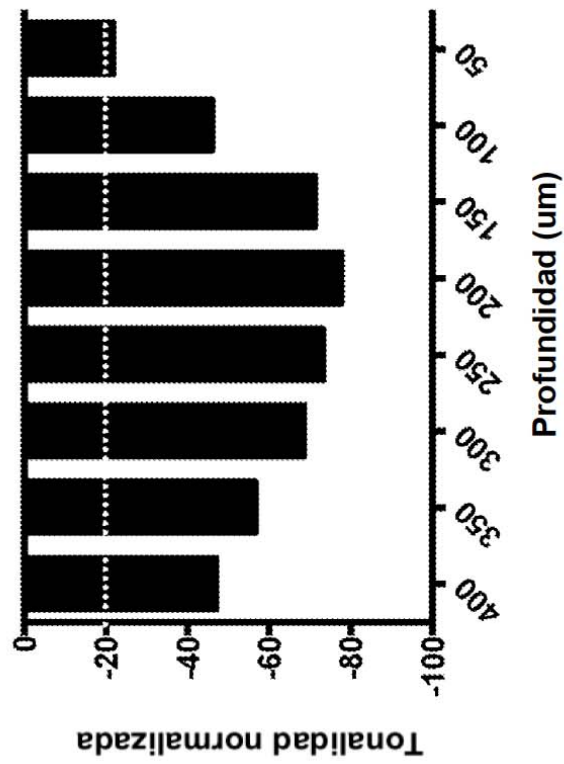


FIG. 9A

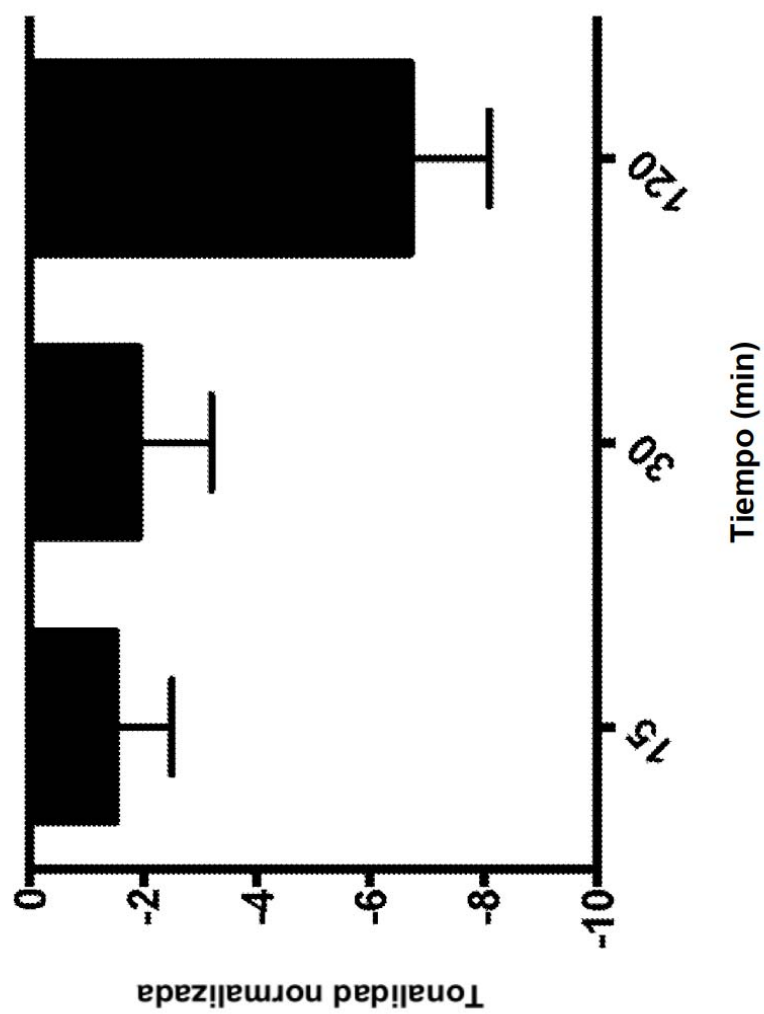


FIG. 10

