

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 934**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2012 PCT/JP2012/077596**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13065574**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2012 E 12845733 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2787077**

54 Título: **Método para detectar ácido nucleico diana**

30 Prioridad:

31.10.2011 JP 2011238174

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

24.04.2020

73 Titular/es:

**EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)
4-19-9, Taito, Taito-ku
Tokyo 110-8408, JP**

72 Inventor/es:

**HOSAKA NORIMITSU y
HIGASHIDE SATOSHI**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 755 934 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

Método para detectar ácido nucleico diana

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para detectar un ácido nucleico diana y un kit para su uso en la detección.

10 **Antecedentes de la técnica**

Los métodos para detectar un ácido nucleico diana utilizando la complementariedad de las secuencias de ácido nucleico se han mejorado o modificado de forma diversa desde la hibridación Southern tradicional hasta la fecha actual. En particular, el establecimiento de métodos de amplificación *in vitro* ha permitido detectar cantidades mucho más pequeñas del ácido nucleico diana.

15 Como métodos para detectar ácidos nucleicos diana se han desarrollado métodos de detección que usan sondas unidas a marcadores (por ejemplo, radioisótopos (RI), agentes luminiscentes o fluoróforos) que comprenden ácidos nucleicos que tienen complementariedad con ácidos nucleicos diana. La detección de elementos múltiples se puede lograr marcando con una pluralidad de RI que difieren en la energía liberada o marcando con una pluralidad de agentes luminiscentes (o fluoróforos) que difieren en la longitud de onda de la luz emitida. Además, los métodos para determinar los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) también se han establecido como métodos de sonda de desactivación (sonda Q, del inglés *quenching*) (referencia de patentes 1).

25 Por otro lado, los métodos para detectar ácidos nucleicos diana utilizando la complementariedad de secuencias de ácido nucleico, como los llamados microplacas o micromatrices de ADN, que han permitido detectar las cantidades de una pluralidad de ácidos nucleicos diana, también se han puesto en práctica marcando ácidos nucleicos diana con radioisótopos o similares e hibridando los ácidos nucleicos diana marcados con sondas de oligonucleótidos (que tienen complementariedad con el ácido nucleico diana) inmovilizadas en una superficie en fase sólida (referencia de patente 2).

30 Los ejemplos de los métodos de amplificación de ácido nucleico incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (referencias de patente 3 y 4), la amplificación de desplazamiento de cadena (SDA) (referencia de patente 5), la amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA) (referencia de patente 6), la amplificación de círculo rodante (RCA) (referencia no de patente 1) y la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (referencia de patente 7). Estos métodos de amplificación de ácido nucleico también proporcionan la detección de ácidos nucleicos diana.

35 Existe otro método de amplificación de ácido nucleico usando ligasa, tal como la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (referencia de patente 8).

40 En el momento, la PCR se usa con frecuencia como método de amplificación de ácido nucleico. El método de PCR amplifica los ácidos nucleicos diana de manera exponencial mediante el uso de polimerasa termoestable y dos cebadores que tienen complementariedad con cada ácido nucleico diana y que realiza tres etapas repetitivamente con temperaturas controladas: (1) desnaturalización de ácidos nucleicos diana bicatenarios, (2) hibridación de los cebadores con los ácidos nucleicos diana desnaturalizados, y (3) reacción de extensión de los cebadores. Después de la reacción, los productos de amplificación se someten a electroforesis, y la presencia o ausencia del producto de amplificación de interés se puede detectar mediante el uso de un intercalador como el bromuro de etidio (EtBr) o verde SYBR(R). En otro método, el producto de amplificación se detecta mediante el uso de bases de nucleótidos unidas a fluoróforo en la reacción de extensión.

50 Los métodos alternativos establecidos implican detectar cuantitativamente la amplificación de los ácidos nucleicos diana mediante el uso de un fluoróforo y un desactivador (referencia de Patente 9). De manera específica, una sonda de oligonucleótidos tipificada por la sonda TaqMan(R), a la que se unen adyacentes un fluoróforo y un desactivador, se añade para la reacción de amplificación por PCR para realizar la reacción de PCR. En la etapa (2) de la PCR, la sonda también se hibrida con el ácido nucleico diana. Junto con la reacción de extensión de la etapa (3), la sonda se degrada por la actividad exonucleasa 5'→3' de la polimerasa. La luz emitida por el fluoróforo liberado del desactivador puede detectarse para detectar de ese modo el ácido nucleico diana. El documento WO 97/29210 describe un ensayo de detección por fluorescencia para sistemas de hibridación de PCR homogéneos. De Baar et al., (Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(5):1895-1902) describen un ensayo de amplificación isotérmica en tiempo real de un tubo para identificar y distinguir los subtipos A, B y C del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1, y las formas recombinantes en circulación AE y AG. Kennedy et al., (Analytical Biochemistry, 2006, 348:294-299) describen ácidos nucleicos bloqueados para optimizar las sondas de desplazamiento para PCR cuantitativa en tiempo real.

65 Se han formulado diversos métodos de detección de ácido nucleico que usan dicha combinación de un fluoróforo y un desactivador sobre la premisa de la amplificación por PCR (referencias de Patente 10 y 11). En ambos métodos, un fluoróforo está unido a una de las sondas de oligonucleótidos complementarios, y un desactivador está unido a la otra

sonda. Estos métodos se han formulado con el propósito de detectar ácidos nucleicos diana durante la amplificación en la etapa de hibridación (la etapa (2)) de la PCR.

5 La característica del método LAMP es que 4 cebadores (FIP, BIP, F3 y B3) están diseñados para 6 regiones en cada ácido nucleico diana, que a su vez se amplifica a una temperatura constante mediante el uso de reacción de desplazamiento de cadena. Una muestra que contiene ácidos nucleicos diana, los cebadores, ADN sintético de tipo desplazamiento de cadena, un sustrato y similares se mezclan y se incuban a una temperatura constante (alrededor de 65 ° C) para promover la reacción. En este método, el proceso de detección se puede realizar en una etapa. El uso adicional de un cebador de bucle B (LB) y/o de un cebador de bucle F (LF) puede acortar el tiempo requerido para la 10 amplificación en 1/2 a 1/3 (referencia de patente 12). Debido a la alta eficacia de amplificación, los ácidos nucleicos diana pueden amplificarse de 10^9 a 10^{10} veces en 15 minutos a 1 hora. Además, debido a su muy alta especificidad, la presencia o ausencia de la secuencia del gen diana de interés puede determinarse basándose en la presencia o ausencia de productos de amplificación. Uno de estos métodos detecta la presencia de productos de amplificación convirtiendo un ion pirofosfato obtenido como subproducto de la reacción de amplificación de ácido nucleico en una sal insoluble (sal de magnesio) y midiendo la turbidez de la solución de reacción o haciendo reaccionar el ion pirofosfato con un complejo de calceína-manganeso y detectando la fluorescencia de calceína liberada (material fluorescente) (referencia de patente 13). Los métodos de detección que utilizan sondas fluorescentes se han establecido aún más (referencias de patente 14 y 15).

20 También se ha documentado un método para detectar ácidos nucleicos diana amplificados mediante el método LAMP utilizando cebadores marcados con fluoróforo y sondas marcadas con desactivador (referencia no de patente 2). De manera específica, los ácidos nucleicos diana se amplifican mediante el método LAMP utilizando cebadores marcados con fluoróforo. Después de la amplificación, las sondas marcadas con desactivador se añaden a las mismas para hibridar las sondas marcadas con desactivador con cebadores libres marcados con fluoróforo que no han contribuido 25 a la amplificación del ácido nucleico diana. En este método, solo se detecta la luz emitida de fluoróforos en los cebadores marcados con fluoróforo que han contribuido a la amplificación del ácido nucleico diana, es decir, se han convertido en parte de los productos de amplificación.

Cualquiera de los métodos de detección de ácido nucleico anteriores tiene sus respectivas ventajas y desventajas. 30 Estos métodos requieren costosos equipos sensibles, en particular, para la reacción o la detección, y además implican diversas etapas. Por lo tanto, se requieren habilidades para llevar a cabo los métodos. Estas técnicas de detección de ácido nucleico se han puesto en práctica principalmente en laboratorios específicos dedicados a la amplificación de ácido nucleico. Por ejemplo, el método de detección descrito en la referencia no de patente 2 tiene el riesgo de causar la contaminación entre muestras o de entornos experimentales debido a la liberación de productos de amplificación al momento de abrir y cerrar la tapa de un recipiente de reacción, porque los desactivadores deben agregarse después 35 de la reacción de amplificación.

En los últimos años, ha habido una creciente demanda de pruebas de amplificación de ácido nucleico (NAT) en diversos campos, incluida la industria, medicina e investigación, mientras que los tipos de elementos de prueba se han ampliado. En consecuencia, los ensayos de amplificación de ácido nucleico han estado más extendidos que nunca. Los ensayos de amplificación de ácido nucleico también se utilizan en, por ejemplo, ensayos realizados con el objetivo de garantizar la seguridad de los productos sanguíneos contra diversos virus en el campo farmacéutico. Debido a la oleada de tal proliferación o universalización, ha habido demandas de técnicas de detección de ácido nucleico convenientemente utilizables sin contaminar los entornos de ensayo y, por extensión, de técnicas capaces de la 45 detección simultánea de múltiples elementos, tales como los ensayos de amplificación de ácido nucleico, que anteriormente solo se ponían en práctica en laboratorios específicos dedicados a la amplificación de ácidos nucleicos, que puedan llevarse a cabo en cada sitio o situación, como laboratorios generales, trabajos de campo, o junto al paciente.

50 **Listado de referencias**

Referencias de patentes

Referencia de patente 1: JP 2001-286300 A
 55 Referencia de patente 2: JP 2001-521622 A
 Referencia de patente 3: JP 61-274697 A
 Referencia de patente 4: JP 62-000281 A
 Referencia de patente 5: JP 5-192195 A
 Referencia de patente 6: JP 2-005864 A
 60 Referencia de patente 7: Patente japonesa N.º 3313358
 Referencia de patente 8: JP 2-002934 A
 Referencia de patente 9: JP 1994-500021 A
 Referencia de patente 10: JP 10-262700 A
 Referencia de patente 11: JP 2004-511227 A
 65 Referencia de patente 12: Publicación internacional N.º WO 2002/024902
 Referencia de patente 13: JP 2004-283161 A

Referencia de patente 14: JP 2001-272475 A

Referencia de patente 15: Publicación internacional N.º WO 2009/051214

Referencias no de patentes

- 5
- Referencia no de patente 1: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92: 4641-4645 (1995)
- Referencia no de patente 2: Journal of Medical Virology 81: 966-972 (2009)

10 Sumario de la invención

Problema técnico

15 Un objeto de la presente invención es proporcionar un método novedoso para detectar ácidos nucleicos diana. Más específicamente, un objeto de la presente invención es proporcionar un método para detectar ácidos nucleicos diana de manera más conveniente y económica que las técnicas convencionales, y un kit o similar para su uso en la detección.

20 Solución al problema

Para alcanzar el objeto, los presentes inventores han desarrollado recientemente un método capaz de amplificar y detectar fácilmente los ácidos nucleicos en un sistema cerrado. De manera específica, los presentes inventores tienen la intención de permitir que se agreguen cebadores marcados con fluoróforo y sondas marcadas con desactivador antes de la reacción de amplificación en métodos para detectar ácidos nucleicos diana amplificados por el método LAMP usando los cebadores marcados con fluoróforo y la sonda marcada con desactivador. Para este fin, los cebadores marcados con fluoróforo y las sondas marcadas con desactivador están diseñados para diferir en la temperatura de fusión (en lo sucesivo, en el presente documento, denominada Tf) entre ellos. Esto facilita la hibridación de los cebadores marcados con fluoróforo con el ácido nucleico diana en condiciones a una temperatura de reacción incluso en presencia de las sondas marcadas con desactivador. A medida que la temperatura disminuye, los cebadores marcados con fluoróforo que no se han unido al ácido nucleico diana pueden hibridar con las sondas marcadas con el desactivador. Como resultado, se ha descubierto que estos marcadores fluorescentes son desactivados por los desactivadores, mientras que solo se pueden detectar los marcadores fluorescentes en los cebadores marcados con fluoróforo unidos con éxito al ácido nucleico diana.

35 Los presentes inventores han descubierto además que este método puede combinarse no solo con la amplificación de LAMP sino también con cualquier otro método de amplificación de ácido nucleico y puede llevarse a cabo sin involucrar una etapa de amplificación de ácido nucleico diana, es decir, incluso usando cebadores marcados con fluoróforo como simples sondas. Por consiguiente, se pueden alcanzar los objetos de la presente invención, y la presente invención se ha completado basándose en estos hallazgos.

40 De manera específica, la presente invención se constituye tal como se describe a continuación en [1] a [15],

[1] Un método para detectar uno o más ácidos nucleicos diana presentes en una muestra, que comprende las siguientes etapas:

- 45
- (1) agregar un cebador o sonda marcada con fluoróforo y una sonda marcada con un desactivador a la muestra, o agregar la muestra a un cebador o sonda marcada con fluoróforo y una sonda marcada con un desactivador, en donde
- 50 el cebador o sonda marcado con fluoróforo es un oligonucleótido marcado con fluoróforo que tiene complementariedad con un ácido nucleico diana, y la sonda marcada con desactivador es un oligonucleótido marcado con desactivador que tiene complementariedad con el cebador o sonda marcada con fluoróforo y que tiene una temperatura de fusión (Tf) menor que la del cebador o sonda marcada con fluoróforo;
- 55 (2) incubar la muestra a una temperatura igual o inferior a la temperatura de fusión (Tf) del cebador o sonda marcada con fluoróforo y superior a la temperatura de fusión (Tf) de la sonda marcada con desactivador, en donde el ácido nucleico diana se amplifica en condiciones isotérmicas por amplificación isotérmica de ácidos nucleicos iniciada por cebadores quiméricos (ICAN), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación por círculo rodante (RCA), proceso de amplificación inteligente versión 2 (SMAP2) o amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP);
- 60 (3) hibridar el cebador o sonda marcado con fluoróforo que no está con el ácido nucleico diana, con la sonda marcada con desactivador incubando la muestra a una temperatura igual o inferior a la temperatura de fusión (Tf) de la sonda marcada con desactivador, desactivando de este modo con el desactivador la fluorescencia emitida por el cebador o sonda marcada con fluoróforo que no ha hibridado con el ácido nucleico diana; y
- 65 (4) medir la fluorescencia del cebador o sonda marcado con fluoróforo unido al ácido nucleico diana, mientras que la muestra se mantiene a una temperatura igual o inferior a la temperatura de fusión (Tf) de la sonda marcada con desactivador, en donde solo se pueden detectar los marcadores fluorescentes en el cebador o

sonda marcado con fluoróforo unido con éxito al ácido nucleico diana.

[2] El método de detección de acuerdo con [1], en donde el oligonucleótido de la sonda marcada con desactivador tiene una longitud de bases más corta que la del oligonucleótido del cebador o sonda marcada con fluoróforo.

[3] El método de detección de acuerdo con [1] o [2], en donde el oligonucleótido de la sonda marcada con desactivador comprende una base modificada.

[4] El método de detección de acuerdo con una cualquiera de [1] a [3], en donde el cebador o sonda marcada con fluoróforo se inmoviliza sobre una superficie en fase sólida para su uso.

[5] El método de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4], en el que se usa una combinación de dos o más cebadores o sondas marcadas con fluoróforo que difieren en longitud de onda de emisión y sondas marcadas con inhibidor respectivamente compatibles con los mismos para detectar dos o más ácidos nucleicos diana.

[6] El método de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [5], en donde la medición de la fluorescencia en la etapa (4) es la determinación visual.

[7] El método de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [5], en donde la medición de la fluorescencia en la etapa (4) es la determinación usando un detector de fluorescencia.

[8] Un kit para su uso en un método de detección de acuerdo con cualquiera de [1] a [7], que comprende una o más combinaciones, cada una de las cuales comprende:

un cebador o sonda marcado con fluoróforo, en donde el cebador o sonda marcado con fluoróforo es un oligonucleótido marcado con fluoróforo que tiene complementariedad con cada ácido nucleico diana, y una sonda marcada con desactivador, en donde la sonda marcada con desactivador es un oligonucleótido marcado con desactivador que tiene complementariedad con el cebador o sonda marcada con fluoróforo y que tiene una temperatura de fusión (Tf) menor que la del cebador o sonda marcada con fluoróforo, en donde el desactivador es compatible con el fluoróforo, y un cebador y una polimerasa para amplificación en condiciones isotérmicas por ICAN, SDA, RCA, SMAP2 o LAMP.

[9] El kit para la detección de ácido nucleico diana de acuerdo con [8], en donde el oligonucleótido de la sonda marcada con desactivador tiene una longitud de bases más corta que la del oligonucleótido del cebador o sonda marcada con fluoróforo.

[10] El kit para la detección de ácido nucleico diana de acuerdo con [8], en donde el oligonucleótido de la sonda marcada con desactivador comprende una base modificada.

[11] El kit de acuerdo con cualquiera de [8] a [10], en donde el kit comprende además un reactivo para la amplificación de ácido nucleico.

[12] El kit para la detección de ácido nucleico diana de acuerdo con cualquiera de [8] a [11], en donde el cebador o sonda marcado con fluoróforo se inmoviliza sobre una superficie en fase sólida.

[13] Uso de un kit en un método de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el kit comprende una o más combinaciones, cada una de las cuales comprende:

un cebador o sonda marcado con fluoróforo, en donde el cebador o sonda marcada con fluoróforo es un oligonucleótido marcado con fluoróforo que tiene complementariedad con un ácido nucleico diana, y una sonda marcada con desactivador, en donde la sonda marcada con desactivador es un oligonucleótido marcado con desactivador que tiene complementariedad con el cebador o sonda marcada con fluoróforo y que tiene una temperatura de fusión (Tf) menor que la del cebador o sonda marcada con fluoróforo, en donde el desactivador es compatible con el fluoróforo.

[14] Uso del kit de acuerdo con [13], en donde:

(a) el oligonucleótido de la sonda marcada con desactivador tiene una longitud de bases más corta que la del oligonucleótido del cebador o sonda marcada con fluoróforo; o

(b) el oligonucleótido de la sonda marcada con desactivador comprende una base modificada.

[15] Uso del kit de acuerdo con [13] o [14], en donde:

(a) el kit comprende además un reactivo para la amplificación de ácido nucleico; y/o

(b) el cebador o sonda marcada con fluoróforo se inmoviliza sobre una superficie en fase sólida.

Efectos ventajosos de la invención

De acuerdo con el método de la referencia no de patentes 2, la reacción de amplificación no tiene lugar normalmente, si se agregan cebadores marcados con fluoróforo y sondas marcadas con desactivador antes de la reacción de amplificación. En este caso, los ácidos nucleicos diana son difíciles de detectar. En la presente invención, sin embargo, los cebadores o sondas marcadas con fluoróforo (en lo sucesivo, en el presente documento, denominados cebadores/sondas marcadas con fluoróforo) y las sondas marcadas con desactivador pueden tener distintas temperaturas de fusión (Tf). Los cebadores marcados con fluoróforo resultantes pueden hibridar preferentemente con ácidos nucleicos diana incluso en presencia de las sondas marcadas con desactivador.

Dicha ventaja de la presente invención se ejerce eficazmente no solo en el método de la referencia no de patente 2 que implica una etapa de amplificación, sino también en otros aspectos libres de la etapa de amplificación.

El método de la presente invención elimina la necesidad de agregar sondas marcadas con desactivador después de la reacción de amplificación y, por lo tanto, no corre peligro de contaminación entre muestras o entornos experimentales debido a la liberación de productos de amplificación. Asimismo, el método de la presente invención no implica una etapa de lavado o similar y hace que el control de temperatura sea relativamente conveniente y libre de la precisión necesaria y, por lo tanto, puede detectar ácidos nucleicos diana de manera más conveniente y económica sin la necesidad de habilidades o equipos especiales, en comparación con los métodos de hibridación convencionales.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama esquemático que muestra un aspecto básico del método de la presente invención.

La Fig. 2 es un diagrama esquemático que muestra el método de la presente invención que comprende además la etapa de amplificar ácidos nucleicos diana.

La Fig. 3A es un diagrama esquemático que muestra el método de la presente invención aplicado a una micromatriz (aspecto sin amplificar los ácidos nucleicos diana).

La figura 3B es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de inmovilización de cebadores/sondas marcadas con fluoróforo en el método de la presente invención aplicado a una micromatriz.

La Fig. 3C es un diagrama esquemático que muestra el método de la presente invención aplicado a una micromatriz (aspecto que implica la etapa de amplificar ácidos nucleicos diana).

La Fig. 4 muestra la curva de turbidez en tiempo real de un ácido nucleico diana usando cebadores/sondas marcadas con fluoróforo en el Ejemplo 2.

La Fig. 5 muestra la detección de fluorescencia antes y después de la adición de CT-LBc-Q1-0 (SEQ ID NO: 8) en el Ejemplo 2.

La Fig. 6 muestra los resultados de la reacción estándar discriminante, *Chlamydia trachomatis*, y *Neisseria gonorrhoeae* en el ejemplo 3.

La Fig. 7 muestra la curva de turbidez en tiempo real de cada ácido nucleico diana añadido en el Ejemplo 4.

La Fig. 8 muestra los tubos de reacción irradiados con UV después de la reacción de amplificación y la posterior adición de sondas marcadas con desactivador seguido de calentamiento a 95 °C durante 5 minutos y luego enfriamiento a temperatura ambiente en el Ejemplo 4.

La Fig. 9 muestra tubos de reacción irradiados con UV en el Ejemplo 5.

La Fig. 10 muestra la curva de turbidez en tiempo real de un ácido nucleico diana usando cebadores/sondas marcadas con fluoróforo y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 6.

La Fig. 11 muestra tubos de reacción irradiados con UV después de la reacción de amplificación en el Ejemplo 6.

La Fig. 12 muestra una curva de turbidez en tiempo real a partir de la reacción de amplificación de ácido nucleico diana de un solo elemento de *Chlamydia trachomatis* usando cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 7.

La Fig. 13 muestra tubos de reacción irradiados con UV después de la reacción de amplificación de ácido nucleico diana de un solo elemento de *Chlamydia trachomatis* usando cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 7.

La Fig. 14 muestra una longitud de onda de fluorescencia después de la reacción de amplificación de ácido nucleico diana de un solo elemento de *Chlamydia trachomatis* usando cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 7.

La Fig. 15 muestra una curva de turbidez en tiempo real a partir de la reacción de amplificación de ácido nucleico diana de un solo elemento de *Neisseria gonorrhoeae* usando cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 7.

La Fig. 16 muestra tubos de reacción irradiados con UV después de la reacción de amplificación de ácido nucleico diana de un solo elemento de *Neisseria gonorrhoeae* usando cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 7.

La Fig. 17 muestra una longitud de onda de fluorescencia después de la reacción de amplificación de ácido nucleico diana de un solo elemento de *Neisseria gonorrhoeae* usando cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 7.

La Fig. 18 muestra una curva de turbidez en tiempo real a partir de la reacción de amplificación de ácido nucleico diana de un solo elemento de un ácido nucleico artificial usando cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 7.

La Fig. 19 muestra tubos de reacción irradiados con UV después de la reacción de amplificación de ácido nucleico diana de un solo elemento de *Neisseria gonorrhoeae* usando cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 7.

La Fig. 20 muestra una longitud de onda de fluorescencia después de la reacción de amplificación de ácido nucleico diana de un solo elemento de un ácido nucleico artificial usando cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 7.

La Fig. 21 muestra una curva de turbidez en tiempo real a partir de la reacción de amplificación de ácido nucleico diana de dos elementos de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* usando cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 7.

La Fig. 22 muestra tubos de reacción irradiados con UV después de la reacción de amplificación de ácido nucleico

diana de dos elementos de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* usando cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 7.

La Fig. 23 muestra una longitud de onda de fluorescencia después de la reacción de amplificación de ácido nucleico diana de dos elementos de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* usando cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 7.

La Fig. 24 muestra una curva de turbidez en tiempo real a partir de la reacción de amplificación de ácido nucleico diana de dos elementos de *Chlamydia trachomatis* y un ácido nucleico artificial usando cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 7.

La Fig. 25 muestra tubos de reacción irradiados con UV después de la reacción de amplificación de ácido nucleico diana de dos elementos de *Chlamydia trachomatis* y un ácido nucleico artificial usando cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 7.

La Fig. 26 muestra una longitud de onda de fluorescencia después de la reacción de amplificación de ácido nucleico diana de dos elementos de *Chlamydia trachomatis* y un ácido nucleico artificial usando cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 7.

La Fig. 27 muestra una curva de turbidez en tiempo real a partir de la reacción de amplificación de ácido nucleico diana de dos elementos de *Neisseria gonorrhoeae* y un ácido nucleico artificial usando cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 7.

La Fig. 28 muestra tubos de reacción irradiados con UV después de la reacción de amplificación de ácido nucleico diana de dos elementos de *Neisseria gonorrhoeae* y un ácido nucleico artificial usando cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 7.

La Fig. 29 muestra una longitud de onda de fluorescencia después de la reacción de amplificación de ácido nucleico diana de dos elementos de *Neisseria gonorrhoeae* y un ácido nucleico artificial usando cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 7.

La Fig. 30 muestra una curva de turbidez en tiempo real a partir de la reacción de amplificación de ácido nucleico diana de tres elementos de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y un ácido nucleico artificial usando cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 7.

La Fig. 31 muestra tubos de reacción irradiados con UV después de la reacción de amplificación de ácido nucleico diana de tres elementos de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y un ácido nucleico artificial usando cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 7.

La Fig. 32 muestra una longitud de onda de fluorescencia después de la reacción de amplificación de ácido nucleico diana de tres elementos de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y un ácido nucleico artificial usando cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, y sondas marcadas con desactivador en el Ejemplo 7.

Descripción de las realizaciones

En lo sucesivo en el presente documento, se describirá con detalle la presente invención.

La "muestra" se refiere a una mezcla que puede contener un "ácido nucleico diana" a detectar. La muestra proviene de un ser (por ejemplo, sangre, saliva, fluido corporal y tejido corporal) incluyendo un ser humano, de un ambiente (por ejemplo, suelo, agua de mar y agua ambiental (aguas termales, aguas de baño, agua de torre de refrigeración, etc.)), o de un material artificial o natural (por ejemplo, alimentos procesados como el pan, alimentos fermentados como el yogur, plantas cultivadas como arroz y trigo, microbios y virus) y generalmente se usa mediante extracción de ácido nucleico. En caso necesario, la purificación de ácido nucleico puede realizarse adicionalmente.

