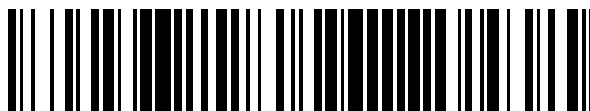


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 447**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6832** (2008.01)

**C12Q 1/6848** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2011 E 16191064 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3144396**

54 Título: **Métodos de uso de cebador de horquilla de extremos cohesivos**

30 Prioridad:

**27.10.2010 US 407291 P**

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

**21.07.2020**

73 Titular/es:

**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD  
COLLEGE (100.0%)  
17 Quincy Street  
Cambridge, MA 02138, US**

72 Inventor/es:

**ZHANG, DAVID YU y  
YIN, PENG**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 774 447 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**

Métodos de uso de cebador de horquilla de extremos cohesivos

**5 Solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica la prioridad según 35 U.S.C. § 119(e) de la solicitud provisional estadounidense con número de serie 61/407.291, presentada el 27 de octubre de 2010.

**10 Campo de la invención**

Las realizaciones descritas en el presente documento se refieren a cebadores de ácido nucleico parcialmente de doble hebra y a su uso, por ejemplo, en métodos de síntesis de ácido nucleico.

**15 Antecedentes de la invención**

Los ácidos nucleicos son portadores de información vital en biología, y la detección, amplificación e identificación de ácidos nucleicos han constituido la base de un amplio sector de la biotecnología. En particular, se han usado métodos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.* Science 239, 487-491 (1988)) en todo el mundo como medio fiable de amplificación de ADN, mientras que se han usado métodos de transcriptasa inversa para detectar con sonda el transcriptoma. El funcionamiento de ADN polimerasa, ARN polimerasa y transcriptasa inversa usa normalmente un fragmento de oligonucleótido corto conocido como cebador para dirigir la parte de una diana larga que va a replicarse o transcribirse.

Aunque la especificidad de la hibridación de ácidos nucleicos con frecuencia es suficiente para dirigir la actividad enzimática para la mayor parte de secuencias diana, las dianas con secuencia repetitiva, estructura secundaria y alto contenido de G/C resultan difíciles de amplificar con alto rendimiento. Además, altos niveles de fondo de otros ácidos nucleicos pueden conducir con frecuencia a una amplificación incorrecta, tal como en el caso de amplificación de genoma humano de una sola copia. Finalmente, puede ser difícil conseguir la amplificación multiplexada, tal como a partir de una combinación de chips de ADN, debido al gran número de reacciones de amplificación ortogonal que deben producirse de forma simultánea. Existen problemas similares para la transcripción y para la transcripción inversa.

El documento EP 0 851 033 A1 se refiere a amplificación activada por diana.

El documento US 2003/165859 A1 se refiere a cebadores y métodos para la detección y discriminación de ácidos nucleicos.

**40 Sumario de la invención**

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

La hibridación de ácidos nucleicos es específica a nivel de un nucleótido individual. Por ejemplo, citosina se une preferentemente a guanina, y adenina se une preferentemente a timina o uracilo.

Sin embargo, para moléculas de ácido nucleico que se componen de muchos nucleótidos, se reduce la especificidad de hibridación, y ácidos nucleicos con secuencias casi complementarias se unirán de forma casi tan fuerte como secuencias complementarias perfectas. Dada una mezcla heterogénea de ácido nucleico diana de interés ("dianas") y ácidos nucleicos con secuencias que difieren de la diana, por ejemplo, en un nucleótido ("dianas falsas"), una parte significativa de cebadores complementarios a la diana se hibridarán más bien con dianas falsas.

Dado que las dianas correctas se unen con una afinidad ligeramente mayor a un cebador que tiene una secuencia complementaria, proporcionando el tiempo suficiente, las dianas correctas desplazarán con el tiempo a las dianas falsas en la unión a un cebador complementario. Sin embargo, este proceso es muy lento, y llevaría meses a las concentraciones nanomolares típicas de muchos sistemas experimentales.

Con el fin de mitigar la tendencia de los cebadores complementarios a unirse a dianas falsas, a menudo es necesario hacer funcionar sistemas experimentales basados en cebador de ácido nucleico cerca de la temperatura de fusión del complejo cebador/diana. Dado que esta temperatura de fusión es generalmente mucho mayor que la temperatura a la que funcionan de manera natural la mayor parte de los sistemas biológicos, este requisito de alta temperatura excluye que el sistema experimental funcione en condiciones biológicas normales. Adicionalmente, dado que la temperatura de fusión variará de una diana a otra, el estrecho intervalo de temperaturas requerido para dichos sistemas experimentales restringe el uso simultáneo de múltiples cebadores para detectar una pluralidad de dianas.

Se proporcionan en el presente documento cebadores (por ejemplo, dúplex de cebador y dúplex de cebador de

horquilla) que, en realizaciones, son capaces de unirse rápidamente a dianas de ácido nucleico con alta especificidad en un amplio intervalo de temperaturas. Estos cebadores pueden usarse, por ejemplo, en reacciones de síntesis de ácido nucleico (por ejemplo, PCR), análisis de micromatrices, métodos de formación de imágenes y análisis de polimorfismos de nucleótidos individuales (SNP). Los cebadores también se pueden usar en ensayos de detección de ácido nucleico en los que funcionan principalmente como "sondas". Por consiguiente, independientemente de la aplicación, los cebadores de la divulgación pueden denominarse en el presente documento de manera indistinta "sondas". Independientemente de la aplicación (o método de uso), los cebadores de la divulgación solucionan los problemas que con frecuencia se presentan cuando se requiere una hibridación específica en presencia de dianas falsas, y más particularmente cuando dichas dianas falsas están presentes en exceso.

Los cebadores proporcionados en el presente documento presentan varias propiedades únicas que facilitan su uso en combinación con enzimas que actúan sobre ácidos nucleicos. En primer lugar, los cebadores están diseñados termodinámicamente para unirse con alta especificidad sólo a sus dianas pretendidas, y muestran alta discriminación frente a cambios incluso de un nucleótido individual. En segundo lugar, la especificidad de los cebadores permite PCR, transcripción y transcripción inversa de dianas tradicionalmente difíciles, tales como las que tienen una repetición de secuencia significativa, estructura secundaria y/o alto contenido de G/C. El alto grado de especificidad que puede lograrse con estos cebadores permite además el procesado preciso incluso con altos niveles de fondo de ácido nucleico tales como la amplificación del genoma humano de copia individual. En tercer lugar, la naturaleza parcialmente de doble hebra de los cebadores significa que es improbable que interactúen entre sí, y por consiguiente son propicios a reacciones de replicación altamente multiplexadas, transcripción y/o transcripción inversa. Finalmente, la hibridación de estos cebadores con dianas es relativamente robusta con respecto a la temperatura y salinidad, y por tanto los cebadores pueden tener una longitud significativamente mayor que los cebadores convencionales, lo que a su vez proporciona mayor especificidad y flexibilidad en cuanto al diseño de cebadores.

En algunas realizaciones, los cebadores de ácido nucleico analizados en este caso se diseñan de manera racional de modo que la energía libre estándar para la hibridación (por ejemplo, energía libre estándar teórica) entre la molécula de ácido nucleico diana específica y el cebador sea próxima a cero, mientras que la energía libre estándar para la hibridación entre una diana falsa (incluso una que difiere de la diana específica (real) únicamente en un nucleótido) y el cebador es lo suficientemente elevada como para hacer que su unión resulte comparativamente desfavorable. Los inventores lograron esto diseñando un cebador que tiene (a) una región específica de diana de hebra individual "de extremos cohesivos" (*toehold*), (b) una región específica de diana de doble hebra "de migración de rama" (*branch migration*), y (c) una región no específica de diana de doble hebra de "equilibrio" (*balance*).

En algunas realizaciones, el cebador puede comprender una sola hebra que se autohibrida para formar regiones de doble hebra. En algunas realizaciones, el cebador puede comprender dos hebras. Como ejemplo de esta última realización, el cebador comprende una primera hebra o hebra complementaria y una segunda hebra o hebra protectora. La hebra complementaria, como su nombre indica, es parcialmente complementaria a la diana de interés y se hibridará con la diana. Por otra parte, la hebra protectora está diseñada para no hibridarse con la diana y más bien competir con la diana (o diana falsa) por la unión del complemento.

La región "de extremos cohesivos" está presente en la hebra complementaria, es complementaria a una secuencia diana y no es complementaria a una región protectora. La región de "equilibrio" de la hebra complementaria (es decir, la región de equilibrio complementaria) es complementaria a parte de la región protectora (es decir, a la región de equilibrio protectora) y no es complementaria a la secuencia diana. La energía de hibridación de la región de extremos cohesivos con la diana coincide o casi coincide con la energía de hibridación de región de equilibrio complementaria con la región de equilibrio protectora (ajustando otras diversas consideraciones termodinámicas). La secuencia de la región de equilibrio se diseña de manera racional para lograr esta coincidencia con las condiciones deseadas de temperatura y concentración de cebador. Como resultado de ello, el equilibrio para la diana real y el cebador se aproxima rápidamente a un 50 % de diana:cebador:protector:cebador (o cualquier razón que se desee), mientras que el equilibrio para la diana falsa y el cebador favorece en gran medida el protector:cebador. El abundante cebador libre en presencia de diana específica facilita su detección altamente sensible y específica.

