

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 873**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6816 (2008.01)

C12Q 1/6848 (2008.01)

C12Q 1/6827 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.11.2014 PCT/EP2014/074111**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2015 WO15067790**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2014 E 14795827 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 3068897**

54 Título: **Detección de polimorfismo mononucleotídico usando cebador y sonda de fusión superpuestos**

30 Prioridad:
11.11.2013 US 201314076979

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.07.2020

73 Titular/es:
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:
JOHNSON, JENNY A.

74 Agente/Representante:
LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 773 873 T3

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

DESCRIPCIÓN

Detección de polimorfismo mononucleotídico usando cebador y sonda de fusión superpuestos

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo del diagnóstico basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y, más en particular, a procedimientos para amplificar y detectar variaciones de secuencia en ácidos nucleicos diana que tienen un polimorfismo mononucleotídico (SNP).

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La detección de SNP por PCR usando sondas de fusión marcadas con fluorescencia se ha descrito previamente (véanse, por ejemplo, Huang *et al.*, 2011, PLoS ONE 6(4) e19206 y Luo *et al.*, 2011, J. Clin. Microbiol., 49(9)3132-3138). La fusión tradicional funciona analizando la temperatura de fusión posterior a la PCR de una sonda marcada con fluorescencia con una diana en ausencia de un SNP y en presencia de un SNP. Una sonda de fusión bien diseñada proporciona una temperatura de fusión (T_f) que es la mayor en ausencia de un SNP, y cualquier cambio de pares de bases que se produce en la región de unión a la sonda provoca una variación (disminución) en la temperatura de fusión. La variación en la temperatura de fusión se puede usar para distinguir las dianas naturales (WT) y mutantes (MT).

15

20

25

30

35

El documento WO2012/095639 divulga un procedimiento y kit para determinar la presencia o ausencia de nucleótidos variantes en una región de diagnóstico de una secuencia de ácido nucleico diana usando un par de cebadores y una sonda oligonucleotídica de bloqueo que se hibrida al ácido nucleico diana. En el presente documento, tanto el primer cebador del par de cebadores como la sonda oligonucleotídica de bloqueo se hibridan a una región de diagnóstico en la secuencia de ácido nucleico diana, en la que la sonda se extiende ampliamente a lo largo del sitio de unión del primer cebador para cubrir los nucleótidos variantes y tiene una doble función actuando como un bloqueante o competidor y actuando como detector en el análisis de la curva de fusión. El documento WO2011/146403 divulga una única prueba para la cuantificación de ADN vírico de VHB y la detección de virus mutantes resistentes a fármacos para su uso en pacientes que se someten a un tratamiento prolongado usando análogos nucleotídicos/nucleosídicos que utiliza un enfoque de superposición parcial cebador-sonda de modo que la longitud eficaz de la sonda es solo de unos pocos nucleótidos. En el presente documento, un cebador se orienta en la misma dirección que la sonda y se superpone parcialmente con la sonda, en el que el cebador no cubre el sitio de mutación y en el que la sonda se extiende ampliamente más allá del extremo de la secuencia de cebador en varios nucleótidos.

40

45

Desafortunadamente, algunos SNP de interés se localizan en regiones génicas no conservadas donde la heterogeneidad en las secuencias cercanas provoca una variación no deseada en la temperatura de fusión de la sonda. Esto hace que sea difícil distinguir las secuencias WT con mutaciones sinónimas de los SNP pertinentes de interés. Los SNP asociados con resistencia a fármacos de los microorganismos son algunos ejemplos donde los SNP específicos que confieren resistencia a fármacos se localizan en regiones génicas que contienen mutaciones sinónimas WT cercanas. En dicho caso, cualquier mutación sinónima en la región de unión a la sonda cerca del SNP de interés también podría generar una variación en la temperatura de fusión de la sonda y proporcionar un resultado positivo falso. Por tanto, existe la necesidad de obtener una manera más exacta y eficaz de detectar solo el SNP de interés en un ácido nucleico diana. Los modos de realización de la presente invención pueden resolver los problemas existentes de heterogeneidad en las secuencias y posibilitar que una sonda de fusión bien diseñada detecte solo el SNP de interés sin interferencia de mutaciones sinónimas cercanas.

50

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. La descripción proporciona procedimientos y kits para la detección rápida de la presencia o ausencia de un SNP en un ácido nucleico diana en una muestra biológica o no biológica, por ejemplo, la detección de uno o más SNP por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real en un único tubo de ensayo.

55

60

65

En un modo de realización, se proporciona un procedimiento para detectar un SNP en un ácido nucleico diana en una muestra. El procedimiento para detectar un SNP incluye las etapas de realizar una etapa de amplificación que incluye poner en contacto la muestra con un cebador oligonucleotídico que tiene una primera secuencia de ácido nucleico natural para producir un producto de amplificación si cualquier ácido nucleico diana está presente en la muestra; realizar una etapa de hibridación que incluye poner en contacto el producto de amplificación con una sonda de fusión oligonucleotídica que tiene una segunda secuencia de ácido nucleico natural que tiene una temperatura de fusión predefinida, en el que la segunda secuencia de ácido nucleico natural de la sonda de fusión oligonucleotídica se superpone con la primera secuencia de ácido nucleico natural del cebador oligonucleotídico con una superposición mínima de al menos un 80 % a lo largo de la longitud de la primera secuencia de ácido nucleico natural; en el que la segunda secuencia de ácido nucleico natural de la sonda de fusión oligonucleotídica tiene la misma secuencia que la primera secuencia de ácido nucleico natural del cebador oligonucleotídico a lo largo de la

superposición; y en el que la segunda secuencia de ácido nucleico natural de la sonda de fusión oligonucleotídica se extiende a lo largo de la primera secuencia de ácido nucleico natural del cebador oligonucleotídico en un extremo en un nucleótido a lo largo de un área del ácido nucleico diana donde el SNP se localiza; y detectar la presencia o ausencia del SNP en el producto de amplificación, en el que una variación decreciente en la temperatura de fusión predefinida de la sonda de fusión oligonucleotídica es indicativa de la presencia del SNP en la muestra y en el que la ausencia de una variación decreciente en la temperatura de fusión predefinida de la sonda de fusión oligonucleotídica es indicativa de la ausencia del SNP en la muestra, en el que el ácido nucleico diana comprende una región no conservada con una o más mutaciones sinónimas localizadas donde el cebador se hibrida al ácido nucleico diana.

En otro modo de realización, se proporciona un procedimiento alternativo para detectar un SNP en un ácido nucleico diana en una muestra. El procedimiento alternativo para detectar un SNP incluye las etapas de realizar una etapa de amplificación que incluye poner en contacto la muestra con un cebador oligonucleotídico que tiene una secuencia de ácido nucleico natural para producir un producto de amplificación si cualquier ácido nucleico diana está presente en la muestra; realizar una etapa de hibridación que incluye poner en contacto el producto de amplificación con una sonda de fusión oligonucleotídica que tiene una secuencia de ácido nucleico específica de SNP que tiene una temperatura de fusión predefinida, en el que la secuencia de ácido nucleico específica de SNP de la sonda de fusión oligonucleotídica se superpone con la secuencia de ácido nucleico natural del cebador oligonucleotídico con una superposición mínima de al menos un 80 % a lo largo de la longitud de la secuencia de ácido nucleico natural; en el que la secuencia de ácido nucleico específica de SNP de la sonda de fusión oligonucleotídica tiene la misma secuencia que la secuencia de ácido nucleico natural del cebador oligonucleotídico a lo largo de la superposición; y en el que la secuencia de ácido nucleico específica de SNP de la sonda de fusión oligonucleotídica se extiende a lo largo de la secuencia de ácido nucleico natural del cebador oligonucleotídico en un extremo en un nucleótido a lo largo de un área del ácido nucleico diana donde el SNP se localiza; y detectar la presencia o ausencia del SNP en el producto de amplificación, en el que una variación decreciente en la temperatura de fusión predefinida de la sonda de fusión oligonucleotídica es indicativa de la ausencia del SNP en la muestra y en el que la ausencia de una variación decreciente en la temperatura de fusión predefinida de la sonda de fusión oligonucleotídica es indicativa de la presencia del SNP en la muestra, en el que el ácido nucleico diana comprende una región no conservada con una o más mutaciones sinónimas localizadas donde el cebador se hibrida al ácido nucleico diana.

También se divulga un conjunto de cebadores y sondas oligonucleotídicas para detectar un SNP en un ácido nucleico diana en una muestra. El conjunto de cebadores y sondas se puede incluir en un kit que se puede proporcionar para detectar el SNP. Por tanto, en otro modo de realización se proporciona un kit que comprende un cebador oligonucleotídico y un conjunto de sondas oligonucleotídicas para detectar un polimorfismo mononucleotídico (SNP) en un ácido nucleico diana en una muestra que incluye un cebador oligonucleotídico que tiene una primera secuencia de ácido nucleico natural para producir un producto de amplificación si cualquier ácido nucleico diana está presente en la muestra; y una sonda de fusión oligonucleotídica que tiene una segunda secuencia de ácido nucleico natural que tiene una temperatura de fusión predefinida, en el que la segunda secuencia de ácido nucleico natural de la sonda de fusión oligonucleotídica se superpone a la primera secuencia de ácido nucleico natural del cebador oligonucleotídico con una superposición mínima de al menos un 80 % a lo largo de la longitud de la primera secuencia de ácido nucleico natural; en el que la segunda secuencia de ácido nucleico natural de la sonda de fusión oligonucleotídica tiene la misma secuencia que la primera secuencia de ácido nucleico natural del cebador oligonucleotídico a lo largo de la superposición; y en el que la segunda secuencia de ácido nucleico natural de la sonda de fusión oligonucleotídica se extiende a lo largo de la primera secuencia de ácido nucleico natural del cebador oligonucleotídico en un extremo en un nucleótido a lo largo de un área del ácido nucleico diana donde el SNP se localiza; en el que se detecta la presencia o ausencia del SNP en el producto de amplificación, con lo que una variación decreciente en la temperatura de fusión predefinida de la sonda de fusión oligonucleotídica es indicativa de la presencia del SNP en la muestra y con lo que la ausencia de una variación decreciente en la temperatura de fusión predefinida de la sonda de fusión oligonucleotídica es indicativa de la ausencia del SNP en la muestra; y en el que el ácido nucleico diana comprende una región no conservada con una o más mutaciones sinónimas localizadas donde el cebador se hibrida al ácido nucleico diana. También se divulga un conjunto de cebadores y sondas oligonucleotídicas alternativo para detectar un SNP en un ácido nucleico diana en una muestra. El conjunto de cebadores y sondas oligonucleotídicas alternativo se puede incluir en un kit que se puede proporcionar para detectar el SNP. Por tanto, en otro modo de realización un kit que comprende un cebador oligonucleotídico y un conjunto de sondas oligonucleotídicas para detectar un polimorfismo mononucleotídico (SNP) en un ácido nucleico diana en una muestra puede incluir un cebador oligonucleotídico que tiene una secuencia de ácido nucleico natural para producir un producto de amplificación si cualquier ácido nucleico diana está presente en la muestra; y una sonda de fusión oligonucleotídica que tiene una secuencia de ácido nucleico específica de SNP que tiene una temperatura de fusión predefinida, en el que la secuencia de ácido nucleico específica de SNP de la sonda de fusión oligonucleotídica se superpone a la secuencia de ácido nucleico natural del cebador oligonucleotídico con una superposición mínima de al menos un 80 % a lo largo de la longitud de la secuencia de ácido nucleico natural; en el que la secuencia de ácido nucleico específica de SNP de la sonda de fusión oligonucleotídica tiene la misma secuencia que la secuencia de ácido nucleico natural del cebador oligonucleotídico a lo largo de la superposición; y en el que la secuencia de ácido nucleico específica de SNP de la sonda de fusión oligonucleotídica se extiende a lo largo de la secuencia de ácido nucleico natural del cebador oligonucleotídico en un extremo en un nucleótido a lo largo de un área del ácido nucleico diana donde el SNP se localiza; en el que se

detecta la presencia o ausencia del SNP en el producto de amplificación, con lo que una variación decreciente en la temperatura de fusión predefinida de la sonda de fusión oligonucleotídica es indicativa de la ausencia del SNP en la muestra y en el que la ausencia de una variación decreciente en la temperatura de fusión predefinida de la sonda de fusión oligonucleotídica es indicativa de la presencia del SNP en la muestra; y en el que el ácido nucleico diana comprende una región no conservada con una o más mutaciones sinónimas localizadas donde el cebador se hibrida al ácido nucleico diana. El kit también puede incluir nucleósidos trifosfato, ácido nucleico polimerasa y tampones necesarios para la función de la ácido nucleico polimerasa. El kit también puede incluir un prospecto del envase e instrucciones para usar los cebadores, sondas y restos fluorofóricos para detectar la presencia o ausencia del SNP en una muestra.