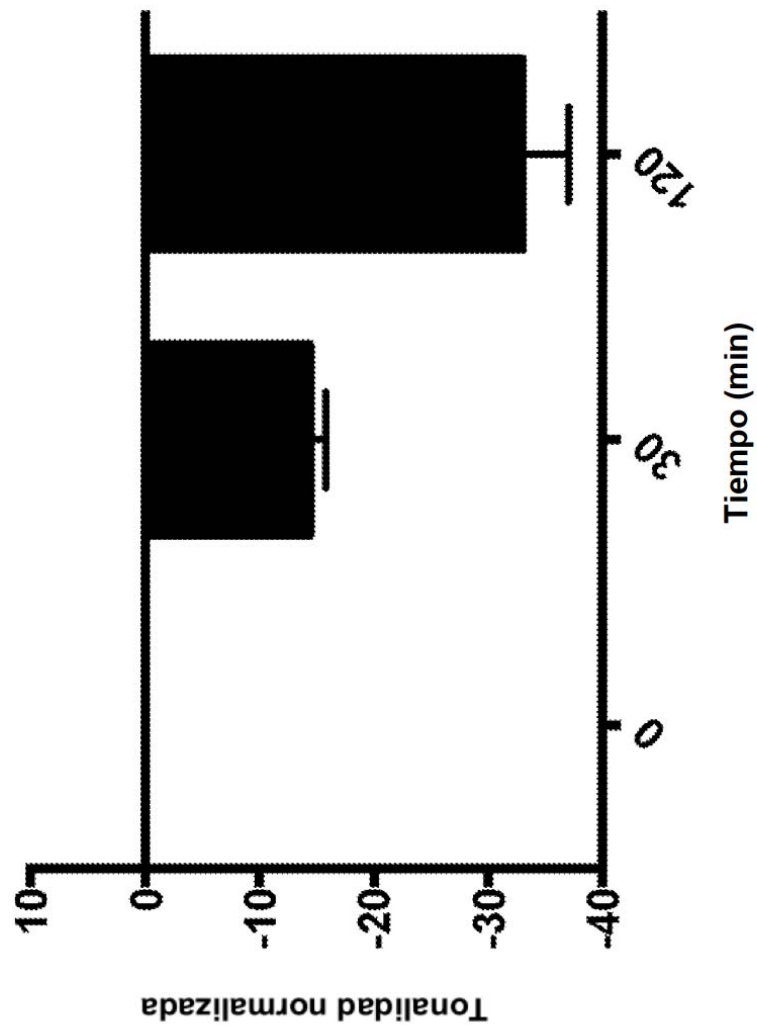


FIG. 11

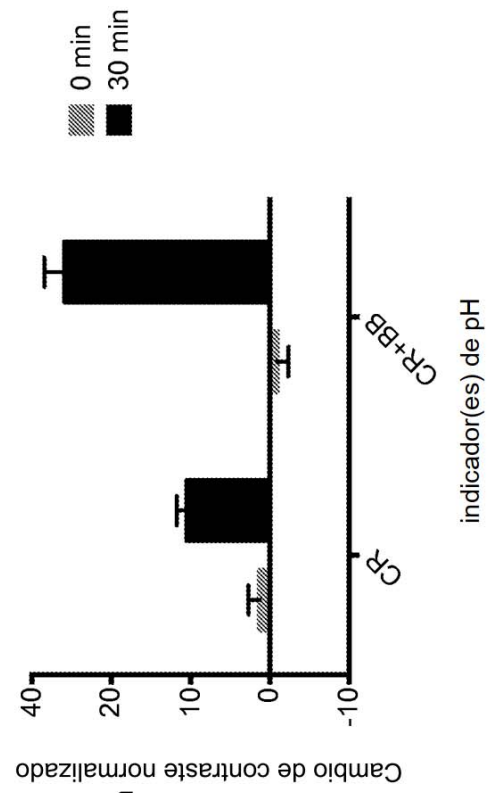


FIG. 12A