En algunas realizaciones, los cebadores de ácido nucleico comentados en este caso se diseñan de modo que la energía libre ajustada a la concentración para la hibridación entre la molécula de ácido nucleico diana específica y el cebador sea próxima a cero, al tiempo que la energía libre estándar ajustada a la concentración para la hibridación entre una diana falsa y el cebador sea lo suficientemente alta como para hacer que su unión resulte comparativamente desfavorable. "Energía libre ajustada a la concentración", tal como se usa en el presente documento, se refiere a  $\Delta G^{\circ} + (\Delta n)RT \ln(c)$ , donde R es la constante universal de los gases, T es la temperatura en Kelvin, c es la concentración del cebador, y  $\Delta n$  es el cambio en el número de moléculas en el transcurso de la reacción ( $\Delta n = -1$  para hibridación convencional,  $\Delta n = 0$  para hibridación de cebador de doble hebra).

Por tanto, aspectos de la divulgación proporcionan las composiciones de cebador que comprenden los cebadores, composiciones que comprenden las hebras complementaria y protectora (por ejemplo en estuches), métodos de preparación de los cebadores, y métodos de uso de los cebadores en ensayos o reacciones que incluyen, sin

limitación, reacciones o ensayos de detección y/o síntesis de ácido nucleico.

Por tanto, en un aspecto, la divulgación proporciona un cebador parcialmente de doble hebra que comprende (a) una primera hebra de ácido nucleico (también denominada en el presente documento hebra complementaria) y segunda hebra de ácido nucleico (también denominada en el presente documento hebra protectora), en el que las hebras primera y segunda cuando se hibridan entre sí se disponen en (1) una región no específica diana de doble hebra (de equilibrio), (2) una región específica de diana de doble hebra (de migración de rama), y (3) una región específica de diana de hebra individual (de extremos cohesivos) a la que contribuye la primera hebra de ácido nucleico, en el que la región no específica de diana de doble hebra tiene una energía libre estándar aproximadamente igual a la energía libre estándar para la región específica de diana de hebra individual unida a un ácido nucleico diana. El cebador parcialmente de doble hebra puede comprender una o más regiones no específicas de diana de doble hebra, una o más regiones específicas de diana de doble hebra y/o una o más regiones específicas de diana de hebra individual. En algunas realizaciones, el cebador parcialmente de doble hebra puede comprender una o dos regiones no específicas de diana de doble hebra (de equilibrio), una o más regiones específicas de diana de doble hebra (de migración de rama) y/o una o más regiones específicas de diana de hebra individual (de extremos cohesivos).

En algunas realizaciones, la segunda hebra de ácido nucleico comprende un nucleótido no extensible en su extremo 3' y/o la primera hebra de ácido nucleico comprende un nucleótido no natural en el extremo 3' de su región no específica de diana o en sus proximidades. En algunas realizaciones, el nucleótido no extensible es un nucleótido no natural o un didesoxinucleótido. En algunas realizaciones, el nucleótido no natural es iso-C, iso-G o desoxiuridina. Estos ejemplos no pretenden ser limitantes.

En algunas realizaciones, la región no específica de diana de doble hebra tiene una longitud de aproximadamente 4-20 nucleótidos. La región no específica de diana de doble hebra puede tener una longitud mayor de 20 nucleótidos, tal como por ejemplo una longitud de 4-21 nucleótidos. En algunas realizaciones, puede tener una longitud de aproximadamente 12-192 nucleótidos.

En algunas realizaciones, la región específica de diana de hebra individual tiene una longitud de aproximadamente 4-20 nucleótidos. La región específica de diana de hebra individual puede tener una longitud mayor de 20 nucleótidos, tal como una longitud de por ejemplo 4-21 nucleótidos. En algunas realizaciones, puede tener una longitud de aproximadamente 12-192 nucleótidos.

En algunas realizaciones, la región no específica de diana de doble hebra y la región específica de diana de hebra individual tienen proporciones similares o idénticas de nucleótidos A/T (y normalmente proporciones similares o idénticas de nucleótidos G/C). En algunas realizaciones, las hebras de ácido nucleico primera y segunda comprenden ADN o ARN o una combinación de los mismos.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un cebador de hebra individual que se autohibrida parcialmente para formar (1) una región no específica de diana de doble hebra, (2) una región específica de diana de doble hebra, (3) una región específica de diana de hebra individual, y (4) una región de bucle de horquilla, en el que la una o más regiones no específicas de diana de doble hebra tiene una energía libre estándar ajustada a la concentración aproximadamente igual a la energía libre estándar ajustada a la concentración de una o más regiones específicas de diana de hebra individual unidas a un ácido nucleico diana.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende cualquiera de los cebadores anteriormente mencionados. La composición puede comprender además un portador tal como un tampón, que comprende opcionalmente un conservante, una o más sales, etc. La composición también puede comprender un exceso de hebras protectoras de hebra individual, en el que cada hebra protectora comprende una región protectora de equilibrio y una región de migración de rama protectora. Las hebras protectoras de hebra individual pueden comprender cada una de ellas un nucleótido no extensible y/o de origen no natural I, preferiblemente en su extremo 3'.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un sistema que comprende un ácido nucleico diana, una polimerasa, y cualquiera de los cebadores anteriores. En algunas realizaciones, el cebador es un cebador parcialmente de doble hebra que comprende una primera y una segunda hebras de ácido nucleico dispuestas en (1) una región no específica de diana de doble hebra, (2) una región específica de diana de doble hebra y (3) una región específica de diana de hebra individual a la que contribuye la primera hebra de ácido nucleico.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es de hebra individual. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es ADN o ARN. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana comprende una secuencia repetitiva, estructura secundaria y/o alto contenido de GC. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana está presente en una pluralidad de ácidos nucleicos diferentes. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana está presente como una copia individual o en un bajo número de copias (por ejemplo, menos de 0,001 %, menos de 0,01 %, menos de 0,1 % o menos de 1 %) en una pluralidad de ácidos nucleicos diferentes.

- 5 En algunas realizaciones, el sistema comprende una pluralidad de cualquiera de los cebadores anteriores tal como una pluralidad de diferentes cebadores parcialmente de doble hebra. En algunas realizaciones, el sistema comprende al menos dos de los cebadores anteriores, tales como al menos dos cebadores parcialmente de doble hebra, que pueden usarse conjuntamente para amplificar una región del ácido nucleico diana.
- 10 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende cualquiera de los sistemas anteriormente mencionados. La composición puede comprender además un portador tal como un tampón, que comprende opcionalmente un conservante, una o más sales, una o más enzimas tales como una polimerasa, nucleótidos adecuados para la síntesis de ácido nucleico, etc. La composición también puede comprender un exceso de hebras protectoras de hebra individual, en el que cada hebra protectora comprende una región protectora de equilibrio y una región de migración de rama protectora. Las hebras protectoras de hebra individual pueden comprender cada una de ellas un nucleótido no extensible y/o de origen no natural, preferiblemente en su extremo 3'.
- 15 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método que comprende poner en contacto cualquiera de los cebadores anteriores, incluyendo cualquiera de los cebadores parcialmente de doble hebra anteriores con una muestra, y detectar la hibridación del cebador con una diana en la muestra.
- 20 En algunas realizaciones, el cebador tal como el cebador parcialmente de doble hebra se marca con un resto detectable. En algunas realizaciones, el resto detectable comprende un fluoróforo o un radioisótopo.
- 25 La diana será normalmente un ácido nucleico. En algunas realizaciones, la diana es un ácido nucleico de hebra individual. En algunas realizaciones, la diana es ADN o ARN. En algunas realizaciones, la diana es un ácido nucleico que comprende secuencia repetitiva, estructura secundaria y/o alto contenido de GC. En algunas realizaciones, la diana está presente en una pluralidad de ácidos nucleicos diferentes. En algunas realizaciones, la diana está presente como copia individual o en un bajo número de copias (por ejemplo, menos de 0,001 %, menos de 0,01 %, menos de 0,11 % o menos de 11 % %) en una pluralidad de ácidos nucleicos diferentes.
- 30 En algunas realizaciones, se realizan este y otros métodos descritos en el presente documento a una temperatura inferior a la temperatura de fusión del complejo hebra complementaria-diana. En algunas realizaciones, se llevan a cabo este y otros métodos descritos en el presente documento a una temperatura entre, e incluyendo, la temperatura ambiente hasta, e incluyendo, 50 °C, o hasta, e incluyendo, 40 °C, o hasta, e incluyendo, 30 °C. En algunas realizaciones, se llevan a cabo este y otros métodos descritos en el presente documento a aproximadamente 37 °C. En algunas realizaciones, se llevan a cabo este y otros métodos descritos en el presente documento con un exceso de hebra protectora que comprende una región protectora de equilibrio y una región de migración de rama protectora y que es idéntica a la hebra protectora en el cebador parcialmente de doble hebra. En este y otros métodos descritos en el presente documento, el cebador puede ser cualquiera de los cebadores anteriores incluyendo los cebadores parcialmente de doble hebra.
- 35 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método que comprende hibridar una región específica de diana de hebra individual (de extremos cohesivos) de una primera hebra (complementaria) de cualquiera de los cebadores parcialmente de doble hebra anteriores con un ácido nucleico diana, disociando de ese modo la primera hebra del cebador de la segunda hebra (protectora) del cebador, y extendiendo la primera hebra en su extremo 3', de manera complementaria a la diana, en presencia de una polimerasa.
- 40 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método que comprende realizar una reacción de síntesis de ácido nucleico en presencia de un ácido nucleico diana, una polimerasa y uno o más de los cebadores parcialmente de doble hebra anteriores.
- 45 En algunas realizaciones, la reacción de síntesis de ácido nucleico es una reacción de amplificación de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación de ácido nucleico es la reacción en cadena de polimerasa (PCR). En algunas realizaciones, la reacción de síntesis de ácido nucleico es una reacción de transcripción. En algunas realizaciones, la reacción de transcripción es una reacción de transcripción inversa.
- 50 En algunas realizaciones, se usan dos cebadores parcialmente de doble hebra.
- 55 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de realización de una reacción de amplificación de ácido nucleico multiplexado que comprende amplificar múltiples moléculas de ácido nucleico único usando cualesquiera de los cebadores anteriores incluyendo el cebador parcialmente de doble hebra.
- 60 En otro aspecto, la divulgación proporciona un estuche que comprende uno o más (incluyendo una pluralidad) de cualquiera de los cebadores parcialmente de doble hebra anteriores y uno o más reactivos de síntesis de ácido nucleico tales como enzimas, nucleótidos, sales, EDTA, un tampón, etc.
- 65 En algunas realizaciones, uno o más reactivos de síntesis de ácido nucleico se escogen entre el grupo que consiste en un tampón, nucleótidos y una polimerasa.