En algunos modos de realización, el procedimiento y el kit pueden incluir sondas ya marcadas con restos fluorescentes de donante y aceptador correspondientes, o pueden incluir restos fluoróforos para marcar las sondas. En determinados modos de realización, los oligonucleótidos (cebadores y/o sondas) tienen 40 nucleótidos o menos (por ejemplo, 30 nucleótidos o menos, 25 nucleótidos o menos, 20 nucleótidos o menos, etc.). En determinados modos de realización, los oligonucleótidos tienen entre 8 y 40 (por ejemplo, entre 8 y 30, entre 8 y 25, entre 8 y 20) nucleótidos de longitud. En determinados modos de realización, los oligonucleótidos tienen entre 12 y 40 (por ejemplo, entre 12 y 30, entre 12 y 25, entre 12 y 20) nucleótidos de longitud. En algunos modos de realización, los oligonucleótidos comprenden al menos un nucleótido modificado, por ejemplo, para alterar la estabilidad de hibridación del ácido nucleico con respecto a los nucleótidos no modificados. En algunos modos de realización, los oligonucleótidos comprenden al menos una variación modificada de forma conservativa. En algunos modos de realización, las sondas de fusión oligonucleotídicas pueden incluir una secuencia de ácido nucleico que permita la formación de estructuras secundarias. La sonda de fusión oligonucleotídica se puede marcar con un resto fluorescente en el extremo 5', y un resto de aceptador correspondiente en el extremo 3' para extinguir la fluorescencia de las sondas de fusión no unidas. La secuencia de ácido nucleico de las sondas de fusión oligonucleotídicas puede proporcionar una conformación enrollada aleatoriamente que posibilite la extinción de fluorescencia a menos que la sonda oligonucleotídica se hibride a su diana. Dicha formación de estructuras secundarias, en general, da como resultado una proximidad espacial entre los primer (por ejemplo, fluoróforo) y segundo (por ejemplo, extintor) restos fluorescentes. Por ejemplo, la sonda de fusión oligonucleotídica no hibridada se puede extinguir o solo ser débilmente fluorescente, aunque la sonda de fusión oligonucleotídica se puede volver más intensamente fluorescente cuando se hibrida con su diana. Después de la desnaturalización de su diana, la sonda de fusión oligonucleotídica puede regresar a su estado extinguido o débilmente fluorescente. En consecuencia, la intensidad de fluorescencia del complejo sonda de fusión-diana disminuye a medida que la temperatura se incrementa de manera dependiente de la diana, proporcionando un valor de temperatura de fusión diferente para cada diana derivado del pico de fusión. En algunos modos de realización, la secuencia de ácido nucleico de la sonda de fusión oligonucleotídica comprende una pluralidad de temperaturas de fusión predefinidas que dependen de las variaciones nucleotídicas de SNP que se distinguen entre las variaciones nucleotídicas de SNP. En algunos modos de realización, la etapa de amplificación se realiza en presencia de un segundo cebador oligonucleotídico.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o pruebas de la presente invención, los procedimientos y materiales adecuados se describen a continuación. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes. Los detalles de uno o más modos de realización de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción a continuación. Otros rasgos característicos, objetivos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de los dibujos y la descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIGURA 1 muestra una vista esquemática de un SNP ejemplar que se va a detectar entre una población WT diversa con el SNP que se localiza en regiones génicas no conservadas que tienen heterogeneidad en las secuencias cercanas.

La FIGURA 2 muestra una vista esquemática de un diseño de cebador y sonda ejemplar para la detección de un SNP, con una secuencia de cebador que "cebará" la PCR para iniciar un par de bases antes del SNP que se va a detectar, y una sonda de fusión superpuesta con la misma secuencia que el cebador y se extiende un par de bases más, cubriendo la localización del SNP.

La FIGURA 3 muestra una vista esquemática de una reacción PCR ejemplar que utiliza el diseño de cebador y sonda superpuestos para la detección de un SNP.

La FIGURA 4 muestra una vista esquemática de un análisis de la curva de fusión ejemplar de los productos de reacción PCR que utiliza el diseño de cebador y sonda superpuestos para la detección de un SNP.

La FIGURA 5 muestra un análisis de las curvas de fusión tradicional.

La FIGURA 6 muestra un análisis de la curva de fusión que utiliza el diseño de cebador y sonda superpuestos en un modo de realización en el que la sonda incluye la secuencia natural.

- 5 La FIGURA 7 muestra un análisis de la curva de fusión que utiliza el diseño de cebador y sonda superpuestos en un modo de realización en el que la sonda incluye la secuencia específica de SNP.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 10 La detección de uno o más SNP en un ácido nucleico diana en una muestra por amplificación del ácido nucleico proporciona un procedimiento de detección rápido y exacto para los SNP. En el presente documento se describe un ensayo en tiempo real para detectar un SNP en ácido nucleico diana en una muestra, así como conjuntos de cebadores y sondas oligonucleotídicos para detectar los SNP. La sensibilidad incrementada de la PCR en tiempo real para la detección de SNP en comparación con otros procedimientos, así como los rasgos característicos mejorados de la PCR en tiempo real que incluyen la contención de la muestra y la detección en tiempo real del producto amplificado, hacen factible la implementación de esta tecnología para el diagnóstico y la detección de SNP rutinarios en el laboratorio clínico.

- 20 Los modos de realización de la presente descripción permiten la detección de un SNP específico, por ejemplo, entre una población WT diversa (fig. 1). Los modos de realización incluyen procedimientos de detección de un SNP utilizando un diseño de cebador y sonda oligonucleotídicos superpuestos (también denominado cebador y sonda oligonucleotídicos apilados), en los que la secuencia de un cebador oligonucleotídico y una sonda de fusión oligonucleotídica se superponen entre sí para detectar el SNP de interés que se encuentra en una región génica no conservada y contiene mutaciones sinónimas cercanas. Se puede diseñar una secuencias de cebador (directa o inversa) que 'cebará' la PCR para iniciar uno o más pares de bases antes del SNP que se va a detectar, y se puede diseñar una sonda de fusión superpuesta con la misma secuencia que el cebador pero que se extiende uno o más pares de bases más que el cebador para extenderse y cubrir la localización del SNP del ácido nucleico diana (fig. 2). El cebador se puede diseñar para que sea lo suficientemente tolerante y sólido como para "cebar" la reacción PCR independientemente de la diversidad en las secuencias bajo la región del cebador en el ácido nucleico diana. El diseño de cebador apropiado puede incluir bases modificadas (estabilizantes) que mejoran la capacidad de unión del cebador en presencia de emparejamientos erróneos (diversidad en las secuencias). Esta manera, independientemente de la diversidad inicial del ácido nucleico diana en el área donde se hibrida el cebador, los productos de amplificación por PCR tendrán la misma secuencia de cebador incorporada en los amplicones generados (fig. 3). Las secuencias de cebador y sonda se pueden diseñar de modo que la sonda se superponga completamente al cebador, y la sonda se extienda en al menos una base a lo largo para cubrir el SNP de interés que se va a detectar en la diana o amplicón (por ejemplo, en algunos modos de realización, el extremo 3' de la sonda se extiende a lo largo del extremo 3' del cebador en al menos una base, mientras que en otros modos de realización, el extremo 5' de la sonda se extiende a lo largo del extremo 5' del cebador en al menos una base). De esta manera, cualquier otro SNP que no sea de interés y pueda estar presente cerca del SNP de interés en la diana se convertirá en sinónimo por extensión del cebador (amplicón) y no afectará a la temperatura de fusión de la sonda. De forma alternativa, las secuencias de cebador y sonda se pueden diseñar de modo que la secuencia de sonda no se superponga completamente a la secuencia de cebador, siempre que la porción de la secuencia de cebador que se superpone con la sonda cubra cualquier SNP que no sea de interés y esté presente cerca del SNP de interés que se va a detectar. Por ejemplo, una superposición mínima entre la secuencia de sonda y la secuencia de cebador puede ser de al menos un 70 % a al menos 90 %, en determinados modos de realización de al menos un 80 % o de al menos un 85 % o de al menos un 90 %. El análisis de fusión de los productos de PCR con el cebador y sonda oligonucleotídicos superpuestos permite detectar la presencia o ausencia del SNP en el producto de amplificación, en el que una variación decreciente en la temperatura de fusión predefinida de la sonda de fusión oligonucleotídica es indicativa de la presencia del SNP en la muestra (fig. 4).

- 50 Los procedimientos pueden incluir realizar al menos una etapa de ciclo que incluye amplificar una o más porciones de una molécula de ácido nucleico diana, por ejemplo, una diana génica que contiene el SNP de interés que se va a detectar, en una muestra usando uno o más cebadores o uno o más pares de cebadores. Los términos "cebador", "cebadores" y "pares de cebadores" como se usa en el presente documento se refieren a cebador(es) oligonucleotídico(s) que se hibridan específicamente a una región de la secuencia de ácido nucleico diana, e inician la síntesis a partir de la misma en condiciones apropiadas. Cada uno de los cebadores analizados se puede diseñar para que se hibride a un ácido nucleico diana y adyacente al SNP de interés que se vaya a detectar en la molécula de ácido nucleico diana, de modo que al menos una porción de cada producto de amplificación contenga la secuencia de ácido nucleico correspondiente a las respectivas dianas y SNP, si está presente. El cebador se puede diseñar para que se hibride adyacente al SNP de interés, por ejemplo, al lado, cerca, ligeramente en dirección 5' o ligeramente en dirección 3', por ejemplo, en uno, dos, tres o más nucleótidos. Por tanto, poner en contacto la muestra con un cebador que tiene una primera secuencia de ácido nucleico natural puede producir un producto de amplificación si cualquier ácido nucleico diana está presente en la muestra, si el SNP de interés está presente o no en la molécula de ácido nucleico diana. En el presente documento, "natural" en el término "secuencia de ácido nucleico natural" se determina con respecto a la secuencia del ácido nucleico diana que se va a analizar.

El procedimiento también puede incluir una etapa de hibridación que incluye poner en contacto el producto de amplificación con una sonda de fusión que tiene una segunda secuencia de ácido nucleico natural, en el que la secuencia de la segunda secuencia de ácido nucleico natural de la sonda de fusión se superpone a (es la misma que) la primera secuencia de ácido nucleico natural del cebador, y se extiende en un extremo en uno o más nucleótidos a lo largo de un área del ácido nucleico diana donde el SNP se localiza. En algunos modos de realización, la secuencia de ácido nucleico de la sonda se extiende en su extremo 3' en uno o más nucleótidos a lo largo de un área del ácido nucleico diana donde el SNP se localiza. En otros modos de realización, la secuencia de ácido nucleico de la sonda se extiende en su extremo 5' en uno o más nucleótidos a lo largo de un área del ácido nucleico diana donde el SNP se localiza. Dependiendo de un diseño elegido para un ensayo, la sonda de fusión puede comprender perfiles de una o más temperaturas de fusión predefinidas, incluyendo, por ejemplo, una primera temperatura predefinida a la que se funde, o no se hibrida, la sonda de fusión a partir de una diana de ácido nucleico natural perfectamente emparejada. Por tanto, una observación de una variación decreciente en la temperatura de fusión predefinida de la sonda de fusión puede indicar un emparejamiento erróneo en la secuencia de la sonda de fusión natural y la diana de ácido nucleico, es decir, la presencia de un SNP en el ácido nucleico diana en la muestra. Esto es porque un emparejamiento erróneo en la secuencia de sonda de fusión natural y la presencia del SNP en la diana da como resultado una menor temperatura de fusión de la sonda de fusión en comparación con una secuencia de sonda de fusión y de diana natural sin el SNP completamente emparejadas. Los perfiles de temperaturas de fusión de la sonda de fusión también pueden incluir, por ejemplo, una segunda temperatura de fusión predefinida a la que se funde la sonda de fusión que tiene una secuencia natural a partir de un SNP conocido en una diana de ácido nucleico, de modo que cuando se observa la segunda temperatura de fusión predefinida, no solo se determina la presencia de un SNP, sino que también se puede distinguir la identidad del SNP de las diversas posibilidades de los SNP para la diana de ácido nucleico. De esta manera, para una diana particular, se puede predefinir o estandarizar una pluralidad de temperaturas de fusión predefinidas que dependen de la identidad de diversas variaciones nucleotídicas de SNP posibles, que se distinguen entre las variaciones nucleotídicas de SNP (véase, por ejemplo, la fig. 6). La temperatura de fusión se puede establecer por experimentación para cada cambio de pares de bases (dA, dT, dC o dG) particular en una única localización bajo la región de la sonda.