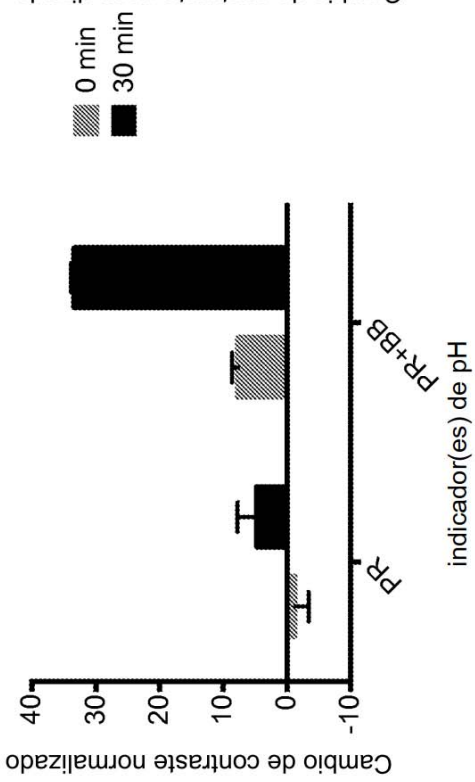


FIG. 12B

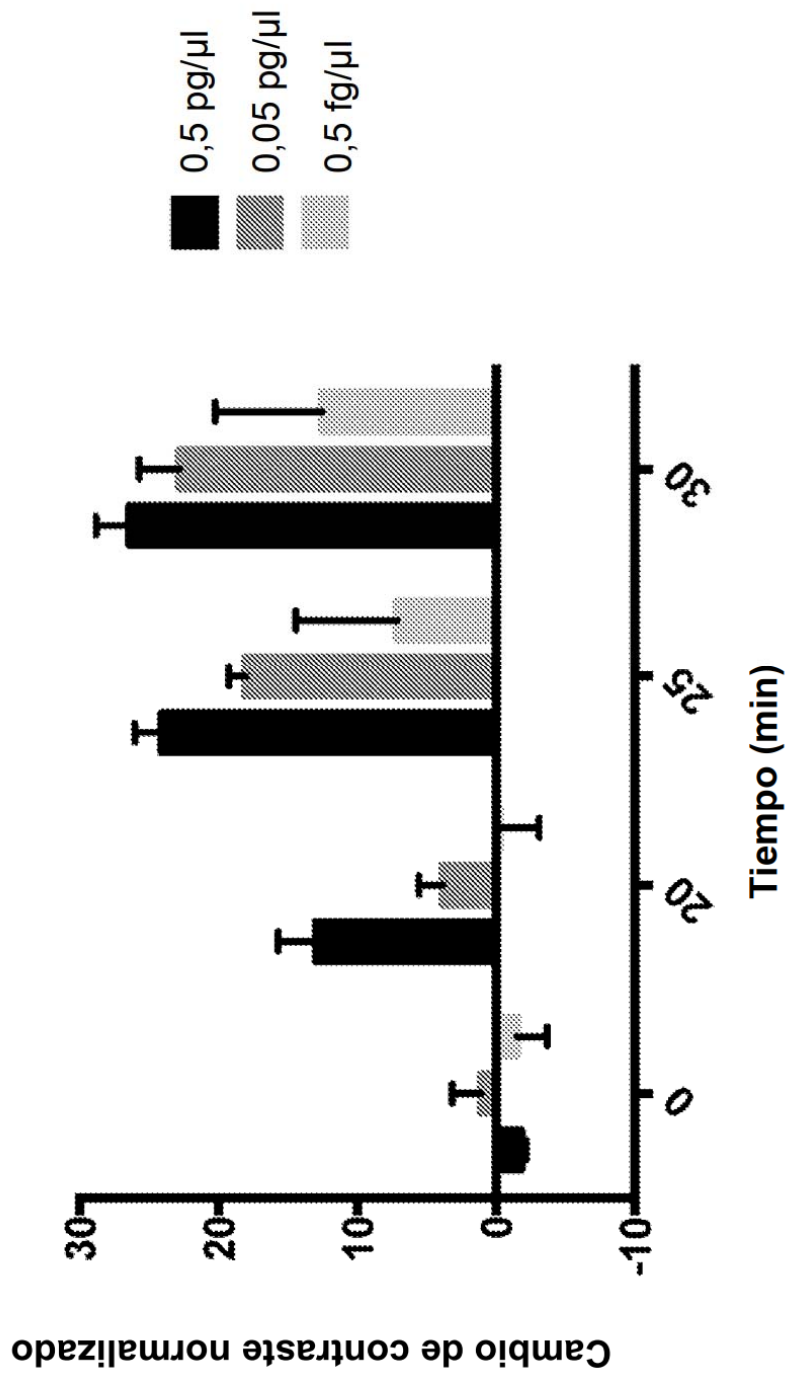


FIG. 13