En algunas realizaciones, el estuche comprende además un exceso de hebra protectora que es idéntica a la hebra protectora presente en el cebador.

5 En algunas realizaciones, el estuche comprende además instrucciones de uso.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un estuche que comprende un primer ácido nucleico de hebra individual (complementario) en un primer recipiente y un segundo ácido nucleico de hebra individual (protector) que es complementario a una región del primer ácido nucleico de hebra individual, en un segundo recipiente, en el que, cuando se hibridan los ácidos nucleicos de hebra individual primero y segundo entre sí, se forma un ácido nucleico parcialmente de doble hebra que comprende (1) una región no específica de diana de doble hebra, (2) una región específica de diana de doble hebra y (3) una región específica de diana de hebra individual a la que contribuye el primer ácido nucleico, en el que el primer ácido nucleico de hebra individual comprende un nucleótido no natural y/o el segundo ácido nucleico de hebra individual comprende un nucleótido no extensible en su extremo 3'.

15 En algunas realizaciones, el estuche comprende además instrucciones de uso. En algunas realizaciones, el estuche comprende además uno o más reactivos de síntesis de ácido nucleico tales como los citados con anterioridad. En algunas realizaciones, uno o más reactivos de síntesis de ácido nucleico se escogen entre el grupo que consiste en un tampón, nucleótidos y una polimerasa.

20 En algunas realizaciones, la hebra protectora se proporciona en el estuche en una cantidad (por ejemplo, una cantidad molar) que es mayor que la cantidad (por ejemplo, una cantidad molar) de hebra complementaria en el estuche.

25 En algunas realizaciones de los aspectos y divulgaciones anteriores, particularmente los relacionados con cebadores de doble hebra, la secuencia de nucleótidos del cebador se escoge de tal manera que:

$|\Delta G_1^o - \Delta G_2^o - \Delta G_3^o| \leq \Delta G_R^o$ , donde:  $\Delta G_1^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de equilibrio protectora con la región de equilibrio complementaria;  $\Delta G_2^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de equilibrio protectora con la secuencia inmediatamente adyacente en la primera dirección a la secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna;  $\Delta G_3^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de extremos cohesivos con la segunda secuencia de ácido nucleico diana; y  $\Delta G_R^o$  es de 3,5 kcal/mol.

35 En un aspecto, se proporciona en el presente documento un sistema de dúplex de cebador que comprende una hebra complementaria y una hebra protectora, en el que la hebra protectora comprende un ácido nucleico que tiene: una región de migración de rama protectora que tiene un primer extremo, un segundo extremo, y una secuencia que corresponde a una primera secuencia de ácido nucleico diana que tiene un primer extremo y un segundo extremo, en el que el primer extremo de la región de migración de rama protectora y el primer extremo de la primera secuencia de ácido nucleico diana están o ambos bien en 5' o bien en 3'; y una región de equilibrio protectora inmediatamente adyacente al primer extremo de la región de migración de rama protectora que tiene una secuencia que no corresponde a la secuencia inmediatamente adyacente al primer extremo de la primera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna; y el cebador complementario comprende un ácido nucleico que tiene: una región de migración de rama complementaria que tiene un primer extremo y un segundo extremo, y una secuencia que es complementaria con la región de migración de rama protectora, en el que el primer extremo de la región de migración de rama complementaria y el primer extremo de la primera secuencia de ácido nucleico diana están ambos bien en 5' o bien en 3'; una región de extremos cohesivos que es: inmediatamente adyacente al primer extremo de la región de migración de rama complementaria; y complementaria a una segunda secuencia de ácido nucleico diana que es inmediatamente adyacente al segundo extremo de la primera secuencia de ácido nucleico diana; y una región de equilibrio complementaria que: es inmediatamente adyacente al segundo extremo de la región de migración de rama complementaria; es complementaria con la región de equilibrio protectora; y tiene una secuencia tal que:

45  $|\Delta G_1^o - \Delta G_2^o - \Delta G_3^o| \leq \Delta G_R^o$ , donde:  $\Delta G_1^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de equilibrio protectora con la región de equilibrio complementaria;  $\Delta G_2^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de equilibrio protectora con la secuencia inmediatamente adyacente en la primera dirección a la secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna;  $\Delta G_3^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de

extremos cohesivos con la segunda secuencia de ácido nucleico diana; y  $\Delta G_R^o$  es de 3,5 kcal/mol.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un sistema de dúplex de cebador que comprende un ácido nucleico que tiene una hebra protectora, una región de horquilla y una hebra complementaria, en el que: la hebra protectora comprende una región de migración de rama protectora y una región de equilibrio protectora, en el que: la región de migración de rama protectora tiene: un primer extremo; un segundo extremo; y una secuencia que corresponde a una primera secuencia de ácido nucleico diana que tiene un primer extremo y un segundo extremo, en el que el primer extremo de la región de migración de rama protectora y el primer extremo de la primera secuencia de ácido nucleico diana están ambos bien en 5' o bien en 3'; y la región de equilibrio protectora tiene: un primer extremo; un segundo extremo inmediatamente adyacente al primer extremo de la región de migración de rama protectora; y una secuencia que no corresponde a la secuencia inmediatamente adyacente al primer extremo de la primera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna; la región de horquilla comprende: un primer extremo; y un segundo extremo inmediatamente adyacente al primer extremo de la región de equilibrio protectora; y la hebra complementaria comprende una región de equilibrio complementaria, una región de migración de rama complementaria, y una región de extremos cohesivos, en el que: la región de equilibrio complementaria tiene: un primer extremo; un segundo extremo inmediatamente adyacente al primer extremo de la región de horquilla; y una secuencia que es complementaria a la región de equilibrio protectora; la región de migración de rama complementaria tiene: un primer extremo; un segundo extremo inmediatamente adyacente al primer extremo de la región de equilibrio complementaria; y una secuencia que es complementaria a la región de migración de rama protectora, en el que el primer extremo de la región de migración de rama complementaria y el primer extremo de la primera secuencia de ácido nucleico diana están ambos bien en 5' o bien en 3'; la región de extremos cohesivos es: inmediatamente adyacente al primer extremo de la región de migración de rama complementaria; y complementarias a una segunda secuencia de ácido nucleico diana que es inmediatamente adyacente al segundo extremo de la primera secuencia de ácido nucleico diana; y la región de equilibrio complementaria tiene una secuencia tal que:

$$\left| \Delta G_1^o - \Delta G_2^o - \Delta G_3^o + \Delta G_4^o + RT \ln(c) \right| \leq \Delta G_R^o$$
, donde:  $\Delta G_1^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de equilibrio protectora con la región de equilibrio complementaria;  $\Delta G_2^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de equilibrio protectora con la secuencia inmediatamente adyacente en la primera dirección a la secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna; y  $\Delta G_3^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de extremos cohesivos con la segunda secuencia de ácido nucleico diana;  $\Delta G_4^o$  es la energía libre estándar de confinamiento de la región de horquilla;  $R$  es la constante de los gases ideales;  $T$  es la temperatura a la que va a usarse el sistema de dúplex de cebador;  $c$  es la concentración a la que va a usarse el sistema de dúplex de cebador; y  $\Delta G_R^o$  es de 3,5 kcal/mol.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un sistema que tiene, en el orden de 3' a 5', una primera hebra protectora, una primera región de horquilla, una hebra complementaria, una segunda región de horquilla y una segunda hebra protectora, en el que: la primera hebra protectora comprende: una primera región de migración de rama protectora que tiene una secuencia que corresponde a una primera secuencia de ácido nucleico diana; y una primera región de equilibrio protectora que: está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de migración de rama protectora; y tiene una secuencia que no corresponde a la secuencia inmediatamente en 5' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna; la primera región de horquilla está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de equilibrio protectora; la hebra complementaria comprende: una primera región de equilibrio complementaria que: está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de horquilla; y tiene una secuencia complementaria a la secuencia de la primera región de equilibrio protectora; una primera región de migración de rama complementaria que: está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de equilibrio complementaria; y tiene una secuencia complementaria a una primera región de migración de rama protectora; una región de extremos cohesivos que: está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de migración de rama complementaria; y tiene una secuencia que es complementaria a una segunda secuencia de ácido nucleico diana que está inmediatamente en 3' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana; una segunda región de migración de rama complementaria que: está inmediatamente en 5' con respecto a la región de extremos cohesivos; y tiene una secuencia complementaria a una tercera secuencia de ácido nucleico diana que está inmediatamente en 3' con respecto a la segunda secuencia de ácido nucleico diana; una segunda región de equilibrio complementaria que: está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de migración de rama complementaria; tiene una secuencia que no es complementaria a una secuencia inmediatamente en 3' con respecto a la tercera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna; la segunda región de horquilla está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de equilibrio complementaria; y la segunda hebra protectora comprende: una segunda región de equilibrio protectora que: está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de horquilla; y tiene una secuencia complementaria a la segunda región de equilibrio complementaria; y una segunda región de migración de rama protectora que: está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de equilibrio protectora; y tiene una secuencia complementaria a la segunda región de migración de rama protectora; y tiene una secuencia complementaria a la segunda región de migración de rama protectora; en el que la primera región de equilibrio complementaria y la segunda región de equilibrio

complementaria tienen secuencias tales que:

$\left| \Delta G_1^{\circ} - \Delta G_2^{\circ} + \Delta G_3^{\circ} - \Delta G_4^{\circ} - \Delta G_5^{\circ} + \Delta G_6^{\circ} + \Delta G_7^{\circ} + RT \ln(c) \right| \leq \Delta G_R^{\circ}$  donde:  $\Delta G_1^{\circ}$  es la energía libre estándar de hibridación de la primera región de equilibrio protectora con la primera región de equilibrio

complementaria;  $\Delta G_2^{\circ}$  es la energía libre estándar de hibridación de la primera región de equilibrio complementaria con la secuencia inmediatamente en 5' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna;

$\Delta G_3^{\circ}$  es la energía libre estándar de hibridación de la segunda región de equilibrio protectora con la segunda secuencia de equilibrio complementaria;  $\Delta G_4^{\circ}$  es la energía libre estándar de hibridación de la segunda secuencia de equilibrio complementaria con la secuencia inmediatamente en 3' con respecto a la tercera secuencia

de ácido nucleico diana, si hubiera alguna;  $\Delta G_5^{\circ}$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de

extremos cohesivos con la segunda secuencia de ácido nucleico diana;  $\Delta G_6^{\circ}$  es la energía libre estándar de

confinamiento de la primera región de horquilla;  $\Delta G_7^{\circ}$  es la energía libre estándar de confinamiento de la segunda región de horquilla;  $R$  es la constante de los gases ideales;  $T$  es la temperatura a la que va a usarse el sistema de

dúplex de cebador;  $c$  es la concentración a la que va a usarse el sistema de dúplex de cebador; y  $\Delta G_R^{\circ}$  es de 3,5 kcal/mol.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un sistema de dúplex de cebador que comprende un cebador de horquilla y una hebra protectora, en el que: el cebador de horquilla comprende un ácido nucleico que tiene: una primera hebra protectora que tiene: una primera región de migración de rama protectora que tiene una secuencia que corresponde a una primera secuencia de ácido nucleico diana; y una primera región de equilibrio protectora que: está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de migración de rama protectora; y tiene una secuencia que no corresponde a la secuencia inmediatamente en 5' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna; una región de horquilla inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de equilibrio protectora; una hebra complementaria que tiene: una primera región de equilibrio complementaria que: está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de horquilla; y tiene una secuencia complementaria a la secuencia de la primera región de equilibrio protectora; una primera región de migración de rama complementaria que: está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de equilibrio complementaria; y tiene una secuencia complementaria a una primera región de migración de rama protectora; una región de extremos cohesivos que: está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de migración de rama complementaria; y tiene una secuencia que es complementaria a una segunda secuencia de ácido nucleico diana que está inmediatamente en 3' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana; una segunda región de migración de rama complementaria que: está inmediatamente en 5' con respecto a la región de extremos cohesivos; y tiene una secuencia complementaria a una tercera secuencia de ácido nucleico diana que está inmediatamente en 3' con respecto a la segunda secuencia de ácido nucleico diana; una segunda región de equilibrio complementaria que: está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de migración de rama complementaria; tiene una secuencia que no es complementaria a una secuencia inmediatamente en 3' con respecto a la tercera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna; y la región protectora comprende un ácido nucleico que tiene: una segunda hebra protectora que tiene: una segunda región de equilibrio protectora que tiene una secuencia complementaria a la segunda región de equilibrio complementaria; y una segunda región de migración de rama protectora que: está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de equilibrio protectora; y tiene una secuencia complementaria a la segunda región de migración de rama complementaria; en el que la primera región de equilibrio complementaria y la segunda región de equilibrio complementaria tienen secuencias tales que:

$\left| \Delta G_1^{\circ} - \Delta G_2^{\circ} + \Delta G_3^{\circ} - \Delta G_4^{\circ} - \Delta G_5^{\circ} + \Delta G_6^{\circ} \right| \leq \Delta G_R^{\circ}$ , donde:  $\Delta G_1^{\circ}$  es la energía libre estándar de

hibridación de la primera región de equilibrio protectora con la primera región de equilibrio complementaria;  $\Delta G_2^{\circ}$  es la energía libre estándar de hibridación de la primera región de equilibrio complementaria con la secuencia

inmediatamente en 5' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna;  $\Delta G_3^{\circ}$  es la energía libre estándar de hibridación de la segunda región de equilibrio protectora con la segunda región de

equilibrio complementaria;  $\Delta G_4^{\circ}$  es la energía libre estándar de hibridación de la segunda región de equilibrio complementaria con la secuencia inmediatamente en 3' con respecto a la tercera secuencia de ácido nucleico diana,

si hubiera alguna;  $\Delta G_5^{\circ}$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de extremos cohesivos con la

segunda secuencia de ácido nucleico diana;  $\Delta G_6^{\circ}$  es la energía libre estándar de confinamiento de la región de



horquilla; y  $\Delta G_R^\circ$  es de 3,5 kcal/mol.

En un aspecto adicional, se proporciona en el presente documento un sistema de dúplex de cebador que comprende una hebra protectora y un cebador de horquilla, en el que: la hebra protectora comprende un ácido nucleico que tiene: una primera hebra protectora que tiene: una primera región de migración de rama protectora que tiene una secuencia que corresponde a una primera secuencia de ácido nucleico diana; y una primera región de equilibrio protectora que: está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de migración de rama protectora; y tiene una secuencia que no corresponde a la secuencia inmediatamente en 5' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna; el cebador de horquilla comprende un ácido nucleico que tiene: una hebra complementaria que tiene: una primera región de equilibrio complementaria que tiene una secuencia complementaria a la secuencia de la primera región de equilibrio protectora; una primera región de migración de rama complementaria que: está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de equilibrio complementaria; y tiene una secuencia complementaria a una primera región de migración de rama protectora; una región de extremos cohesivos que: está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de migración de rama complementaria; y tiene una secuencia que es complementaria a una segunda secuencia de ácido nucleico diana que está inmediatamente en 3' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana; una segunda región de migración de rama complementaria que: está inmediatamente en 5' con respecto a la región de extremos cohesivos; y tiene una secuencia complementaria a una tercera secuencia de ácido nucleico diana que está inmediatamente en 3' con respecto a la segunda secuencia de ácido nucleico diana; una segunda región de equilibrio complementaria que: está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de migración de rama complementaria; tiene una secuencia que no es complementaria a una secuencia inmediatamente en 3' con respecto a la tercera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna; una región de horquilla inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de equilibrio complementaria; y una segunda hebra protectora que tiene: una segunda región de equilibrio protectora que: está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de horquilla; y tiene una secuencia complementaria a la segunda región de equilibrio complementaria; y una segunda región de migración de rama protectora que: está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de equilibrio protectora; y tiene una secuencia complementaria a la segunda región de migración de rama complementaria; en el que la primera región de equilibrio complementaria y la segunda región de equilibrio complementaria tienen secuencias tales que:

$$\left| \Delta G_1^\circ - \Delta G_2^\circ + \Delta G_3^\circ - \Delta G_4^\circ - \Delta G_5^\circ + \Delta G_6^\circ \right| \leq \Delta G_R^\circ, \quad \text{donde: } \Delta G_1^\circ \text{ es la energía libre estándar de}$$

hibridación de la primera región de equilibrio protectora con la primera región de equilibrio complementaria;  $\Delta G_2^\circ$  es la energía libre estándar de hibridación de la primera región de equilibrio complementaria con la secuencia inmediatamente en 5' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna;  $\Delta G_3^\circ$  es la energía libre estándar de hibridación de la segunda región de equilibrio protectora con la segunda región de equilibrio complementaria;  $\Delta G_4^\circ$  es la energía libre estándar de hibridación de la segunda región de equilibrio complementaria con la secuencia inmediatamente en 3' con respecto a la tercera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna; y  $\Delta G_5^\circ$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de extremos cohesivos con la segunda secuencia de ácido nucleico diana;  $\Delta G_6^\circ$  es la energía libre estándar de confinamiento de la región de horquilla; y  $\Delta G_R^\circ$  es de 3,5 kcal/mol.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un sistema de dúplex de cebador que comprende una primera hebra protectora, una hebra complementaria y una segunda hebra protectora, en el que: la primera hebra protectora comprende un ácido nucleico que tiene: una primera región de migración de rama protectora que tiene una secuencia que corresponde a una primera secuencia de ácido nucleico diana; y una primera región de equilibrio protectora que: está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de migración de rama protectora; y tiene una secuencia que no corresponde a la secuencia inmediatamente en 5' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna; la hebra complementaria comprende un ácido nucleico que tiene: una primera región de equilibrio complementaria que: está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de horquilla; y tiene una secuencia complementaria a la secuencia de la primera región de equilibrio protectora; una primera región de migración de rama complementaria que: está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de equilibrio complementaria; y tiene una secuencia complementaria a una primera región de migración de rama protectora; una región de extremos cohesivos que: está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de migración de rama complementaria; y tiene una secuencia que es complementaria a una segunda secuencia de ácido nucleico diana que está inmediatamente en 3' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana; una segunda región de migración de rama complementaria que: está inmediatamente en 5' con respecto a la región de extremos cohesivos; y tiene una secuencia complementaria a una tercera secuencia de ácido nucleico diana que está inmediatamente en 3' con respecto a la segunda secuencia de ácido nucleico diana; una segunda región de equilibrio complementaria que: está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de migración de rama

complementaria; tiene una secuencia que no es complementaria a una secuencia inmediatamente en 3' con respecto a la tercera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna; y la segunda hebra protectora comprende: una segunda región de equilibrio protectora que tiene una secuencia complementaria a la segunda región de equilibrio complementaria; y una segunda región de migración de rama protectora que: está

inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de equilibrio protectora; y tiene una secuencia complementaria a la segunda región de migración de rama complementaria; en el que la primera región de equilibrio complementaria y la segunda región de equilibrio complementaria tienen secuencias tales que:

$$\left| \Delta G_1^{\circ} - \Delta G_2^{\circ} + \Delta G_3^{\circ} - \Delta G_4^{\circ} - \Delta G_5^{\circ} - RT \ln(c) \right| \leq \Delta G_R^{\circ},$$
 donde:  $\Delta G_1^{\circ}$  es la energía libre estándar de

hibridación de la primera región de equilibrio protectora con la primera región de equilibrio complementaria;  $\Delta G_2^{\circ}$

es la energía libre estándar de hibridación de la primera región de equilibrio complementaria con la secuencia inmediatamente en 5' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna;  $\Delta G_3^{\circ}$  es la

energía libre estándar de hibridación de la segunda región de equilibrio protectora con la segunda región de equilibrio complementaria;  $\Delta G_4^{\circ}$  es la energía libre estándar de hibridación de la segunda región de equilibrio

complementaria con la secuencia inmediatamente en 3' con respecto a la tercera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna; y  $\Delta G_5^{\circ}$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de extremos cohesivos con la segunda secuencia de ácido nucleico diana;  $R$  es la constante de los gases ideales;  $T$  es la temperatura a la que va a usarse el sistema de dúplex de cebador;  $c$  es la concentración a la que va a usarse el sistema de dúplex de

cebador; y  $\Delta G_R^{\circ}$  es de 3,5 kcal/mol.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un sistema de dúplex de cebador que comprende, en el orden de 3' a 5', una primera hebra protectora, una primera región de horquilla, una hebra complementaria, una segunda región de horquilla y una segunda hebra protectora, en el que: la primera hebra protectora tiene una secuencia que corresponde a una primera secuencia de ácido nucleico diana; la primera región de horquilla está inmediatamente en 5' con respecto a la primera hebra protectora; la hebra complementaria comprende: una primera región de migración de rama complementaria que: está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de horquilla; y tiene una secuencia complementaria a la secuencia de la primera hebra protectora; una región de extremos cohesivos que: está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de migración de rama complementaria; y tiene una secuencia complementaria a una segunda secuencia de ácido nucleico diana que está inmediatamente en 3' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana; y una segunda región de migración de rama complementaria que: está inmediatamente en 5' con respecto a la región de extremos cohesivos; y tiene una secuencia complementaria a una tercera secuencia de ácido nucleico diana que está inmediatamente en 3' con respecto a la segunda secuencia de ácido nucleico; la segunda región de horquilla está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de migración de rama complementaria; y la segunda hebra protectora tiene una secuencia que es complementaria a la secuencia de la segunda región de migración de rama complementaria.

En uno cualquiera de los aspectos anteriores,  $\Delta G_R^{\circ}$  puede ser de 2,0 kcal/mol, 1,0 kcal/mol o 0,5 kcal/mol; y/o  $c$  puede ser de aproximadamente 10 nM; y/o  $T$  puede ser de aproximadamente 293K o aproximadamente 338K; y/o la región de extremos cohesivos puede tener una longitud entre 4 y 20 nucleótidos, una longitud entre aproximadamente 4 y 15 nucleótidos, o una longitud entre aproximadamente 4 y 10 nucleótidos; y/o el primer extremo de la región de migración de rama protectora puede estar en 5' o en 3'; y/o el sistema de dúplex de cebador puede comprender además un colorante o grupo fluorescente funcionalizado; y/o el sistema de dúplex de cebador puede inmovilizarse sobre un soporte sólido; y/o la región de horquilla puede tener una longitud de no más de 20 nucleótidos o una longitud de no más de 10 nucleótidos; y/o la secuencia de la región de horquilla puede escogerse entre el grupo que consiste en una secuencia de poli-adenosina, una secuencia de poli-desoxiadenosina, una secuencia de poli-5'-metiluridina, una secuencia de poli-timidina, una secuencia de poli-guanosina, una secuencia de poli-desoxiguanosina, una secuencia de poli-citidina, una secuencia de poli-desoxicitidina, una secuencia de poli-uridina y una secuencia de poli-desoxiuridina; y/o la primera secuencia de ácido nucleico diana y/o la segunda secuencia de ácido nucleico diana pueden ser secuencias de origen natural en un organismo o un virus; y/o la primera secuencia de ácido nucleico diana y/o la segunda secuencia de ácido nucleico diana pueden ser secuencias que se producen de manera natural en un micro-ARN.

En un aspecto, se proporciona en el presente documento un método de detección de un ácido nucleico diana en una muestra que comprende: poner en contacto un ácido nucleico diana con un sistema de dúplex de cebador de una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento; y detectar la formación de un complejo entre el ácido nucleico diana y al menos una parte del sistema de dúplex de cebador. En algunas realizaciones, el sistema de dúplex de cebador comprende además un colorante o grupo fluorescente funcionalizado. En algunas realizaciones, el sistema de dúplex de cebador se inmoviliza sobre un soporte sólido. En algunas realizaciones, la puesta en contacto se produce en una célula. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico de origen natural en un organismo o un virus. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un micro-ARN.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un método de amplificación de una secuencia presente dentro de un ácido nucleico diana que comprende: formar una disolución que comprende: un ácido nucleico diana; un sistema de dúplex de cebador de una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento; y reactivos para llevar a cabo una reacción de amplificación; e incubar la disolución en condiciones tales que se amplifique dicha secuencia presente dentro del ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico de origen natural en un organismo o un virus.

Se explicarán estos y otros aspectos y realizaciones de la divulgación con mayor detalle en el presente documento.

### Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 4-8, 9A, y 9B representan sistemas de sonda de ácido nucleico a modo de ejemplo.

Las figuras 10, 11, 12A, 12B, 13, y 14 representan métodos a modo de ejemplo de uso de sistemas de sonda de ácido nucleico.

Las figuras 15A y 15B representan la reacción en cadena de polimerasa (PCR) altamente específica usando los dúplex de cebador proporcionados en el presente documento.

Las figuras 16A-16D muestran demostraciones experimentales de hibridación de cebador con discriminación de nucleótido individual.

Las figuras 17A-17D muestran resultados experimentales adicionales y datos estadísticos sobre las capacidades de discriminación de una base individual de dúplex de cebador.

Las figuras 18A-18B muestran resultados experimentales usando cebadores de dúplex para mejorar el rendimiento de PCR de una diana cuasi-repetitiva.