De forma alternativa, la sonda de fusión puede comprender una secuencia específica de SNP para que se vaya a detectar un SNP conocido. En dicho caso, los perfiles de una temperatura de fusión predefinida pueden incluir una primera temperatura predefinida a la que se funde la sonda de fusión específica de SNP a partir de una diana de ácido nucleico que contiene SNP perfectamente emparejada, y, por tanto, una observación de la temperatura de fusión predefinida puede indicar la presencia del SNP específico en la secuencia de ácido nucleico diana porque una sonda de fusión específica de SNP perfectamente emparejada con la secuencia de ácido nucleico diana que contiene SNP no dará como resultado una variación decreciente en la temperatura de fusión. Además, en dicho caso, una variación decreciente en la temperatura de fusión predefinida de la sonda de fusión específica de SNP puede indicar un emparejamiento erróneo en la secuencia de sonda de fusión específica de SNP y la diana de ácido nucleico, por ejemplo, la ausencia de SNP y la presencia del ácido nucleico natural, o la presencia de un SNP diferente, en la muestra. Si se sabe que una molécula de ácido nucleico diana tiene una pluralidad de SNP que son de interés para la detección, se puede diseñar una pluralidad de sondas de fusión como se explica anteriormente, teniendo cada una una secuencia natural o una secuencia específica de SNP para la detección y caracterización de los múltiples SNP de interés.

La presencia del producto de amplificación es indicativa de la presencia del ácido nucleico diana en la muestra. La presencia o ausencia de una variación decreciente en la temperatura de fusión predefinida de la sonda de fusión es indicativa de la presencia o ausencia del SNP en la diana de ácido nucleico diana en la muestra. Dependiendo de si el ácido nucleico diana contiene o no el SNP de interés que se va a detectar, el producto de amplificación producido de acuerdo con los presentes procedimientos contendrá la secuencia de ácido nucleico diana que es complementaria a las sondas de fusión detectables que se pueden diseñar para que contengan la secuencia natural o bien la secuencia específica de SNP dependiendo del diseño del ensayo como se describe anteriormente. Cada etapa de ciclo incluye una etapa de amplificación, una etapa de hibridación y una etapa de detección, en las que la muestra se pone en contacto con la una o más sondas de fusión detectables para la detección de la presencia o ausencia del SNP de interés en la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra.

Los modos de realización de los procedimientos de detección de SNP pueden detectar y discriminar entre el ácido nucleico diana natural y el ácido nucleico diana que contiene SNP en un único tubo de PCR. Los procedimientos descritos aquí se pueden diseñar para que detecten simultáneamente las secuencias de ácido nucleico diana tanto natural como el que contiene SNP, y discriminarlas en una única reacción PCR.

Como se usa en el presente documento, el término "amplificar" se refiere al procedimiento de sintetizar moléculas de ácido nucleico que son complementarias a una o ambas cadenas de una molécula de ácido nucleico molde (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico diana para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) o virus de la hepatitis C (VHC)). Amplificar una molécula de ácido nucleico típicamente incluye desnaturar el ácido nucleico molde, hibridar cebadores al ácido nucleico molde a una temperatura que esté por debajo de las temperaturas de fusión de los cebadores y alargar enzimáticamente a partir de los cebadores para generar un producto de amplificación. La amplificación típicamente requiere la presencia de desoxirribonucleósidos trifosfato, una enzima ADN polimerasa (por ejemplo, Taq Platinum®) y un tampón apropiado y/o cofactores para la

actividad óptima de la enzima polimerasa (por ejemplo, MgCl₂ y/o KCl).

El término "cebador" se usa en el presente documento como se conoce por los expertos en la técnica y se refiere a compuestos oligoméricos, principalmente a oligonucleótidos, pero también a oligonucleótidos modificados que pueden "cebar" la síntesis de ADN por una ADN polimerasa dependiente de molde, es decir, el extremo 3', por ejemplo, del oligonucleótido proporciona un grupo 3'-OH libre al que se pueden unir "nucleótidos" adicionales por una ADN polimerasa dependiente de molde que establece un enlace fosfodiéster 3' a 5', con lo que se usan desoxinucleósidos trifosfato, y con lo que se libera pirofosfato. En general, los cebadores se diseñan en base a en secuencias molde conocidas. Un cebador ceba la cadena sentido, y el otro ceba la cadena complementaria del ADN o ADNc diana. La PCR se puede realizar en un ADN o ARN diana uniforme (es decir, dianas con la misma secuencia) o en ADN o ARN dianas mixtos (es decir, dianas con diferentes intrones flanqueados por secuencias conservadas). Para ADN/ARN mixtos (por ejemplo, que contienen heterogeneidad en las secuencias) incluso los cebadores emparejados erróneamente pueden funcionar en la reacción PCR si las secuencias de las dianas tienen suficiente complementariedad con los cebadores emparejados erróneamente (es decir, cebadores tolerantes).

El término "hibridación" se refiere a la hibridación de una o más sondas a un producto de amplificación. Las condiciones de hibridación típicamente incluyen una temperatura que está por debajo de la temperatura de fusión de las sondas, pero que evita la hibridación no específica de las sondas.

El término "polimerasa termoestable" se refiere a una enzima polimerasa que es estable frente al calor, es decir, la enzima cataliza la formación de productos de extensión del cebador complementarios a un molde y no se desnaturaliza de forma irreversible cuando se somete a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de ácidos nucleicos molde bicatenarios. En general, la síntesis se inicia en el extremo 3' de cada cebador y continúa en la dirección de 5' a 3' a lo largo de la cadena molde. Las polimerasas termoestables se han aislado de *Thermus flavus*, *T. ruber*, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Bacillus stearothermophilus* y *Methanothermus fervidus*. No obstante, también se pueden emplear polimerasas que no son termoestables en ensayos de PCR siempre que se reponga la enzima.

El término "complemento del mismo" se refiere a un ácido nucleico que al mismo tiempo tiene la misma longitud que, y es exactamente complementario a, un ácido nucleico dado.

El término "extensión" o "alargamiento" cuando se usa con respecto a ácidos nucleicos, se refiere a cuando se incorporan nucleótidos adicionales (u otras moléculas análogas) en los ácidos nucleicos. Por ejemplo, un ácido nucleico se extiende opcionalmente por un biocatalizador que incorpora nucleótidos, tal como una polimerasa que típicamente añade nucleótidos en el extremo terminal 3' de un ácido nucleico.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, por ejemplo, como se mide usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias disponibles para los expertos o por inspección visual. Los algoritmos ejemplares que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud entre secuencias son los programas BLAST, que se describen, por ejemplo, en Altschul *et al.* (1990) "Basic local alignment search tool" *J. Mol. Biol.* 215:403-410, Gish *et al.* (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search" *Nature Genet.* 3:266-272, Madden *et al.* (1996) "Applications of network BLAST server" *Meth. Enzymol.* 266:131-141, Altschul *et al.* (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs" *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 y Zhang *et al.* (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation" *Genome Res.* 7:649-656.

Un "nucleótido modificado" en el contexto de un oligonucleótido se refiere a una alteración en la que al menos un nucleótido de la secuencia de oligonucleótidos se reemplaza por un nucleótido diferente que proporciona una propiedad deseada al oligonucleótido. Los nucleótidos modificados ejemplares que se pueden sustituir en los oligonucleótidos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, una C5-metil-dC, una C5-etil-dC, una C5-metil-dU, una C5-etil-dU, una 2,6-diaminopurina, una C5-propinil-dC, una C5-propinil-dU, una C7-propinil-dA, una C7-propinil-dG, una C5-propargilamino-dC, una C5-propargilamino-dU, una C7-propargilamino-dA, una C7-propargilamino-dG, una 7-desaza-2-desoxixantósina, un análogo de pirazolopirimidina, una pseudo-dU, un nitropirrol, un nitroindol, 2'-O-metil-ribo-U, 2'-O-metil-ribo-C, una N4-etil-dC, una N6-metil-dA y similares. En el presente documento se hace referencia a muchos otros nucleótidos modificados que se pueden sustituir en los oligonucleótidos de la invención o de otro modo son conocidos en la técnica. En determinados modos de realización, las sustituciones de nucleótidos modificados modifican las temperaturas de fusión (T_f) de los oligonucleótidos con respecto a las temperaturas de fusión de los oligonucleótidos no modificados correspondientes. Para ilustrar adicionalmente, determinadas sustituciones de nucleótidos modificados pueden reducir la amplificación del ácido nucleico no específica (por ejemplo, minimizar la formación de dímeros de cebador o similar), incrementar el rendimiento de un amplicón diana pretendido, y/o similar, en algunos modos de realización de la invención. Los ejemplos de estos tipos de modificaciones en ácidos nucleicos se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.001.611.

Ácidos nucleicos diana y oligonucleótidos

La presente descripción proporciona procedimientos para detectar un SNP en un ácido nucleico diana amplificando, por ejemplo, una porción de las secuencias de ácido nucleico diana, que puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico diana que se sabe o se sospecha que comprende uno o más SNP, por ejemplo, secuencias de ácido nucleico diana, por ejemplo, de VIH, VHC o MTB que es resistente a rifampicina.

Para la detección de SNP en la secuencia de ácido nucleico diana, se pueden preparar cebadores y sondas para amplificar las secuencias de ácido nucleico diana. Además, se pueden evaluar variantes funcionales en cuanto a la especificidad y/o sensibilidad por los expertos en la técnica usando procedimientos rutinarios. Las variantes funcionales representativas pueden incluir, por ejemplo, una o más deleciones, inserciones y/o sustituciones en los cebadores y/o sondas divulgados en el presente documento. Por ejemplo, se puede proporcionar una variante sustancialmente idéntica de los cebadores o sondas en la que la variante tenga al menos, por ejemplo, un 80 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con uno de los cebadores y sondas originales, o un complemento de los mismos. Se puede identificar una variante funcionalmente activa de cualquiera del cebador y/o sonda que proporcione una especificidad y sensibilidad similar o mayor en el procedimiento o kit descrito actualmente en comparación con las respectivas secuencias originales.

Como se detalla anteriormente, un cebador (y/o sonda) se puede modificar químicamente, es decir, un cebador y/o sonda pueden comprender un nucleótido modificado o un compuesto no nucleotídico. Una sonda (o un cebador) es, entonces, un oligonucleótido modificado. Los "nucleótidos modificados" (o "análogos nucleotídicos") difieren de un "nucleótido" natural en alguna modificación, pero todavía consisten en una base o compuesto similar a base, un azúcar pentofuranosilo o un compuesto similar a azúcar pentofuranosilo, una porción fosfato o porción similar a fosfato o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un "marcador" se puede unir a la porción de base de un "nucleótido", con lo que se obtiene un "nucleótido modificado". Una base natural en un "nucleótido" también se puede reemplazar por, por ejemplo, una 7-desazapurina, con lo que también se obtiene un "nucleótido modificado". Los términos "nucleótido modificado" o "análogo nucleotídico" se usan de manera intercambiable en la presente solicitud. Un "nucleósido modificado" (o "análogo nucleosídico") difiere de un nucleósido natural en alguna modificación de la manera como se explica anteriormente para un "nucleótido modificado" (o un "análogo nucleotídico").

Se pueden diseñar oligonucleótidos, incluyendo oligonucleótidos modificados y análogos oligonucleotídicos, que amplifican las secuencias de ácido nucleico diana usando, por ejemplo, un programa informático, tal como OLIGO (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, Colo.). Los rasgos característicos importantes cuando se diseñan oligonucleótidos que se van a usar como cebadores de amplificación incluyen, pero no se limitan a, un producto de amplificación de tamaño apropiado para facilitar la detección (por ejemplo, por electroforesis), temperaturas de fusión similares para los miembros de un par de cebadores, y la longitud de cada cebador (es decir, los cebadores necesitan ser lo suficientemente largos para hibridarse con especificidad de secuencia y para iniciar la síntesis, pero no tan largos como para que se reduzca la fidelidad durante la síntesis oligonucleotídica). Típicamente, los cebadores oligonucleotídicos tienen de 8 a 50 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 o 50 nucleótidos de longitud). En algunos modos de realización, los cebadores tienen 40 nucleótidos o menos y/o tienen entre 8 y 40 nucleótidos de longitud. En otros modos de realización, los cebadores tienen 30 nucleótidos o menos y/o tienen entre 8 y 30 nucleótidos de longitud. En otros modos de realización, los cebadores tienen 25 nucleótidos o menos y/o tienen entre 8 y 25 nucleótidos de longitud. En determinados modos de realización, los cebadores oligonucleotídicos tienen entre 12 y 40 (por ejemplo, entre 12 y 30, entre 12 y 25) nucleótidos de longitud.

Además de un conjunto de cebadores, los presentes procedimientos pueden usar una o más sondas para detectar la presencia o ausencia de SNP en una secuencia de ácido nucleico diana. El término "sonda" se refiere a ácidos nucleicos (ADN o ARN) producidos de forma sintética o biológica, que, por diseño o selección, contienen secuencias de nucleótidos específicas que les permiten hibridarse bajo restricciones predeterminadas definidas específicamente (es decir, preferentemente) a "ácidos nucleicos diana". Una "sonda" se puede denominar "sonda de detección", lo que significa que detecta el ácido nucleico diana. En algunos modos de realización de la presente descripción, las sondas descritas se pueden marcar con al menos un marcador fluorescente. En un modo de realización, las sondas se pueden marcar con un resto fluorescente de donante, por ejemplo, un tinte fluorescente, y un resto fluorescente de aceptador correspondiente, por ejemplo, un extintor.