El "ácido nucleico diana" se refiere a una molécula de ácido nucleico a detectar de acuerdo con la presente invención. El tipo de ácido nucleico puede ser desoxirribonucleótido (ADN), ribonucleótido (ARN), o una mezcla o un conjugado de los mismos. Las bases que constituyen el ácido nucleico pueden ser nucleótidos naturales, por ejemplo, guanina (G), adenina (A), timina (T), citosina (C) y uracilo (U) o pueden contener otras bases naturales y artificiales modificadas. En este contexto, la "base modificada" significa una base en la cual cualquiera de estos 5 nucleótidos ha sufrido modificación química. Los ejemplos de la base modificada incluyen, pero sin limitación, metilcitosina, pseudouridina, 4-tiouridina, dihidrouridina, queuosina e hipoxantina (inosina (I)). En la presente invención, el ácido nucleico diana debe ser monocatenario cuando se detecta. Incluso un ácido nucleico bicatenario o un ácido nucleico que tiene una conformación, sin embargo, puede usarse después de convertirse en hebras simples por desnaturalización térmica, tratamiento de desnaturalización alcalina, o similares. El ácido nucleico diana de la presente invención también incluye tales formas desnaturalizadas. Como alternativa, el "ácido nucleico diana" también incluye ADNc preparado mediante reacción de transcripción inversa a partir de un molde de ARN.

El "oligonucleótido" significa un oligómero lineal compuesto de un enlace a través de enlaces fosfodiéster de nucleósidos como la adenosina, timidina, citidina, guanosina y uridina o nucleósidos que tienen una base modificada y se refiere a ADN, ARN, o un conjugado de los mismos. En algunos casos, se puede usar un ácido nucleico peptídico (PNA).

La "complementariedad" no solo significa que una cadena polinucleotídica u oligonucleotídica hibrida con otra cadena para formar una estructura bicatenaria donde los respectivos nucleótidos de las cadenas forman pares de bases de Watson-Crick, sino que significa que los nucleótidos forman pares de bases que no son de Watson-Crick, tales como pares de nucleótidos modificados que tienen una base de desoxiinosina (dl) o 2-aminopurina.

El "fluoróforo" significa una molécula o grupo funcional que libera energía redundante como una onda electromagnética (luz emitida) cuando regresa al estado fundamental desde el estado excitado de los electrones resultante de la absorción de la energía de la luz de excitación irradiada con una longitud de onda dada. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen, pero sin limitación, fluoresceína y sus derivados (fosforamida de fluoresceína (FAM), isotiocianato de fluoresceína, etc.), rodamina y sus derivados (Texas Red, etc.) y colorantes Cy (Cy3, Cy5, etc.).

El "desactivador" significa una molécula o un grupo funcional que tiene un nivel de energía apropiado para absorber la energía de la luz emitida del fluoróforo. Se puede usar un fluoróforo como desactivador y, por ejemplo, la tetrametilrodamina (TAMRA) se puede utilizar como desactivador de la fosforamida de fluoresceína (FAM). Sin embargo, una molécula o un grupo funcional que absorbe y excita la luz emitida por el fluoróforo, pero no emite luz en sí mismo es más adecuado como desactivador. Los ejemplos de los mismos incluyen, pero sin limitación, DABCYL, Black Hole Quencher (BHQ (TM) (Biosearch Technologies, Inc.)) y Eclipse (TM) Dark Quencher (Epoch Biosciences, Inc.).

La "incubación" significa que la muestra se deja a una temperatura particular. Los ejemplos de medios para la conductividad térmica incluyen, pero sin limitación, baños de agua, baños de aire y baños de metal.

La temperatura de fusión (Tf) significa la temperatura a la cual 1/2 de las moléculas de ADN se disocian en cadenas simples durante el calentamiento de una solución de ADN bicatenaria. En la presente invención, la temperatura de fusión se calcula de acuerdo con la siguiente expresión del método vecino más cercano utilizando una concentración de Na⁺ de 50 mM (Na⁺ = 50 3 10³) y una concentración de oligonucleótidos de 0,5 mM (Ct = 0,5 3 10⁶) (Nucl. Acids Res. (1990) 18 (21): 6409-6412).

$$T_f = \left\{ \frac{(1000\Delta H)}{(-10,8 + \Delta S + R \ln(Ct/4))} \right\} - 273,15 + 16,6 \log[Na^+]$$

En este contexto, ΔH representa un total [kcal/mol] de cambios en la entalpía del vecino más cercano en un híbrido; ΔS representa un total [cal/mol K] de cambios en la entropía del vecino más cercano en el híbrido; R representa una constante de gas (1,987 cal/grado mol); Ct representa la concentración molar total [mol/l] del oligo; y Na⁺ representa una concentración molar [mol/l].

La temperatura de fusión (Tf) varía según la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido y su longitud. Un oligonucleótido que tiene mayores contenidos de guanina y citosina o que tiene una mayor longitud tiene una temperatura de fusión (Tf) más alta. Por consiguiente, la temperatura de fusión se puede ajustar permitiendo que un ajustador de temperatura de fusión esté contenido en la solución de reacción, aunque la temperatura de hibridación se determina dependiendo de la secuencia de nucleótidos y de su longitud.

Los ejemplos del ajustador de temperatura de fusión utilizado en un método de amplificación de ácido nucleico incluyen formamida, betaína (N,N,N-trimetilglicina), prolina, dimetilsulfóxido, N-óxido de trimetilamina y sal de tetraalquilamonio.

El "cebador o sonda marcada con fluoróforo (en lo sucesivo, en el presente documento denominado cebador/sonda marcada con fluoróforo)" se refiere a un "oligonucleótido" unido a un "fluoróforo" y tiene complementariedad con cada ácido nucleico diana. En un aspecto donde el ácido nucleico diana no está amplificado, el cebador/sonda marcada con fluoróforo se usa solo como una "sonda". En un aspecto donde se amplifica el ácido nucleico diana, el cebador/sonda marcada con fluoróforo puede usarse como un "cebador". El "cebador/sonda marcada con fluoróforo" puede sintetizarse usando un (mono)nucleótido unido a fluoróforo, por ejemplo, nucleótido Alexa Fluor (TM) (Invitrogen Corp.). Como alternativa, un oligonucleótido sintetizado puede unirse en 5'-terminal o en 3'-terminal con el fluoróforo. Sin embargo, el extremo 3' no debe unirse al fluoróforo en el caso de amplificar el ácido nucleico diana utilizando el "cebador/sonda marcada con fluoróforo", es decir, en el caso de utilizar el "cebador/sonda marcada con fluoróforo" en forma de "cebador". Se prefiere más un "oligonucleótido" unido en 5'-terminal con el fluoróforo. La secuencia de nucleótidos del "cebador/sonda marcada con fluoróforo" no está particularmente limitada por su longitud y es preferentemente de 15 bases o más, más preferentemente de 20 bases o más, más preferentemente de 25 bases o más. De manera deseable, la longitud de la secuencia de nucleótidos del "cebador/sonda marcada con fluoróforo" está diseñada teniendo en cuenta la hibridación con el ácido nucleico diana y las condiciones de temperatura de la reacción de amplificación posterior de modo que el "cebador/sonda marcada con fluoróforo" tenga una temperatura de fusión (Tf) de 30 a 70 °C, preferentemente de 50 a 65 °C.

La "sonda marcada con desactivador" se refiere a un "oligonucleótido" unido con un "desactivador". La "sonda marcada con desactivador" puede sintetizarse usando un nucleótido unido al desactivador. Como alternativa, un oligonucleótido sintetizado puede unirse en 5'-terminal o en 3'-terminal con el desactivador. Preferentemente, el desactivador está unido a la posición en la que el desactivador desactiva eficazmente la luz emitida (fluorescencia) del fluoróforo en el "cebador/sonda marcada con fluoróforo" cuando la "sonda marcada con el desactivador" y el "cebador/sonda marcada fluorescentemente" hibridan entre sí. En un aspecto que implica la amplificación de ácido nucleico diana, el extremo 3' del oligonucleótido de la "sonda marcada con desactivador" está preferentemente bloqueado para no provocar una reacción de extensión. Más preferentemente, cuando el "cebador/sonda marcada con fluoróforo" es un

"oligonucleótido" unido en 5'-terminal con el fluoróforo, una "sonda marcada con desactivador" deseable tiene el desactivador unido al extremo 3' y es compatible con el "oligonucleótido".

5 De manera deseable, la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido de la "sonda marcada con desactivador" tiene complementariedad con la secuencia de nucleótidos del "cebador/sonda marcada con fluoróforo" y tiene una longitud de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más bases más cortas que el cebador/sonda marcada con fluoróforo. Más preferentemente, la secuencia de nucleótidos es más corta porque las bases en 5'-terminal de la "sonda marcada con desactivador" son menores que las bases en 3'-terminal del "cebador/sonda marcada con fluoróforo". Como alternativa, se puede permitir que la "sonda marcada con desactivador" tenga una temperatura de fusión (Tf) sustancialmente más baja que la del 10 "cebador/sonda marcada con fluoróforo" mediante el uso de un nucleótido que tiene una base modificada eficaz para disminuir la Tf, incluso si la "sonda marcada con desactivador" tiene la misma longitud de secuencia de nucleótidos que el "cebador/sonda marcada con fluoróforo". El nucleótido que tiene una base modificada eficaz para disminuir la Tf es, por ejemplo, un nucleótido que tiene inosina. Más preferentemente, la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido de la "sonda marcada con desactivador" está diseñada de modo que su temperatura de fusión sea 15 igual o superior a la temperatura ambiente (por ejemplo, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C o 30 °C). La longitud del oligonucleótido preferentemente es de 7 bases o más, más preferentemente de 9 bases o más, para satisfacer estas 15 condiciones.

20 En la presente invención, se requiere que el cebador/sonda marcada con fluoróforo y la sonda marcada con un desactivador difieran en la temperatura de fusión (Tf). La sonda marcada con desactivador tiene una temperatura de fusión (Tf) menor que la del cebador/sonda marcada con fluoróforo. Más específicamente, la temperatura de fusión (Tf) de la sonda marcada con desactivador es preferentemente 5 °C más baja, más preferentemente 10 °C más bajo, incluso más preferentemente 15 °C más bajo, más preferentemente 20 °C más bajo, aún más preferentemente 30 °C más bajo, aún más preferentemente 35 °C más bajo, particularmente preferentemente 40 °C o al menos 45 °C más 25 bajo que la del cebador/sonda marcada con 1 fluoróforo.

La "adición" a la muestra incluye un aspecto en el que se agregan reactivos tales como el cebador/sonda marcada con fluoróforo y la sonda marcada con desactivador a la muestra, así como un aspecto en el que la muestra se agrega a los reactivos.

30 La proporción molar del "cebador/sonda marcada con fluoróforo" frente a la "sonda marcada con desactivador" utilizada para la adición puede ser 1:1, 1:2 o 1:10 o más y es más preferentemente de 1:2 o más.

35 La "inmovilización en una superficie en fase sólida" significa que los "cebadores/sondas marcadas con fluoróforo" se distribuyen de manera desigual durante la reacción. De manera específica, la inmovilización en una superficie en fase sólida significa que, pero sin limitación, los "cebadores/sondas marcadas con fluoróforo" están inmovilizadas en la superficie del vidrio, una membrana de nailon, una oblea semiconductora, microperlas, o similares. El método de inmovilización puede llevarse a cabo utilizando una técnica conocida en la materia. Los sitios de oligonucleótidos de los "cebadores/sondas marcadas con fluoróforo" pueden inmovilizarse directamente sobre la superficie de vidrio o 40 similares o pueden inmovilizarse indirectamente sobre las mismas mediante la unión de biotina-avidina o similares o mediante una molécula de enlace.

45 La "amplificación de un ácido nucleico diana usando el cebador/sonda marcada con fluoróforo" significa que el ácido nucleico diana se amplifica a través de la extensión mediada por polimerasa usando el cebador/sonda marcada con fluoróforo como cebador. Es obvio para los expertos en la técnica que en un aspecto que comprende la etapa de amplificar ácidos nucleicos diana de la presente invención, naturalmente, el "cebador/sonda marcada con fluoróforo" y la "sonda marcada con desactivador", y la muestra se complementan con otros reactivos necesarios para la amplificación del ácido nucleico diana, por ejemplo, cebadores, polimerasa y dNTP, según el método de amplificación a realizar.

50 La frase "la amplificación se realiza en condiciones isotérmicas" significa que cada ácido nucleico diana se amplifica con la temperatura mantenida constante. Los ejemplos del método de amplificación isotérmica incluyen la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos iniciada por cebadores quiméricos (ICAN), SDA, NASBA, RCA, el proceso de amplificación inteligente versión 2 (SMAP2) (Nature Methods 4: 257-262 (2007)) y LAMP.

55 La "irradiación UV" se refiere a la irradiación con una onda electromagnética que tiene una longitud de onda del orden de 10 nm a 400 nm. La longitud de onda de la onda electromagnética puede no controlarse estrictamente y solo debe corresponder a la luz de excitación del fluoróforo.

60 La "determinación visual" significa que la presencia o ausencia de la luz emitida por el fluoróforo se determina a simple vista a corto plazo, por ejemplo, dentro de 5 segundos, 15 segundos, 30 segundos, o 1 minuto de la irradiación UV. En algunos casos, la determinación visual se puede realizar en comparación con muestras de color.

65 Para la "determinación visual", la excitación por "irradiación UV" es la más adecuada, y se logra la detección simultánea de elementos múltiples (hasta aproximadamente 3 a 4 elementos). La medición usando un "detector de fluorescencia" puede lograr una detección simultánea de más elementos múltiples usando un detector de matriz de fotodiodos o

similar.

El "kit" significa reactivos para su uso en el método de detección según la presente invención. El kit comprende el "cebador/sonda marcada con fluoróforo", la "sonda marcada con desactivador" y un cebador y una polimerasa para la
 5 amplificación en condiciones isotérmicas por ICAN, SDA, RCA, SMAP2 o LAMP, y opcionalmente puede comprender reactivos, herramientas e instrumentos necesarios para la detección. El kit puede comprender además un manual de instrucciones del "kit" y muestras de color.

En el método de detección de la presente invención, cada ácido nucleico diana hibrida con el cebador/sonda marcada
 10 con fluoróforo preferentemente mediante incubación a una temperatura igual o inferior a la temperatura de fusión (Tf) del cebador/sonda marcada con fluoróforo y mayor que la temperatura de fusión (Tf) de la sonda marcada con desactivador. Posteriormente, un cebador/sonda marcado con fluoróforo que no hibrida con el ácido nucleico diana hibrida con la sonda marcada con desactivador por incubación a una temperatura igual o inferior a la temperatura de fusión (Tf) de la sonda marcada con desactivador. Como resultado, el fluoróforo en el cebador/sonda marcada con
 15 fluoróforo que no hibrida con el ácido nucleico diana se encuentra adyacente al desactivador en la sonda marcada con desactivador. Mientras que la muestra se mantiene a una temperatura igual o inferior a la temperatura de fusión (Tf) de la sonda marcada con desactivador, la fluorescencia del cebador/sonda marcada con fluoróforo unido con el ácido nucleico diana se mide para detectar el ácido nucleico diana.

Una característica del método de detección de la presente invención es que: el "cebador/sonda marcada con
 20 fluoróforo" y la "sonda marcada con desactivador" tienen distintas temperaturas de fusión (Tf); y para la detección del "ácido nucleico diana", la hibridación entre el "cebador/sonda marcada con fluoróforo" y el "ácido nucleico diana" prevalece sobre la hibridación entre el "cebador/sonda marcada con fluoróforo" y la "sonda marcada con desactivador" como resultado del control de la relación de estas temperaturas de fusión con temperaturas de reacción. Además, el
 25 método de la presente invención elimina la necesidad de añadir, después de la reacción de amplificación, el cebador/sonda marcada con fluoróforo y la sonda marcada con desactivador necesarias para la detección y, por lo tanto, pueden realizarse mediante una operación más conveniente y prevenir la contaminación atribuida a la liberación de productos de amplificación, en comparación con las técnicas convencionales.

En lo sucesivo en el presente documento, cada aspecto de la presente invención se desvelará en detalle. Sin embargo,
 30 la presente invención no pretende estar limitada a los mismos.

El aspecto más básico de la presente invención es como se muestra en la Fig. 1. Siempre que se agreguen primero
 35 el "cebador/sonda marcada con fluoróforo" y la "sonda marcada con extintor", cada ácido nucleico diana puede detectarse en un sistema cerrado sin agregar posteriormente ningún reactivo. Por ejemplo, el cebador/sonda marcada con fluoróforo puede tener un valor de Tf de 65 °C, mientras que la sonda marcada con desactivador puede tener un valor de Tf de 35 °C. En ese caso, el cebador/sonda marcada con fluoróforo se une al ácido nucleico diana, pero no se une a la sonda marcada con desactivador a una temperatura de reacción establecida en 60 °C (Etapa 1). Cuando la temperatura de reacción se reduce a una temperatura (30 °C) igual o inferior al valor de Tf de la sonda marcada con
 40 desactivador (etapa 2), el "cebador/sonda marcada con fluoróforo" que no se une al ácido nucleico diana hibrida con la "sonda marcada con el desactivador". Solo el fluoróforo en el "cebador/sonda marcada con fluoróforo" unida al "ácido nucleico diana" emite luz (fluorescencia) tras la radiación UV, mientras que la fluorescencia del fluoróforo en el "cebador/sonda marcada con fluoróforo" unida a la "sonda marcada con desactivador" no se puede detectar. Por consiguiente, la intensidad de fluorescencia de la muestra depende de la cantidad de "ácido nucleico diana" en la
 45 muestra.

La Fig. 2 muestra un aspecto de la presente invención que comprende la etapa de amplificar ácidos nucleicos diana. En los métodos de amplificación y detección de ácido nucleico como se describe en las técnicas convencionales de
 50 las patentes japonesas N.º 3016759 y 3999653, una sonda marcada con fluoróforo que hibrida con un ácido nucleico diana coexiste con una sonda marcada con fluoróforo que hibrida con una sonda marcada con desactivador en la etapa de hibridación en PCR. En consecuencia, la intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ácido nucleico diana amplificado, pero no indica directamente la cantidad de ácido nucleico diana amplificado. Además, la sonda marcada con fluoróforo y la sonda marcada con desactivador pueden inhibir la reacción de extensión posterior. Las técnicas convencionales son, por lo tanto, poco precisas. Por otro lado, de acuerdo con el aspecto de la presente
 55 invención que se muestra en la Fig. 2, el cebador/sonda marcada con fluoróforo se incorpora al producto bicatenario amplificado. Por lo tanto, solo la cantidad del ácido nucleico diana amplificado puede detectarse con mayor precisión.

La Fig. 3 muestra un aspecto en el que el método de la presente invención se aplica a una denominada microplaca o
 60 micromatriz de ADN.

La Fig. 3A es un diagrama esquemático que muestra el método de la presente invención que usa el cebador/sonda
 65 marcada con fluoróforo en forma de sonda (aspecto sin la etapa de amplificar ácidos nucleicos diana). En este caso, el cebador/sonda marcada con fluoróforo puede inmovilizarse en el extremo 3' de su oligonucleótido en la superficie de la fase sólida.

Los ejemplos de formas inmovilizadas se muestran en la Fig. 3B.

(1) El cebador/sonda marcada con fluoróforo se inmoviliza en el extremo 3' de su oligonucleótido en la superficie. En este caso, la sonda marcada con desactivador compatible deseablemente tiene el desactivador unido con el extremo 5'.

5 (2) El cebador/sonda marcada con fluoróforo se inmoviliza sobre él a través del fluoróforo unido al extremo 3' del oligonucleótido. En este caso, la sonda marcada con desactivador compatible deseablemente tiene el desactivador unido con el extremo 5'.

10 (3) El cebador/sonda marcada con fluoróforo tiene el fluoróforo unido al extremo 5' del oligonucleótido y se inmoviliza sobre él en el extremo 3' del oligonucleótido. En este caso, la sonda marcada con desactivador compatible deseablemente tiene el desactivador unido con el extremo 3'.

15 La Fig. 3C muestra un aspecto que comprende la etapa de amplificar ácidos nucleicos diana. En este caso, se prefiere que el cebador/sonda marcada con fluoróforo no se inmovilice en la región 3' de su oligonucleótido en la superficie. En el aspecto que comprende la etapa de amplificación de ácido nucleico, el ácido nucleico diana se une de manera más estable con el cebador/sonda marcada con fluoróforo.

20 Los ácidos nucleicos que se van a unir con una micromatriz están marcados con un radioisótopo, un fluoróforo, o similar e hibridan con, por ejemplo, oligonucleótidos inmovilizados sin marcar. Después, los ácidos nucleicos marcados no unidos se eliminan por lavado. Después, los marcadores de los ácidos nucleicos unidos con la micromatriz a través de la hibridación pueden detectarse para detectar de ese modo los ácidos nucleicos. Como es evidente por el aspecto de la Fig. 3, sin embargo, el uso del cebador/sonda marcada con fluorescencia unido a la superficie en fase sólida elimina la necesidad de marcar con fluorescencia toda la muestra y también elimina la necesidad de la etapa de lavado. Por consiguiente, los ácidos nucleicos diana se pueden detectar más convenientemente.

25 De acuerdo con la presente invención, varios ácidos nucleicos diana pueden detectarse simultáneamente usando varios cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, es decir, varios cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, respectivamente, que tienen marcadores de fluoróforo que emiten luces distintas, y sondas marcadas con desactivador, respectivamente, compatibles con ellos. Los fluoróforos en los cebadores/sondas marcados con fluoróforo liberan energía redundante como una onda electromagnética (luz emitida) cuando regresan al estado fundamental desde el estado excitado de los electrones resultante de la absorción de energía externa. La diferencia en el nivel de energía entre el estado excitado y el estado fundamental es específica para cada fluoróforo. Los diferentes fluoróforos emiten luces (ondas electromagnéticas) con sus respectivas longitudes de onda específicas de fluoróforo, es decir, emiten "luces con diferentes colores", incluso si absorbe energía externa al mismo tiempo. Estas luces emitidas son absorbidas y desactivadas solo por los desactivadores en las sondas compatibles marcadas con desactivador y no son influenciadas por otras sondas marcadas con desactivador. Por consiguiente, se pueden detectar varios ácidos nucleicos diana simultáneamente observando las "longitudes de onda", es decir, los "colores", de las luces emitidas de los fluoróforos. Estas luces emitidas se pueden detectar utilizando un espectrofotómetro o similar y se pueden detectar como color mixto o color entre los colores de fluorescencia a simple vista.

40 El método de detección de la presente invención puede aplicarse a la detección de diversos patógenos, incluidas bacterias, hongos y virus. Los ejemplos de las bacterias incluyen *Mycoplasma pneumoniae*, bacterias del género *Legionella*, bacterias del género *Salmonella*, *E. coli* enterohemorrágica, *Mycobacterium tuberculosis*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, y *Bordetella pertussis*. Ejemplos de hongos incluyen hongos del género *Candida*, hongos del género *Aspergillus*, y hongos del género *Cryptococcus*. Los ejemplos de los virus incluyen el virus pdm de la gripe A (H1N1), el virus de la gripe A (H1N1), el virus de la gripe del subtipo H5, el coronavirus del SARS, virus del herpes simple tipo 1/2 (HSV-1/2), y el norovirus de genogrupo I (GI) y genogrupo II (GII). Los ejemplos de parásitos incluyen parásitos de la malaria, *Cryptosporidium* spp., y *Giardia* spp. El método de detección de la presente invención no solo puede detectar el patógeno en sí mismo sino que también puede detectar un gen implicado en la patogenicidad, por ejemplo, un gen de toxina (por ejemplo, verotoxina (en adelante denominado VT) gen 1 (VT1) y 2 (VT2)), un gen de resistencia a los medicamentos o un gen asociado con la infección del hospedador (invasión, colonización o proliferación). El método de detección de la presente invención se puede aplicar adicionalmente a, por ejemplo, la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes de citocromo o similares, o la detección de una secuencia de genes específica de machos para la discriminación sexual de embriones bovinos. Para tal detección, primero se diseña un cebador/sonda marcada con fluoróforo que tiene una secuencia de oligonucleótidos complementaria a una secuencia de ácido nucleico específica para un sujeto de detección, y después se diseña una sonda marcada con un desactivador compatible con el mismo. El método de detección de la presente invención puede llevarse a cabo usando el cebador/sonda marcada con fluoróforo diseñado y la sonda marcada con desactivador.

60 En particular, el aspecto de la presente invención para detectar varios ácidos nucleicos diana es eficaz para detectar y discriminar simultáneamente virus de especies relacionadas tales como los virus de la gripe humana (tipos A (incluyendo H1N1, H3N2, H1N2, H2N2, H9N1 y H5N1), B y C) o virus de la hepatitis (virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B y virus de la hepatitis C). También, este aspecto es eficaz para detectar y discriminar simultáneamente (la presencia o ausencia de) agentes patógenos que lleva a diversos tipos de enfermedades de transmisión sexual, como *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, y *Chlamydia trachomatis*. Este aspecto es aún más eficaz para detectar y discriminar simultáneamente (la presencia o ausencia de) norovirus, rotavirus, y similares responsables de la gastroenteritis infecciosa. Como alternativa, el aspecto es eficaz para detectar y discriminar simultáneamente (la

presencia o ausencia de) el virus del SIDA (VIH), el virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la hepatitis C (VHC) como prueba de detección para el suministro de sangre.

5 El kit de la presente invención es un kit para la detección de ácido nucleico diana que se usa para detectar uno o más ácidos nucleicos diana presentes en una muestra con el uso de amplificación. El kit para la detección de ácido nucleico diana comprende una o más combinaciones, cada una de las cuales comprende: un cebador/sonda marcada con fluoróforo que es un oligonucleótido marcado con fluoróforo que tiene complementariedad con un ácido nucleico diana; una sonda marcada con desactivador que es un oligonucleótido marcado con desactivador que tiene complementariedad con el cebador/sonda marcada con fluoróforo y que tiene una temperatura de fusión (Tf) menor
10 que la del cebador/sonda marcada con fluoróforo; y un cebador y una polimerasa para la amplificación en condiciones isotérmicas por ICAN, SDA, RCA, SMAP2 o LAMP.