### Descripción detallada de la invención

Un reto importante en los ensayos de ácido nucleico basados en sonda es que los ácidos nucleicos que tienen secuencias similares a la de una diana se hibriden al complemento de la diana con fuerte termodinámica y cinética rápida. Sin embargo, tal como se describe en el presente documento, la cinética y termodinámica de las reacciones con desplazamiento de hebra pueden estar parcialmente desacopladas, de modo que reacciones que sólo sean ligeramente favorables o incluso termodinámicamente desfavorables puedan tener, no obstante, una cinética tan rápida como la hibridación de dos hebras complementarias. Las composiciones y los métodos descritos en el presente documento se aprovechan de este mecanismo de desacoplamiento para proporcionar sistemas de sonda de ácido nucleico con especificidad y cinética mejoradas.

Se proporcionan en el presente documento sistemas de sonda de ácido nucleico altamente específicos y métodos de uso de dichos sistemas de sonda. En determinadas realizaciones, los sistemas de sonda de ácido nucleico descritos en el presente documento comprenden sondas complementarias que tienen regiones complementarias a una secuencia diana que se protegen frente a la hibridación con dianas falsas mediante regiones protectoras complementarias a una parte de las sondas complementarias. La energía libre de la reacción de unión entre la diana y la sonda protegida se controla con precisión mediante las bases diseñadas de manera racional de una o más regiones de equilibrio, que tienen secuencias que no corresponden a la secuencia de ácido nucleico diana o su complemento. En determinadas realizaciones, una región protectora y una sonda complementaria forman regiones en una molécula individual de ácido nucleico y están separadas entre sí por una o más horquillas de ácido nucleico.

Los métodos y las composiciones descritos en el presente documento presentan varias propiedades únicas que facilitan su uso en ensayos de hibridación. En primer lugar, los sistemas de sonda de ácido nucleico descritos en el presente documento convierten de manera fiable pequeñas diferencias de secuencia entre dianas y dianas falsas en grandes diferencias en cuanto a afinidad de unión y velocidades de reacción entre la hibridación de la diana frente a la diana falsa con la sonda. En segundo lugar, los sistemas de sonda de ácido nucleico descritos en el presente documento pueden diseñarse para funcionar en cualquier intervalo amplio de temperaturas y concentraciones de sal, y por tanto pueden funcionar de manera fiable en muchas condiciones experimentales diferentes. En tercer lugar, el uso de los sistemas de sonda de ácido nucleico descritos en el presente documento puede dar como resultado reacciones de hibridación que sean cinéticamente rápidas incluso a temperatura ambiente, lo que facilita el análisis rápido y de alto rendimiento de ácidos nucleicos. En cuarto lugar, los sistemas de sonda de ácido nucleico descritos en el presente documento se diseñan de manera racional, y por tanto es improbable que interaccionen de manera desfavorable o inesperada con otras biomoléculas.

Por consiguiente, se proporcionan en el presente documento composiciones de cebador, métodos de preparación de dichas composiciones, y métodos de su uso. Las realizaciones descritas en el presente documento se basan en

parte en el descubrimiento de que cebadores (por ejemplo, un par de cebadores parcialmente hibridados, o un cebador de autohibridación individual) que son parcialmente de doble hebra y parcialmente de hebra individual, cuando se usan en una reacción de síntesis de ácido nucleico por ejemplo, son capaces de discriminar entre dianas totalmente complementarias y las que tienen uno o más apareamientos erróneos (es decir, las dianas falsas). Tal como se demuestra en el presente documento, los dúplex de cebador descritos en el presente documento son superiores a los cebadores convencionales, por ejemplo, en las reacciones de PCR que usan las dianas falsas tales como las que tienen secuencias cuasi-repetitivas.

Los dúplex de cebador en el presente documento comprenden una región de hebra individual denominada en el presente documento “de extremos cohesivos” a partir de la cual el dúplex de cebador inicia la unión a una diana, una “región de equilibrio” de doble hebra que se disocia espontáneamente de modo que una sola hebra de cebador no completa la hibridación (a lo largo de la longitud completa del cebador) con la diana, y una región de migración de rama de doble hebra, entre las regiones de extremos cohesivos y de equilibrio, que es totalmente complementaria a una secuencia de ácido nucleico diana. Mecánicamente, se cree que la hibridación con una diana comienza en la región de extremos cohesivos y continúa a lo largo de la longitud de la hebra complementaria hasta que el cebador ya no es “de doble hebra”. Esto también supone complementariedad entre la diana y la región de rama. Tal como se usa en el presente documento, una “región” o “dominio” de ácido nucleico es un tramo consecutivo de nucleótidos de cualquier longitud. Cuando existen apareamientos erróneos de nucleótidos entre la “diana” y la hebra complementaria, el desplazamiento de la segunda hebra (es decir, la hebra protectora) es termodinámicamente desfavorable y se revierte la asociación entre la hebra complementaria y la “diana”. Ha de entenderse que en esta última descripción, la “diana” es en realidad una diana falsa puesto que comprende diferencias o apareamientos erróneos de nucleótidos con respecto a la hebra complementaria.

Dado que la energía libre estándar favorece un apareamiento completo (totalmente complementario) entre la secuencia diana del ácido nucleico y las regiones de migración de rama más la de extremos cohesivos del cebador más que un apareamiento erróneo (por ejemplo, cambio de un nucleótido individual), la primera hebra (complementaria) del cebador se unirá de manera estable a una diana en ausencia de un apareamiento erróneo pero no en presencia de un apareamiento erróneo. Si existe un apareamiento erróneo entre la primera hebra (complementaria) del cebador y la diana, el dúplex de cebador prefiere volver a formarse mediante regiones de equilibrio de hebra individual recién expuestas. De este modo, se reduce la frecuencia de comienzo de una reacción de síntesis de ácido nucleico en una posición incorrecta en una diana (o en una muestra, en este sentido). Este tipo de discriminación normalmente no es posible usando los cebadores convencionales de hebra individual de la técnica anterior dado que en esas reacciones no hay ninguna hebra de ácido nucleico competitiva (tal como la hebra protectora) a la que preferiría unirse una hebra de cebador con apareamiento erróneo. En algunas realizaciones, los cebadores descritos en el presente documento pueden ser significativamente más largos que los cebadores convencionales (por ejemplo, los usados para amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)) dado que los presentes cebadores se basan en la presencia de una hebra protectora competitiva para la especificidad más que en la temperatura de fusión para discriminar entre secuencias complementarias y con apareamiento erróneo. Por consiguiente, los presentes cebadores se pueden escoger y usar de manera que sean independientes de la temperatura.

Los dúplex de cebador descritos en el presente documento mejoran por tanto la especificidad, por ejemplo, de las reacciones de síntesis de ácido nucleico y, en algunas realizaciones, permiten un mayor grado de formación de estructuras multiplex de cebadores. Experimentos preliminares, cuyos resultados se proporcionan en el presente documento, muestran que el rendimiento de PCR de dianas cuasi-repetitivas puede mejorarse significativamente usando los dúplex de cebador proporcionados en el presente documento en comparación con los cebadores convencionales (por ejemplo, un 75 % frente a un 30 %). Los dúplex de cebador descrito en el presente documento también proporcionan la detección y amplificación específicas de ácido nucleico de una población heterogénea de ácidos nucleicos, tal como por ejemplo, detectar y amplificar un ADN bacteriano procedente de una muestra que comprende ADN humano, que tiene amplia aplicabilidad en la detección de organismos poco frecuentes tales como agentes de guerra biológica.

#### *Dúplex de cebador*

Tal como se usa en el presente documento, los cebadores de la divulgación pueden denominarse “dúplex de cebador” para abarcar que pueden proporcionarse y/o existir en una conformación en la que comprenden regiones de doble hebra. Por consiguiente, el término “cebador” y la expresión “dúplex de cebador” pueden usarse indistintamente.

Los dúplex de cebador proporcionan especificidad y cinética mejoradas con respecto a los cebadores existentes. Un “dúplex de cebador” en el presente documento se refiere a un cebador que comprende una primera hebra (denominada en el presente documento “hebra complementaria”) y una segunda hebra (denominada en el presente documento “hebra protectora”) que complementa parcialmente a la primera hebra. En algunas realizaciones, la hebra complementaria y la hebra protectora son moléculas de ácido nucleico de hebra individual independientes (Figuras 1A y 1B). En otras realizaciones, la hebra complementaria y la hebra protectora están conectadas entre sí y separadas por una región de horquilla para formar regiones contiguas de una molécula de ácido nucleico individual

(Figuras 2A y 2B). Tal como se usa en el presente documento, una “región de horquilla” es un bucle de hebra individual de nucleótidos que conecta dos regiones de doble hebra de un ácido nucleico. La estructura general de dúplex de cebador a modo de ejemplo se ilustra en las figuras y se describe en el presente documento. Ha de entenderse que, en la mayor parte de los casos, cuando se hace referencia a una región complementaria o una región protectora (o viceversa), cada región está normalmente dentro de un “dúplex de cebador” individual (o un sistema de cebador individual). Por ejemplo, una región de equilibrio complementaria en un cebador de la divulgación es complementaria a una región de equilibrio protectora en el mismo cebador de tal manera que una región de equilibrio complementaria de un cebador de la divulgación no se hibrida con una región de equilibrio protectora de un cebador independiente físicamente diferente.