El diseño de los oligonucleótidos que se van a usar como sondas de hibridación se puede realizar de manera similar al diseño de los cebadores. Los modos de realización de la presente descripción pueden usar una única sonda o un par de sondas para la detección del producto de amplificación. Dependiendo del modo de realización, el uso de la(s) sonda(s) puede comprender al menos un marcador y/o al menos un resto de extintor. Como sucede con los cebadores, las sondas normalmente tienen temperaturas de fusión similares, y la longitud de cada sonda debe ser suficiente para que se produzca la hibridación específica de secuencia, pero no tan larga como para que se reduzca la fidelidad durante la síntesis. Típicamente, las sondas oligonucleotídicas tienen de 8 a 50 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 o 50 nucleótidos de longitud). En algunos modos de realización, las sondas tienen 40 nucleótidos o menos y/o tienen entre 8 y 40

nucleótidos de longitud. En otros modos de realización, las sondas tienen 30 nucleótidos o menos y/o tienen entre 8 y 30 nucleótidos de longitud. En otros modos de realización, las sondas tienen 25 nucleótidos o menos y/o tienen entre 8 y 25 nucleótidos de longitud. En determinados modos de realización, las sondas oligonucleotídicas tienen entre 12 y 40. En otros modos de realización, las sondas tienen 30 nucleótidos o menos y/o tienen entre 12 y 30 nucleótidos de longitud. En otros modos de realización, las sondas tienen 25 nucleótidos o menos y/o tienen entre 12 y 25 nucleótidos de longitud. En algunos modos de realización, las sondas oligonucleotídicas tienen entre 15 y 40 (por ejemplo, entre 15 y 30, entre 15 y 25) nucleótidos de longitud (por ejemplo, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 nucleótidos).

Las construcciones pueden incluir vectores, conteniendo cada uno una de una molécula de ácido nucleico de cebador o una de sonda. Se pueden usar construcciones, por ejemplo, como moléculas de ácido nucleico molde de control. Los vectores adecuados para su uso en la presente invención están disponibles comercialmente y/o se producen por procedimientos de la tecnología de ácidos nucleicos recombinantes rutinarios en la técnica. Las construcciones adecuadas para su uso en los procedimientos descritos típicamente incluyen, además de las moléculas de ácido nucleico de cebador y sonda, secuencias que codifican un marcador seleccionable (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos) para seleccionar construcciones y/o transformantes deseados, y un origen de replicación. La elección de los sistemas de vectores normalmente depende de varios factores, incluyendo, pero sin limitarse a, la elección de células huésped, eficacia de la replicación, selectividad, inducibilidad y facilidad de recuperación.

Las construcciones que contienen moléculas de ácido nucleico de cebador y sonda se pueden propagar en una célula huésped. Como se usa en el presente documento, el término célula huésped pretende incluir procariotas y eucariotas, tales como células de levaduras, vegetales y animales. Los huéspedes procariotas pueden incluir *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. Los huéspedes eucariotas incluyen levaduras, tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Pichia pastoris*, células de mamífero, tales como células COS o células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto y células vegetales, tales como *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*. Se puede introducir una construcción en una célula huésped usando cualquiera de las técnicas conocidas comúnmente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la precipitación con fosfato de calcio, electroporación, choque térmico, lipofección, microinyección y transferencia de ácido nucleico mediada por virus son procedimientos comunes para introducir ácidos nucleicos en células huésped. Además, se puede suministrar ADN no marcado directamente a las células (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.580.859 y 5.589.466).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las patentes de EE. UU. n.ºs 4.683.202, 4.683.195, 4.800.159 y 4.965.188 divulgan técnicas de PCR convencionales. La PCR típicamente emplea dos cebadores oligonucleotídicos que se unen a un molde de ácido nucleico seleccionado (por ejemplo, ADN o ARN). Los cebadores útiles en los modos de realización descritos incluyen oligonucleótidos que pueden actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ácido nucleico dentro de las secuencias de ácido nucleico diana. Un cebador se puede purificar a partir de un hidrolizado de restricción por procedimientos convencionales, o se puede producir de forma sintética. El cebador es preferentemente monocatenario para una máxima eficacia en la amplificación, pero el cebador puede ser bicatenario. Los cebadores bicatenarios se desnaturalizan en primer lugar, es decir, se tratan para separar las cadenas. Un procedimiento de desnaturalización de ácidos nucleicos bicatenarios es por calentamiento.

Si el ácido nucleico molde es bicatenario, es necesario separar las dos cadenas antes de que se pueda usar como molde en la PCR. La separación de las cadenas se puede lograr por cualquier procedimiento de desnaturalización adecuado incluyendo medios físicos, químicos o enzimáticos. Un procedimiento de separación de las cadenas de ácido nucleico implica calentar el ácido nucleico hasta que esté predominantemente desnaturalizado (por ejemplo, más de un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % desnaturalizado). Las condiciones de calentamiento necesarias para desnaturalizar el ácido nucleico molde dependerán, por ejemplo, de la concentración de sal tampón y de la longitud y composición de nucleótidos de los ácidos nucleicos que se desnaturalizan, pero típicamente varían de aproximadamente 90 °C a aproximadamente 105 °C durante un tiempo que depende de los rasgos característicos de la reacción, tal como la temperatura y la longitud del ácido nucleico. La desnaturalización típicamente se realiza durante aproximadamente 30 s a 4 min (por ejemplo, de 1 min a 2 min 30 s, o 1,5 min).

Si el ácido nucleico molde bicatenario se desnaturaliza por calor, la mezcla de reacción se deja enfriar a una temperatura que promueva la hibridación de cada cebador a su secuencia diana en las moléculas de ácido nucleico diana descritas, por ejemplo, que contienen el SNP. La temperatura para la hibridación es normalmente de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 65 °C (por ejemplo, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C; de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 50 °C). Los tiempos de hibridación pueden ser de aproximadamente 10 s a aproximadamente 1 min (por ejemplo, de aproximadamente 20 s a aproximadamente 50 s; de aproximadamente 30 s a aproximadamente 40 s). A continuación, se ajusta la mezcla de reacción a una temperatura a la que se promueve u optimiza la actividad de la polimerasa, es decir, una temperatura suficiente para que se produzca la extensión a partir del cebador hibridado para generar productos complementarios al ácido nucleico molde. La temperatura debe ser suficiente para sintetizar un producto de extensión a partir de cada cebador que se hibrida a un molde de ácido nucleico, pero no debe ser tan alta como para desnaturalizar un producto de

extensión a partir de su molde complementario (por ejemplo, la temperatura para extensión varía, en general, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 80 °C (por ejemplo, de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C; aproximadamente 60 °C). Los tiempos de extensión pueden ser de aproximadamente 10 s a aproximadamente 5 min (por ejemplo, de aproximadamente 30 s a aproximadamente 4 min; de aproximadamente 1 min a aproximadamente 3 min; de aproximadamente 1 min 30 s a aproximadamente 2 min).

Los ensayos de PCR pueden emplear ácido nucleico de cebador y sonda, tal como ARN o ADN (ADNc). El ácido nucleico molde no necesita estar purificado; puede ser una fracción sin importancia de una mezcla compleja, tal como un ácido nucleico que contiene SNP contenido en células humanas. Las moléculas de ácido nucleico que contienen SNP se pueden extraer de una muestra biológica por técnicas rutinarias, tales como las descritas en *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications* (Persing *et al.* (eds), 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C.). Se pueden obtener ácidos nucleicos a partir de una serie de fuentes, tales como plásmidos, o fuentes naturales, incluyendo bacterias, levaduras, virus, orgánulos u organismos superiores, tales como plantas o animales.

Los cebadores oligonucleotídicos se combinan con reactivos de PCR en condiciones de reacción que inducen la extensión del cebador. Por ejemplo, las reacciones de extensión de la cadena incluyen, en general, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 15 mM, gelatina al 0,001 % (p/v), 0,5-1,0 µg de ADN molde desnaturalizado, 50 pmoles de cada cebador oligonucleotídico, 2,5 U de Taq polimerasa y DMSO al 10 %. Las reacciones contienen normalmente de 150 a 320 µM de cada uno de dATP, dCTP, dTTP, dGTP o uno o más análogos de los mismos.

Las cadenas recién sintetizadas forman una molécula bicatenaria que se puede usar en las etapas sucesivas de la reacción. Las etapas de separación, hibridación y alargamiento de la cadena se pueden repetir con tanta frecuencia como sea necesario para producir la cantidad deseada de productos de amplificación correspondientes a las moléculas de ácido nucleico diana. Los factores limitantes en la reacción son las cantidades de cebadores, enzima termoestable y nucleósidos trifosfato presentes en la reacción. Las etapas de ciclo (es decir, desnaturalización, hibridación y extensión) se repiten preferentemente al menos una vez. Para su uso en la detección, el número de etapas de ciclo dependerá, por ejemplo, de la naturaleza de la muestra. Si la muestra es una mezcla compleja de ácidos nucleicos, se requerirán más etapas de ciclo para amplificar la secuencia diana lo suficiente para la detección. En general, las etapas de ciclo se repiten al menos aproximadamente 20 veces, pero se pueden repetir hasta 40, 60 o incluso 100 veces.

Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET)

La tecnología de FRET (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 4.996.143, 5.565.322, 5.849.489 y 6.162.603) se basa en el concepto de que cuando un resto fluorescente de donante y un resto fluorescente de aceptador correspondiente se sitúan a una determinada distancia entre sí, tiene lugar una transferencia de energía entre los dos restos fluorescentes que se puede visualizar o de otro modo detectar y/o cuantificar. El donante típicamente transfiere la energía al aceptador cuando se excita el donante por radiación luminosa con una longitud de onda adecuada. El aceptador típicamente reemite la energía transferida en forma de radiación luminosa con una longitud de onda diferente.

En un ejemplo, una sonda de fusión oligonucleotídica puede contener un resto fluorescente de donante y un extintor correspondiente, que disipa la energía transferida en una forma distinta de la luz. Cuando la sonda de fusión está intacta y no hibridada a su diana, la transferencia de energía típicamente se produce entre los dos restos fluorescentes, de modo que se extinga la emisión fluorescente del resto fluorescente de donante. Cuando la sonda de fusión se hibrida a su secuencia de ácido nucleico diana, el resto fluorescente y un extintor correspondiente se separan especialmente más y la sonda de fusión se vuelve más intensamente fluorescente. Los pares donante-aceptador usados comúnmente incluyen el par FAM-TAMRA. Los extintores usados comúnmente son DABCYL y TAMRA. Los extintores oscuros usados comúnmente incluyen BlackHole Quenchers™ (BHQ), (Biosearch Technologies, Inc., Novato, Cal.), Iowa Black™, (Integrated DNA Tech., Inc., Coralville, Iowa), BlackBerry™ Quencher 650 (BBQ-650), (Berry & Assoc., Dexter, Mich.).

Se puede llevar a cabo el análisis fluorescente usando, por ejemplo, un sistema de microscopio epifluorescente de recuento de fotones (que contiene el espejo dicróico apropiado y filtros para controlar la emisión fluorescente en el intervalo particular), un sistema fotomultiplicador de recuento de fotones o un fluorímetro. La excitación para iniciar la transferencia de energía se puede llevar a cabo con un láser de iones de argón, una lámpara de arco de mercurio (Hg) de alta intensidad, una fuente de luz de fibra óptica u otra fuente de luz de alta intensidad filtrada apropiadamente para la excitación en el intervalo deseado.

Como se usa en el presente documento con respecto a los restos fluorescentes de donante y aceptador correspondientes, "correspondiente" se refiere a un resto fluorescente de aceptador que tiene un espectro de emisión que se superpone al espectro de excitación del resto fluorescente de donante. El máximo de longitud de onda del espectro de emisión del resto fluorescente de aceptador debe ser al menos 100 nm mayor que el máximo de longitud de onda del espectro de excitación del resto fluorescente de donante. En consecuencia, se puede producir una transferencia de energía no radiativa eficaz entre los mismos.

Los restos fluorescentes de donante y aceptador correspondientes se eligen, en general, para (a) la transferencia de energía de Förster de alta eficacia; (b) una gran variación de Stokes final (>100 nm); (c) una variación de la emisión lo más lejos posible en la porción roja del espectro visible (>600 nm); y (d) una variación de la emisión a una mayor longitud de onda que la emisión fluorescente del agua de Raman producida por excitación en la longitud de onda de excitación del donante. Por ejemplo, se puede elegir un resto fluorescente de donante que tenga su máximo de excitación cerca de una línea láser (por ejemplo, helio-cadmio 442 nm o argón 488 nm), un alto coeficiente de extinción, un alto rendimiento cuántico y una buena superposición de su emisión fluorescente con el espectro de excitación del resto fluorescente de aceptador correspondiente. Se puede elegir un resto fluorescente de aceptador correspondiente que tenga un alto coeficiente de extinción, un alto rendimiento cuántico, una buena superposición de su excitación con la emisión del resto fluorescente de donante y emisión en la parte roja del espectro visible (>600 nm).