15 El oligonucleótido de la sonda marcada con desactivador tiene una longitud de bases más corta que la del oligonucleótido del cebador/sonda marcada con fluoróforo. Como alternativa, el oligonucleótido de la sonda marcada con desactivador comprende una base modificada.

20 El cebador/sonda marcada con fluoróforo puede inmovilizarse en una superficie en fase sólida. El kit de la presente invención puede comprender otros reactivos para la amplificación de ácido nucleico diana y puede comprender opcionalmente otros reactivos necesarios para su uso en la detección habitual de ácido nucleico.

25 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá más específicamente con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, la presente invención no pretende limitarse a estos Ejemplos.

Ejemplos

25 Ejemplo 1. Confirmación de influencia del valor de Tf

(1) Molde de ensayo

30 Una porción (SEQ ID NO: 21) de una región de plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* se subclonó como molde para el ensayo para preparar ADN de plásmido (en lo sucesivo, denominados plásmidos CT).

(2) Síntesis de cebador, cebador/sonda marcada con fluorescencia y sonda marcada con desactivador

35 Los cebadores para la reacción LAMP se diseñaron para dirigirse a la región del plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* y no tienen reactividad cruzada con bacterias relacionadas. De los cebadores diseñados, se usó LB marcado con fluorescencia en 5'-terminal con FAM como un cebador/sonda marcada con fluorescencia, mientras que su cadena complementaria marcada en 3'-terminal con BHQ1 se usó como una sonda marcada con desactivador. También, se diseñaron sondas marcadas con desactivador que tienen un valor de Tf más bajo, en las que se
40 deleccionaron de 3 a 10 bases en 5'-terminal de cada sonda marcada con desactivador. La síntesis del cebador se encargó a Operon Biotechnologies Inc. La síntesis del cebador/sonda marcada con fluoróforo y las sondas marcadas con desactivador se encargó a Japan Bio Services Co., Ltd. Los valores de Tf de las sondas marcadas con desactivador se indican en valores calculados por el método del vecino más cercano.

45 <cebador de *Chlamydia trachomatis*>

CT-FIP: 5'-CAAGCAGGACTACAAGCTGCAGCGTTTGTACTCCGTCAC-3' (SEQ ID NO: 1)

CT-BIP: 5'-GCGGGCGATTTGCCTTAAGTTCGGTCAACGAAGAGGTT-3' (SEQ ID NO: 2)

CT-F3: 5'-ATGTCGGAGTCTGAGCAC-3' (SEQ ID NO: 3)

50 CT-B3: 5'-CCTCAGAAGTTTATGCACTTTC-3' (SEQ ID NO: 4)

CT-LF: 5'-AAGATAACCCCGCACGT-3' (SEQ ID NO: 5)

CT-LB: 5'-GGAGCGAGTTACGAAGACA-3' (SEQ ID NO: 6)

<cebador/sonda marcada con fluoróforo de *Chlamydia trachomatis*>

55 FAM-CT-LB: 5'-(FAM)-GGAGCGAGTTACGAAGACA-3' (SEQ ID NO: 7)

<sonda marcada con desactivador de *Chlamydia trachomatis*>

60 CT-LBc-QI-0: 5'-TGTCTTCGTAAGTTCGCTCC-(BHQ1)-3' (SEQ ID NO: 8) Tf=60,6 °C

CT-LBc-QI-3: 5'-CTTCGTAAGTTCGCTCC-(BHQ1)-3' (SEQ ID NO: 9) Tf=53,9 °C

CT-LBc-QI-5: 5'-TCGTAAGTTCGCTCC-(BHQ1)-3' (SEQ ID NO: 10) Tf=49,7 °C

CT-LBc-QI-6: 5'-CGTAAGTTCGCTCC-(BHQ1)-3' (SEQ ID NO: 11) Tf=46,5 °C

CT-LBc-QI-7: 5'-GTAAGTTCGCTCC-(BHQ1)-3' (SEQ ID NO: 12) Tf=37,5 °C

65 CT-LBc-QI-9: 5'-AACTCGCTCC-(BHQ1)-3' (SEQ ID NO: 13) Tf=32,6 °C

CT-LBc-QI-10: 5'-ACTCGCTCC-(BHQ1)-3' (SEQ ID NO: 14) Tf=26,7 °C

(3) Composición y concentración del reactivo de reacción LAMP

Las soluciones de reacción final de LAMP se prepararon de manera que cada reactivo tuviera una concentración que se muestra a continuación en 30 ml de cada una de las soluciones de reacción. Estas soluciones de reacción no se complementaron con ninguna sonda marcada con desactivador (control) ni con ninguno de CT-LBc-Q1-0 (SEQ ID NO: 8), CT-LBc-Q1-3 (SEQ ID NO: 9), CT-LBc-Q1-5 (SEQ ID NO: 10), CT-LBc-Q1-6 (SEQ ID NO: 11), CT-LBc-Q1-7 (SEQ ID NO: 12), CT-LBc-Q1-9 (SEQ ID NO: 13), y CT-LBc-Q1-10 (SEQ ID NO: 14).

- 10 Tris-HCl 30 mM (pH 8,8)
- KCl 15 mM
- (NH₄)₂SO₄ 15 mM
- MgSO₄ 12 mM
- Tween 20 al 0,15 %
- 15 dATP 2,1 mM (GeneACT, Inc.)
- dCTP 2,1 mM (GeneACT, Inc.)
- dGTP 2,1 mM (GeneACT, Inc.)
- dTTP 2,1 mM (GeneACT, Inc.)
- ADN polimerasa de Bst 38,4 U (New England Biolabs Inc.)

Cebador, cebador/sonda marcada con fluoróforo y sonda marcada con desactivador:

- 25 CT-FIP 0,8 mM (SEQ ID NO: 1)
- CT-BIP 0,8 mM (SEQ ID NO: 2)
- CT-F3 0,1 mM (SEQ ID NO: 3)
- CT-B3 0,1 mM (SEQ ID NO: 4)
- CT-LF 0,4 mM (SEQ ID NO: 5)
- FAM-CT-LB 0,4 mM (SEQ ID NO: 7)
- 30 CT-LBc-Q1-0 0,8 mM (SEQ ID NO: 8), CT-LBc-Q1-3 (SEQ ID NO: 9), CT-LBc-Q1-5 (SEQ ID NO: 10), CT-LBc-Q1-6 (SEQ ID NO: 11), CT-LBc-Q1-7 (SEQ ID NO: 12), CT-LBc-Q1-9 (SEQ ID NO: 13) o CT-LBc-Q1-10 (SEQ ID NO: 14)

(4) Amplificación

- 35 Se añadió agua destilada (AD) o 10⁴ copias de plásmidos CT por reacción. La reacción de amplificación se realizó a 65 °C durante 120 minutos usando un aparato turbidimétrico en tiempo real LA-320C (Teramecs Co., Ltd.).

(5) Determinación

- 40 La reacción de amplificación se confirmó usando LA-320C (LA-320C controla la reacción de amplificación de ácido nucleico basándose en el cambio en la absorbancia causada por la formación de su subproducto pirofosfato de magnesio, es decir, cambio en la turbidez; valor de Tt: tiempo requerido para que el valor aritmético de los datos turbidimétricos alcance un valor de determinación desde el inicio de la reacción; curva de turbidez: gráfico de los datos de ensayo de turbidez en tiempo real), mientras que los tubos de reacción después de la amplificación se irradiaron con UV y se encontraron positivos cuando emitían fluorescencia verde (FAM) o negativos cuando no emitían fluorescencia detectable.

- 50 Cuando no se utilizó una sonda marcada con desactivador, la amplificación de 10⁴ copias de plásmidos CT se confirmó a los 20,7 minutos. Por el contrario, los tiempos de amplificación de los plásmidos CT complementados con las sondas marcadas con desactivador diferían dependiendo de las sondas marcadas con desactivador y fueron 92,4 minutos (+71,7 minutos) para CT-LBc-Q1-0 (SEQ ID NO: 8), 41,5 minutos (+20,8 minutos) para CT-LBc-Q1-3 (SEQ ID NO: 9), 27,8 minutos (+7,1 minutos) para CT-LBc-Q1-5 (SEQ ID NO: 10), 25,5 minutos (+4,8 minutos) para CT-LBc-Q1-6 (SEQ ID NO: 11), 22,8 minutos (+2,1 minutos) para CT-LBc-Q1-7 (SEQ ID NO: 12), 20,7 minutos (+0,0 minutos) para CT-LBc-Q1-9 (SEQ ID NO: 13) y 20,6 minutos (-0,1 minutos) para CT-LBc-Q1-10 (SEQ ID NO: 14). En cualquiera de los
- 55 casos en los que se usaron sondas marcadas con un desactivador, la fluorescencia verde derivada de FAM se confirmó en los tubos suplementados con los plásmidos CT, pero no se confirmó en los tubos suplementados con AD (Tabla 1).

[Tabla 1]

Valor de Tf de la sonda marcada con desactivador (Q) y el tiempo de amplificación								
CT-LBc-Tf	-	Q1-0	Q1-3	0 1-5	Q1-6	Q1-7	Q1-9	0 1-10
	-	60,6	53,9	49,7	46,5	37,5	32,6	26,7
Tt (AD)	N.D.*							
Tt (CT)	20,7	92,4	41,5	27,8	25,5	22,8	20,7	20,6
Δ Tt		71,7	20,8	7,1	4,8	2,1	0,0	-0,1

N.D no detectado (no detectable)

"Tt (AD)" representa un valor de Tt derivado de la adición de AD. "Tt (CT)" representa un valor de Tt derivado de la reacción de 10⁴ copias de plásmidos CT añadidos por reacción.

- 5 En ausencia de CT-LBc-Q1, se confirmó la fluorescencia incluso en los tubos suplementados con AD, porque el marcador fluorescente no se desactivó. En presencia de CT-LBc-Q1 (Q1-0), la fluorescencia se desactivó en cualquiera de los tubos suplementados con AD y se confirmó en los tubos suplementados con los plásmidos CT sin verse influenciado por el valor Tf de CT-LBc-Q1.
- 10 Tal como se muestra en la [Tabla 1], valores de Tf mayores de las sondas marcadas con desactivador retrasan más los tiempos de amplificación, mientras que esta influencia no se encuentra en valores de Tf de 32,6 °C o menos. Esto sugirió que la Tf de la sonda marcada con desactivador es deseablemente 32,6 °C o inferior.

Ejemplo 2. El caso de la sonda marcada con desactivador se agrega después de la amplificación de LAMP

- 15 (1) Molde de ensayo

Una porción (SEQ ID NO: 21) de una región de plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* se subclonó como molde para el ensayo para preparar ADN de plásmido (en lo sucesivo, denominados plásmidos CT).

- 20 (2) Síntesis de cebador, cebador/sonda marcada con fluoróforo y sonda marcada con desactivador

Los cebadores se diseñaron para dirigirse a la región del plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* y no tienen reactividad cruzada con bacterias relacionadas. De los cebadores diseñados, se usó LB marcado con fluorescencia en 5'-terminal con FAM como cebador/sonda marcada con fluoróforo, mientras que su cadena complementaria marcada en 3'-terminal con BHQ1 se usó como una sonda marcada con desactivador. La síntesis del cebador se encargó a Operon Biotechnologies Inc. La síntesis del cebador marcado con fluoróforo y las sondas marcadas con extintor se encargó a Japan Bio Services Co., Ltd.

- 30 <cebador de *Chlamydia trachomatis*>

CT-FIP: 5'-CAAGCAGGACTACAAGCTGCAGCGTTTGTACTCCGTCAC-3' (SEQ ID NO: 1)
 CT-BIP: 5'-GCGGGCGATTTGCCTTAAGTTCGGTCAACGAAGAGGTT-3' (SEQ ID NO: 2)
 CT-F3: 5'-ATGTCGGAGTCTGAGCAC-3' (SEQ ID NO: 3)
 35 CT-B3: 5'-CCTCAGAAGTTTATGCACTTTC-3' (SEQ ID NO: 4)
 CT-LF: 5'-AAGATAACCCCGCACGT-3' (SEQ ID NO: 5)
 CT-LB: 5'-GGAGCGAGTTACGAAGACA-3' (SEQ ID NO: 6)

- 40 <cebador marcado con fluoróforo de *Chlamydia trachomatis*>

FAM-CT-LB: 5'-(FAM)-GGAGCGAGTTACGAAGACA-3' (SEQ ID NO: 7)

<sonda marcada con desactivador de *Chlamydia trachomatis*>

- 45 CT-LBc-QI-0: 5'-TGTCTTCGTAAGTTCGCTCC-(BHQ1)-3' (SEQ ID NO: 8)

(3) Composición y concentración del reactivo de reacción LAMP

50 Las soluciones de reacción final de LAMP se prepararon de manera que cada reactivo tuviera una concentración que se muestra a continuación en 30 ml de cada una de las soluciones de reacción.

Tris-HCl 30 mM (pH 8,8)
 KCl 15 mM
 (NH₄)₂SO₄ 15 mM
 55 MgSO₄ 12 mM
 Tween 20 al 0,15 %
 dATP 2,1 mM (GeneACT, Inc.)
 dCTP 2,1 mM (GeneACT, Inc.)
 dGTP 2,1 mM (GeneACT, Inc.)
 60 dTTP 2,1 mM (GeneACT, Inc.)
 ADN polimerasa de Bst 38,4 U (New England Biolabs Inc.)

Cebador y cebador/sonda marcada con fluoróforo:

- 65 CT-FIP 0,8 mM (SEQ ID NO: 1)

- CT-BIP 0,8 mM (SEQ ID NO: 2)
 CT-F3 0,1 mM (SEQ ID NO: 3)
 CT-B3 0,1 mM (SEQ ID NO: 4)
 CT-LF 0,4 mM (SEQ ID NO: 5)
 5 FAM-CT-LB 0,4 mM (SEQ ID NO: 7)

El siguiente reactivo también se añadió después de la reacción de amplificación.

- 10 Sonda marcada con desactivador:
 CT-LBc-QI-0 0,8 mM (SEQ ID NO: 8)

(4) Amplificación

- 15 Se añadió AD o 10⁴ copias de plásmidos CT por reacción. La reacción de amplificación se realizó a 65 °C durante 120 minutos usando LA-320C.

(5) Determinación

- 20 La reacción de amplificación se confirmó usando LA-320C de la misma manera que en el Ejemplo 1 (Tabla 2 y Fig. 4).

No se detectó ningún valor de Tt y no se observó aumento de la turbidez en el tubo de reacción suplementado con AD. Por el contrario, se confirmó un valor de Tt de 18,7 minutos y un aumento de la turbidez en el tubo de reacción suplementado con los plásmidos CT. Estos resultados demostraron que la reacción de amplificación se produjo solo en los tubos de reacción que contienen los plásmidos CT, es decir, el ácido nucleico diana.

- 25 En cuanto a la fluorescencia de cada tubo de reacción, la fluorescencia se detectó tanto en el tubo de reacción suplementado con AD (Tubo N.º 1) como en el tubo de reacción suplementado con los plásmidos CT (Tubo N.º 2) (Fig. 5). A continuación, se añadió CT-LBc-QI-0 (SEQ ID NO: 8) a cada tubo de reacción a temperatura ambiente. Como resultado, la fluorescencia se desactivó en el tubo de reacción suplementado con AD (Tubo N.º 3). Por el contrario, la fluorescencia se conservó en el tubo de reacción suplementado con los plásmidos CT (Tubo N.º 4).

[Tabla 2]

Tiempo de amplificación		
Muestra	AD	CT
Tt	N.D.*	18,7
N. D. *: No detectado		

- 35 Ejemplo 3. Método de amplificación y detección simultánea de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* usando LAMP

(1) Molde de ensayo

- 40 Una porción (SEQ ID NO: 21) de una región de plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* se subclonó como un molde estándar interno para preparar ADN de plásmido (en adelante, citados como los plásmidos CT). También, una porción (SEQ ID NO: 32) de una región mtrA de *Neisseria gonorrhoeae* se subclonó como un molde de ácido nucleico diana para preparar ADN plasmídico (en lo sucesivo, citados como los plásmidos NG).

- 45 (2) Síntesis del cebador de *Chlamydia trachomatis*, Cebador de bucle marcado con TAMRA (cebador/sonda marcada con fluoróforo) y sonda de desactivación marcada con BHQ2 (sonda marcada con desactivador)

- 50 Los cebadores se diseñaron para dirigirse a la región del plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* y no tienen reactividad cruzada con bacterias relacionadas. La síntesis del cebador se encargó a Operon Biotechnologies Inc. La síntesis del cebador de bucle marcado con TAMRA y la sonda de desactivación marcada con BHQ2 se encargó a Japan Bio Services Co., Ltd.

<cebador de *Chlamydia trachomatis*>

- 55 CT-FIP: 5'-CAAGCAGGACTACAAGCTGCAGCGTTTGTACTCCGTAC-3' (SEQ ID NO: 1)
 CT-BIP: 5'-GCGGGCGATTTGCCTTAACCTCGGTCAACGAAGAGGTT-3' (SEQ ID NO: 2)
 CT-F3: 5'-ATGTCCGAGTCTGAGCAC-3' (SEQ ID NO: 3)
 CT-B3: 5'-CCTCAGAAGTTTATGCACTTTC-3' (SEQ ID NO: 4)
 CT-LB: 5'-GGAGCGAGTTACGAAGACA-3' (SEQ ID NO: 6)

- 60 <cebador de bucle marcado con TAMRA de *Chlamydia trachomatis*>

TAM-CT-LF: 5'-(TAMRA)-AAGATAACCCCGCACGT-3' (SEQ ID NO: 15)

<sonda de desactivación marcada con BHQ2 de *Chlamydia trachomatis*>

CT-LFC-Q2: 5'-GGGGTTATCTT-(BHQ2)-3' (SEQ ID NO: 16)

5 (3) Síntesis de cebador de *Neisseria gonorrhoeae*, cebador de bucle marcado con FAM (cebador/sonda marcada con fluoróforo) y sonda de desactivación marcada con BHQ1 (sonda marcada con desactivador)

10 Los cebadores se diseñaron para dirigirse a la región mtrA de *Neisseria gonorrhoeae* y no tienen reactividad cruzada con bacterias relacionadas. La síntesis del cebador se encargó a Operon Biotechnologies Inc. La síntesis del cebador de bucle marcado con FAM y la sonda de desactivación marcada con BHQ1 se encargó a Japan Bio Services Co., Ltd.

<cebador de *Neisseria gonorrhoeae*>

15 NG-FIP: 5'-CGTGGCTCAACACATGACCCAAGCGTCCGGTCCGGCA-3' (SEQ ID NO: 17)
 NG-BIP: 5'-ACGGAGAAAGTTTACAACCGGACACAAAACAGGCTCATATCCAGC-3' (SEQ ID NO: 18)
 NG-F3: 5'-GCGGTTATCTCTGCATCG-3' (SEQ ID NO: 19)
 NG-B3: 5'-GGTGTCTAGCGGAAAC-3' (SEQ ID NO: 20)
 20 NG-LF: 5'-CGGAAAAATACAATATCGCCC-3' (SEQ ID NO: 22)

<cebador de bucle marcado con FAM de *Neisseria gonorrhoeae*>

25 FAM-NG-LB: 5'-(FAM)-CGACAAAACGGCACATTTATGG-3' (SEQ ID NO: 23)

<sonda de desactivación marcada con BHQ1 de *Neisseria gonorrhoeae*>

NG-LBc-QI: 5'-CGTTTTGTCTG-(BHQ1)-3' (SEQ ID NO: 24)

30 (4) Composición y concentración del reactivo de reacción LAMP

Las soluciones de reacción final de LAMP se prepararon de manera que cada reactivo tuviera una concentración que se muestra a continuación en 30 ml de cada una de las soluciones de reacción.

35 Tris-HCl 30 mM (pH 8,8)
 KCl 15 mM
 (NH₄)₂SO₄ 15 mM
 MgSO₄ 12 mM
 Tween 20 al 0,15 %
 40 ATP 2,1 mM
 CTP 2,1 mM
 GTP 2,1 mM
 TTP 2,1 mM
 ADN polimerasa de Bst 38,4 U (New England Biolabs Inc.)

45 Cebador de *Chlamydia trachomatis*, cebador de bucle marcado con TAMRA y sonda de desactivación marcada con BHQ2:

50 CT-FIP 0,8 mM (SEQ ID NO: 1) y CT-BIP (SEQ ID NO: 2)
 CT-F3 0,1 mM (SEQ ID NO: 3) y CT-B3 (SEQ ID NO: 4)
 CT-LB 0,4 mM (SEQ ID NO: 6) y TAM-CT-LF (SEQ ID NO: 15)
 CT-LFC-Q2 0,8 mM (SEQ ID NO: 16)

55 Cebador de *Neisseria gonorrhoeae*, cebador de bucle marcado con FAM y sonda de desactivación marcada con BHQ1:

60 NG-FIP 0,8 mM (SEQ ID NO: 17) y NG-BIP (SEQ ID NO: 18)
 NG-F3 0,1 mM (SEQ ID NO: 19) y NG-B3 (SEQ ID NO: 20)
 NG-LF 0,4 mM (SEQ ID NO: 22) y FAM-NG-LB (SEQ ID NO: 23)
 NG-LBc-QI 0,8 mM (SEQ ID NO: 24)

(5) Amplificación

65 Se añadió AD, 10⁴ copias de plásmidos CT, o 10⁴ copias de plásmidos NG, o 10⁴ copias de plásmidos CT y 10⁴ copias de plásmidos NG por reacción. La reacción de amplificación se realizó a 65 °C durante 60 minutos usando LA-320C.

(6) Determinación

La amplificación del ácido nucleico derivado de *Chlamydia trachomatis* (CT) produce un color rojo visualmente detectable (TAMRA) bajo radiación UV, mientras que la amplificación del ácido nucleico derivado de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) produce un color verde visualmente detectable (FAM) bajo irradiación UV. Después de la reacción de amplificación, la fluorescencia se confirmó por irradiación UV. Como resultado (Fig. 6), el AD (muestras negativas) era incolora (Tubos N.º 1 a 4); el color verde se detectó visualmente en las muestras positivas de *Neisseria gonorrhoeae* (Tubos N.º 5 a 8); el color rojo se detectó visualmente en las muestras positivas de *Chlamydia trachomatis* (Tubos N.º 9 a 12); y se detectó visualmente el color amarillo (rojo + verde) en las muestras positivas para ambas bacterias (Tubos N.º 13 a 16).

Ejemplo 4. Amplificación simultánea de múltiples elementos y detección de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, y ácido nucleico artificial15 (1) Molde de ensayo

Una porción (SEQ ID NO: 21) de una región de plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* se subclonó como molde para el ensayo para preparar ADN de plásmido (en lo sucesivo, denominados plásmidos CT). También, se subclonó una porción (SEQ ID NO: 32) de la región mtrA de *Neisseria gonorrhoeae* como molde para el ensayo para preparar ADN plasmídico (en lo sucesivo, denominados plásmidos NG). Además, se subclonó una secuencia de ácido nucleico artificial (SEQ ID NO: 33) como molde para el ensayo para preparar ADN plasmídico (en lo sucesivo, denominados plásmidos ARITA2).

25 (2) Síntesis de cebador, cebador/sonda marcada con fluoróforo y sonda marcada con desactivador

Los cebadores para la reacción LAMP se diseñaron para dirigirse a la región de plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis*, a la región mtrA de *Neisseria gonorrhoeae*, o a la secuencia de ácido nucleico artificial y no tienen reactividad cruzada con bacterias relacionadas. De los cebadores diseñados, LF de *Chlamydia trachomatis* marcado en 5'-terminal con fluorescente con TAMRA, LB de *Neisseria gonorrhoeae* marcado en 5'-terminal con fluorescente con FAM, y la secuencia de ácido nucleico artificial LB marcada en 5'-terminal con fluorescente con Alexa Fluor (TM) 350 (en lo sucesivo, en el presente documento denominado Alexa350) se usaron como cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, mientras que una cadena complementaria de LF de *Chlamydia trachomatis* marcada en 3'-terminal con BHQ2, una cadena complementaria de LB de *Neisseria gonorrhoeae* marcada en 3'-terminal con BHQ1, y una cadena complementaria de LB de secuencia de ácido nucleico artificial marcada en 3'-terminal con BHQ0 se usaron como sondas marcadas con desactivador. La síntesis del cebador se encargó a Operon Biotechnologies Inc. La síntesis de los cebadores/sondas marcados con fluoróforo y las sondas marcadas con el desactivador se encargó a Japan Bio Services Co., Ltd.

40 <cebador de *Chlamydia trachomatis*>

CT-FIP: 5'-CAAGCAGGACTACAAGCTGCAGCGTTTGTACTCCGTCAC-3' (SEQ ID NO: 1)

CT-BIP: 5'-GCGGGCGATTTGCCTTAAGCTCGGTCACGAAGAGGTT-3' (SEQ ID NO: 2)

CT-F3: 5'-ATGTCGGAGTCTGAGCAC-3' (SEQ ID NO: 3)

CT-B3: 5'-CCTCAGAAGTTTATGCACTTTC-3' (SEQ ID NO: 4)

45 CT-LB: 5'-GGAGCGAGTTACGAAGACA-3' (SEQ ID NO: 6)

<cebador/sonda marcada con fluoróforo de *Chlamydia trachomatis*>

50 TAM-CT-LF: 5'-(TAMRA)-AAGATAACCCCGCACGT-3' (SEQ ID NO: 15)

<sonda marcada con desactivador de *Chlamydia trachomatis*>

CT-LFC-Q2: 5'-ACGTGCGGGTTATCTT-(BHQ2)-3' (SEQ ID NO: 16)

55 <cebador de *Neisseria gonorrhoeae*>

NG-FIP: 5'-CGTGGCTCAACACATGACCCAAGCGTCCGGTCCGGCA-3' (SEQ ID NO: 17)

NG-BIP: 5'-ACGGAGAAAGTTTACAACCGGACACAAAACAGGCTCATATCCAGC-3' (SEQ ID NO: 18)

NG-F3: 5'-GCGGTTATCTCTGCATCG-3' (SEQ ID NO: 19)

60 NG-B3: 5'-GGTGTCTAGCGGAAAC-3' (SEQ ID NO: 20)

NG-LF: 5'-CGGGAAAATACAATATCGCCC-3' (SEQ ID NO: 22)

<cebador/sonda marcada con fluoróforo de *Neisseria gonorrhoeae*>

65 FAM-NG-LB: 5'-(FAM)-CGACAAAACGGCACATTTATGG-3' (SEQ ID NO: 23)

<sonda marcada con desactivador de *Neisseria gonorrhoeae*>

NG-LBc-QI: 5'-CGTTTTGTCTG-(BHQ1)-3' (SEQ ID NO: 24)

5 Cebador de ácido nucleico artificial>

ARITA2-FIP: 5'-CGCTTGGATAGTCGGATGCAAGGGTCAATGGTAC-3' (SEQ ID NO: 25)

ARITA2-BIP: 5'-ACGGTGTATGCTTCGGTGTGCGAACCTATCAGC-3' (SEQ ID NO: 26)

ARITA2-F3: 5'-GGACAATCGAAGCCAGAA-3' (SEQ ID NO: 27)

10 ARITA2-B3: 5'-ATCACGGATCGTATGTGG-3' (SEQ ID NO: 28)

ARITA2-LF: 5'-GCTAGCTAAGTGCCATCC-3' (SEQ ID NO: 29)

<Cebador/sonda marcada con fluoróforo de ácido nucleico artificial>

15 Ale-ARITA2-LB: 5'-(Alexa350)-AACGATCGCACTAAGCAT-3' (SEQ ID NO: 30)

<sonda marcada con desactivador de ácido nucleico artificial>

ARITA2-LBC-Q0: 5'-ATGCTTAGTGCGATCGTT-(BHQ0)-3' (SEQ ID NO: 31)

20

(3) Composición y concentración del reactivo de reacción LAMP

Las soluciones de reacción final de LAMP se prepararon de manera que cada reactivo tuviera una concentración que se muestra a continuación en 30 ml de cada una de las soluciones de reacción.