En realizaciones en las que el cebador de la divulgación consiste únicamente en una hebra individual, la “hebra” complementaria puede denominarse la región complementaria, y la “hebra” protectora puede denominarse la región protectora.

En determinadas realizaciones, la hebra (o región) complementaria comprende una región de extremos cohesivos, una región de migración de rama complementaria y una región de equilibrio complementaria, mientras que la hebra (o región) protectora comprende una región de migración de rama protectora y una región de equilibrio protectora. Tal como se usa en el presente documento, una “región” de ácido nucleico es un tramo consecutivo de nucleótidos de cualquier longitud. Las regiones de extremos cohesivos y migración de rama están diseñadas cada una para ser complementarias a, y por tanto “con apareamiento de bases” con (por ejemplo, se hibridan con), regiones adyacentes en un ácido nucleico diana. Una región de una hebra complementaria que presenta apareamiento de bases con una región en un ácido nucleico diana se denomina región “específica de diana”. Las regiones de equilibrio están diseñadas para no ser complementarias a, y por tanto no presentar apareamiento de bases con, un ácido nucleico diana. Las regiones de equilibrio se denominan por tanto regiones “no específicas de diana”. En determinados aspectos, cuando la hebra (o región) complementaria y la hebra (o región) protectora se hibridan entre sí (son de doble hebra), se forma un dúplex de cebador. De este modo, en algunos aspectos, un dúplex de cebador comprende una región de extremos cohesivos de hebra individual específica de diana, una región de migración de rama de doble hebra específica de diana, y una región de equilibrio de doble hebra no específica de diana (Figuras 1A y 1B). En algunos casos, el dúplex de cebador también puede comprender un bucle de horquilla, tal como se describe con más detalle a continuación.

Los dúplex de cebador descritos en el presente documento pueden diseñarse para hibridarse específicamente con un ácido nucleico diana. La eficacia de un cebador, por ejemplo, en una reacción de amplificación de ácido nucleico, depende de la especificidad, eficiencia y fidelidad del cebador. Los cebadores de ácido nucleico típicos se unen a menudo a dianas falsas con un perfil termodinámico y cinético comparable al del mismo cebador que se une a su ácido nucleico diana específico pretendido, excepto entre las temperaturas de fusión del dúplex con apareamiento erróneo y el dúplex perfectamente hibridado. Por consiguiente, pueden distinguirse los dúplex perfectos y con apareamiento erróneo por sus temperaturas de fusión. Los cebadores de la divulgación en cambio, distinguen entre las dianas falsas y correctas de manera relativamente independiente de la temperatura.

Una “diana falsa” en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico que difiere de una molécula de ácido nucleico diana en al menos un nucleótido dentro de la región que se hibrida con la hebra complementaria. Por ejemplo, TCGACGGGG es una diana falsa, si la diana es TCGAAGGGG. En determinadas realizaciones, una diana falsa comprende al menos 2, al menos 3, al menos 4 o más cambios de nucleótidos con relación a la diana. La unión del cebador a las dianas falsas reduce la fidelidad (exactitud) de, por ejemplo, la amplificación de ácido nucleico. Los dúplex de cebador presentados en el presente documento se diseñan para alterar la energía libre estándar del desplazamiento de hebra con dianas falsas, permitiendo la discriminación entre las dianas correctas y las dianas falsas, incluyendo las dianas falsas que difieren de una diana correcta únicamente en un nucleótido. Tal como se describe en el presente documento, la hebra protectora es responsable de alterar la energía libre estándar para permitir que la hebra complementaria discrimine entre dianas correctas y falsas.

Los cebadores descritos en el presente documento se diseñan de manera racional para facilitar reacciones con desplazamiento de hebra con cinética y termodinámica ajustadas con precisión de tal manera que la cinética y termodinámica de reacciones con desplazamiento de hebra estén parcialmente desacopladas. Como resultado de este desacoplamiento, las reacciones que sólo son ligeramente favorables o incluso desfavorables termodinámicamente pueden tener, no obstante, una cinética tan rápida como la hibridación de dos hebras complementarias.

Por ejemplo, a 37 °C y Na<sup>+</sup> 1 M, la energía libre estándar ajustada a la concentración para la hibridación de un cebador con una diana perfectamente complementaria (correcta o específica) (es decir, el 100 % de apareamiento de nucleótidos) está entre 1,9 kcal/mol y 6,6 kcal/mol más favorable que la energía libre estándar ajustada a la concentración para la hibridación del mismo cebador con una diana falsa para cada nucleótido en que difiere la diana falsa de la diana pretendida. En determinadas realizaciones, los presentes dúplex de cebador usan reacciones con desplazamiento de hebra de intercambio de extremos cohesivos para traducir esta diferencia de 1,9 a 6,6 kcal/mol en la energía libre estándar ajustada a la concentración para una discriminación óptima entre la diana y las dianas falsas. Se describe un ejemplo de la termodinámica/cinética de la unión de dúplex de cebador a un ácido

nucleico diana tal como sigue con referencia a las Figuras 3A y 3B.

Para los propósitos de este ejemplo, el ácido nucleico diana tiene al menos dos regiones, (1) y (2). En determinadas realizaciones, la región (1) puede tener una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 (incluyendo 14-200 ó 20-200) nucleótidos, mientras que la región 2 puede ser más pequeña, por ejemplo, una longitud de aproximadamente 4 a aproximadamente 20 nucleótidos. Tal como se usa en el presente documento, los términos "nucleótido" y "bases" se usan indistintamente. La hebra protectora incluye una región de migración de rama protectora adyacente a una región de equilibrio protectora (3). La región de migración de rama protectora corresponde a la región diana 1, mientras que la región de equilibrio protectora (3) no corresponde a la región (1) ni a la región (2) ni a ninguna región inmediatamente en 5' con respecto a las regiones diana. Una secuencia, dominio o región de ácido nucleico es "inmediatamente adyacente a", "está inmediatamente en 5'" o "inmediatamente en 3'" con respecto a otra secuencia si las dos secuencias forman parte de la misma molécula de ácido nucleico y si ninguna base separa las dos secuencias. La hebra complementaria incluye una región de equilibrio complementaria (3), una región de migración de rama complementaria (1) y una región de extremos cohesivos (2). La región de equilibrio complementaria (3) es complementaria a la región de equilibrio protectora (3), la región de migración de rama complementaria (1) es complementaria a la región de migración de rama protectora y la región diana (1) (es decir, la región de migración de rama protectora y la región diana (1) son de secuencia idéntica y éstas se unen ambas a la región de migración de rama complementaria (1), y la región de extremos cohesivos (2) es complementaria a la región diana (2).

En determinadas realizaciones, la región de equilibrio se diseña de modo que su energía libre estándar ajustada a la concentración ( $\Delta G_{3:3}^{\circ}$ ) sea igual o aproximadamente igual a la energía libre estándar ajustada a la concentración para la región de extremos cohesivos unida a la región diana (2) ( $\Delta G_{2:2}^{\circ}$ ). En algunos casos, para un cebador

10 nanomolar (nM) usado en una reacción a 37 °C,  $|\Delta G_{2:2}^{\circ}|$  y  $|\Delta G_{3:3}^{\circ}|$  (indicando las barras verticales el valor absoluto) deben ser cada uno menores de aproximadamente 11,3 kcal/mol para garantizar la disociación de la hebra protectora completa de la diana.

En algunas realizaciones, cuando el dúplex de cebador interactúa con una molécula de ácido nucleico diana (correcta) específica (Figura 3A), la disociación de (3):(3) y la asociación de (2):(2) se equilibran entre sí, y las termodinámicas de hibridación de (1):(1) son idénticas para el ácido nucleico diana y para la hebra protectora que interactúa con la hebra complementaria. El cambio de energía libre total entre los dos estados es relativamente pequeño (por ejemplo, aproximadamente 1 kcal/mol), y la reacción alcanza rápidamente (por ejemplo, menos de un minuto) un equilibrio de aproximadamente 50:50. En determinadas realizaciones, la región de equilibrio puede diseñarse para tener una energía libre estándar muy próxima a la de la región de extremos cohesivos que se une a la región diana 2, de modo que el equilibrio sea, por ejemplo, de 60:40 ó 70:30. En algunas realizaciones, el diseño de la región de equilibrio también puede tener en cuenta otros factores contribuyentes al cambio de energía libre durante la reacción, tales como la hibridación entre la región de equilibrio protectora y las secuencias diana aguas arriba (que en algunos casos es despreciable), el confinamiento de una horquilla (si está presente), la temperatura de uso pretendida y la concentración de cebador pretendida.

En algunas realizaciones, cuando el dúplex de cebador interactúa con una molécula de ácido nucleico diana falsa (Figura 3B), la disociación de (3):(3) y la asociación de (2m):(2) no se equilibran dado que la región diana falsa (2m) no es totalmente complementaria a la región de extremos cohesivos. Por consiguiente, el equilibrio se desplaza al estado en el que el dúplex de cebador no se une a la diana falsa.