Los restos fluorescentes de donante representativos que se pueden usar con diversos restos fluorescentes de aceptador en la tecnología de FRET incluyen fluoresceína, amarillo Lucifer, B-ficoeritrina, 9-acridinisotiocianato, amarillo Lucifer VS, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbena-2,2'-disulfónico, 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina, 1-pirenbutirato de succinimidilo y derivados de ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbena-2,2'-disulfónico.

Los restos fluorescentes de aceptador representativos, que dependen del resto fluorescente de donante usado, incluyen LC Red 640, LC Red 705, Cy5, Cy5.5, cloruro de sulfonil lisamina rodamina B, tetrametilrodamina-isotiocianato, rodamina x-isotiocianato, eritrosina-isotiocianato, fluoresceína, pentaacetato de dietiltriamina u otros quelatos de iones de lantánido (por ejemplo, europio o terbio). Se pueden obtener restos fluorescentes de donante y aceptador, por ejemplo, de Molecular Probes (Junction City, Oreg.) o Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.).

Los restos fluorescentes de donante y aceptador se pueden unir al oligonucleótido de sonda apropiado por medio de un brazo de conector. La longitud de cada brazo de conector es importante, ya que los brazos de conector afectarán a la distancia entre los restos fluorescentes de donante y aceptador. La longitud de un brazo de conector para el propósito de la presente invención es la distancia en Angstroms (Å) desde la base nucleotídica al resto fluorescente. En general, un brazo de conector es de aproximadamente 10 Å a aproximadamente 25 Å. El brazo de conector puede ser de la clase descrita en el documento WO 84/03285. El documento WO 84/03285 también divulga procedimientos para unir brazos de conector a una base nucleotídica particular, y también para unir restos fluorescentes a un brazo de conector.

Se puede combinar un resto fluorescente de aceptador, tal como un LC Red 640-éster de NHS, con C6-fosforamiditas (disponibles de ABI (Foster City, Calif.) o Glen Research (Sterling, Va.)) para producir, por ejemplo, LC Red 640-fosforamidita. Los conectores usados con frecuencia para acoplar un resto fluorescente de donante, tal como fluoresceína, a un oligonucleótido incluyen conectores de tiourea (derivados de FITC, por ejemplo, fluoresceína-CPG de Glen Research o ChemGene (Ashland, Mass.)), conectores de amida (derivados de fluoresceína-éster de NHS, tal como fluoresceína-CPG de BioGenex (San Ramon, Calif.)) o 3'-amino-CPG, que requieren el acoplamiento de fluoresceína-éster de NHS después de la síntesis oligonucleotídica.

Detección de un SNP en un ácido nucleico diana en una muestra

La presente divulgación proporciona procedimientos para detectar la presencia o ausencia de un SNP en un ácido nucleico diana en una muestra biológica o no biológica. Los procedimientos proporcionados por la invención evitan problemas de contaminación de la muestra, negativos falsos y positivos falsos. Los procedimientos incluyen realizar al menos una etapa de ciclo, que incluye amplificar una porción de la molécula de ácido nucleico diana de una muestra usando uno o un par de cebadores, una etapa de hibridación, que incluye poner en contacto el producto de amplificación con una sonda de fusión, y una etapa de detección. Se realizan múltiples etapas de ciclo, preferentemente en un termociclador. Los procedimientos divulgados se pueden realizar usando sondas naturales o específicas de SNP, dependiendo del diseño elegido, para detectar la presencia del o ausencia del SNP en el ácido nucleico diana en la muestra.

Como se describe en el presente documento, se pueden detectar productos de amplificación usando sondas de fusión marcadas que aprovechan la tecnología de FRET. Un formato de FRET utiliza una sonda de fusión monocatenaria marcada con dos restos fluorescentes. Cuando se excita un primer resto fluorescente con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere a un segundo resto fluorescente de acuerdo con los principios de FRET. El segundo resto fluorescente es, en general, una molécula de extintor. Durante la etapa de hibridación de la reacción PCR, la sonda de fusión marcada se une al ADN diana (es decir, el producto de amplificación) y, como resultado, el resto fluorescente excitado y el resto de extintor se separan espacialmente entre sí. Como consecuencia, tras la excitación del primer resto fluorescente en ausencia del extintor, se puede detectar la emisión de fluorescencia del primer resto fluorescente.

También se pueden usar balizas moleculares junto con FRET para detectar la presencia de un producto de amplificación usando los procedimientos de PCR en tiempo real de la invención. La tecnología de balizas

moleculares usa una sonda de hibridación marcada con un primer resto fluorescente y un segundo resto fluorescente. El segundo resto fluorescente es, en general, un extintor, y los marcadores fluorescentes típicamente se localizan en cada extremo de la sonda. La tecnología de balizas moleculares usa un oligonucleótido de sonda que tiene secuencias que permiten la formación de estructuras secundarias (por ejemplo, una horquilla).

5 Como resultado de la formación de estructuras secundarias dentro de la sonda, ambos restos fluorescentes están en proximidad espacial cuando la sonda está en solución. Después de la hibridación a los ácidos nucleicos diana (es decir, productos de amplificación), la estructura secundaria de la sonda se altera y los restos fluorescentes se separan entre sí, de modo que, después de la excitación con luz de una longitud de onda adecuada, se puede
10 detectar la emisión del primer resto fluorescente.

Dependiendo del diseño del ensayo, la presencia de FRET puede indicar la presencia del ácido nucleico diana en la muestra, y la ausencia de FRET puede indicar la ausencia del ácido nucleico diana en la muestra. Por ejemplo, la
15 variación decreciente en la temperatura de fusión predefinida de las sondas de hibridación es indicativa de la presencia del SNP en la muestra y en la que la ausencia de una variación decreciente en la temperatura de fusión predefinida de la sonda de hibridación es indicativa de la ausencia del SNP en la muestra.

Las muestras biológicas representativas que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, hisopos dérmicos, hisopos nasales, hisopos para heridas, hemocultivos, piel e infecciones de partes blandas. Son conocidos
20 procedimientos de recogida y almacenamiento de muestras biológicas por los expertos en la técnica. Las muestras biológicas se pueden procesar (por ejemplo, por procedimientos y/o kits de extracción de ácido nucleico conocidos en la técnica) para liberar el ácido nucleico o, en algunos casos, la muestra biológica se puede poner en contacto directamente con los componentes de la reacción PCR y los oligonucleótidos apropiados.

El análisis de la curva de fusión es una etapa que se puede incluir en un perfil de ciclo. El análisis de la curva de fusión se basa en el hecho de que el ADN se funde a una temperatura característica llamada temperatura de fusión (T_f), que se define como la temperatura a la que la mitad de las dobles hebras de ADN se han separado en cadenas
25 individuales. La temperatura de fusión de un ADN depende principalmente de su composición de nucleótidos. Por tanto, las moléculas de ADN ricas en nucleótidos G y C tienen una mayor T_f que las que tienen una abundancia de nucleótidos A y T. Detectando la temperatura a la que se pierde la señal, se puede determinar la temperatura de fusión de las sondas.
30

De forma similar, detectando la temperatura a la que se genera la señal, se puede determinar la temperatura de hibridación de las sondas. Dependiendo del diseño de un ensayo, la temperatura de fusión predeterminada real de la sonda de fusión de los productos de amplificación (en el caso de usar una sonda de fusión que tenga una secuencia
35 específica de SNP) o una variación decreciente de las temperaturas de fusión predeterminadas (en el caso de usar una sonda de fusión que tenga una secuencia natural) puede confirmar la presencia o ausencia del SNP en la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra.

Dentro de cada serie del termociclador, también se pueden realizar ciclos de muestras de control. Las muestras de control positivo pueden amplificar un molde de control de ácido nucleico (distinto de los productos de amplificación descritos de secuencia de ácido nucleico diana) usando, por ejemplo, cebadores de control y sondas de control. Las
40 muestras de control positivo también pueden amplificar, por ejemplo, una construcción plasmídica que contenga una molécula de ácido nucleico. Dicho control plasmídico se puede amplificar internamente (por ejemplo, dentro de la muestra) o en una muestra separada procesada en paralelo con la muestra del paciente. Cada serie del termociclador también puede incluir un control negativo que, por ejemplo, carezca de ADN molde diana. Dichos controles son indicadores del éxito o fracaso de la amplificación, hibridación y/o reacción de FRET.
45

Por lo tanto, las reacciones de control pueden determinar fácilmente, por ejemplo, la capacidad de los cebadores de hibridarse con especificidad de secuencia y de iniciar el alargamiento, así como la capacidad de las sondas de hibridarse con especificidad de secuencia y para que se produzca la FRET.
50

En un modo de realización, los procedimientos de la descripción incluyen etapas para evitar la contaminación. Por ejemplo, un procedimiento enzimático que utiliza uracil-ADN glucosilasa se describe en las patentes de EE. UU. n.ºs
55 5.035.996, 5.683.896 y 5.945.313 para reducir o eliminar la contaminación entre una serie del termociclador y la siguiente.

Se pueden usar procedimientos de PCR convencionales junto con la tecnología de FRET para poner en práctica los procedimientos descritos. En un modo de realización, se usa un instrumento LightCycler®. Las siguientes solicitudes de patente describen la PCR en tiempo real como se usa en la tecnología de LightCycler®: documentos WO
60 97/46707, WO 97/46714 y WO 97/46712.

Se entiende que los modos de realización de la presente descripción no se limitan por la configuración de uno o más instrumentos disponibles comercialmente.
65

Artículos de fabricación/kits

Los modos de realización de la presente descripción proporcionan además artículos de fabricación o kits para detectar un SNP en un ácido nucleico diana en una mezcla. Un artículo de fabricación puede incluir cebadores y sondas de fusión usados para detectar el SNP en el ácido nucleico diana, conjuntamente con materiales de envasado adecuados. Los cebadores y sondas de fusión representativos para la detección de SNP en un ácido nucleico diana en una muestra se pueden hibridar a las moléculas de ácido nucleico diana. Además, los kits también pueden incluir reactivos y materiales adecuadamente envasados necesarios para la inmovilización, hibridación y detección de ADN, tales como soportes sólidos, tampones, enzimas y patrones de ADN. En el presente documento se divulgan procedimientos de diseño de cebadores y sondas de fusión, y se proporcionan ejemplos representativos de cebadores y sondas de fusión que amplifican y se hibridan a las moléculas de ácido nucleico diana.

Los artículos de fabricación de la descripción también pueden incluir uno o más restos fluorescentes para marcar las sondas de fusión o, de forma alternativa, las sondas de fusión suministradas con el kit pueden estar marcadas. Por ejemplo, un artículo de fabricación puede incluir un resto fluorescente de donante y/o de un aceptador para marcar las sondas de fusión. Anteriormente se proporcionan ejemplos de restos fluorescentes de donante de FRET adecuados y restos fluorescentes de aceptador correspondientes.

Los artículos de fabricación también pueden contener un prospecto del envase o ficha técnica del envase que tenga instrucciones en los mismos para usar los cebadores y sondas de fusión para detectar la presencia o ausencia de SNP en un ácido nucleico diana en una muestra. Los artículos de fabricación pueden incluir adicionalmente reactivos para llevar a cabo los procedimientos divulgados en el presente documento (por ejemplo, tampones, enzimas polimerasa, cofactores o agentes para prevenir la contaminación). Dichos reactivos pueden ser específicos para uno de los instrumentos disponibles comercialmente descritos en el presente documento.

Los modos de realización de la divulgación se describirán además en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

EJEMPLOS

Se proporcionan los siguientes ejemplos y figuras para ayudar al entendimiento de la presente invención, exponiéndose su verdadero alcance en las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLO I**Procedimiento de fusión de sonda tradicional**

En referencia a la fig. 5 y tabla I, se amplificó ADN plasmídico (SEQ ID NO: 2-9) usando PCR asimétrica e inmediatamente seguido de análisis de fusión en un sistema de tubo cerrado. La PCR asimétrica contenía una abundancia de cebador directo, cebador inverso limitado y sonda en exceso. El diseño de cebadores y sonda en este procedimiento de fusión de sonda tradicional se diseñó para no superponerse. La sonda (SEQ ID NO: 1) se marcó en el extremo 5' con fluoróforo (F) y el extremo 3' con un Black Hole Quencher (Q) que sirve para extinguir la fluorescencia de la sonda no unida y también para prevenir la amplificación a partir de la extensión de la sonda.