25

Tris-HCl 30 mM (pH 8,8)

KCl 15 mM

(NH₄)₂SO₄ 15 mM

MgSO₄ 12 mM

30 Tween 20 al 0,15 %

dATP 2,1 mM (GeneACT, Inc.)

dCTP 2,1 mM (GeneACT, Inc.)

dGTP 2,1 mM (GeneACT, Inc.)

dTTP 2,1 mM (GeneACT, Inc.)

35 ADN polimerasa de Bst 38,4 U (New England Biolabs Inc.)

Cebador y cebador/sonda marcada con fluoróforo:

40 CT-FIP 0,6 mM (SEQ ID NO: 1), NG-FIP (SEQ ID NO: 17)

CT-BIP 0,6 mM (SEQ ID NO: 2), NG-BIP (SEQ ID NO: 18)

CT-F3 0,1 mM (SEQ ID NO: 3), NG-F3 (SEQ ID NO: 19)

CT-B3 0,1 mM (SEQ ID NO: 4), NG-B3 (SEQ ID NO: 20)

CT-LB 0,3 mM (SEQ ID NO: 6), NG-LF (SEQ ID NO: 22)

45 ARITA2-FIP 0,1 mM (SEQ ID NO: 25), ARITA2-BIP (SEQ ID NO: 26)

ARITA2-F3 0,02 mM (SEQ ID NO: 27), ARITA2-B3 (SEQ ID NO: 28)

ARITA2-LF 0,1 mM (SEQ ID NO: 29)

TAM-CT-LF 0,4 mM (SEQ ID NO: 15), FAM-NG-LB (SEQ ID NO: 23), Ale-ARITA2-LB (SEQ ID NO: 30)

El siguiente reactivo también se añadió después de la reacción de amplificación.

50

Sonda marcada con desactivador:

CT-LFC-Q2 0,8 mM (SEQ ID NO: 16), NG-LBc-Q1 (SEQ ID NO: 24) y ARITA2-LBc-Q0 (SEQ ID NO: 31)

(4) Amplificación

55

Se añadió AD o uno o más de 10⁴ copias de plásmidos CT, 10⁴ copias de plásmidos NG y 10² copias de los plásmidos ARITA2 por reacción. La reacción de amplificación se realizó a 65 °C durante 120 minutos usando LA-320C.

[Tabla 3]

Molde añadido y tiempo de amplificación									
	CT	-	10 ⁴	-	-	10 ⁴	10 ⁴	-	10 ⁴
Molde añadido	NG	-	-	10 ⁴	-	10 ⁴	-	10 ⁴	10 ⁴
	AR1TA2	-	-	-	10 ²	-	10 ²	10 ²	10 ²
	Tt	N.D.*	25,1	30,2	72,0	23,1	24,4	25,3	21,1
N.D.*: No detectado									

60

(5) Determinación

La reacción de amplificación se confirmó usando LA-320C de la misma manera que en el Ejemplo 1 (Tabla 3 y Fig. 7).

- 5 No se detectó ningún valor de Tt y no se observó aumento de la turbidez en el tubo de reacción suplementado con AD (negativo (-) para todos los plásmidos TC, NG y ARITA2). Por otro lado, se obtuvo cada valor de Tt y se confirmó un aumento de la turbidez en los tubos de reacción suplementados con uno, dos en combinación, o tres de los plásmidos CT, los plásmidos NG y los plásmidos ARITA2. Estos resultados demostraron que la reacción de amplificación se produjo solo en los tubos de reacción que contienen uno o más de los plásmidos CT, los plásmidos NG y los plásmidos
- 10 ARITA2. 0,8 mM cada uno de CT-LFc-Q2 (SEQ ID NO: 16), NG-LBc-Q1 (SEQ ID NO: 24) y ARITA2-LBc-Q0 (SEQ ID NO: 31) se añadieron a cada tubo de reacción después de completar la amplificación. Los tubos de reacción se calentaron a 95 °C durante 5 minutos, luego se enfriaron a temperatura ambiente y luego se irradiaron con UV para confirmar la fluorescencia (Fig. 8).
- 15 No se confirmó fluorescencia en los tubos de reacción suplementados con AD, debido a la ausencia de productos de amplificación (Tubo N.º 1). La fluorescencia roja se confirmó en el tubo de reacción suplementado con los plásmidos CT (Tubo N.º 2). Asimismo, la fluorescencia verde se confirmó en el tubo de reacción suplementado con los plásmidos NG (Tubo N.º 3), mientras que la fluorescencia azul se confirmó en el tubo de reacción suplementado con los plásmidos ARITA2 (Tubo N.º 4). Los tubos de reacción suplementados con dos de los plásmidos presentaron color entre sus
- 20 respectivos colores de fluorescencia. La fluorescencia amarilla se confirmó en el tubo de reacción suplementado con los plásmidos CT y los plásmidos NG (Tubo N.º 5). La fluorescencia violeta se confirmó en el tubo de reacción suplementado con los plásmidos CT y los plásmidos ARITA2 (Tubo N.º 6). La fluorescencia azul claro se confirmó en el tubo de reacción suplementado con los plásmidos NG y los plásmidos ARITA2 (Tubo N.º 7). La fluorescencia blanca se confirmó en el tubo de reacción suplementado con tres de los plásmidos (Tubo N.º 8).

25 Ejemplo 5. Detección de ácido nucleico diana (*Chlamydia trachomatis*) usando la sonda

(1) Preparación de muestra

- 30 Las soluciones de reacción LAMP después de la reacción de amplificación se usaron como muestras. En cuanto a las condiciones de reacción de LAMP, la composición y la concentración final de cada reactivo fueron como se muestra a continuación, y se agregaron 10⁴ copias de plásmidos CT como molde por reacción o se añadió AD en lugar del molde para preparar 30 ml de cada una de las soluciones de reacción final de LAMP. La reacción de amplificación se realizó a 65 °C durante 40 minutos usando LA-320C. Las soluciones de reacción obtenidas se trataron térmicamente a 80 °C
- 35 durante 5 minutos para la inactivación de la ADN polimerasa de Bst para evitar que se produzca una reacción de amplificación durante la detección posterior usando un cebador/sonda marcada con fluoróforo. Las soluciones de reacción de LAMP, es decir, las muestras, obtenidas de este modo se definieron como una muestra positiva cuando se preparó con los plásmidos CT como molde o como muestra negativa cuando se preparó mediante la adición de AD.

40 <Composición y concentración final de reactivo de reacción de LAMP>

Las soluciones de reacción final de LAMP se prepararon de manera que cada reactivo tuviera una concentración que se muestra a continuación en 30 ml de cada una de las soluciones de reacción.

- 45 Tris-HCl 30 mM (pH 8,8)
KCl 15 mM
(NH₄)₂SO₄ 15 mM
MgSO₄ 12 mM
- 50 Tween 20 al 0,15 %
dATP 2,1 mM (GeneACT, Inc.)
dCTP 2,1 mM (GeneACT, Inc.)
dGTP 2,1 mM (GeneACT, Inc.)
dTTP 2,1 mM (GeneACT, Inc.)
- 55 ADN polimerasa de Bst 38,4 U (New England Biolabs Inc.)

<cebador de *Chlamydia trachomatis*>

- 60 • CT-FIP 0,8 mM: 5'-CAAGCAGGACTACAAGCTGCAGCGTTTGTACTCCGTAC-3' (SEQ ID NO: 1)
• CT-BIP 0,8 mM: 5'-GCGGGCGATTTGCCCTTAACCTCGGTCAACGAAGAGGTT-3' (SEQ ID NO: 2)
• CT-F3 0,1 mM: 5'-ATGTCCGAGTCTGAGCAC-3' (SEQ ID NO: 3)
• CT-B3 0,1 mM: 5'-CCTCAGAAGTTTATGCACTTTC-3' (SEQ ID NO: 4)
• CT-FL 0,4 mM: 5'-AAGATAACCCCGCACGT-3' (SEQ ID NO: 5)
• CT-BL 0,4 mM: 5'-GGAGCGAGTTACGAAGACA-3' (SEQ ID NO: 6)

65 (2) Síntesis de cebador/sonda marcada con fluoróforo y sonda marcada con desactivador

De los cebadores diseñados, se usó BL marcado en 5'-terminal con fluorescencia con FAM como un cebador/sonda marcada con fluoróforo, mientras que su cadena complementaria marcada en 3'-terminal con BHQ1 se usó como una sonda marcada con desactivador. La síntesis del cebador/sonda marcada con fluoróforo y la sonda marcada con desactivador se encargó a Japan Bio Services Co., Ltd.

<cebador/sonda marcada con fluoróforo de *Chlamydia trachomatis*>

FAM-CT-BL: 5'-(FAM)-GGAGCGAGTTACGAAGACA-3' (SEQ ID NO: 7)

<sonda marcada con desactivador de *Chlamydia trachomatis*>

CT-BLc-Q1-0: 5'-TGTCTTCGTAACCTCGCTCC-(BHQ1)-3' (SEQ ID NO: 8)

(3) Adición de cebador/sonda marcada con fluoróforo y sonda marcada con desactivador a la muestra

Se añadió cebador/sonda marcada con fluoróforo 0,4 mM (SEQ ID NO: 7) a cada muestra positiva y la muestra negativa preparada en el párrafo (1). Las muestras se trataron térmicamente a 95 °C durante 5 minutos para la desnaturalización del molde. Posteriormente, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente para que hibridase el cebador marcado con fluoróforo con el molde.

Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió a la misma una sonda marcada con un desactivador 0,8 mM (SEQ ID NO: 8) y se agitó. Después, la fluorescencia de las muestras se confirmó bajo irradiación UV (Fig. 9).

(4) Determinación

No se detectó fluorescencia ni en la muestra positiva ni en la muestra negativa antes de la adición del cebador/sonda marcada con fluoróforo (Tubos N.º 1 y 2), y se detectó después de la adición del cebador/sonda marcada con fluoróforo FAM-CT-BL (SEQ ID NO: 7) (Tubos N.º 3 y 4). Estos tubos de reacción se calentaron a 95 °C durante 5 minutos, luego se enfriaron a temperatura ambiente y se suplementaron con la sonda CT-BLc-Q1-0 marcada con desactivador (SEQ ID NO: 8). La fluorescencia se desactivó en la muestra negativa, porque FAM-CT-BL (SEQ ID NO: 7) se une a CT-BLc-Q1-0 (SEQ ID NO: 8) en ausencia de productos de LAMP (Tubo N.º 5). Por el contrario, la fluorescencia se mantuvo en la muestra positiva, porque FAM-CT-BL (SEQ ID NO: 7) se une a los productos amplificados por LAMP con los plásmidos CT como molde, sin unión a CT-BLc-Q1-0 (SEQ ID NO: 8) (Tubo N.º 6).

Por consiguiente, el Ejemplo 5 muestra que se puede llevar a cabo el aspecto más básico de la presente invención que se muestra en la Fig. 1.

Ejemplo 6. Amplificación y detección de *Chlamydia trachomatis* utilizando el proceso de amplificación inteligente versión 2 (en adelante, denominado SMAP2) (amplificación de ácido nucleico y detección del producto de amplificación en presencia de sonda marcada con desactivador en el método de amplificación isotérmica SMAP2 que no sea LAMP)

(1) Molde de ensayo

Una porción (SEQ ID NO: 21) de una región de plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* se subclonó como molde para el ensayo para preparar ADN de plásmido (en lo sucesivo, denominados plásmidos CT).

(2) Síntesis de cebador, cebador marcado con fluoróforo y sonda marcada con desactivador

Los cebadores para la reacción SMAP2 (un total de cinco cebadores: FP, TP, OP1, OP2 y BP) fueron diseñados para dirigirse a una parte de la región del plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* y no tienen reactividad cruzada con bacterias relacionadas. De los cebadores diseñados, un cebador BP capaz de hibridar con un resto de bucle formado en productos de amplificación por un cebador TP se marcó fluorescentemente en 5'-terminal con Alexa350 y se usó como cebador/sonda marcada con fluoróforo. Se usó una cadena complementaria de cebador BP marcada en 3' con BHQ0 como una sonda marcada con desactivador. La síntesis del cebador se encargó a Operon Biotechnologies Inc. La síntesis del cebador/sonda marcada con fluoróforo y la sonda marcada con desactivador se encargó a Japan Bio Services Co., Ltd.

<Cebador SMAP2 de *Chlamydia trachomatis*>

CT-FP: 5'-TTTATATATATATAAAGCGTTTGTACTCCGTCAC-3' (SEQ ID NO: 34)

CT-TP: 5'-GCGGGCGATTTGCTTAACCTCGGTCAACGAAGAGGTT-3' (SEQ ID NO: 35)

CT-OP1: 5'-CCTCAGAAGTTTATGCACTTTC-3' (SEQ ID NO: 36)

CT-OP2: 5'-ATGTCGGAGTCTGAGCAC-3' (SEQ ID NO: 37)

<cebador/sonda marcada con fluoróforo de *Chlamydia trachomatis*>

Ale-CT-BP: 5'-(Alexa350)-GGAGCGAGTTACGAAGACA-3' (SEQ ID NO: 38)

<sonda marcada con desactivador de *Chlamydia trachomatis*>

5

CT-BPc-QO: 5'-AACTCGCTCC-(BHQ0)-3' (SEQ ID NO: 39)

(3) Composición y concentración del reactivo de reacción SMAP2

10 Las soluciones de reacción final SMAP2 se prepararon de manera que cada reactivo tuviera una concentración que se muestra a continuación en 30 ml de cada una de las soluciones de reacción.

Tris-HCl 30 mM (pH 8,8)

KCl 15 mM

15 (NH₄)₂SO₄ 15 mM

MgSO₄ 12 mM

Tween 20 al 0,15 %

dATP 2,1 mM (GeneACT, Inc.)

dCTP 2,1 mM (GeneACT, Inc.)

20 dGTP 2,1 mM (GeneACT, Inc.)

dTTP 2,1 mM (GeneACT, Inc.)

ADN polimerasa de Bst 38,4 U (New England Biolabs Inc.)

Cebador, cebador/sonda marcada con fluoróforo y sonda marcada con un desactivador:

25

CT-FP 1,33 mM (SEQ ID NO: 34)

CT-TP 1,33 mM (SEQ ID NO: 35)

CT-OP1 0,17 mM (SEQ ID NO: 36)

CT-OP2 0,17 mM (SEQ ID NO: 37)

30 Ale-CT-BP 0,67 mM (SEQ ID NO: 38)

CT-BPc-QO 1,33 mM (SEQ ID NO: 39)

(4) Amplificación

35 Se añadió AD o 10⁶ copias de plásmidos CT por reacción. La reacción de amplificación se realizó a 65 °C durante 45 minutos usando un aparato turbidimétrico en tiempo real Loopamp EXIA (TM) (Teramecs Co., Ltd.).

(5) Determinación

40 La reacción de amplificación se confirmó usando Loopamp EXIA(TM) (Loopamp EXIA (TM), que controla la reacción de amplificación de ácido nucleico basándose en el cambio en la absorbancia causado por la formación de su subproducto pirofosfato de magnesio, es decir, cambio en la turbidez; valor de Tt: tiempo requerido para que el valor aritmético de los datos de turbidimetría alcance un valor de determinación desde el inicio de la reacción; curva de turbidez: gráfico de los datos de turbidez del ensayo en tiempo real) (Tabla 4 y Fig. 10).

45

No se detectó ningún valor de Tt y no se observó aumento de la turbidez en el tubo de reacción suplementado con AD. Por otro lado, se confirmó un valor de Tt de 23,2 minutos y un aumento de la turbidez en el tubo de reacción suplementado con los plásmidos CT. Estos resultados demostraron que la reacción de amplificación se produjo solo en los tubos de reacción que contienen los plásmidos CT, es decir, el ácido nucleico diana.

50

Cada tubo de reacción se irradió con UV después de la finalización de la reacción de amplificación para observar fluorescencia. Como resultado (Fig. 11), no se observó fluorescencia en el tubo de reacción suplementado con AD (Tubo N.º 1), y se observó en el tubo de reacción suplementado con los plásmidos CT (Tubo N.º 2).

55 El ejemplo 6 muestra que la presente invención puede llevarse a cabo no solo para el método LAMP sino también para diversas reacciones de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos.

[Tabla 4]

Tiempo de amplificación	
Muestra	Tt
AD	N.D. *
CT	23,2

*N.D. : No detectado

60 Ejemplo 7. Detección de la longitud de onda de fluorescencia en un sistema de reacción de amplificación simultánea de dos o tres elementos

(1) Molde de ensayo

Una porción (SEQ ID NO: 21) de una región de plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* se subclonó como molde para el ensayo para preparar ADN de plásmido (en lo sucesivo, denominados plásmidos CT). También, se subclonó una porción (SEQ ID NO: 32) de la región mtrA de *Neisseria gonorrhoeae* como molde para el ensayo para preparar ADN plasmídico (en lo sucesivo, denominados plásmidos NG). Además, se subclonó una secuencia de ácido nucleico artificial (SEQ ID NO: 33) como molde para el ensayo para preparar ADN plasmídico (en lo sucesivo, denominados plásmidos ARITA2).

(2) Síntesis de cebador, cebador/sonda marcada con fluoróforo y sonda marcada con desactivador

Los cebadores para la reacción LAMP se diseñaron para dirigirse a la región de plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis*, a la región mtrA de *Neisseria gonorrhoeae*, o a la secuencia de ácido nucleico artificial y no tienen reactividad cruzada con bacterias relacionadas. De los cebadores diseñados, BL marcado en 5'-terminal con fluorescente con Alexa350 de *Chlamydia trachomatis*, BL marcado en 5'-terminal con fluorescente con TAMRA de *Neisseria gonorrhoeae*, y la secuencia de ácido nucleico artificial de BL marcado en 5'-terminal con fluorescente con FAM se usaron como cebadores/sondas marcadas con fluoróforo, mientras que una cadena complementaria de BL de *Chlamydia trachomatis* marcada en 3'-terminal con BHQ0, una cadena complementaria de BL de *Neisseria gonorrhoeae* marcada en 3'-terminal con BHQ2, y una cadena complementaria de BL de la secuencia de ácido nucleico artificial marcada en 3'-terminal con BHQ1 se usaron como sondas marcadas con desactivador. La síntesis del cebador se encargó a Operon Biotechnologies Inc. La síntesis de los cebadores/sondas marcados con fluoróforo y las sondas marcadas con el desactivador se encargó a Japan Bio Services Co., Ltd.

<cebador de *Chlamydia trachomatis*>

CT-FIP: 5'-CAAGCAGGACTACAAGCTGCAGCGTTTGTACTCCGTCAC-3' (SEQ ID NO: 1)

CT-BIP: 5'-GCGGGCGATTTGCCTTAACTCGGTCAACGAAGAGGTT-3' (SEQ ID NO: 2)

CT-F3: 5'-ATGTCGGAGTCTGAGCAC-3' (SEQ ID NO: 3)

CT-B3: 5'-CCTCAGAAGTTTATGCACTTTC-3' (SEQ ID NO: 4)

CT-LF: 5'-AAGATAACCCCGCACGT-3' (SEQ ID NO: 5)

<cebador/sonda marcada con fluoróforo de *Chlamydia trachomatis*>

Ale-CT-LB: 5'-(Alexa350)-GGAGCGAGTTACGAAGACA-3' (SEQ ID NO: 40)

<sonda marcada con desactivador de *Chlamydia trachomatis*>

CT-LBc-QO: 5'-AACTCGCTCC-(BHQ0)-3' (SEQ ID NO: 41)

<cebador de *Neisseria gonorrhoeae*>

NG-FIP: 5'-CGTGGCTCAACACATGACCCAAGCGTCCGGTCCGGCA-3' (SEQ ID NO: 17)

NG-BIP: 5'-ACGGAGAAAGTTTACAACCGGACACAAAACAGGCTCATATCCAGC-3' (SEQ ID NO: 18)

NG-F3: 5'-GCGGTTATCTCTGCATCG-3' (SEQ ID NO: 19)

NG-B3: 5'-GGTGTCTAGCGGAAAC-3' (SEQ ID NO: 20)

NG-LF: 5'-CGGGAAAATACAATATCGCCC-3' (SEQ ID NO: 22)

<cebador/sonda marcada con fluoróforo de *Neisseria gonorrhoeae*>

TAM-NG-LB: 5'-(TAMRA)-CGACAAAACGGCACATTTATGG-3' (SEQ ID NO: 42)

<sonda marcada con desactivador de *Neisseria gonorrhoeae*>

NG-LBC-Q2: 5'-CGTTTTGTCTG-(BHQ2)-3' (SEQ ID NO: 43)

<Cebador de ácido nucleico artificial>

ARITA2-FIP: 5'-CGCTTGGATAGTCGGATGCAAGGGTCAATGGTAC-3' (SEQ ID NO: 25)

ARITA2-BIP: 5'-ACGGTGTATGCTTCGGTGTGCGAACCTATCAGC-3' (SEQ ID NO: 26)

ARITA2-F3: 5'-GGACAATCGAAGCCAGAA-3' (SEQ ID NO: 27)

ARITA2-B3: 5'-ATCACGGATCGTATGTGG-3' (SEQ ID NO: 28)

ARITA2-LF: 5'-GCTAGCTAAGTGCCATCC-3' (SEQ ID NO: 29)

<Cebador/sonda marcada con fluoróforo de ácido nucleico artificial>

FAM-ARITA2-LB: 5'-(FAM)-AACGATCGCACTAAGCAT-3' (SEQ ID NO: 44)

Sonda marcada con desactivador de ácido nucleico artificial>

5 ARITA2-LBC-Q1: 5'-ATGCTTAGTGCGATCGTT-(BHQ1)-3' (SEQ ID NO: 45)

(3) Composición y concentración del reactivo de reacción LAMP

10 Las soluciones de reacción final de LAMP se prepararon de manera que cada reactivo tuviera una concentración que se muestra a continuación en 30 ml de cada una de las soluciones de reacción.

15 Tris-HCl 30 mM (pH 8,8)
 KCl 15 mM
 (NH₄)₂SO₄ 15 mM
 MgSO₄ 12 mM
 Tween 20 al 0,15 %
 ATP 2,1 mM
 CTP 2,1 mM
 GTP 2,1 mM
 20 TTP 2,1 mM
 ADN polimerasa de Bst 38,4 U (New England Biolabs Inc.)

25 En cuanto a los cebadores, se añadieron uno o más conjuntos de 3 formas que contienen cebadores, cebadores/sondas marcadas con fluoróforo y sondas marcadas con desactivador descritas a continuación.

30 Estos conjuntos que contienen cada uno el cebador, el cebador/sonda marcada con fluoróforo y la sonda marcada con desactivador fueron: 3 tipos para la amplificación de un solo elemento de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y el ácido nucleico artificial, respectivamente; 3 tipos para la amplificación simultánea de dos elementos de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* y ácido nucleico artificial, y *Neisseria gonorrhoeae* y ácido nucleico artificial, respectivamente; y un tipo para la amplificación simultánea de 3 elementos de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y el ácido nucleico artificial.

<cebador, cebador/sonda marcada con fluoróforo, y sonda marcada con desactivador de *Chlamydia trachomatis*>

35 CT-FIP 0,67 mM (SEQ ID NO: 1)
 CT-BIP 0,67 mM (SEQ ID NO: 2)
 CT-F3 0,17 mM (SEQ ID NO: 3)
 CT-B3 0,17 mM (SEQ ID NO: 4)
 CT-LF 0,33 mM (SEQ ID NO: 5)
 40 Ale-CT-LB 0,67 mM (SEQ ID NO: 40)
 CT-LBc-Q0 1,33 mM (SEQ ID NO: 41)

<cebador, cebador/sonda marcada con fluoróforo, y sonda marcada con desactivador de *Neisseria gonorrhoeae*>

45 NG-FIP 1,20 mM (SEQ ID NO: 17)
 NG-BIP 1,20 mM (SEQ ID NO: 18)
 NG-F3 0,17 mM (SEQ ID NO: 19)
 NG-B3 0,17 mM (SEQ ID NO: 20)
 NG-LF 0,67 mM (SEQ ID NO: 22)
 50 TAM-NG-LB 0,67 mM (SEQ ID NO: 42)
 NG-LBc-Q2 1,33 mM (SEQ ID NO: 43)

<Cebador, cebador/sonda marcada con fluoróforo y sonda marcada con desactivador de ácido nucleico artificial>

55 ARITA2-FIP 0,20 mM (SEQ ID NO: 25)
 ARITA2-BIP 0,20 mM (SEQ ID NO: 26)
 ARITA2-F3 0,03 mM (SEQ ID NO: 27)
 ARITA2-B3 0,03 mM (SEQ ID NO: 28)
 ARITA2-LF 0,13 mM (SEQ ID NO: 29)
 60 FAM-ARITA2-LB 0,67 mM (SEQ ID NO: 44)
 ARITA2-LBC-Q1 1,33 mM (SEQ ID NO: 45)

(4) Amplificación

65 Se añadió AD o uno o más de 10³ copias de plásmidos CT, 10³ copias de plásmidos NG y 10³ copias de los plásmidos ARITA2 por reacción. La reacción de amplificación se realizó a 65 °C durante 45 minutos usando LoopampEXIA (TM).