TABLA I: Dianas y sonda para el procedimiento de fusión de sonda tradicional

SEQ ID NO		SECUENCIA
1	Sonda (WT)	5'- FTGTGGGTCAACCCCGAQ -3'
2	Plásmido WT01A	5'- CGCTTGTGGGTCAACCCCGA -3'
3	Plásmido MT03A	5'- CGCTTGT <u>C</u> GGTCAACCCCGA -3'
4	Plásmido MT05A	5'- CGCTTGT <u>G</u> GGTCAACCCCGA -3'
5	Plásmido MT06A	5'- CGCTTGT <u>A</u> GGTCAACCCCGA -3'
6	Plásmido MT07A	5'- CGCTTGT <u>G</u> GGTCAACCCCGA -3'
7	Plásmido MT08A	5'- CGCTTGTGGGTCAACCCCTA -3'
8	Plásmido MT09A	5'- CGCTTGTGGGTCAACCCCA -3'
9	Plásmido MT10A	5'- CGCTTGTGGGTCAACCCCA -3'

Condiciones de PCR: volumen de reacción total de 50 µl que contiene 24 µl de tampón de elución (Tris, metilparabeno, acida de sodio), 1 µl de ADN plasmídico (~1e4c/ul), más 25 µl de mezcla maestra (tricina, acetato de potasio, glicerol, DMSO, Tween 20, EDTA, acida de sodio, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, polimerasa, cebador FWD, cebador REV, sonda).

Análisis de fusión (posterior a la PCR): 5 s a 94 °C seguido de 30-80 °C, tasa de rampa de 0,06 °C/s.

Análisis de fusión tradicional: la mayor temperatura de fusión más alta se produce a partir de la sonda WT y la diana WT perfectamente emparejada (WT01: ~63 °C). Una menor T_f está provocada por cualquier SNP que se produzca bajo la región de la sonda, incluyendo mutaciones sinónimas (MT03A-MT10A). La cantidad de variación de la T_f es indicativa de la intensidad y localización de un SNP particular bajo la región de sonda.

EJEMPLO II

Cebador superpuesto y procedimiento de fusión de sonda con sonda WT

En referencia a la fig. 6 y tabla II, se amplificó ADN plasmídico (SEQ ID NO: 12-19) usando PCR asimétrica e inmediatamente seguido de análisis de fusión en un sistema de tubo cerrado. La PCR asimétrica contenía una abundancia de cebador directo, cebador inverso limitado y sonda en exceso. La sonda (SEQ ID NO: 11) se diseñó para superponerse al cebador inverso (SEQ ID NO: 10) y se diseñó en el mismo sentido que el cebador inverso para evitar la interacción sonda-cebador. La sonda se marcó en el extremo 5' con un fluoróforo y el extremo 3' con un Black Hole Quencher que sirve para extinguir la fluorescencia de la sonda no unida y también para prevenir la amplificación a partir de la extensión de la sonda.

TABLA II: Dianas y cebador y sonda WT apilados

SEQ ID NO		SECUENCIA
10	Cebador (WT)	5'- GCGCTTGTGGGTCAACCCC -3'
11	Sonda (WT)	5'- FCGCTTGTGGGTCAACCCC <u>Q</u> -3'
12	Plásmido WT01	5'- CGCTTGTGGGTCAACCCCCG -3'
13	Plásmido MT03	5'- CGCTTGT <u>C</u> GGTCAACCCCCG -3'
14	Plásmido MT05	5'- CGCTTGT <u>C</u> GGGTCAACCCCCG -3'
15	Plásmido MT06	5'- CGCTTGT <u>A</u> GGTCAACCCCCG -3'
16	Plásmido MT07	5'- CGCTTGT <u>A</u> GGGTCAACCCCCG -3'
17	Plásmido MT08	5'- CGCTTGTGGGTCAACCC <u>T</u> -3'
18	Plásmido MT09	5'- CGCTTGTGGGTCAACCC <u>A</u> -3'
19	Plásmido MT10	5'- CGCTTGTGGGTCAACCC <u>C</u> -3'

Condiciones de PCR: volumen de reacción total de 50 μ l que contiene 24 μ l de tampón de elución (Tris, metilparabeno, acida de sodio), 1 μ l de ADN plasmídico (~1e4c/ μ l), más 25 μ l de mezcla maestra (tricina, acetato de potasio, glicerol, DMSO, Tween 20, EDTA, acida de sodio, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, polimerasa, cebador FWD, cebador REV, sonda).

Análisis de fusión (posterior a la PCR): 5 s a 94 °C seguido de 30-80 °C, tasa de rampa de 0,06 °C/s.

Detección positiva de tres SNP en el extremo de la sonda 3': análisis de fusión con cebador y sonda apilados, lo que indica una T_f equivalente (~66 °C) de la diana WT (WT01) y mutaciones sinónimas bajo la región de la sonda (MT03, 05, 06 y 07). La variación de la T_f solo se produce a partir de SNP localizados en el extremo de la sonda 3' (MT08, MT09 y MT10), y la cantidad de variación de la T_f es específica del cambio de pares de bases (T_f de MT08: ~64 °C, MT09: ~61 °C, MT10: ~59 °C).

EJEMPLO III

Cebador superpuesto y procedimiento de fusión de sonda con sonda específica de SNP

En referencia a la fig. 7 y tabla III, se amplificó ADN plasmídico (SEQ ID NO: 12-19) usando PCR asimétrica e inmediatamente seguido de análisis de fusión en un sistema de tubo cerrado. La PCR asimétrica contenía una abundancia de cebador directo, cebador inverso limitado y sonda en exceso. La sonda (SEQ ID NO: 20) se diseñó para superponerse al cebador inverso (SEQ ID NO: 10) y se diseñó en el mismo sentido que el cebador inverso para evitar la interacción sonda-cebador. La sonda se marcó en el extremo 5' con un fluoróforo y el extremo 3' con un Black Hole Quencher que sirve para extinguir la fluorescencia de la sonda no unida y también para prevenir la amplificación a partir de la extensión de la sonda.

TABLA III: Dianas y cebador y sonda específica de SNP apilados

SEQ ID NO		SECUENCIA
10	Cebador (WT)	5'- GCGCITGTGGGTCAACCCC -3'
20	Sonda (SNP)	5'- FCGCTTGTGGGTCAACCCCT <u>T</u> Q -3'
12	Plásmido WT01A	5'- CGCTTGTGGGTCAACCCCG -3'
13	Plásmido MT03A	5'- CGCTTGT <u>C</u> GGTCAACCCCG -3'
14	Plásmido MT05A	5'- CGCTTGT <u>C</u> GGGTCAACCCCG -3'
15	Plásmido MT06A	5'- CGCTTGT <u>A</u> GGTCAACCCCG -3'
16	Plásmido MT07A	5'- CGCTTGT <u>A</u> GGGTCAACCCCG -3'
17	Plásmido MT08A	5'- CGCTTGTGGGTCAACCCCT -3'
18	Plásmido MT09A	5'- CGCTTGTGGGTCAACCCCA -3'
19	Plásmido MT10A	5'- CGCTTGTGGGTCAACCCCC -3'

5 Condiciones de PCR: volumen de reacción total de 50 μ l que contiene 24 μ l de tampón de elución (Tris, metilparabeno, acida de sodio), 1 μ l de ADN plasmídico ($\sim 1e4c/\mu$ l), más 25 μ l de mezcla maestra (tricina, acetato de potasio, glicerol, DMSO, Tween 20, EDTA, acida de sodio, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, polimerasa, cebador FWD, cebador REV, sonda).

Análisis de fusión (posterior a la PCR): 5 s a 94 °C seguido de 30-80 °C, tasa de rampa de 0,06 °C/s.

10 Detección positiva de un SNP en el extremo de la sonda 3': análisis de fusión con cebador y sonda apilados, lo que indica la mayor T_f (~ 65 °C) a partir de sonda de MT08 solo con diana de MT08 emparejada. Todas las demás mutaciones bajo la región de la sonda (indicada por las dianas MT03, 05, 06 y 07, MT09 y MT10) provocan una T_f variada ($\sim 60-62$ °C).

15 Aunque la invención precedente se ha descrito con algún detalle con propósitos de claridad y entendimiento, será evidente para un experto en la técnica, a partir de una lectura de esta divulgación, que se pueden realizar diversos cambios en forma y detalle sin apartarse del verdadero alcance de la invención. Por ejemplo, se pueden usar todas las técnicas y aparatos descritos anteriormente en diversas combinaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110>	Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG Roche Molecular Systems, Inc.	
	<120>	DETECCIÓN DE POLIMORFISMO MONONUCLEOTÍDICO USANDO CEBADOR Y Sonda DE FUSIÓN SUPERPUESTOS	
10	<130>	P31776-WO-HS	
	<150>	US 14/076979	
	<151>	11-11-2013	
15	<160>	20	
	<170>	PatentIn versión 3.5	
20	<210>	1	
	<211>	16	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
25	<220>		
	<223>	Oligonucleótido	
	<400>	1	
		tgtgggtcaa ccccga	16
30	<210>	2	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
35	<220>		
	<223>	Oligonucleótido	
	<400>	2	
		cgcttggtggg tcaaccccga	20
40	<210>	3	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
45	<220>		
	<223>	Oligonucleótido	
	<400>	3	
50		cgcttgtcgg tcaaccccga	20
	<210>	4	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
55	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido	
60	<400>	4	
		cgcttgctggg tcaaccccga	20
	<210>	5	

	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
5	<220>		
	<223>	Oligonucleótido	
	<400>	5	
		cgcttgtagg tcaaccccga	20
10	<210>	6	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
15	<220>		
	<223>	Oligonucleótido	
	<400>	6	
20		cgcttgaggg tcaaccccga	20
	<210>	7	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
25	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido	
30	<400>	7	
		cgcttgtaggg tcaacccta	20
	<210>	8	
	<211>	20	
35	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido	
40	<400>	8	
		cgcttgtaggg tcaaccctaa	20
	<210>	9	
45	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
50	<223>	Oligonucleótido	
	<400>	9	
		cgcttgtaggg tcaaccctca	20
55	<210>	10	
	<211>	19	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
60	<220>		
	<223>	Oligonucleótido	
	<400>	10	
		gcgcttgtagg gtcaacccc	19

	<210>	11	
	<211>	19	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido	
10	<400>	11	
		cgcttgtggg tcaaccccg	19
	<210>	12	
	<211>	19	
15	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido	
20	<400>	12	
		cgcttgtggg tcaaccccg	19
	<210>	13	
	<211>	19	
25	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
30	<223>	Oligonucleótido	
	<400>	13	
		cgcttgtcgg tcaaccccg	19
35	<210>	14	
	<211>	19	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
40	<220>		
	<223>	Oligonucleótido	
	<400>	14	
45		cgcttgcggg tcaaccccg	19
	<210>	15	
	<211>	19	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
50	<220>		
	<223>	Oligonucleótido	
	<400>	15	
55		cgcttgtagg tcaaccccg	19
	<210>	16	
	<211>	19	
	<212>	ADN	
60	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido	
65	<400>	16	

	cgcttgaggg tcaaccccg	19
	<210> 17	
	<211> 19	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
10	<400> 17	
	cgcttgtggg tcaaccct	19
	<210> 18	
15	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido	
	<400> 18	
	cgcttgtggg tcaacccca	19
25	<210> 19	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 19	
	cgcttgtggg tcaaccccc	19
35	<210> 20	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 20	
45	cgcttgtggg tcaaccct	19

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar un polimorfismo mononucleotídico (SNP) en un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo el procedimiento:
- 5 - realizar una etapa de amplificación que comprende poner en contacto la muestra con un cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de ácido nucleico natural para producir un producto de amplificación si cualquier ácido nucleico diana está presente en la muestra;
- 10 - realizar una etapa de hibridación que comprende poner en contacto el producto de amplificación con una sonda de fusión oligonucleotídica, comprendiendo dicha sonda de fusión oligonucleotídica una secuencia de ácido nucleico que tiene una temperatura de fusión predefinida, en el que la secuencia de ácido nucleico de la sonda de fusión oligonucleotídica se superpone a la secuencia de ácido nucleico natural del cebador oligonucleotídico con una superposición mínima de al menos un 80 % a lo largo de la longitud de la secuencia de ácido nucleico natural;
- 15 en el que la secuencia de ácido nucleico de la sonda oligonucleotídica comprende una segunda secuencia de ácido nucleico natural o una secuencia de ácido nucleico específica de SNP;
- 20 en el que la secuencia de ácido nucleico de la sonda de fusión oligonucleotídica tiene la misma secuencia que la secuencia de ácido nucleico natural del cebador oligonucleotídico a lo largo de la superposición; y
- en el que la secuencia de ácido nucleico de la sonda de fusión oligonucleotídica se extiende a lo largo de la secuencia de ácido nucleico natural del cebador oligonucleotídico en un extremo en un nucleótido a lo largo de donde el SNP se localiza; y
- 25 - detectar la presencia o ausencia del SNP en el producto de amplificación,
- en el que una variación decreciente en la temperatura de fusión predefinida de la sonda de fusión oligonucleotídica es indicativa de la presencia del SNP en la muestra y en el que la ausencia de una variación decreciente en la
- 30 temperatura de fusión predefinida de la sonda de fusión oligonucleotídica es indicativa de la ausencia del SNP en la muestra si la sonda de fusión oligonucleotídica comprende una segunda secuencia de ácido nucleico natural, o
- en el que una variación decreciente en la temperatura de fusión predefinida de la sonda de fusión oligonucleotídica es indicativa de la ausencia del SNP en la muestra y en el que la ausencia de una variación decreciente en la
- 35 temperatura de fusión predefinida de la sonda de fusión oligonucleotídica es indicativa de la presencia del SNP en la muestra si la sonda de fusión oligonucleotídica comprende una secuencia de ácido nucleico específica de SNP,
- en el que el ácido nucleico diana comprende una región no conservada con una o más mutaciones sinónimas localizadas donde el cebador se hibrida al ácido nucleico diana.
- 40 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la sonda de fusión oligonucleotídica está marcada con un resto fluorescente en el extremo 5', y un resto de aceptor correspondiente en el extremo 3' para extinguir la fluorescencia de las sondas de fusión oligonucleotídicas no unidas.
- 45 3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la secuencia de ácido nucleico de la sonda de fusión oligonucleotídica comprende una pluralidad de temperaturas de fusión predefinidas que dependen de las variaciones nucleotídicas de SNP que se distinguen entre las variaciones nucleotídicas de SNP.
- 50 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia de ácido nucleico del cebador oligonucleotídico y/o la secuencia de ácido nucleico de la sonda de fusión oligonucleotídica comprenden al menos un nucleótido modificado.
- 55 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la secuencia de ácido nucleico del cebador oligonucleotídico y/o la secuencia de ácido nucleico de la sonda de fusión oligonucleotídica tiene 40 nucleótidos o menos.
6. Un kit que comprende un cebador oligonucleotídico y un conjunto de sondas oligonucleotídicas para detectar un polimorfismo mononucleotídico (SNP) en un ácido nucleico diana en una muestra, que comprende:
- 60 - un cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de ácido nucleico natural para producir un producto de amplificación si cualquier ácido nucleico diana está presente en la muestra; y
- una sonda de fusión oligonucleotídica que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una temperatura de fusión predefinida,
- 65 en el que la secuencia de ácido nucleico de la sonda de fusión oligonucleotídica se superpone a la secuencia de

ácido nucleico natural del cebador oligonucleotídico con una superposición mínima de al menos un 80 % a lo largo de la longitud de la secuencia de ácido nucleico natural;

5 en el que la secuencia de ácido nucleico de la sonda oligonucleotídica comprende una segunda secuencia de ácido nucleico natural o una secuencia de ácido nucleico específica de SNP;

en el que la secuencia de ácido nucleico de la sonda de fusión oligonucleotídica tiene la misma secuencia que la secuencia de ácido nucleico natural del cebador oligonucleotídico a lo largo de la superposición; y

10 en el que la secuencia de ácido nucleico de la sonda de fusión oligonucleotídica se extiende a lo largo de la secuencia de ácido nucleico natural del cebador oligonucleotídico en un extremo en un nucleótido a lo largo de donde el SNP se localiza;

15 en el que se detecta la presencia o ausencia del SNP en el producto de amplificación, con lo que una variación decreciente en la temperatura de fusión predefinida de la sonda de fusión oligonucleotídica es indicativa de la presencia del SNP en la muestra y con lo que la ausencia de una variación decreciente en la temperatura de fusión predefinida de la sonda de fusión oligonucleotídica es indicativa de la ausencia del SNP en la muestra si la sonda de fusión oligonucleotídica comprende una segunda secuencia de ácido nucleico natural, o

20 en el que una variación decreciente en la temperatura de fusión predefinida de la sonda de fusión oligonucleotídica es indicativa de la ausencia del SNP en la muestra y en el que la ausencia de una variación decreciente en la temperatura de fusión predefinida de la sonda de fusión oligonucleotídica es indicativa de la presencia del SNP en la muestra si la sonda de fusión oligonucleotídica comprende una secuencia de ácido nucleico específica de SNP; y

25 en el que el ácido nucleico diana comprende una región no conservada con una o más mutaciones sinónimas localizadas donde el cebador se hibrida al ácido nucleico diana.

30 7. El kit de la reivindicación 6, en el que la sonda de fusión oligonucleotídica está marcada con un resto fluorescente, y un resto de aceptador correspondiente para extinguir la fluorescencia de las sondas de fusión oligonucleotídicas no unidas.

35 8. El kit de la reivindicación 7, en el que la sonda de fusión oligonucleotídica está marcada con un resto fluorescente en el extremo 5', y un resto de aceptador correspondiente en el extremo 3' para extinguir la fluorescencia de las sondas de fusión oligonucleotídicas no unidas.

9. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que la secuencia de ácido nucleico de la sonda de fusión oligonucleotídica comprende una pluralidad de temperaturas de fusión predefinidas que dependen de las variaciones nucleotídicas de SNP que se distinguen entre las variaciones nucleotídicas de SNP.