(5) Determinación

La reacción de amplificación se confirmó usando Loopamp EXIA(TM).

5 Cada tubo de reacción se irradió con UV después de la finalización de la reacción de amplificación para observar fluorescencia.

10 También, cada solución de reacción después de la reacción de amplificación se diluyó 100 veces con un diluyente y se irradió con luz de excitación correspondiente a cada marcador fluorescente usando un espectrofluorofotómetro RF-5300PC (fabricado por Shimadzu Corp.) para escanear una longitud de onda de fluorescencia.

Composición del diluyente>

15 Tris-HCl 30 mM, pH 8,8
KCl 15 mM
(NH₄)₂SO₄ 15 mM
MgSO₄ 12 mM

20 La siguiente longitud de onda se usó como la luz de excitación correspondiente a cada marcador fluorescente.

Alexa350: 350 nm
TAMRA: 555 nm
FAM: 495 nm

25 1) Resultados de medir la longitud de onda de fluorescencia después de la reacción de amplificación de un solo elemento en el sistema de reacción de amplificación de *Chlamydia trachomatis*

30 En el tubo de reacción suplementado con AD, no se observó amplificación de ácido nucleico (el molde CT en la Tabla 5 muestra que no se detectó ningún valor de Tt; y la curva de amplificación de AD en la Fig. 12 no muestra aumento en la turbidez), y no se confirmó fluorescencia bajo radiación UV (Tubo N.º 1 en la Fig. 13). En el tubo de reacción suplementado con los plásmidos CT, se observó amplificación de ácido nucleico (el molde CT "+" en la Tabla 5 muestra un valor de Tt de 13,3 minutos; y la curva de amplificación de CT en la Fig. 12 muestra un aumento en la turbidez), y la fluorescencia azul presumiblemente derivada de Ale-CT-LB (SEQ ID NO: 40) se confirmó bajo irradiación UV (Tubo N.º 2 en la Fig. 13). En cuanto a la longitud de onda de fluorescencia, asimismo, solo se confirmó la luz de excitación alrededor de 350 nm y un pico espectral Raman de agua alrededor de 398 nm en la solución de reacción de molde(-) (suplementada con AD) irradiada con luz de excitación correspondiente a Alexa350 (Fig. 14A). Por otro lado, se confirmó un pico de fluorescencia presumiblemente derivado de Ale-CT-LB alrededor de 443 nm, además de la luz de excitación alrededor de 350 nm y un pico espectral Raman de agua alrededor de 398 nm, en la solución de reacción de molde(+) (suplementado con plásmido CT) (Fig. 14B).

[Tabla 5]

Molde añadido y tiempo de amplificación		
Molde CT	-	+
Tt	N.D.*	13,3

* N.D. : No detectado

45 2) Resultados de medir la longitud de onda de fluorescencia después de la reacción de amplificación de un solo elemento en el sistema de reacción de amplificación de *Neisseria gonorrhoeae*

50 En el tubo de reacción suplementado con AD, no se observó amplificación de ácido nucleico (el molde NG en la Tabla 6 muestra que no se detectó ningún valor de Tt; y la curva de amplificación de AD en la Fig. 15 no muestra aumento en la turbidez), y no se confirmó fluorescencia bajo radiación UV (Tubo N.º 1 en la Fig. 16). En el tubo de reacción suplementado con los plásmidos NG, se observó amplificación de ácido nucleico (el molde NG "+" en la Tabla 6 muestra un valor de Tt de 11,6 minutos; y la curva de amplificación de NG en la Fig. 15 muestra un aumento en la turbidez), y la fluorescencia roja presumiblemente derivada de TAM-NG-LB (SEQ ID NO: 42) se confirmó bajo radiación UV (Tubo N.º 2 en la Fig. 16). En cuanto a la longitud de onda de fluorescencia, asimismo, solo se confirmó la luz de excitación alrededor de 555 nm en la solución de reacción del molde (-) (suplementado con AD) irradiada con luz de excitación correspondiente con TAMRA (Fig. 17A). Por otro lado, la luz de excitación alrededor de 555 nm y un pico de fluorescencia presumiblemente derivado de TAM-NG-LB alrededor de 580 nm se confirmaron en la solución de reacción de molde(+) (suplementado con plásmido NG) (Fig. 17B).

[Tabla 6]

Molde añadido y tiempo de amplificación		
Molde NG	-	+

Tt	N.D.*	11,6
* N.D. : No detectado		

3) Resultados de medir la longitud de onda de fluorescencia después de la reacción de amplificación en un sistema de reacción de amplificación de ácido nucleico artificial de un solo elemento

5 En el tubo de reacción suplementado con AD, no se observó amplificación de ácido nucleico (el molde ARITA2 en la Tabla 7 muestra que no se detectó ningún valor de Tt; y la curva de amplificación de AD en la Fig. 18 no muestra aumento en la turbidez), y no se confirmó fluorescencia bajo radiación UV (Tubo N.º 1 en la Fig. 19). En el tubo de reacción suplementado con los plásmidos ARITA2, se observó amplificación de ácido nucleico (el molde ARITA2 "+" en la Tabla 7 muestra que no se detectó un valor de Tt dentro del tiempo de reacción, pero la curva de amplificación de ARITA2 en la Fig. 18 muestra un aumento en la turbidez; por lo tanto, se concluyó que el ácido nucleico se amplificó) y se confirmó la fluorescencia verde presumiblemente derivada de FAM-ARITA2-LB (SEQ ID NO: 44) bajo irradiación UV (Tubo N.º 2 en la Fig. 19).

15 En cuanto a la longitud de onda de fluorescencia, se observó luz de excitación alrededor de 495 nm y un pico de fluorescencia derivado presumiblemente de FAM-ARITA2-LB alrededor de 522 nm tanto en la solución de reacción de molde(-) (suplementada con AD) (Fig. 20A) como en la solución de reacción de molde(+) (suplementada con plásmido ARITA2) (Fig. 20B) irradiada con luz de excitación correspondiente a FAM. Sin embargo, se confirmó un pico más pequeño (intensidad de fluorescencia: menos de 20) (fondo) en la solución de reacción de molde(-), mientras que se confirmó un pico más grande (intensidad de fluorescencia: más de 80) en la solución de reacción del(los) molde(s).

[Tabla 7]

Molde añadido y tiempo de amplificación		
Molde ARITA2	-	+
Tt	N.D.*	N.D.*
* N.D. : No detectado		

4) Resultados de medir la longitud de onda de fluorescencia después de la reacción de amplificación en un sistema de reacción de amplificación simultánea de dos elementos de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*

25 En el tubo de reacción suplementado con AD, no se observó amplificación de ácido nucleico (el molde CT y NG en la Tabla 8 muestran que no se detectó ningún valor de Tt; y la curva de amplificación de AD en la Fig. 21 no muestra aumento en la turbidez), y no se confirmó fluorescencia bajo radiación UV (Tubo N.º 1 en la Fig. 22). En el tubo de reacción suplementado solo con los plásmidos CT, solo los plásmidos NG, o los plásmidos CT y los plásmidos NG, se observó amplificación de ácido nucleico (Molde CT "+" y Molde NG "+" y CT y Molde CT "+" y NG "+" en la Tabla 8 muestran valores de Tt de 12,8 minutos, 13,6 minutos y 12,2 minutos, respectivamente; y las curvas de amplificación de CT, NG, y CT + NG en la Fig. 21 muestran un aumento en la turbidez), y fluorescencia azul (Tubo N.º 2 en la Fig. 22) presumiblemente derivada de Ale-CT-LB (SEQ ID NO: 40), fluorescencia roja (Tubo N.º 3 en la Fig. 22) presumiblemente derivada de TAM-NG-LB (SEQ ID NO: 42), y fluorescencia violeta (Tubo N.º 4 en la Fig. 22) presumiblemente derivada de Ale-CT-LB y TAM-NG-LB se confirmaron respectivamente bajo irradiación UV.

40 En cuanto a la longitud de onda de fluorescencia, la luz de excitación alrededor de 350 nm y un pico espectral Raman de agua alrededor de 398 nm se confirmaron en la solución de reacción de molde CT y NG(-) (suplementada con AD) (Fig. 23A) irradiada con luz de excitación correspondiente a Alexa350, mientras que solo se confirmó la luz de excitación alrededor de 555 nm en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a TAMRA.

45 Se confirmó un pico de fluorescencia presumiblemente derivado de Ale-CT-LB alrededor de 443 nm, además de la luz de excitación alrededor de 350 nm y un pico espectral Raman de agua alrededor de 398 nm, en la solución de reacción de molde CT (+) y molde NG (-) (suplementada con plásmido CT y sin plásmido NG) (Fig. 23B) irradiada con luz de excitación correspondiente a Alexa350, mientras que solo se confirmó la luz de excitación alrededor de 555 nm en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a TAMRA.

50 Solo se confirmó la luz de excitación alrededor de 350 nm y un pico espectral Raman de agua alrededor de 398 nm en la solución de reacción de molde NG (+) y molde CT (-) (suplementada con plásmido NG y sin plásmido CT) (Fig. 23C) irradiada con luz de excitación correspondiente a Alexa350, mientras que la luz de excitación alrededor de 555 nm y un pico de fluorescencia presumiblemente derivado de TAM-NG-LB alrededor de 580 nm se confirmaron en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a TAMRA.

55 Un pico de fluorescencia presumiblemente derivado de Ale-CT-LB se confirmó alrededor de 443 nm, además de la luz de excitación para Alexa350 alrededor de 350 nm y un pico espectral Raman de agua alrededor de 398 nm, en la solución de reacción de molde CT y NG (+) (suplementada con plásmido CT y suplementada con plásmido NG) (Fig. 23D) irradiada con luz de excitación correspondiente a Alexa350, mientras que la luz de excitación alrededor de 555 nm y un pico de fluorescencia presumiblemente derivado de TAM-NG-LB alrededor de 580 nm se confirmaron en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a TAMRA.

[Tabla 8]

Molde añadido y tiempo de amplificación					
	CT	-	+	-	+
Molde	NG	-	-	+	+
Tt		N.D.*	12,8	13,6	12,2

* N.D. : No detectado

5) Resultados de medir la longitud de onda de fluorescencia después de la reacción de amplificación en un sistema de reacción de amplificación simultánea de dos elementos de *Chlamydia trachomatis* y ácido nucleico artificial

En el tubo de reacción suplementado con AD, no se observó amplificación de ácido nucleico (el molde CT y ARITA2 en la Tabla 9 muestran que no se detectó ningún valor de Tt; y la curva de turbidez de AD en la Fig. 24 no muestra aumento en la turbidez), y no se confirmó fluorescencia bajo radiación UV (Tubo N.º 1 en la Fig. 25). En el tubo de reacción suplementado solo con los plásmidos CT, solo los plásmidos ARITA2, o los plásmidos CT y los plásmidos ARITA2, se observó amplificación de ácido nucleico (Molde CT "+" y ARITA2, molde ARITA2 "+" y CT y molde CT "+" y ARITA2 "+" en la Tabla 9 muestran valores de Tt de 12,0 minutos, 28,2 minutos y 13,6 minutos, respectivamente; y las curvas de turbidez de CT, ARITA2 y CT + ARITA2 en la Fig. 24 muestran un aumento en la turbidez) y fluorescencia azul (Tubo N.º 2 en la Fig. 25) presumiblemente derivada de Ale-CT-LB (SEQ ID NO: 40), fluorescencia verde (Tubo N.º 3 en la Fig. 25) presumiblemente derivada de FAM-ARITA2-LB (SEQ ID NO: 44), y fluorescencia azul claro (Tubo N.º 4 en la Fig. 25) presumiblemente derivada de Ale-CT-LB y FAM-ARITA2 -LB se confirmaron respectivamente bajo irradiación UV.

En cuanto a la longitud de onda de fluorescencia, la luz de excitación alrededor de 350 nm y un pico espectral Raman de agua alrededor de 398 nm se confirmaron en la solución de reacción de molde CT y ARITA2 (-) (suplementada con AD) (Fig. 26A) irradiada con luz de excitación correspondiente a Alexa350, mientras que solo se confirmó la luz de excitación alrededor de 495 nm en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a FAM.

Se confirmó un pico de fluorescencia presumiblemente derivado de Ale-CT-LB alrededor de 443 nm, además de la luz de excitación alrededor de 350 nm y un pico espectral Raman de agua alrededor de 398 nm, en la solución de reacción de molde CT (+) y molde ARITA2 (-) (suplementada con plásmido CT y sin plásmido ARITA2) (Fig. 26B) irradiada con luz de excitación correspondiente a Alexa350, mientras que la luz de excitación alrededor de 495 nm y un pequeño pico (intensidad de fluorescencia: menos de 20) (fondo) de fluorescencia presumiblemente derivado de FAM-ARITA2-LB alrededor de 522 nm se confirmaron en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a FAM.

Solo se confirmó la luz de excitación alrededor de 350 nm y un pico espectral Raman de agua alrededor de 398 nm en la solución de reacción de molde ARITA2 (+) y molde CT (-) (suplementada con plásmido ARITA2 y no suplementada con plásmido CT) (Fig. 26C) irradiada con luz de excitación correspondiente a Alexa350, mientras que la luz de excitación alrededor de 495 nm y un pico lo suficientemente grande (intensidad de fluorescencia: más de 80) de fluorescencia presumiblemente derivado de FAM-ARITA2-LB alrededor de 522 nm se confirmaron en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a FAM.

Se confirmó un pico de fluorescencia presumiblemente derivado de Ale-CT-LB alrededor de 443 nm, además de la luz de excitación alrededor de 350 nm y un pico espectral Raman de agua alrededor de 398 nm, en la solución de reacción de molde CT y ARITA (+) (suplementado con plásmido CT y suplementado con plásmido ARITA2) (Fig. 26D) irradiada con luz de excitación correspondiente a Alexa350, mientras que la luz de excitación alrededor de 495 nm y un pico lo suficientemente grande (intensidad de fluorescencia: más de 80) de fluorescencia presumiblemente derivado de FAM-ARITA2-LB alrededor de 522 nm se confirmaron en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a FAM.

[Tabla 9]

Molde añadido y tiempo de amplificación					
	CT	-	+	-	+
Molde	ARITA2	-	-	+	+
Tt		N.D.*	12,0	28,2	13,6

* N.D. : No detectado

6) Resultados de medir la longitud de onda de fluorescencia después de la reacción de amplificación en un sistema de reacción de amplificación simultánea de dos elementos de *Neisseria gonorrhoeae* y ácido nucleico artificial

En el tubo de reacción suplementado con AD, no se observó amplificación de ácido nucleico (el molde de NG y ARITA2 en la Tabla 10 muestra que no se detectó ningún valor de Tt; y la curva de turbidez de AD en la Fig. 27 no muestra aumento en la turbidez), y no se confirmó fluorescencia bajo radiación UV (Tubo N.º 1 en la Fig. 28). En el tubo de reacción suplementado solo con los plásmidos NG, solo los plásmidos ARITA2, o los plásmidos NG y los plásmidos

ARITA2, se observó amplificación de ácido nucleico (molde NG "+" y ARITA2, molde ARITA2 "+" y NG y molde NG "+" y ARITA2 "+", en la Tabla 10 se muestran valores de Tt de 12,0 minutos, 29,0 minutos y 11,9 minutos, respectivamente; y las curvas de turbidez de NG, ARITA2 y NG+ARITA2 en la Fig. 27 muestran un aumento en la turbidez), y la fluorescencia roja (Tubo N.º 2 en la Fig. 28) presumiblemente derivada de TAM-NG-LB (SEQ ID NO: 42), la fluorescencia verde (Tubo N.º 3 en la Fig. 28) presumiblemente derivada de FAM-ARITA2-LB (SEQ ID NO: 44) y la fluorescencia amarilla (Tubo N.º 4 en la Fig. 28) presumiblemente derivados de TAM-NG-LB y FAM-ARITA2-LB se confirmaron respectivamente bajo irradiación UV.

En cuanto a la longitud de onda de fluorescencia, se confirmó la luz de excitación alrededor de 555 nm en la solución de reacción del molde NG y ARITA2(-) (suplementada con AD) (Fig. 29A) irradiada con luz de excitación correspondiente a TAMRA, mientras que la luz de excitación alrededor de 495 nm y un pequeño pico (intensidad de fluorescencia: menos de 20) (fondo) de fluorescencia presumiblemente derivado de FAM-ARITA2-LB alrededor de 522 nm se confirmaron en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a FAM.

La luz de excitación alrededor de 555 nm y un pico de fluorescencia presumiblemente derivado de TAM-NG-LB alrededor de 580 nm se confirmaron en la solución de reacción de molde NG (+) y molde ARITA2 (-) (suplementada con plásmido NG y no suplementado con plásmido ARITA2) (Fig. 29B) irradiado con luz de excitación correspondiente a TAMRA, mientras que la luz de excitación alrededor de 495 nm y un pequeño pico (intensidad de fluorescencia: menos de 20) (fondo) de fluorescencia presumiblemente derivado de FAM-ARITA2-LB alrededor de 522 nm se confirmaron en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a FAM.

Solo se confirmó la luz de excitación alrededor de 555 nm en la solución de reacción del molde ARITA2 (+) y del molde NG (-) (suplementada con plásmido ARITA2 y sin plásmido NG) (Fig. 29C) irradiada con luz de excitación correspondiente a TAMRA, mientras que la luz de excitación alrededor de 495 nm y un pico lo suficientemente grande (intensidad de fluorescencia: más de 80) de fluorescencia presumiblemente derivado de FAM-ARITA2-LB alrededor de 522 nm se confirmaron en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a FAM.

La luz de excitación alrededor de 555 nm y un pico de fluorescencia supuestamente derivado de TAM-NG-LB alrededor de 580 nm se confirmaron en la solución de reacción de molde NG y ARITA (+) (suplementada con plásmido NG y suplementada con plásmido ARITA2) (Fig. 29D) irradiado con luz de excitación correspondiente a TAMRA, mientras que la luz de excitación alrededor de 495 nm y un pico lo suficientemente grande (intensidad de fluorescencia: más de 80) de fluorescencia presumiblemente derivado de FAM-ARITA2-LB alrededor de 522 nm se confirmaron en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a FAM.

[Tabla 10]

Molde añadido y tiempo de amplificación					
	CT	-	+	-	+
Molde	ARITA2	-	-	+	+
Tt		N.D.*	12,0	29,0	11,9

* N.D. : No detectado

7) Resultados de medir la longitud de onda de fluorescencia después del sistema de reacción de amplificación en un sistema de reacción de amplificación de tres elementos de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y ácido nucleico artificial

En el tubo de reacción suplementado con AD, no se observó amplificación de ácido nucleico (Molde CT NG y ARITA2 en la Tabla 11 muestran que no se detectó ningún valor de Tt; y la curva de turbidez de AD en la Fig. 30 no muestra aumento en la turbidez), y no se confirmó fluorescencia bajo radiación UV (Tubo N.º 1 en la Fig. 31). En el tubo de reacción suplementado con uno, dos en combinación, o tres de los plásmidos CT, los plásmidos NG y los plásmidos ARITA2, se observó amplificación de ácido nucleico (Molde CT "+" y el otro molde NG "+" y el otro molde ARITA2 "+" y el otro molde CT "+" y NG "+", molde CT "+" y ARITA2 "+", molde NG "+" y ARITA2 "+", y molde CT "+", NG "+" y ARITA2 "+" en la Tabla 11 muestran valores de Tt de 14,3 minutos, 13,5 minutos, 35,6 minutos, 12,3 minutos, 14,2 minutos, 13,5 minutos y 12,4 minutos, respectivamente; y las curvas de turbidez de CT, NG, ARITA2, CT+NG, CT+ARITA2, NG+ARITA2 y CT+NG+ARITA2 en la Fig. 30 muestran un aumento en la turbidez), y la fluorescencia azul (Tubo N.º 2 en la Fig. 31) probablemente derivada de Ale-CT-LB (SEQ ID NO: 40), la fluorescencia roja (Tubo N.º 3 en la Fig. 31) presumiblemente derivada de TAM-NG-LB (SEQ ID NO: 42), la fluorescencia verde (Tubo N.º 4 en la Fig. 31) presumiblemente derivada de FAM-ARITA2-LB (SEQ ID NO: 44), la fluorescencia violeta (Tubo N.º 5 en la Fig. 31) presumiblemente derivada de Ale-CT-LB y TAM-NG-LB, la fluorescencia azul claro (Tubo N.º 6 en la Fig. 31) presumiblemente derivada de Ale-CT-LB y FAM-ARITA2-LB, la fluorescencia amarilla (Tubo N.º 7 en la Fig. 31) presumiblemente derivada de TAM-NG-LB y FAM-ARITA2-LB, y la fluorescencia blanca (Tubo N.º 8 en la Fig. 31) presumiblemente derivada de Ale-CT-LB, TAM-NG-LB y FAM-ARITA2-LB se confirmaron respectivamente bajo irradiación UV.

En cuanto a la longitud de onda de fluorescencia, solo la luz de excitación alrededor de 350 nm y un pico espectral Raman de agua alrededor de 398 nm se confirmaron en la solución de reacción de molde CT, NG y ARITA2 (-) (suplementada con AD) (Fig. 32A) irradiada con luz de excitación correspondiente a Alexa350. Solo se confirmó la luz

de excitación alrededor de 555 nm en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a TAMRA. La luz de excitación alrededor de 495 nm y un pequeño pico (intensidad de fluorescencia: menos de 20) (fondo) de fluorescencia presumiblemente derivado de FAM-ARITA2-LB alrededor de 522 nm se confirmaron en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a FAM.

5 Un pico de fluorescencia presumiblemente derivado de Ale-CT-LB se confirmó alrededor de 443 nm, además de la luz de excitación alrededor de 350 nm y un pico espectral Raman de agua alrededor de 398 nm, en la solución de reacción de molde CT (+) (suplementado con plásmido CT) (Fig. 32B) irradiada con luz de excitación correspondiente a Alexa350. Solo se confirmó la luz de excitación alrededor de 555 nm en esta solución de reacción irradiada con luz de
10 excitación correspondiente a TAMRA. La luz de excitación alrededor de 495 nm y un pequeño pico (intensidad de fluorescencia: menos de 20) (fondo) de fluorescencia presumiblemente derivado de FAM-ARITA2-LB alrededor de 522 nm se confirmaron en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a FAM.

15 Solo se confirmó la luz de excitación alrededor de 350 nm y un pico espectral Raman de agua alrededor de 398 nm en la solución de reacción de molde NG (+) (suplementada con plásmido NG) (Fig. 32C) irradiada con luz de excitación correspondiente a Alexa350. Un pico de fluorescencia presumiblemente derivado de TAM-NG-LB se confirmó alrededor de 580 nm, además de la luz de excitación alrededor de 555 nm, en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a TAMRA. La luz de excitación alrededor de 495 nm y un pequeño pico (intensidad de fluorescencia: menos de 20) (fondo) de fluorescencia presumiblemente derivado de FAM-ARITA2-LB alrededor de
20 522 nm se confirmaron en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a FAM.

25 Solo se confirmó la luz de excitación alrededor de 350 nm y un pico espectral Raman de agua alrededor de 398 nm en la solución de reacción de molde ARITA2 (+) (suplementado con plásmido ARITA2) (Fig. 32D) irradiada con luz de excitación correspondiente a Alexa350. Solo se confirmó la luz de excitación alrededor de 555 nm en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a TAMRA. La luz de excitación alrededor de 495 nm y un pico lo suficientemente grande (intensidad de fluorescencia: más de 80) (fondo) de fluorescencia presumiblemente derivado de FAM-ARITA2-LB alrededor de 522 nm se confirmaron en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a FAM.

30 Se confirmó un pico de fluorescencia presumiblemente derivado de Ale-CT-LB alrededor de 443 nm, además de la luz de excitación para Alexa350 alrededor de 350 nm y un pico espectral Raman de agua alrededor de 398 nm, en la solución de reacción de molde CT y NG (+) (suplementada con plásmido CT y suplementada con plásmido NG) (Fig. 32E) irradiada con luz de excitación correspondiente a Alexa350. La luz de excitación alrededor de 555 nm y un pico de fluorescencia presumiblemente derivado de TAM-NG-LB alrededor de 580 nm se confirmaron en esta solución de
35 reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a TAMRA. Por el contrario, solo la luz de excitación alrededor de 495 nm y un pequeño pico (intensidad de fluorescencia: menos de 20) (fondo) de fluorescencia presumiblemente derivado de FAM-ARITA2-LB alrededor de 522 nm se confirmaron en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a FAM.

40 Un pico de fluorescencia presumiblemente derivado de Ale-CT-LB se confirmó alrededor de 443 nm, además de la luz de excitación alrededor de 350 nm y un pico espectral Raman de agua alrededor de 398 nm, en la solución de reacción de molde CT y ARITA2 (+) (suplementada con plásmido CT y suplementada con plásmido ARITA2) (Fig. 32F) irradiada con luz de excitación correspondiente a Alexa350. Solo se confirmó la luz de excitación alrededor de 555 nm en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a TAMRA. La luz de excitación alrededor de 495
45 nm y un pico lo suficientemente grande (intensidad de fluorescencia: más de 80) de fluorescencia presumiblemente derivado de FAM-ARITA2-LB alrededor de 522 nm se confirmaron en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a FAM.

50 Solo se confirmó la luz de excitación alrededor de 350 nm y un pico espectral Raman de agua alrededor de 398 nm en la solución de reacción de molde NG y ARITA2 (+) (suplementada con plásmido NG y suplementada con plásmido ARITA2) (Fig. 32G) irradiada con luz de excitación correspondiente a Alexa350. La luz de excitación alrededor de 555 nm y un pico de fluorescencia presumiblemente derivado de TAM-NG-LB alrededor de 580 nm se confirmaron en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a TAMRA. La luz de excitación alrededor de 495 nm y un pico lo suficientemente grande (intensidad de fluorescencia: más de 80) de fluorescencia presumiblemente
55 derivado de FAM-ARITA2-LB alrededor de 522 nm se confirmaron en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a FAM.