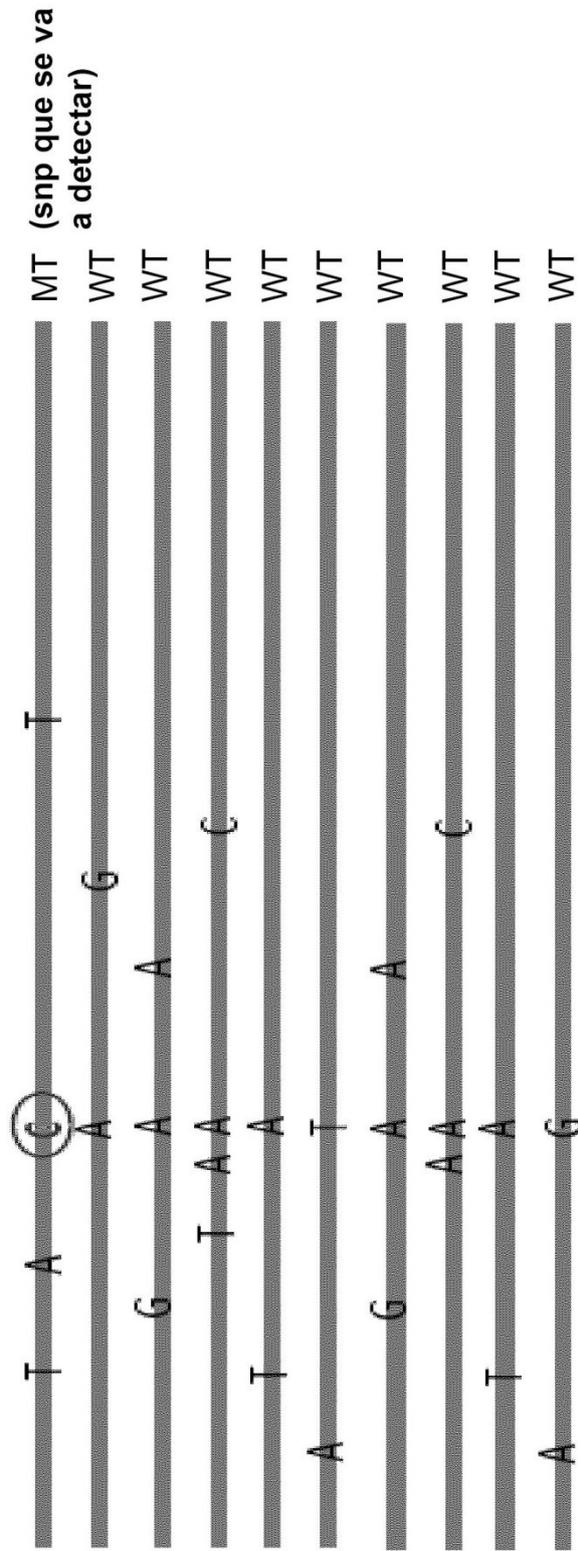


Fig. 1

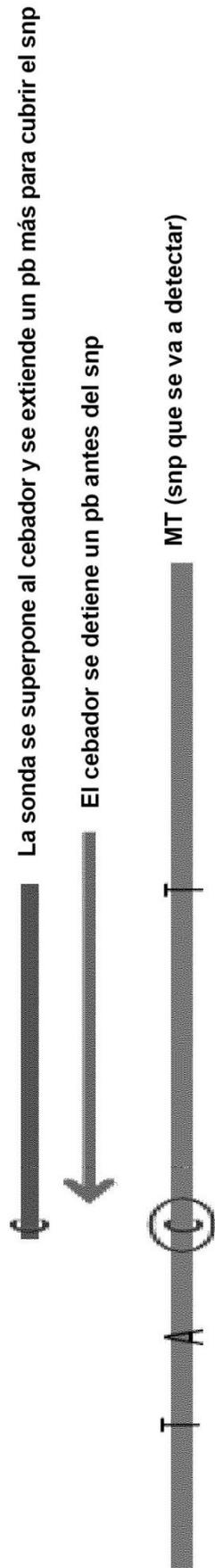


Fig. 2

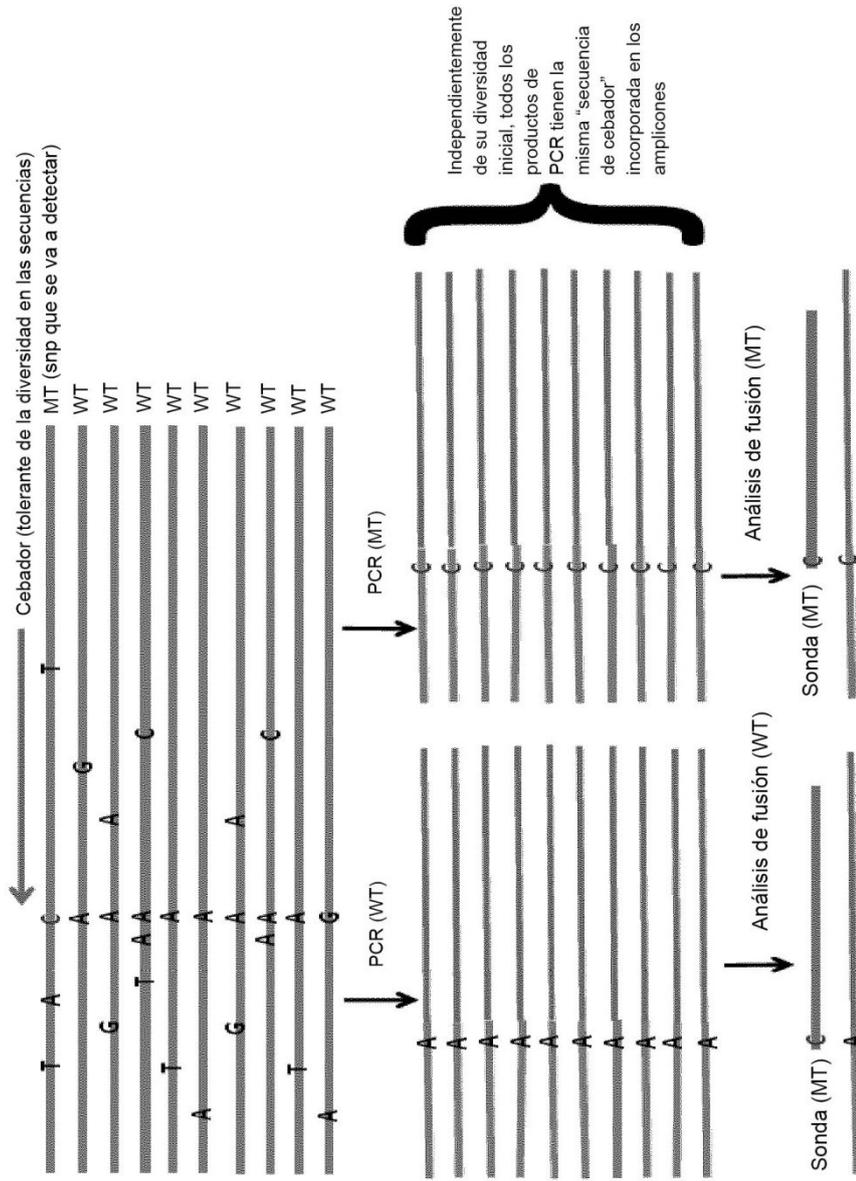


Fig. 3

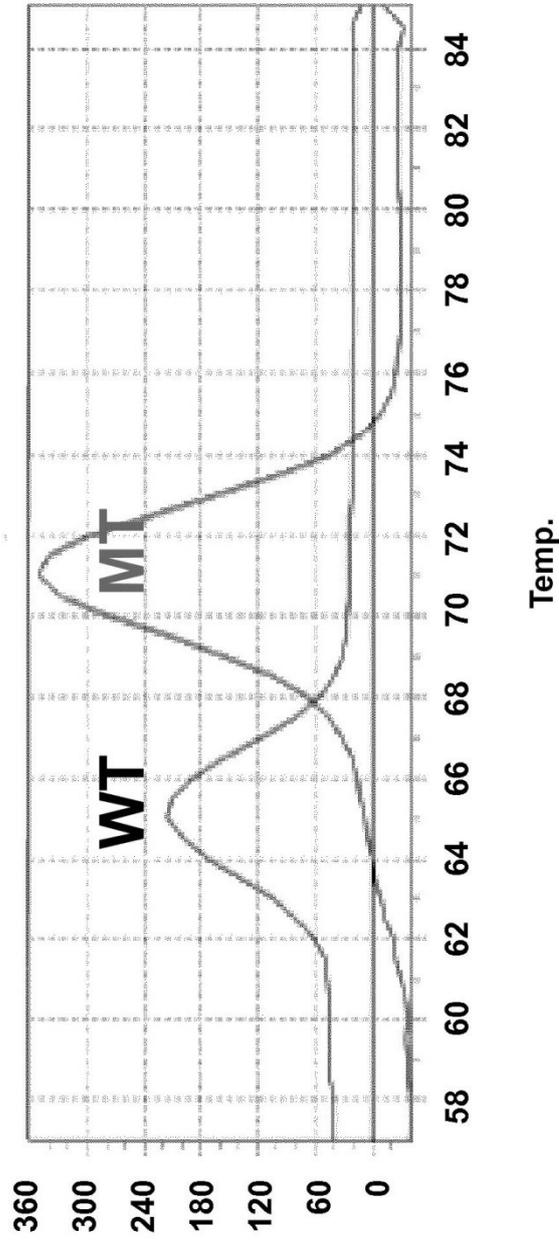
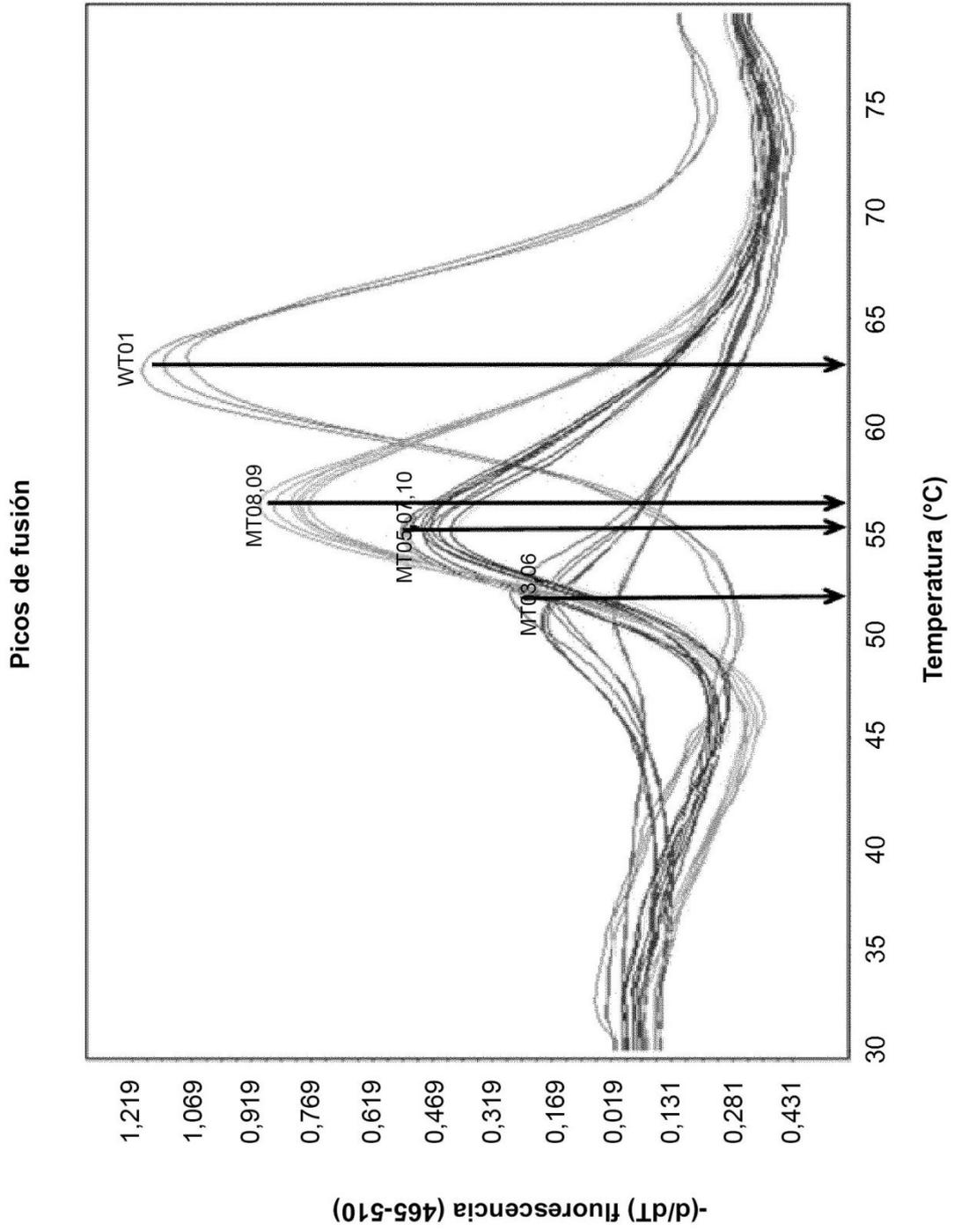


Fig. 4



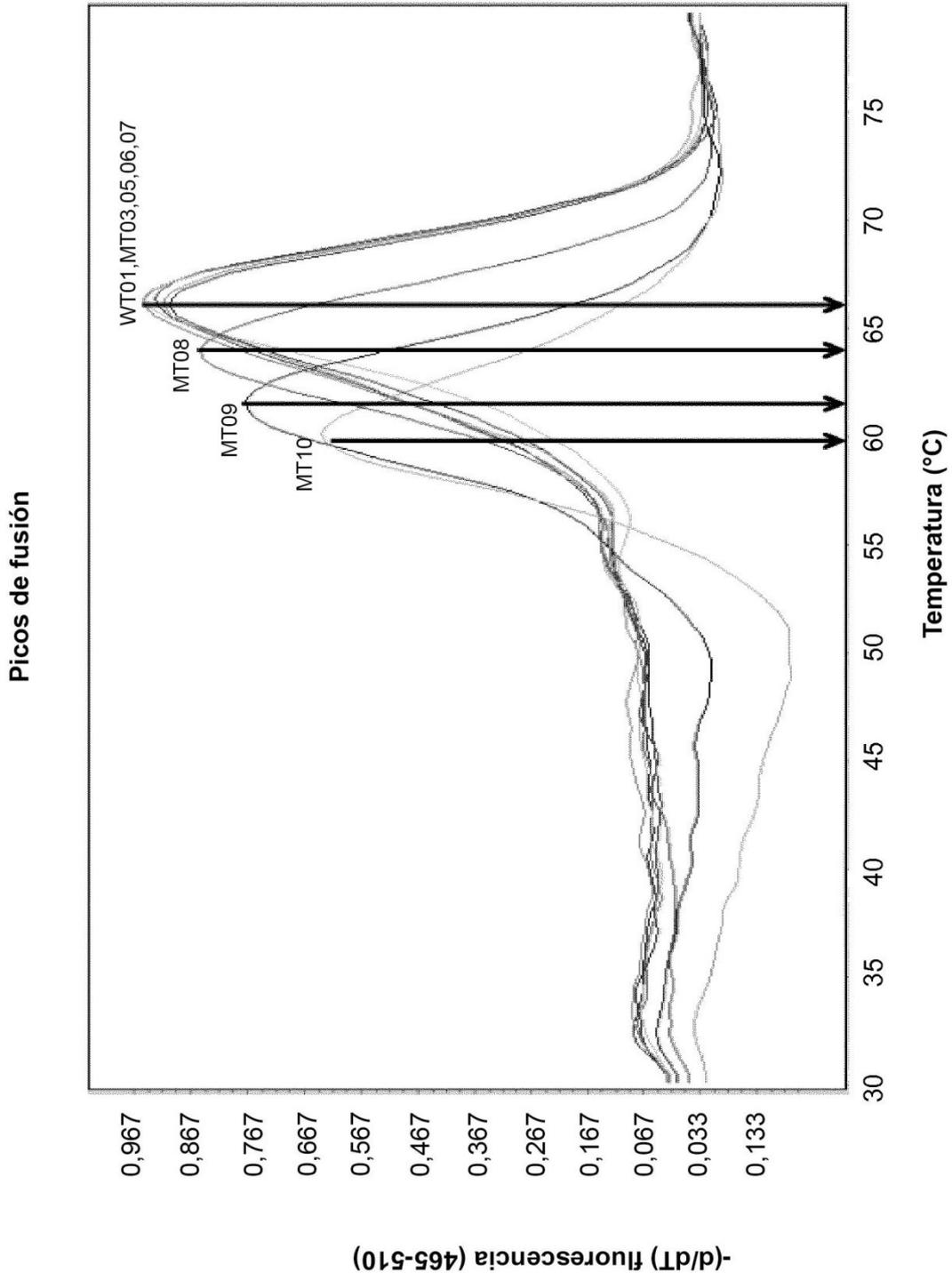


Fig. 6

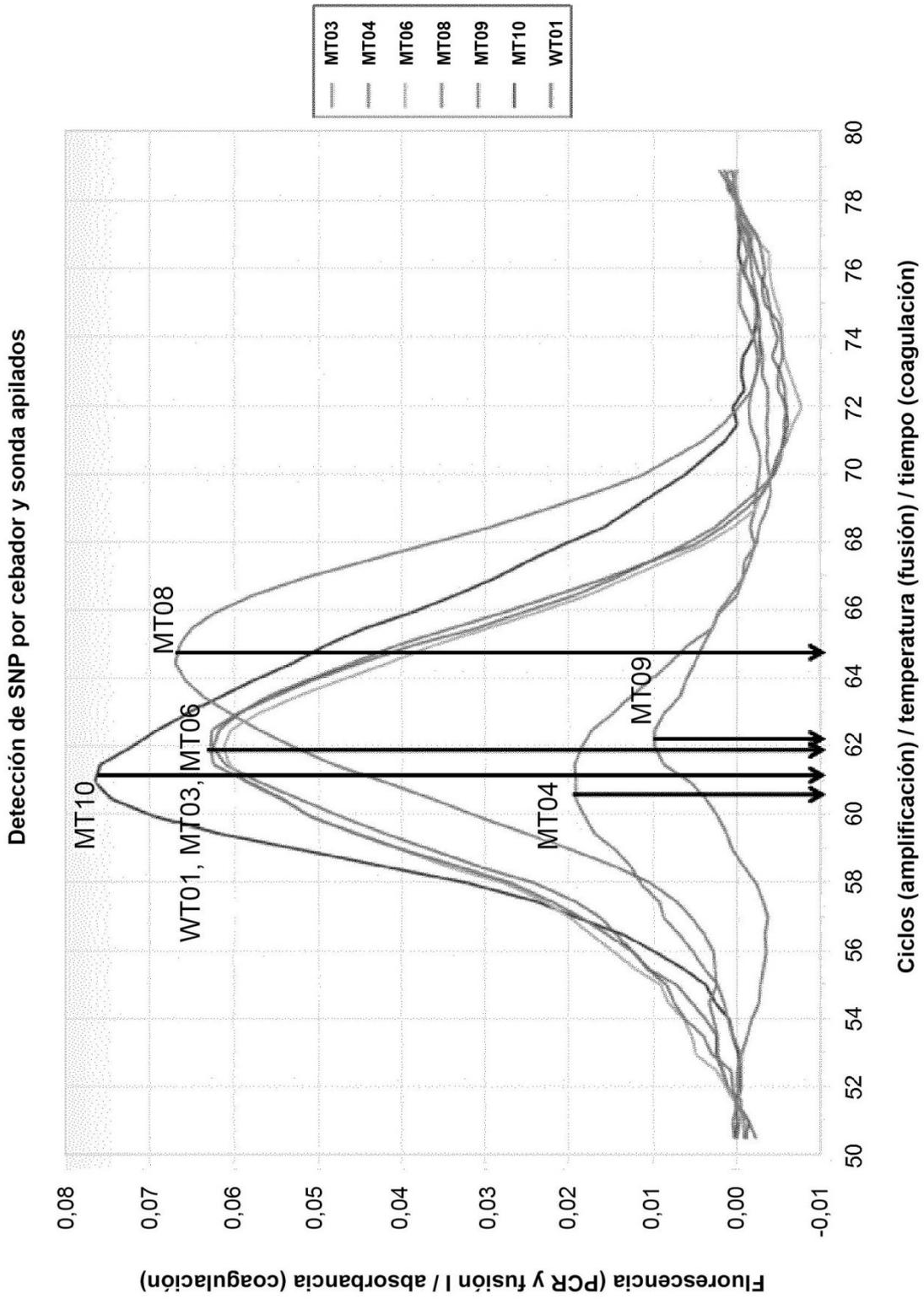


Fig. 7