60 Un pico de fluorescencia presumiblemente derivado de Ale-CT-LB se confirmó alrededor de 443 nm, además de la luz de excitación para Alexa350 alrededor de 350 nm y un pico espectral Raman de agua alrededor de 398 nm, en la solución de reacción de molde CT y ARITA2 (+) (suplementada con plásmido CT y suplementada con plásmido ARITA2) (Fig. 32H) irradiada con luz de excitación correspondiente a Alexa350. La luz de excitación alrededor de 555 nm y un pico de fluorescencia presumiblemente derivado de TAM-NG-LB alrededor de 580 nm se confirmaron en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a TAMRA. La luz de excitación alrededor de 495 nm y un pico lo suficientemente grande (intensidad de fluorescencia: más de 80) de fluorescencia presumiblemente
65 derivado de FAM-ARITA2-LB alrededor de 522 nm se confirmaron en esta solución de reacción irradiada con luz de excitación correspondiente a FAM.

[Tabla 11]

Molde añadido y tiempo de amplificación								
CT	-	+	-	-	+	+	-	+
Molde NG	-	-	+	-	+	-	+	+
ARITA2	-	-	-	+	-	+	+	+
Tt	N.D*	14,3	13,5	35,6	12,3	14,2	13,5	12,4

* N.D. : No detectado

5 La presente invención está dirigida a la detección de fluorescencia derivada de un marcador fluorescente para su uso en la detección basándose en la amplificación de ácido nucleico de un molde en un sistema de reacción de amplificación de elemento único o elemento múltiple y a la detección de fluorescencia derivada de varios marcadores fluorescentes para su uso en la detección de los respectivos elementos para la amplificación de ácido nucleico a partir de varios moldes en un sistema de reacción de amplificación de elementos múltiples. La detección visual requiere que la fluorescencia tenga un color dentro de un rango reconocible por el tricromatismo en humanos. Por ejemplo, los marcadores fluorescentes azul, rojo y verde, como se muestra en los Ejemplos, se usan como colores primarios, y los tonos de color expresados mediante la mezcla aditiva son 7 colores: violeta, amarillo, azul claro y blanco además de los 3 colores primarios anteriores. Por consiguiente, el límite superior es un total de 8 colores, incluida la ausencia de fluorescencia (incolore, es decir, sin fluorescencia). Por otro lado, la detección usando un fluorómetro puede detectar más elementos simultáneamente y también puede cuantificar los elementos en función de la intensidad de emisión, porque pueden usarse marcadores fluorescentes de tipos reconocibles por el aparato.

10 El ejemplo 7 muestra que de acuerdo con la presente invención, la fluorescencia se puede medir utilizando un detector de fluorescencia para detectar la amplificación de ácido nucleico a través de la reacción de amplificación isotérmica, independientemente de elementos únicos o múltiples.

20

Aplicabilidad industrial

La presente invención puede proporcionar un método para detectar un ácido nucleico diana de manera más conveniente y económica que las técnicas convencionales. También, El método de la presente invención aplicado a una micromatriz puede detectar la expresión génica sin marcar ácidos nucleicos diana. Asimismo, el método de la presente invención combinado con una técnica convencional de amplificación de ácido nucleico también puede detectar múltiples ácidos nucleicos diana a la vez simplemente mediante la adición de reactivos en una sola etapa. Además, el método de la presente invención permite que dicha detección se logre visualmente sin el uso de equipo especial. Por consiguiente, la presente invención puede servir como una herramienta muy eficaz no solo en laboratorios específicos sino también en la identificación de bacterias o virus infecciosos en hospitales, la confirmación de la sensibilidad a los medicamentos, la predicción de los efectos terapéuticos mediante la detección de polimorfismos de un solo nucleótido, el control de seguridad en la producción y distribución de alimentos, etc.

LISTADO DE SECUENCIAS

35

<110> EIKEN CHEMICAL CO., LTD.

<120> Método para detectar ácido nucleico diana

40

<130> W6550

<150> JP 2011/238174

<151> 31/10/2011

45

<160> 45

<170> PatentIn versión 3.1

50

<210> 1

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> CT-FIP: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 1

caagcaggac tacaagctgc agcgtttcta ctccgtcac 39

60

<210> 2

<211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> CT-BIP: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 2
 gcgggcgatt tgccttaact cggcaacga agagggtt 37

10

<210> 3
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> CT-F3: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 3
 atgtcggagt ctgagcac 18

20

<210> 4
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> CT-B3: Cebador/Sonda sintetizado

30

<400> 4
 cctcagaagt ttatgcactt tc 22

35

<210> 5
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> CT-LF: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 5
 aagataaccc cgcacgt 17

45

<210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> CT-LB: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 6
 ggagcgagtt acgaagaca 19

55

<210> 7
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> FAM-CT-LB: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 7
 ggagcgagtt acgaagaca 19

65

<210> 8

ES 2 755 934 T3

<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> CT-LBc-Q1-0: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 8
tgtcttcgta actcgctcc 19

10 <210> 9
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> CT-LBc-Q1-3: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 9
cttcgtaact cgctcc 16

20 <210> 10
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> CT-LBc-Q1-5: Cebador/Sonda sintetizado

30 <400> 10
tcgtaactcg ctcc 14

<210> 11
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> CT-LBc-Q1-6: Cebador/Sonda sintetizado

40 <400> 11
cgtaactcgc tcc 13

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

45 <220>
<223> CT-LBc-Q1-7: Cebador/Sonda sintetizado

50 <400> 12
gtaactcgct cc 12

<210> 13
<211> 10
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> CT-LBc-Q1-9: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 13
Aactcgctcc 10

60 <210> 14

65

<211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> CT-LBc-Q1-10: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 14
 Actcgctcc 9

10 <210> 15
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> TAM-CT-LF: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 15
 aagataaccc cgcacgt 17

20 <210> 16
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> CT-LFc-Q2: Cebador/Sonda sintetizado

30 <400> 16
 acgtgcgggg ttatctt 17

<210> 17
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> NG-FIP: Cebador/Sonda sintetizado

40 <400> 17
 cgtggctcaa cacatgacct aagcgtccgg tcggca 36

45 <210> 18
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> NG-BIP: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 18
 acggagaaag ttacaaccg gacacaaaac aggctcatat ccagc 45

55 <210> 19
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> NG-F3: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 19
 gcggttatct ctgcatcg 18

65 <210> 20

ES 2 755 934 T3

<211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> NG-B3: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 20
 ggtgtcgtag cggaaac 17

10 <210> 21
 <211> 428
 <212> ADN
 <213> Chlamydia trachomatis

15 <400> 21

ctcgagaaga tttatcgtac gcaaatatca tctttgcggt tgcgtgtcct gtgaccttca 60
 ttatgtcggga gtctgagcac cctaggcggt tgtactccgt cacagcgggt gctcgaagca 120
 cgtgcgggggt tatcttaaaa gggattgcag cttgtagtcc tgcttgagag aacgtgcggg 180
 cgatttgcct taaccccacc atttttccgg agcgagttac gaagacaaaa cctcttcggt 240
 gaccgatgta ctctttaga aagtgcataa acttctgagg ataagttata ataatcctct 300
 tttctgtctg acggttctta agctgggaga aagaaatggt agcttgttgg aaacaaatct 360
 gactaatctc caagcttaag acttcagagg agcgtttacc tccttgagc attgtctggg 420
 cgatcaac 428

20 <210> 22
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> NG-LF: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 22
 cgggaaaaat acaatcgc cc 22

30 <210> 23
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> FAM-NG-LB: Cebador/Sonda sintetizado

40 <400> 23
 cgacaaaacg gcacattat gg 22

<210> 24
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> NG-LBc-Q1: Cebador/Sonda sintetizado

50 <400> 24

ccataaatgt gccgtttgt eg 22

5 <210> 25
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> ARITA2-FIP: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 25
 egettggata gteggatgea agggatcaatg gtac 34

15 <210> 26
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> ARITA2-BIP: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 26
 acgggtgatg cttcgggtg cgaacctatc age 33

25 <210> 27
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> ARITA2-F3: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 27
 ggacaatcga agccagaa 18

35 <210> 28
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> ARITA2-B3: Cebador/Sonda sintetizado

45 <400> 28
 atcacggatc gtatgtgg 18

50 <210> 29
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> ARITA2-LF5: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 29
 gctagctaag tgccatcc 18

60 <210> 30
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Ale-ARITA2-LB: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 30

ES 2 755 934 T3

aacgatcgca ctaagcat 18

5 <210> 31
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> ARITA2-LBc-Q0: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 31
 atgcttagtg cgatcggt 18

15 <210> 32
 <211> 451
 <212> ADN
 <213> Neisseria gonorrhoeae

20 <400> 32

gacattctgg	acaaactggt	cgatctcgcc	caattgacgg	gcagtgcgga	tgtgcagtgc	60
cttttggggcg	gacaatggtc	ggtacggcat	gaaaccttgc	aatgcgaagg	gctggtacac	120
attgttacgg	cgggcagcgg	ttatctctgc	atcgacggcg	aaacttcccc	gcgtccggtc	180
ggcacggggcg	atattgtatt	tttcccgccg	ggcttgggtc	atgtgttgag	ccacgacgga	240
aaatacggag	aaagtttaca	accggacata	cgacaaaacg	gcacatttat	ggtcaaacag	300
tgcggcaacg	ggctggatat	gagcctgttt	tgcgcccgtt	tccgctacga	caccacgcc	360
gatttgatga	acgggctgcc	ggaaaccggt	tttctgaaca	ttgcccattc	aagtttgtag	420
tatgtggttt	caatgctgca	actggaaagc	g			451

25 <210> 33
 <211> 569
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> ADN sintetizado

<400> 33

ES 2 755 934 T3

gggtcaatcg tagggacaat cgaagccaga atgcaagggt caatggtacg cagaatggat 60
 ggcacttagc tagccagtta ggatccgact atccaagcgt gtatcgtacg gtgtatgctt 120
 cggagtaacg atcgcactaa gcatggctca atcctaggct gataggttcg cacatagcat 180
 gccacatacg atccgtgatt gctagcgtga ttcgtaccga gaactcacgc cttatgactg 240
 cccttatgtc accgcttatg tctcccgata tcacaccggt tatctcagcc ctaatctctg 300
 cggtttagtc tggccttaat ccatgcctca tagctaccct cataccatcg ctcatacctt 360
 ccgacattgc atccgtcatt ccaaccctga ttcctacggt ctaacctagc ctctatccta 420
 cccagttagg ttgcctctta gcatccctgt tacgtacgct cttacatgc gtcttacctt 480
 ggcactatcg atgggagtat ggtagcagat atggaacgga ctaacgtagg cagtaagcta 540
 ggggtgtaagg ttgggactaa ggatgccag 569

5 <210> 34
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CT-FP: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 34
 ttatatata tataaagcgt ttgtactccg tcac 34

15 <210> 35
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CT-TP: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 35
 gcgggcgatt tgccttaact cgtcaacga agaggtt 37

25 <210> 36
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> CT-OP1: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 36
 cctcagaagt ttatgcactt tc 22

35 <210> 37
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> CT-OP2: Cebador/Sonda sintetizado

45 <400> 37
 atgtcggagt ctgagcac 18

ES 2 755 934 T3

<210> 38
<211> 19
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ale-CT-BP: Cebador/Sonda sintetizado

10 <400> 38
ggagcgagtt acgaagaca 19

<210> 39
<211> 10
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CT-BPc-QO: Cebador/Sonda sintetizado

20 <400> 39
aactcgctcc 10

<210> 40
<211> 19
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ale-CT-LB: Cebador/Sonda sintetizado

30 <400> 40
ggagcgagtt acgaagaca 19

35 <210> 41
<211> 10
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> CT-LBc-QO: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 41
45 aactcgctcc 10

<210> 42
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> TAM-NG-LB: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 42
55 cgacaaaacg gcacatttat gg 22

<210> 43
<211> 10
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> NG-LBc-Q2: Cebador/Sonda sintetizado

65 <400> 43
cgttttgtcg 10

ES 2 755 934 T3

5 <210> 44
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> FAM-ARITA2-LB: Cebador/Sonda sintetizado

10 <400> 44
aacgatcgca ctaagcat 18

15 <210> 45
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> ARITA2-LBc-Q1: Cebador/Sonda sintetizado

<400> 45
atgcttagtg cgatcggt 18

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar uno o más ácidos nucleicos diana presentes en una muestra, que comprende las siguientes etapas:

5 (1) agregar un cebador o sonda marcada con fluoróforo y una sonda marcada con un desactivador a la muestra, o agregar la muestra a un cebador o sonda marcada con fluoróforo y una sonda marcada con un desactivador, en donde el cebador o sonda marcada con fluoróforo es un oligonucleótido marcado con fluoróforo que tiene complementariedad con un ácido nucleico diana, y

10 la sonda marcada con desactivador es un oligonucleótido marcado con desactivador que tiene complementariedad con el cebador o sonda marcada con fluoróforo y que tiene una temperatura de fusión (Tf) menor que la del cebador o sonda marcada con fluoróforo;

15 (2) incubar la muestra a una temperatura igual o inferior a la temperatura de fusión (TF) del cebador o sonda marcada con fluoróforo y superior a la temperatura de fusión (TF) de la sonda marcada con desactivador en la que se amplifica el ácido nucleico diana en condiciones isotérmicas por amplificación isotérmica de ácidos nucleicos iniciada por cebadores quiméricos (ICAN), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación por círculo rodante (RCA), proceso de amplificación inteligente versión 2 (SMAP2) o amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP);

20 (3) hibridar el cebador o sonda marcado con fluoróforo que no está con el ácido nucleico diana, con la sonda marcada con desactivador incubando la muestra a una temperatura igual o inferior a la temperatura de fusión (Tf) de la sonda marcada con desactivador, desactivando de este modo con el desactivador la fluorescencia emitida por el cebador o sonda marcada con fluoróforo que no ha hibridado con el ácido nucleico diana; y

25 (4) medir la fluorescencia del cebador o sonda marcado con fluoróforo unido al ácido nucleico diana, mientras que la muestra se mantiene a una temperatura igual o inferior a la temperatura de fusión (Tf) de la sonda marcada con desactivador, en donde solo se pueden detectar los marcadores fluorescentes en el cebador o sonda marcado con fluoróforo unido con éxito al ácido nucleico diana.

30 2. El método de detección de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el oligonucleótido de la sonda marcada con desactivador tiene una longitud de bases más corta que la del oligonucleótido del cebador o sonda marcada con fluoróforo.

3. El método de detección de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el oligonucleótido de la sonda marcada con desactivador comprende una base modificada.

35 4. El método de detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el cebador o sonda marcada con fluoróforo se inmoviliza sobre una superficie en fase sólida para su uso.

40 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se usa una combinación de dos o más cebadores o sondas marcadas con fluoróforo que difieren en longitud de onda de emisión y sondas marcadas con inhibidor respectivamente compatibles con los mismos para detectar dos o más ácidos nucleicos diana.

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la medición de la fluorescencia en la etapa (4) es la determinación visual.

45 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la medición de la fluorescencia en la etapa (4) es la determinación usando un detector de fluorescencia.

50 8. Un kit para su uso en un método de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende una o más combinaciones, cada una de las cuales comprende:

un cebador o sonda marcado con fluoróforo, en donde el cebador o sonda marcada con fluoróforo es un oligonucleótido marcado con fluoróforo que tiene complementariedad con un ácido nucleico diana, y una sonda marcada con desactivador, en donde la sonda marcada con desactivador es un oligonucleótido marcado con desactivador que tiene complementariedad con el cebador o sonda marcada con fluoróforo y que tiene una temperatura de fusión (Tf) menor que la del cebador o sonda marcada con fluoróforo, en donde el desactivador es compatible con el fluoróforo, y un cebador y una polimerasa para la amplificación en condiciones isotérmicas por ICAN, SDA, RCA, SMAP2 o LAMP.

60 9. El kit para la detección de ácido nucleico diana de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el oligonucleótido de la sonda marcada con desactivador tiene una longitud de bases más corta que la del oligonucleótido del cebador o sonda marcada con fluoróforo.

10. El kit para la detección de ácido nucleico diana de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el oligonucleótido de la sonda marcada con desactivador comprende una base modificada.

65 11. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde el kit comprende además un reactivo

para la amplificación de ácido nucleico.

12. El kit para la detección de ácido nucleico diana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde el cebador o sonda marcado con fluoróforo se inmoviliza sobre una superficie en fase sólida.

5 13. Uso de un kit en un método de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el kit comprende una o más combinaciones, cada una de las cuales comprende:

10 un cebador o sonda marcado con fluoróforo, en donde el cebador o sonda marcada con fluoróforo es un oligonucleótido marcado con fluoróforo que tiene complementariedad con un ácido nucleico diana, y una sonda marcada con desactivador, en donde la sonda marcada con desactivador es un oligonucleótido marcado con desactivador que tiene complementariedad con el cebador o sonda marcada con fluoróforo y que tiene una temperatura de fusión (T_f) menor que la del cebador o sonda marcada con fluoróforo, en donde el desactivador es compatible con el fluoróforo.

15 14. Uso del kit de acuerdo con la reivindicación 13, en donde:

(a) el oligonucleótido de la sonda marcada con desactivador tiene una longitud de bases más corta que la del oligonucleótido del cebador o sonda marcada con fluoróforo; o
20 (b) el oligonucleótido de la sonda marcada con desactivador comprende una base modificada.

15. Uso del kit de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en donde:

(a) el kit comprende además un reactivo para la amplificación de ácido nucleico; y/o
25 (b) el cebador o sonda marcada con fluoróforo se inmoviliza sobre una superficie en fase sólida.

Fig. 1

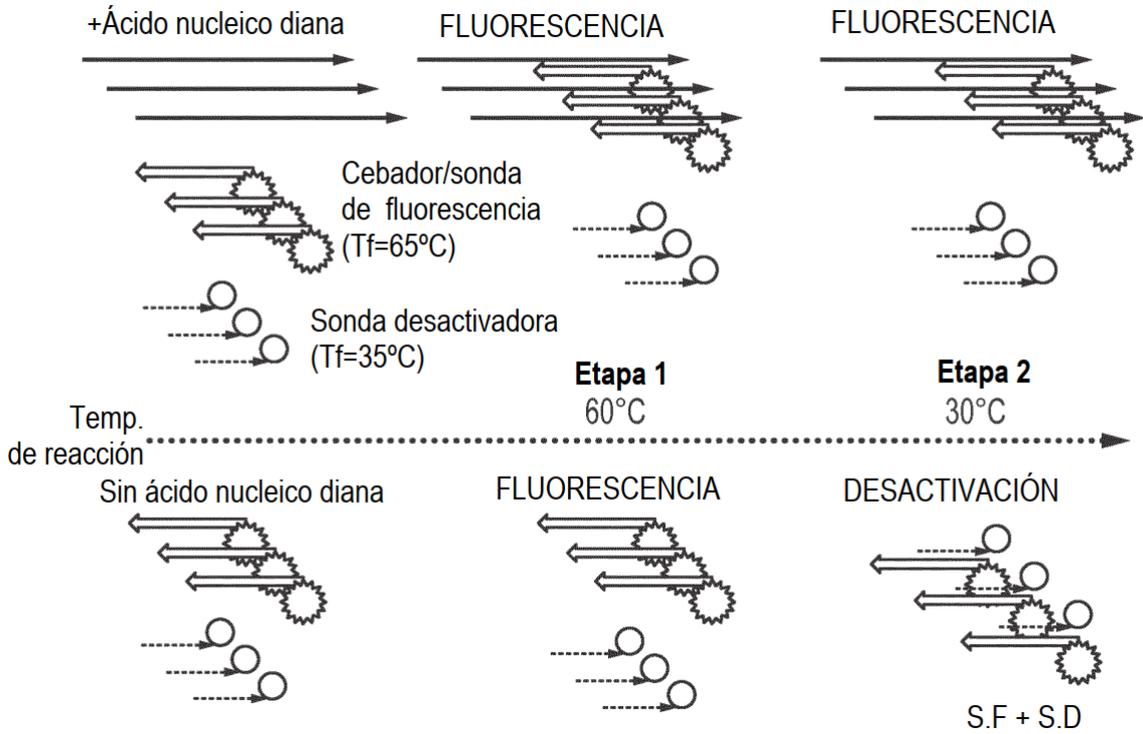


Fig. 2

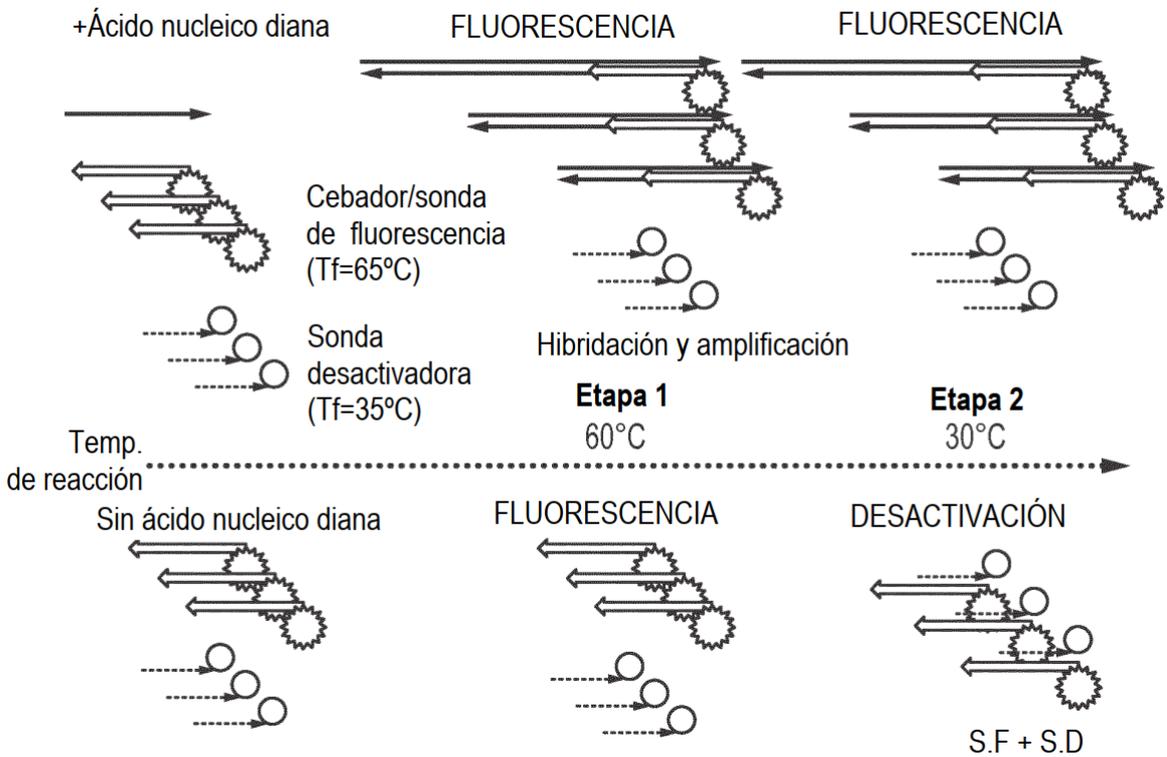


Fig. 3A

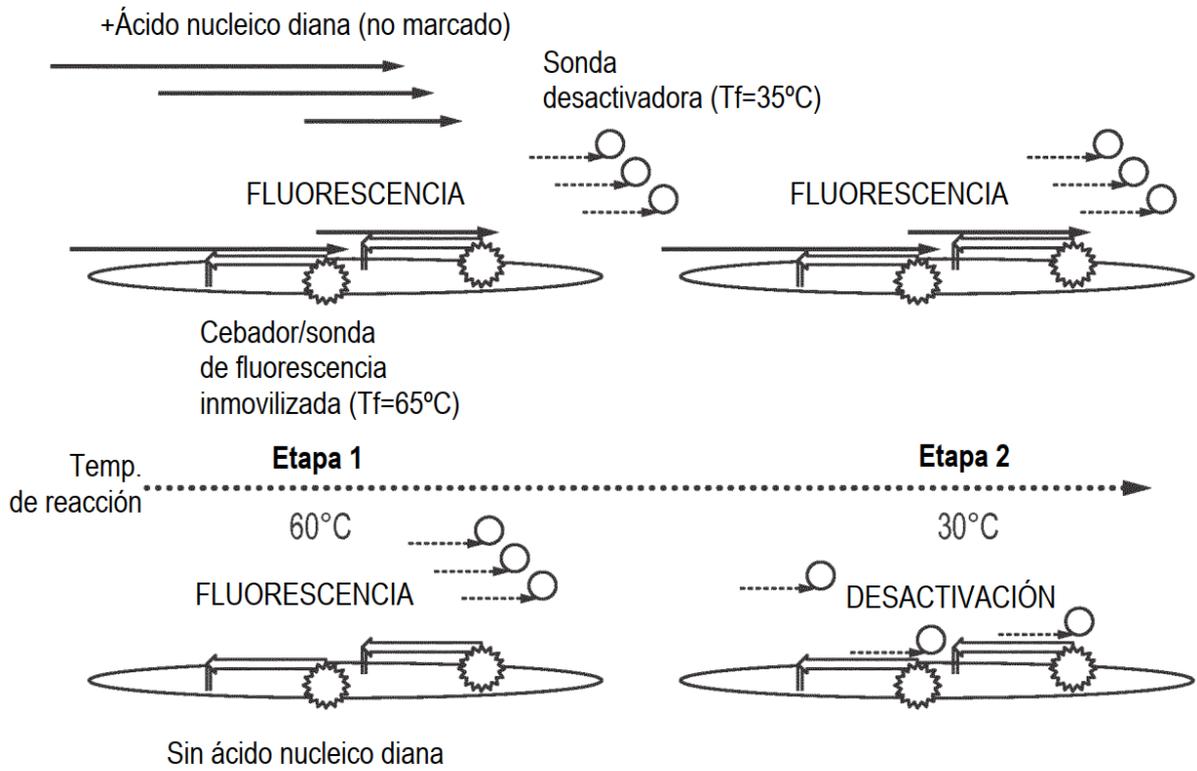


Fig. 3B

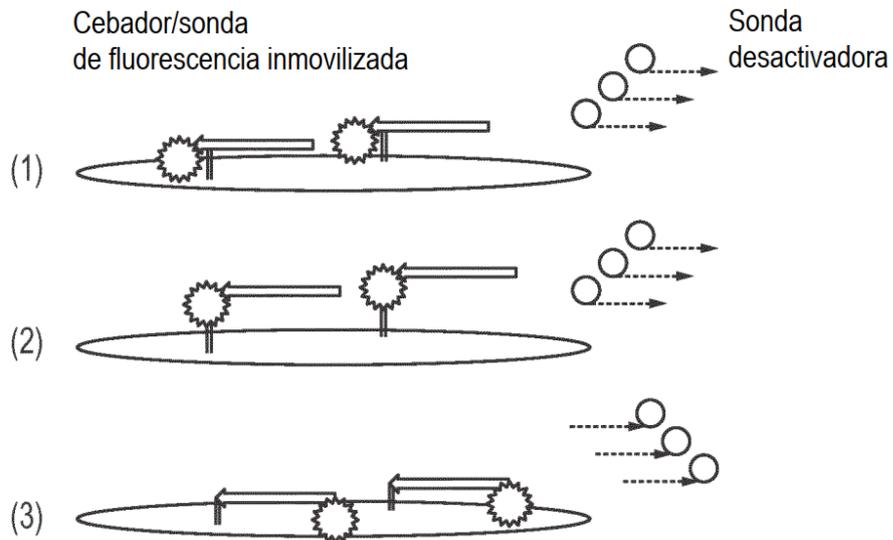


Fig. 3C

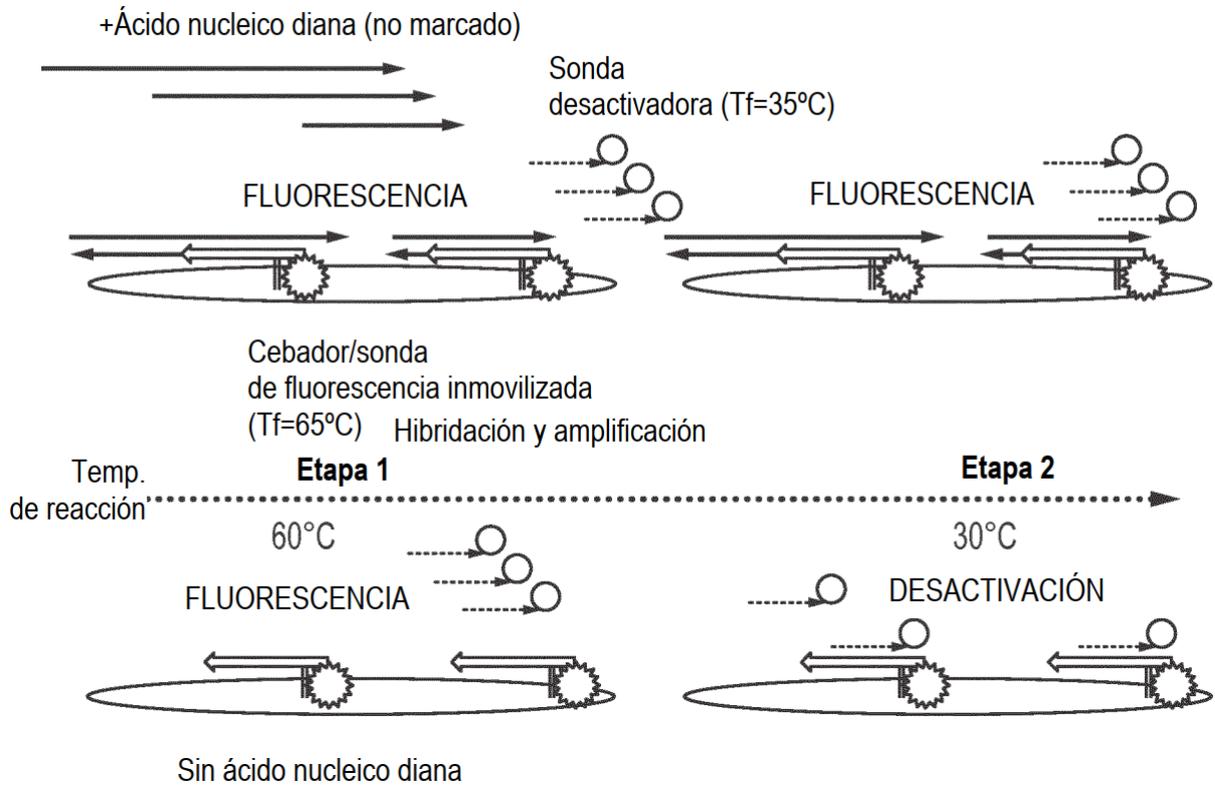


Fig. 4

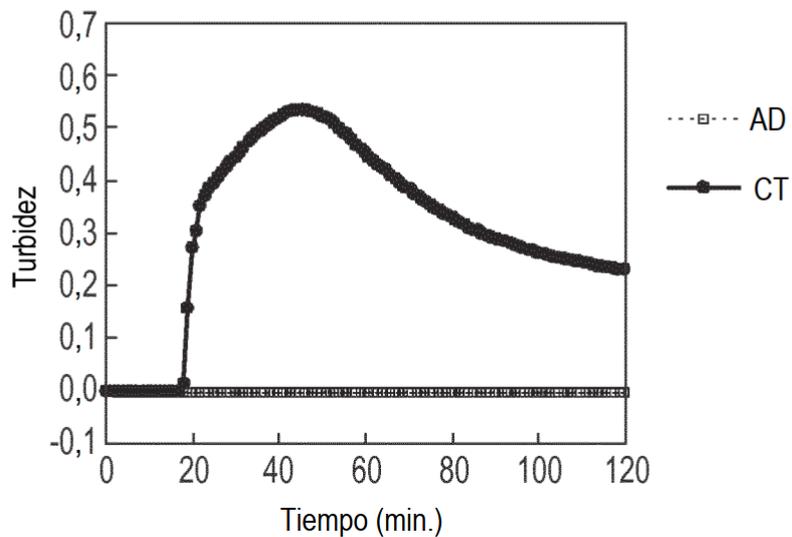


Fig. 5

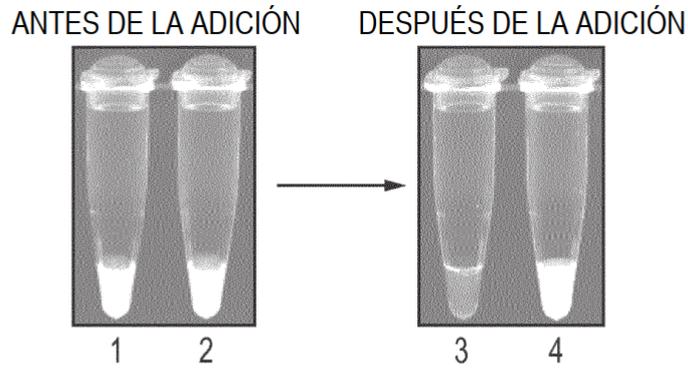


Fig. 6

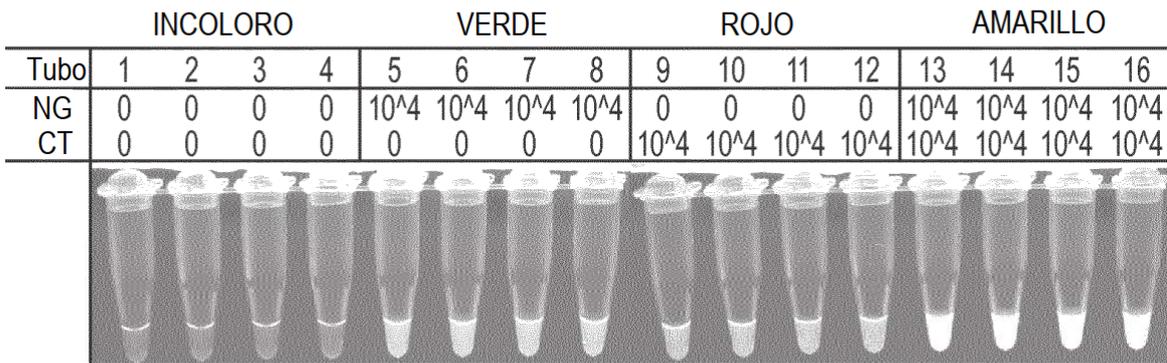


Fig. 7

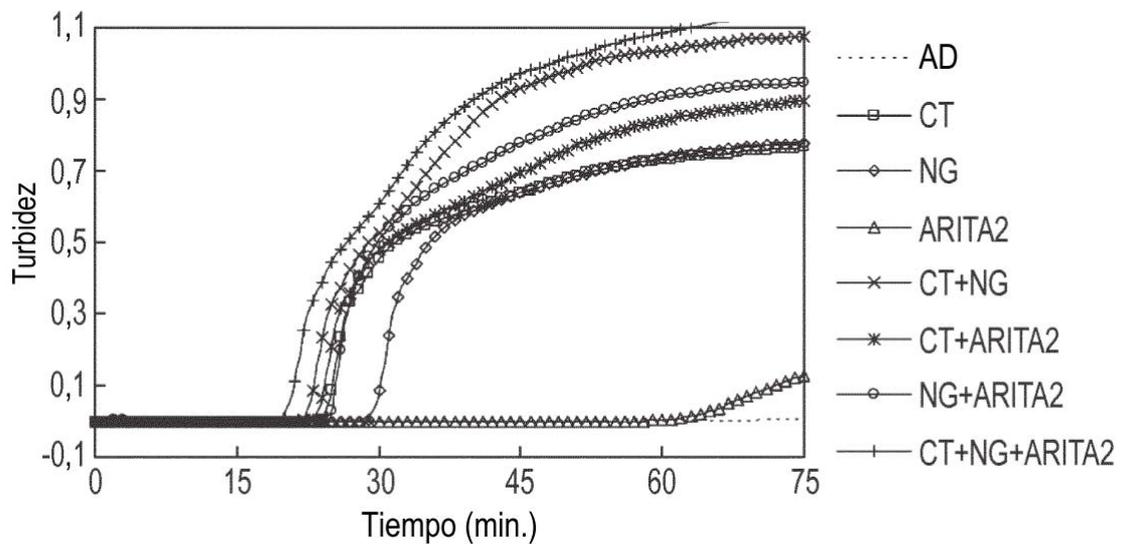


Fig. 8

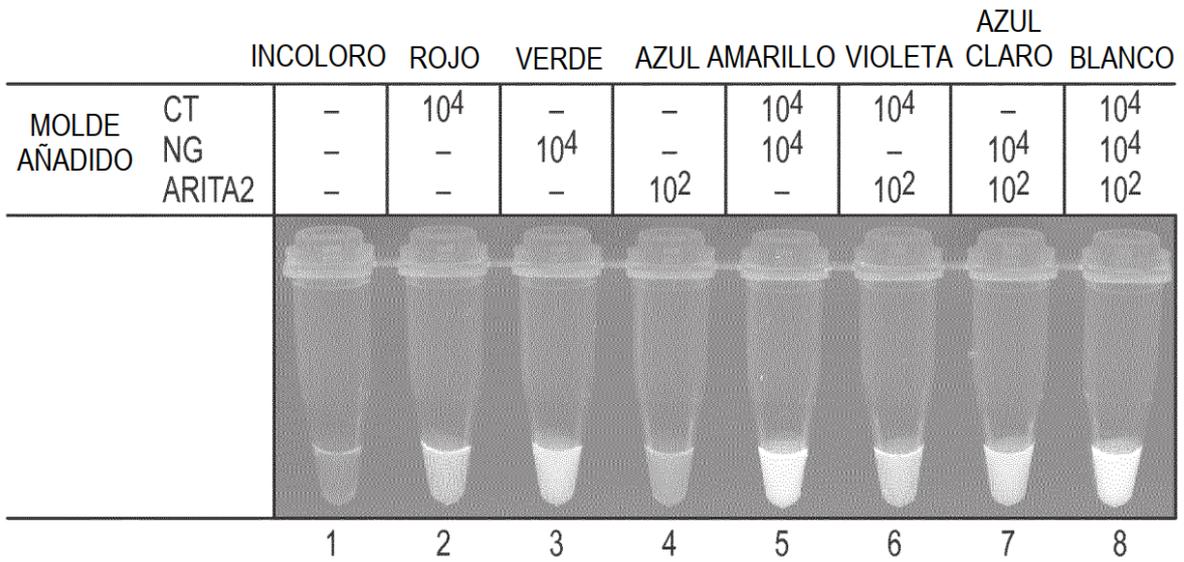


Fig. 9

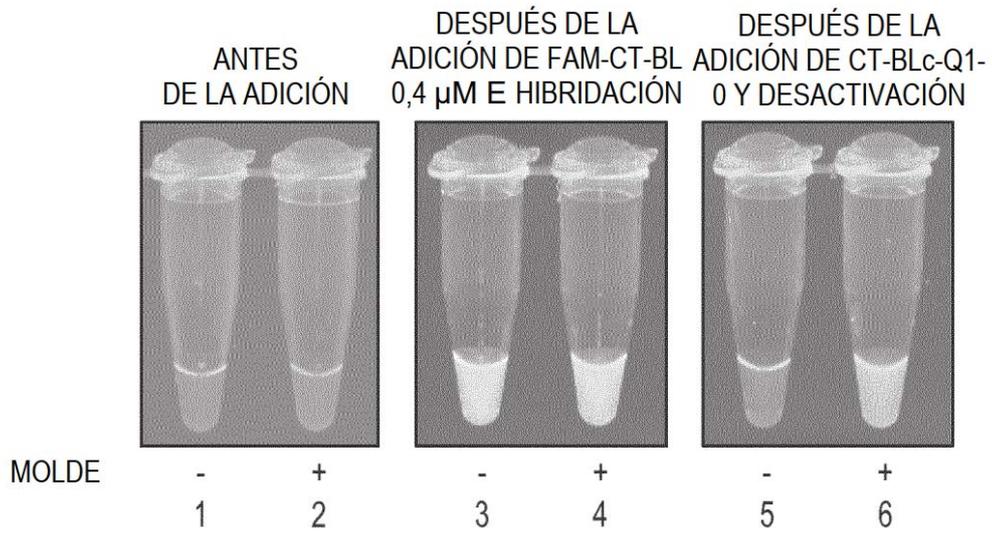


Fig. 10

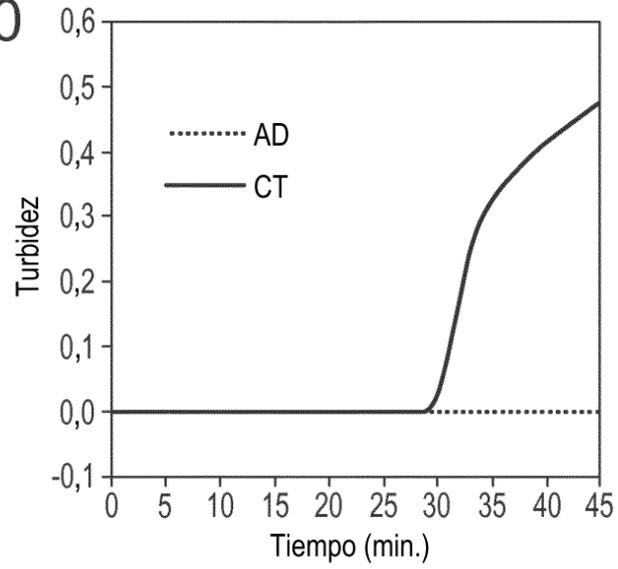


Fig. 11

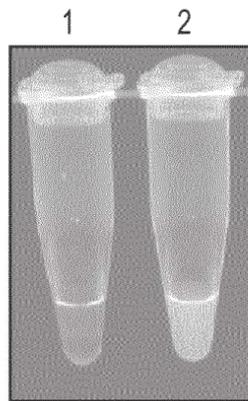


Fig. 12

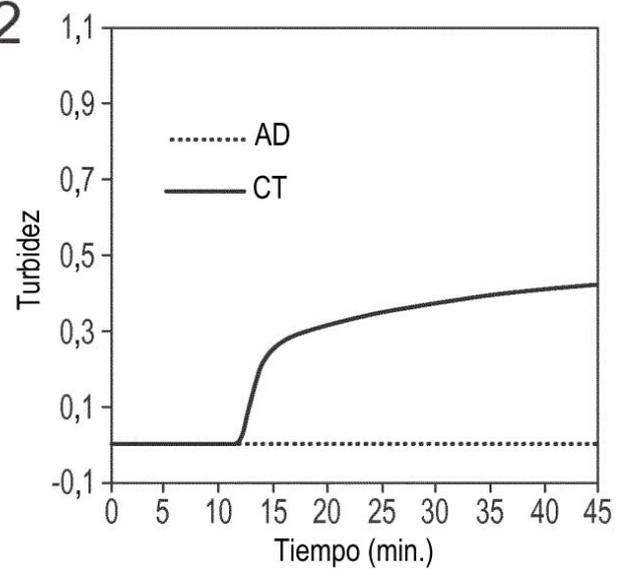


Fig. 13

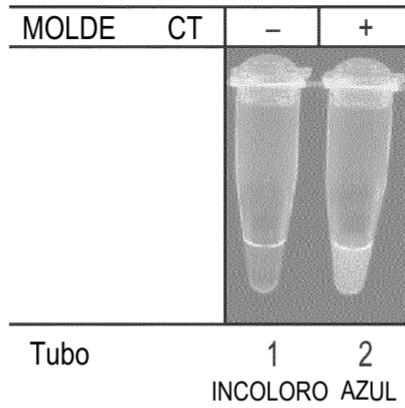


Fig. 14A

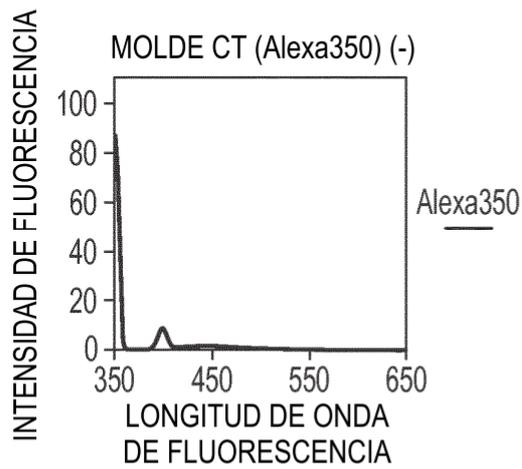


Fig. 14B

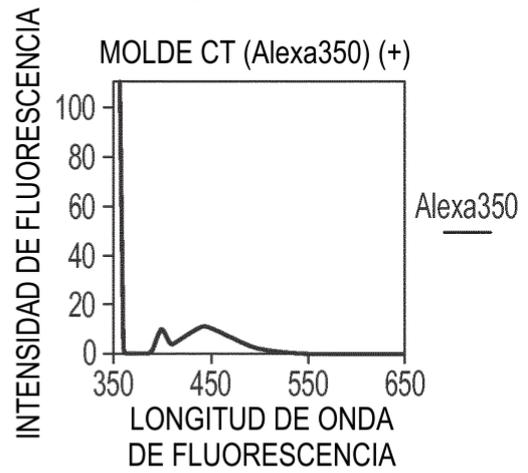


Fig. 15

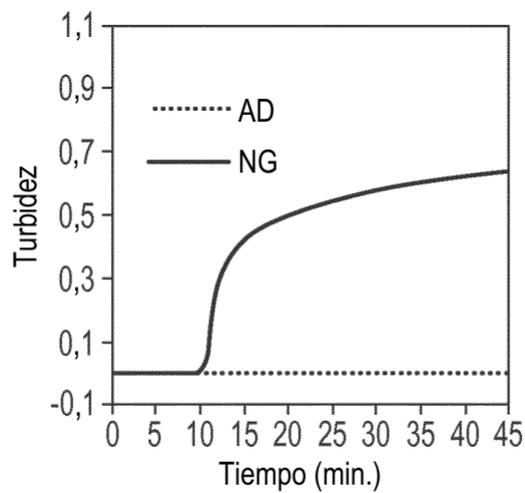


Fig. 16

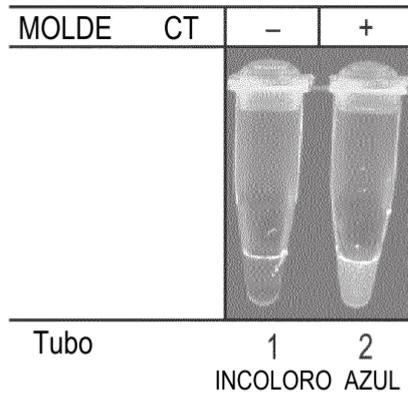


Fig. 17A

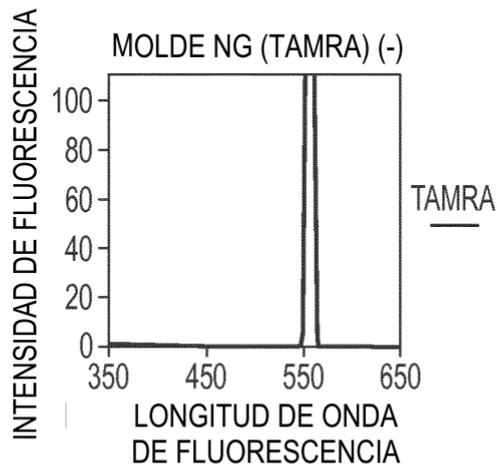


Fig. 17B

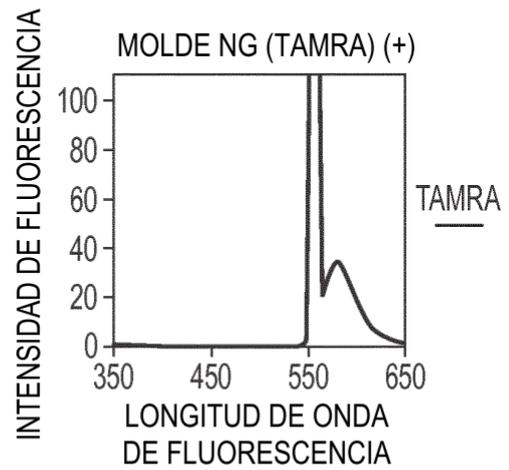


Fig. 18

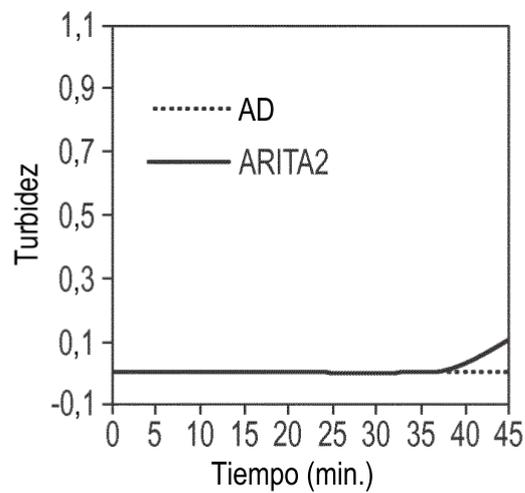


Fig. 19

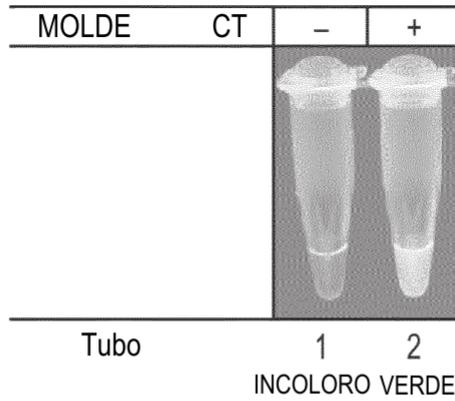


Fig. 20A

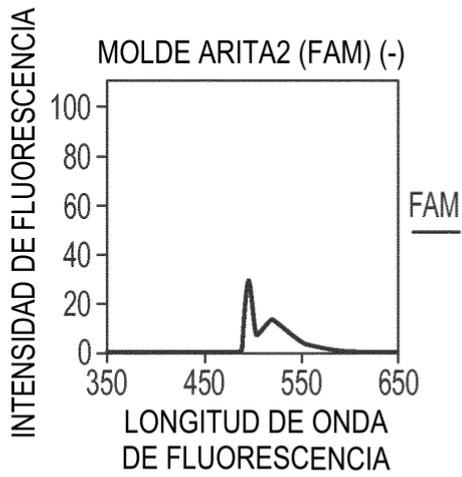


Fig. 20B

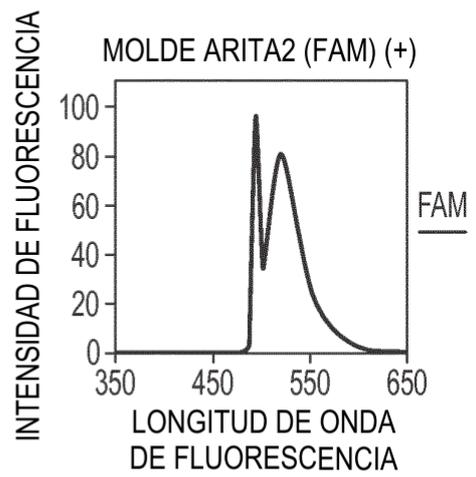


Fig. 21

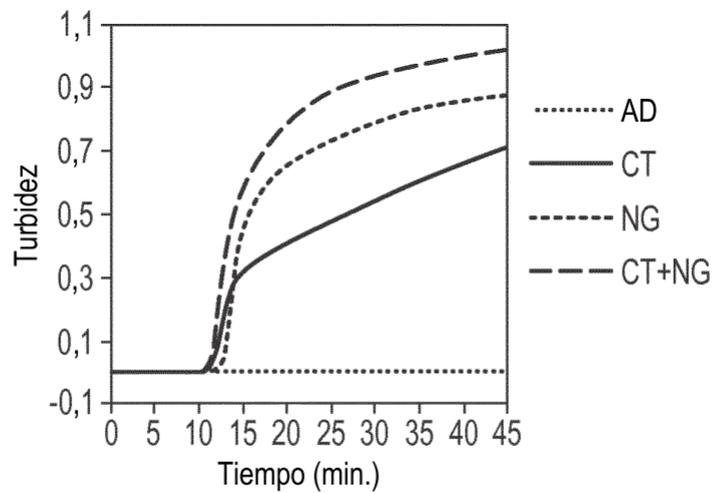


Fig. 22

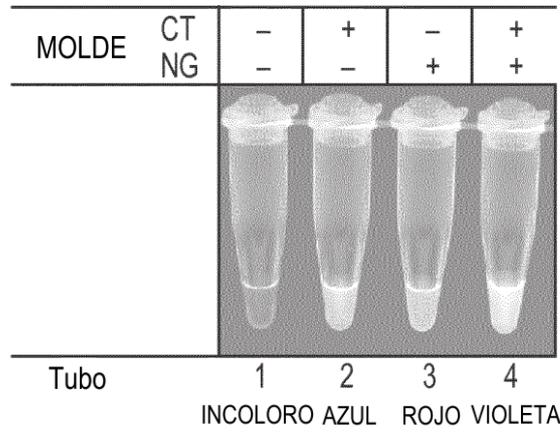


Fig. 23A

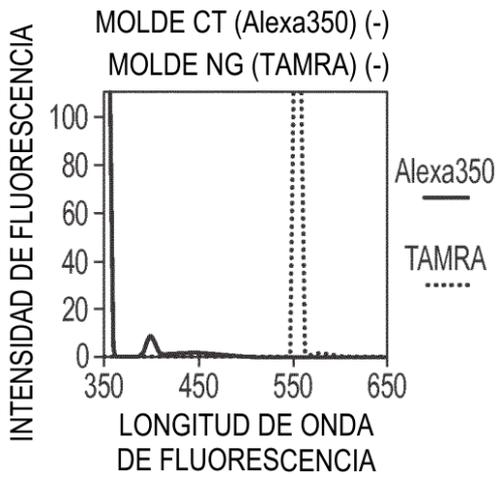


Fig. 23B

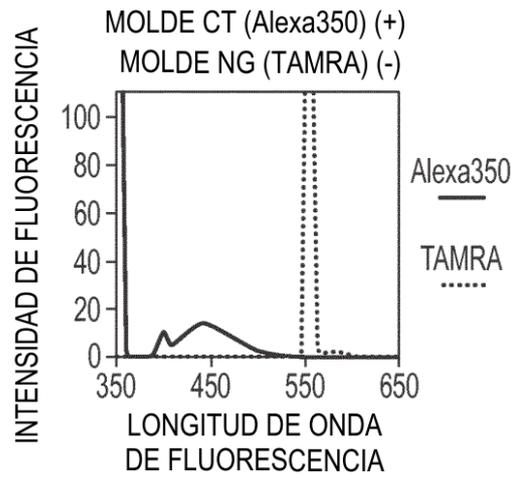


Fig. 23C

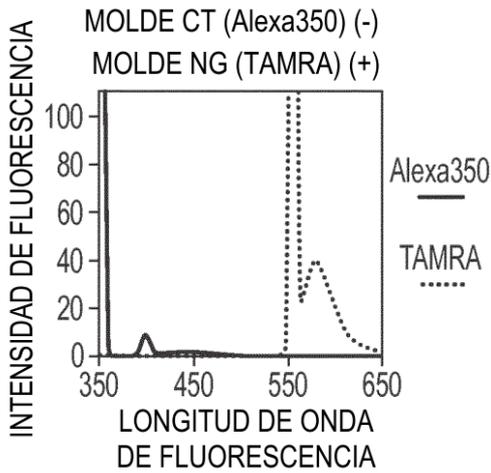


Fig. 23D

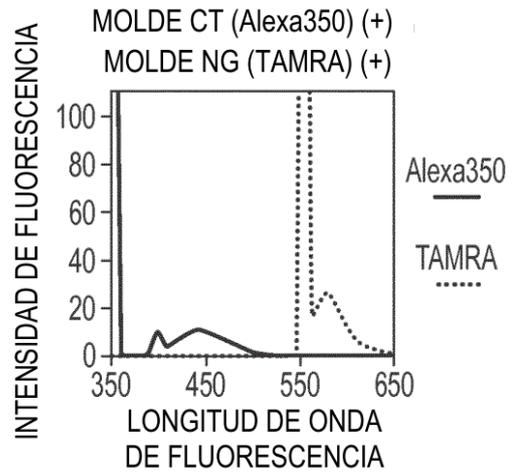


Fig. 24

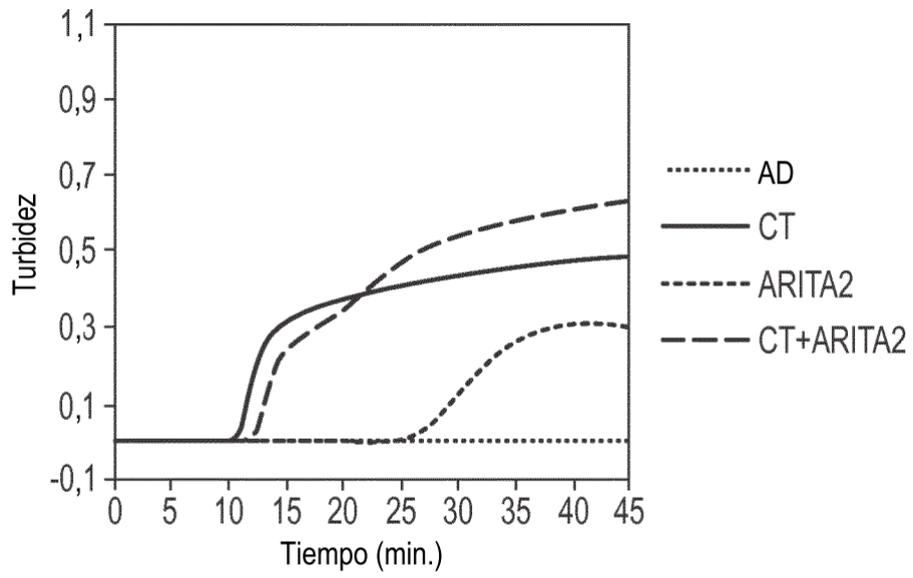


Fig. 25

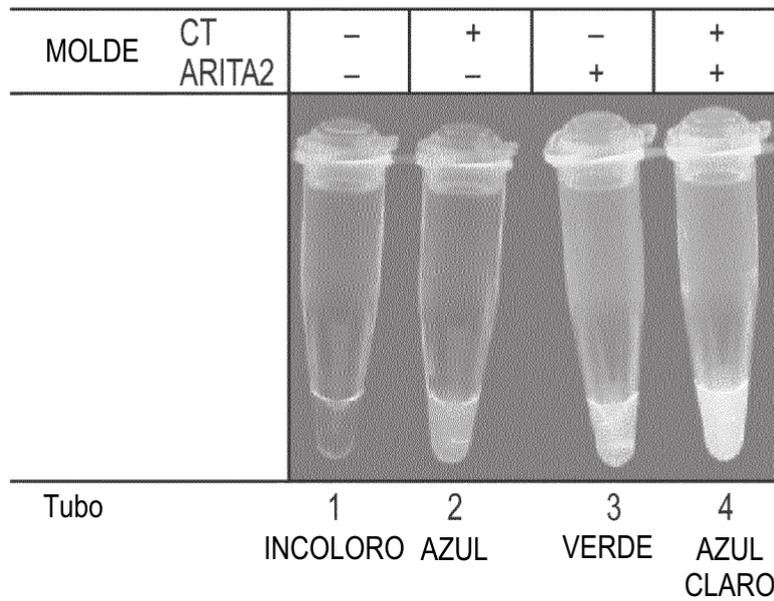


Fig. 26A

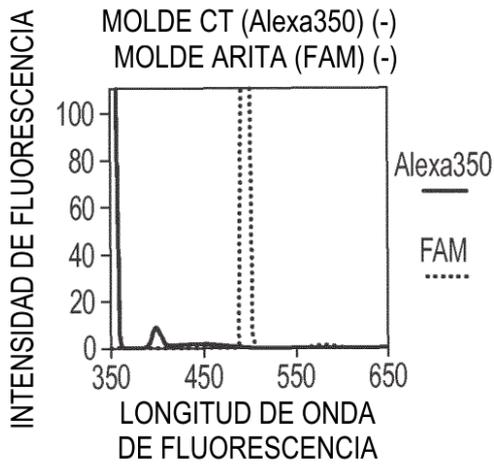


Fig. 26B

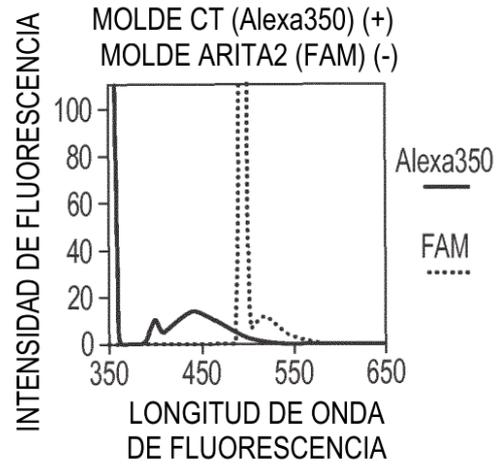


Fig. 26C

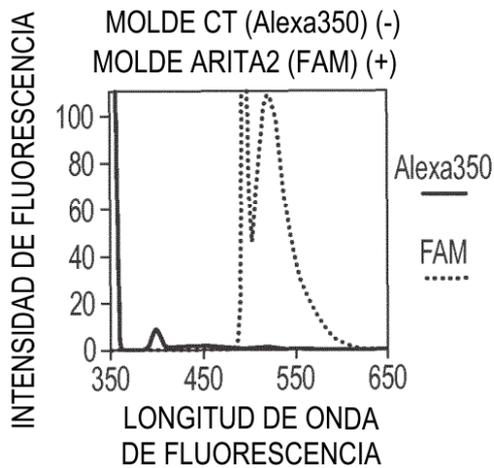


Fig. 26D

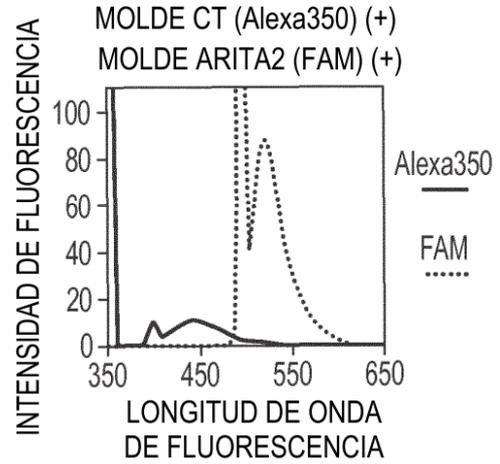


Fig. 27

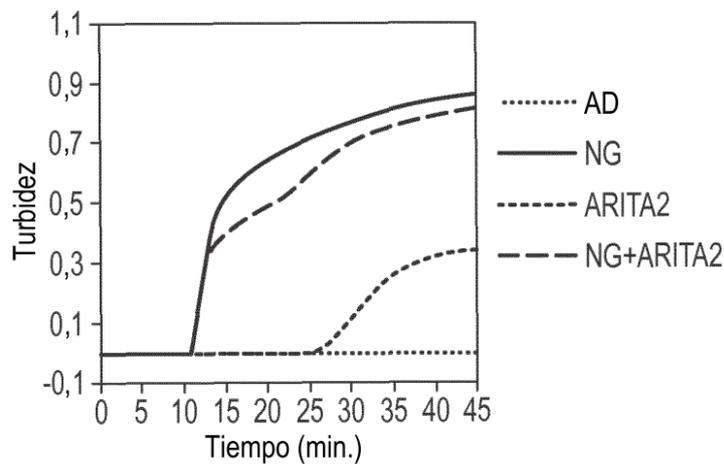


Fig. 28

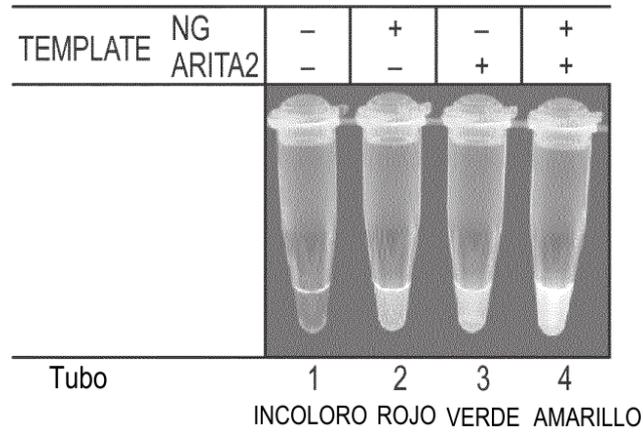


Fig. 29A

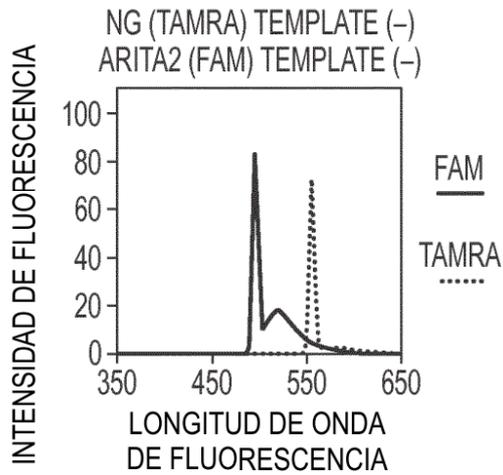


Fig. 29B

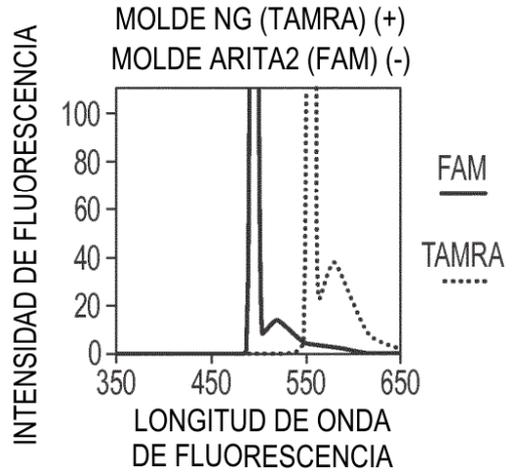


Fig. 29C

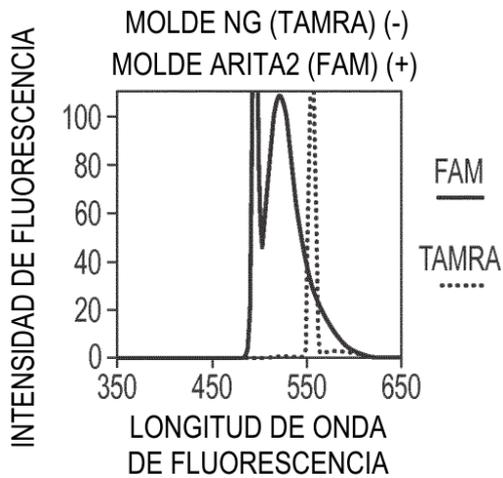


Fig. 29D

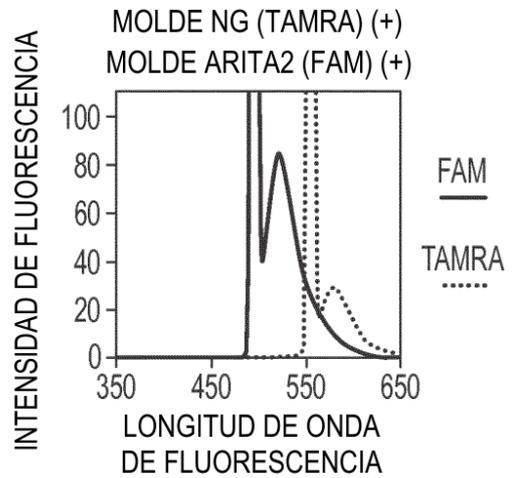


Fig. 30

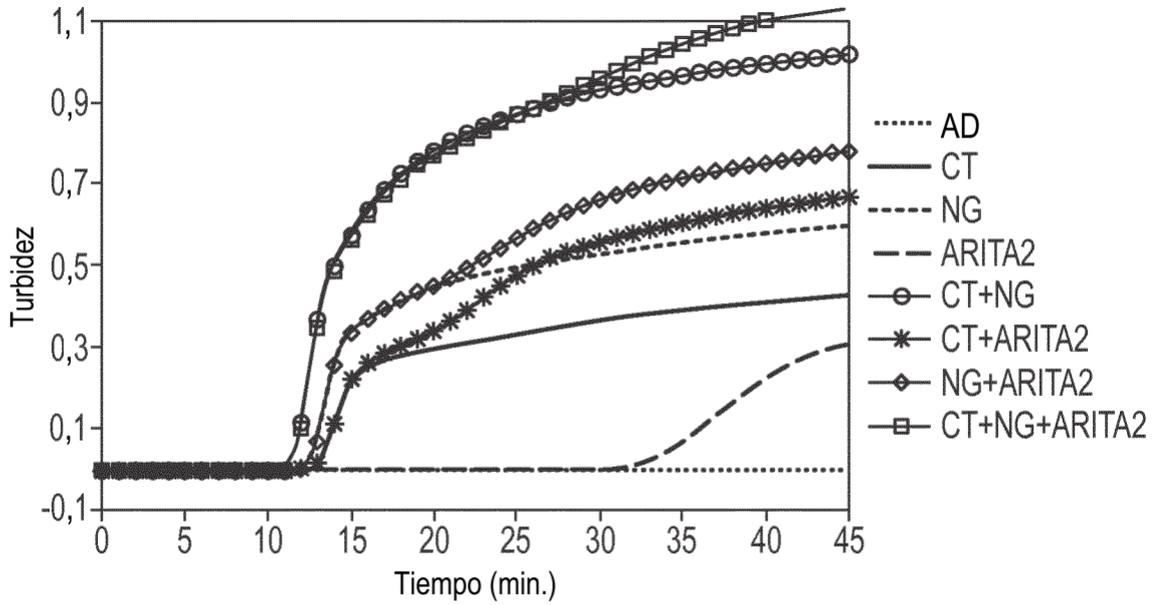


Fig. 31

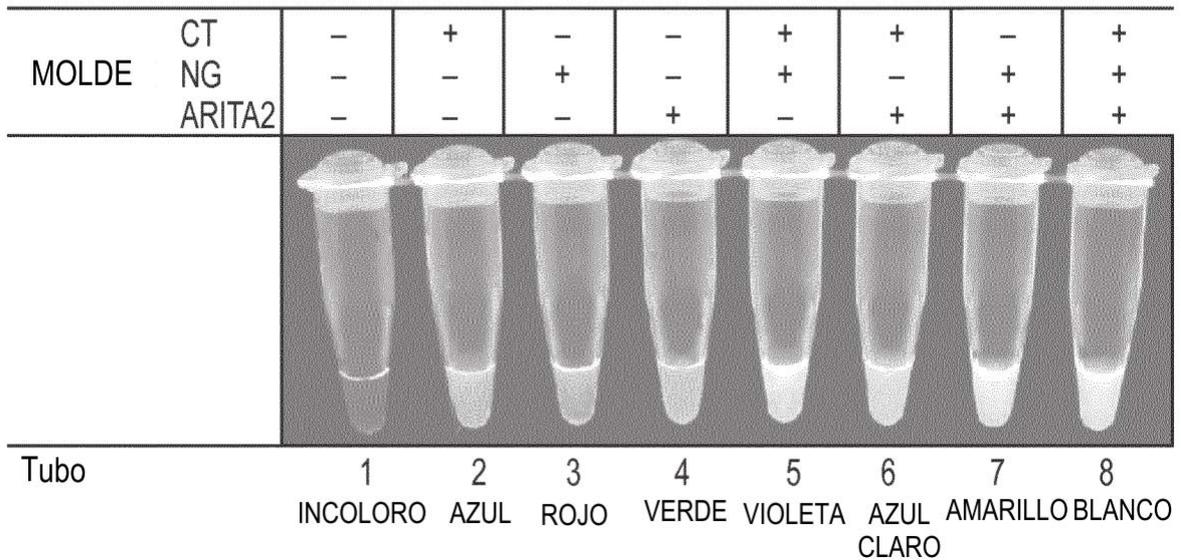


Fig. 32A

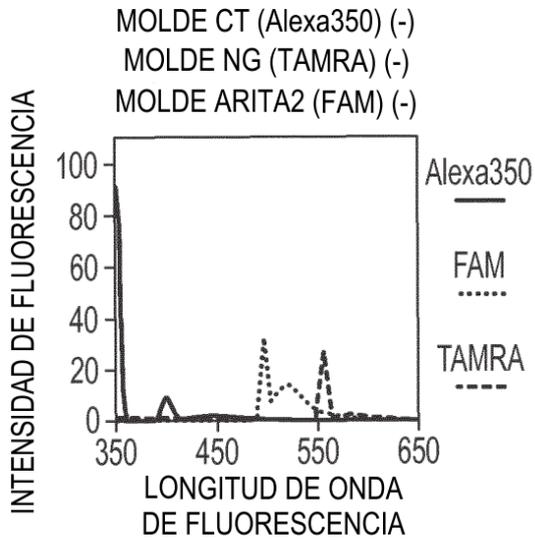


Fig. 32B

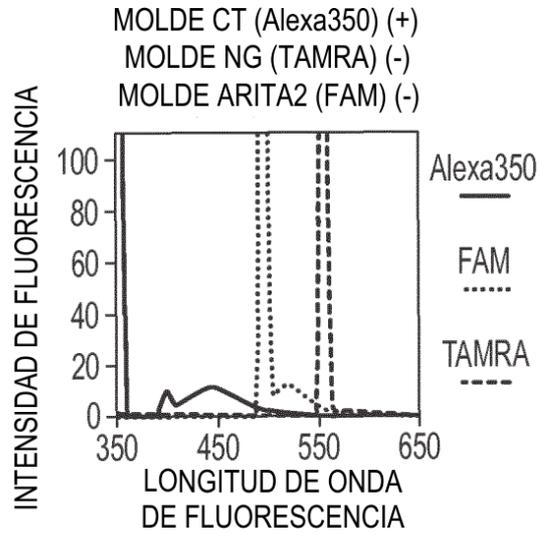


Fig. 32C

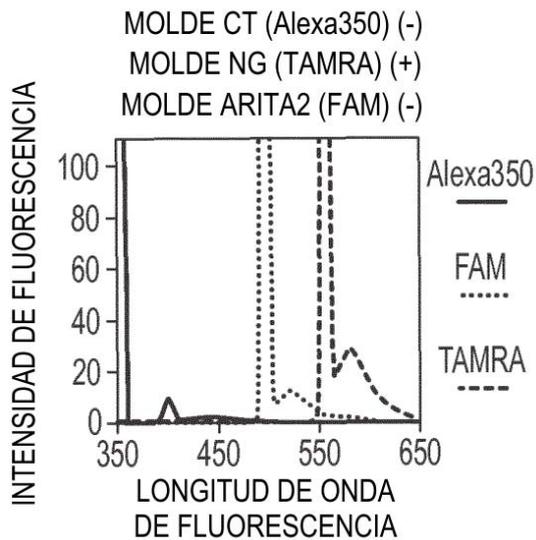


Fig. 32D

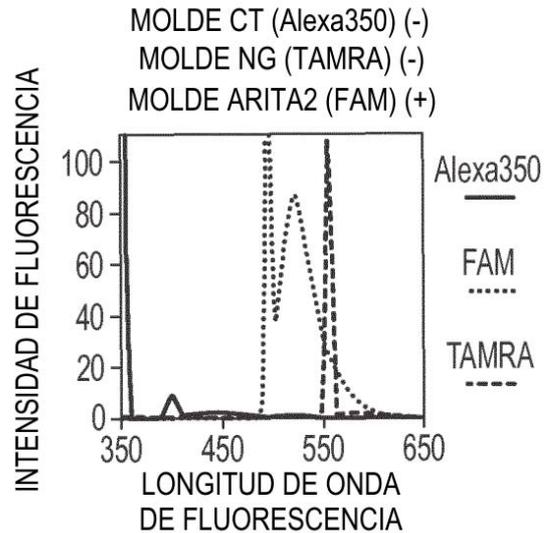


Fig. 32E

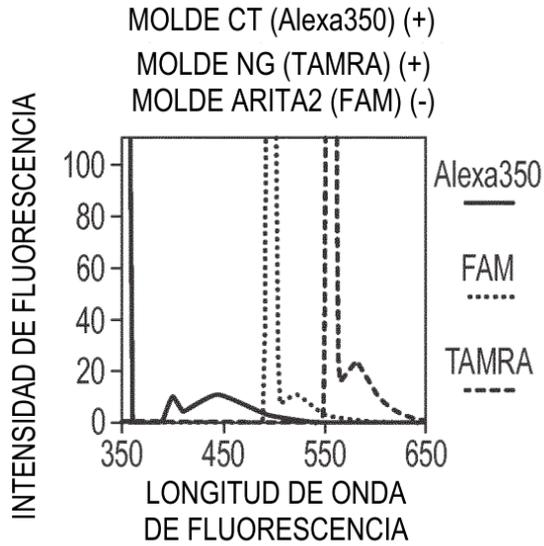


Fig. 32F

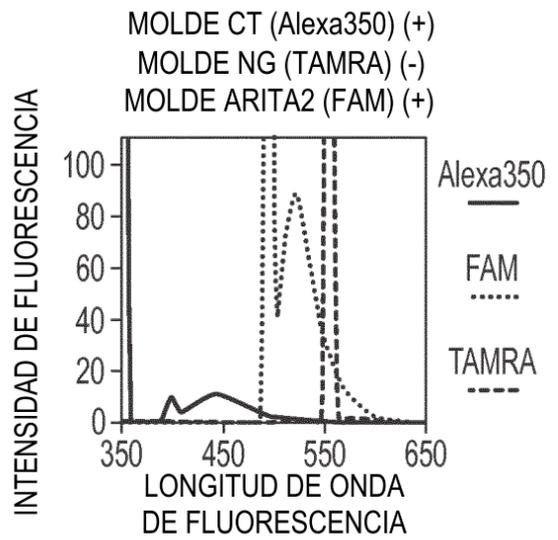


Fig. 32G

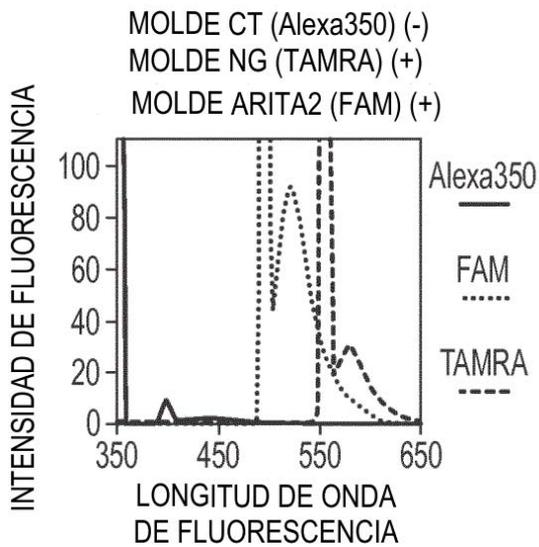


Fig. 32H