Explicado de otro modo, en algunos casos, la energía libre de la hebra complementaria unida a la hebra protectora es  $\Delta G_{3:3}^{\circ} + \Delta G_{1:1}^{\circ}$  (ignorando la contribución de la región de horquilla opcional y otras consideraciones), lo cual

equilibra la energía libre de la hebra complementaria unida a diana específica,  $\Delta G_{2:2}^{\circ} + \Delta G_{1:1}^{\circ}$ . En este ejemplo, este se debe a que la región de equilibrio (3) del dúplex de cebador se ha diseñado para tener una energía libre estándar ajustada a la concentración igual a (o aproximadamente igual a) la de la región diana (2). Cuando el dúplex de cebador interactúa con una diana falsa que tiene un cambio de un nucleótido individual (base) en la región diana (2m), la energía libre del sistema  $\Delta G_{2m:2}^{\circ} + \Delta G_{1:1}^{\circ}$  es menos negativa que la del dúplex de cebador, y por tanto se ve desfavorecido en el equilibrio.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "aproximadamente igual a" con referencia a la energía libre estándar significa que la primera energía libre a la que se hace referencia está dentro de un 10 % de la segunda energía libre a la que se hace referencia. En algunas realizaciones, una primera energía libre que es aproximadamente igual a una segunda energía libre está dentro de aproximadamente +3 kcal/mol a aproximadamente -3 kcal/mol de la segunda energía libre. Ha de entenderse que las diferencias entre las energías

verdaderas primera y segunda pueden ser menores que o aproximadamente de 1 kcal/mol, ser menores que o aproximadamente de 2 kcal/mol, ser menores que o aproximadamente de 3 kcal/mol, ser menores que o aproximadamente de 3,5 kcal/mol, o más, en algunas realizaciones.

5 Aunque la Figura 3B ilustra un cambio de un solo nucleótido correspondiente a la región (2)/(2m) de una molécula de ácido nucleico diana, los presentes dúplex de cebador también pueden discriminar entre una diana específica y una diana falsa que tiene un cambio de nucleótido en la región (1). Cuando la diana falsa tiene un cambio de una base individual en la región diana 1, entonces la energía libre estándar del dúplex de cebador después de la unión se

vuelve  $\Delta G_{2:2}^{\circ} + \Delta G_{1m:1}^{\circ}$  donde  $\Delta G_{1m:1}^{\circ}$  es la energía libre estándar de la región diana con apareamiento erróneo (1) que se une a la región complementaria (1) del dúplex de cebador. Debido al cambio de una base individual, la energía libre del dúplex de cebador es menos negativa que  $\Delta G_{3:3}^{\circ} + \Delta G_{1:1}^{\circ}$  (energía libre de cebador complementario unido al protector), de modo que se desplaza el equilibrio al estado en el que el dúplex de cebador no se une a la región diana falsa. Las energías libres estándar se pueden calcular teóricamente basándose en los conocimientos en la técnica y las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

15

#### *Hebras, regiones o dominios complementarios o protectores*

Los dominios complementarios de los sistemas de sonda de ácido nucleico descritos en el presente documento incluyen cada uno de ellos una pluralidad de regiones, incluyendo una región de extremos cohesivos y una o más regiones diana complementarias. Tanto la región de extremos cohesivos como una o más regiones diana complementarias tienen secuencias de ácido nucleico que son complementarias a secuencias de ácido nucleico del ácido nucleico diana. Por tanto, la región de extremos cohesivos y la región diana complementaria son capaces de presentar apareamiento de bases y formar por tanto un complejo con una secuencia de un ácido nucleico diana cuando el sistema de sonda de ácido nucleico se pone en contacto con un ácido nucleico diana en condiciones de hibridación apropiadas. Los dominios complementarios también pueden incluir una o más regiones de equilibrio complementarias. Una o más regiones de equilibrio complementarias se diseñan de manera racional. De este modo, las secuencias de una o más regiones de equilibrio complementarias no se diseñan para ser complementarias a una secuencia de ácido nucleico diana.

30 Una región de extremos cohesivos es complementaria a (y por tanto se hibrida con) una secuencia en la molécula de ácido nucleico diana; sin embargo, una región de extremos cohesivos no se hibrida con una hebra protectora. De este modo, cuando la hebra complementaria se hibrida con la molécula de ácido nucleico diana, la región de extremos cohesivos también se hibrida con la molécula de ácido nucleico diana, pero cuando la hebra complementaria se hibrida con la hebra protectora, la región de extremos cohesivos sigue siendo de hebra individual. Una región de extremos cohesivos puede situarse en el extremo 3' o el extremo 5' de la hebra complementaria (por ejemplo, es una extensión del extremo 3' o el extremo 5' de la hebra complementaria).

En determinadas realizaciones, una región de extremos cohesivos tiene una longitud de aproximadamente 4 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos, una longitud de aproximadamente 4 nucleótidos a aproximadamente 15 nucleótidos, o una longitud de aproximadamente 4 nucleótidos a aproximadamente 10 nucleótidos. En algunas realizaciones, una región de extremos cohesivos tiene una longitud de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, la región de extremos cohesivos tiene una longitud de más de 20 nucleótidos, incluyendo por ejemplo menos de o aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 nucleótidos o más.

45 La región de migración de rama complementaria es complementaria a una secuencia en la molécula de ácido nucleico diana y a la región de migración de rama protectora. De este modo, cuando la hebra complementaria se hibrida con una molécula de ácido nucleico diana, la región de migración de rama complementaria se hibrida con el ácido nucleico diana. Cuando la hebra complementaria se hibrida con su hebra protectora, la región de migración de rama complementaria se hibrida con la región de migración de rama protectora.

En determinadas realizaciones, una región de migración de rama tiene una longitud de no más de 200, 100, 75, 50, 40, 30, 25 ó 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, una región de migración de rama tiene una longitud de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 200 nucleótidos. En determinadas realizaciones, una región de migración de rama tiene una longitud de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 150 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, o de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos. En realizaciones particulares, una región de migración de rama tiene una longitud de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192,

60

193, 194, 195, 196, 197, 198, 199 ó 200 nucleótidos. En realizaciones particulares, una región de migración de rama puede tener una longitud de más de 200 nucleótidos, dependiendo de la molécula de ácido nucleico diana de interés.

5 Las regiones de equilibrio de una hebra complementaria y una hebra protectora son complementarias entre sí (es decir, forman un ácido nucleico de doble hebra) pero no son complementarias a la diana de interés (es decir, tampoco forman un ácido nucleico de doble hebra con la diana). De este modo, cuando una hebra complementaria se hibrida con una molécula de ácido nucleico diana, la región de equilibrio complementaria no se hibrida con la molécula de ácido nucleico diana. Cuando la hebra complementaria se hibrida con su hebra protectora, la región de equilibrio complementaria se hibrida con la región de equilibrio protectora.

15 El diseño de la región de equilibrio depende del diseño de la región de extremos cohesivos. En algunas realizaciones, la región de equilibrio se diseña de tal manera que el perfil termodinámico de la región de equilibrio sea comparable al de la región de extremos cohesivos. En algunas realizaciones, el perfil termodinámico se basa en un modelo teórico, usando por ejemplo, software Mfold disponible en el sitio web de información biológica de RPI. El número y/o la naturaleza de los nucleótidos dentro de una región de equilibrio son comparables los de la región de extremos cohesivos. Por ejemplo, si una región de extremos cohesivos se compone de un 40 % de nucleótidos A y T y un 60 % de nucleótidos G y C, entonces la región de equilibrio también debe comprender un 40 % de nucleótidos A y T y un 60 % de nucleótidos G y C. En realizaciones, la región de equilibrio se diseña de tal manera que no más de tres nucleótidos consecutivos sean complementarios a una secuencia en el ácido nucleico diana para evitar la unión de la región de equilibrio al ácido nucleico diana.

25 En algunas realizaciones, la longitud de una región de equilibrio es lo suficientemente corta de modo que la región complementaria y la protectora se disocian espontáneamente una de otra. En algunas realizaciones, una región de equilibrio tiene una longitud de aproximadamente 4 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos, una longitud de aproximadamente 4 nucleótidos a aproximadamente 15 nucleótidos, o una longitud de aproximadamente 4 nucleótidos a aproximadamente 10 nucleótidos. En algunas realizaciones, una región de equilibrio tiene una longitud de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, una región de equilibrio tiene más de 20 nucleótidos, incluyendo por ejemplo menos de aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 nucleótidos o más. En algunas realizaciones, el número de nucleótidos consecutivos que son complementarios a una secuencia de nucleótidos dentro del ácido nucleico diana puede ser mayor de tres, siempre que la región de equilibrio no se una al ácido nucleico diana.

35 En algunas realizaciones, por ejemplo aquellas en las que el dúplex de cebador contiene dos hebras de ácido nucleico independientes, el diseño de una región de equilibrio no depende de la concentración del dúplex de cebador ni de la temperatura a la que se forma/usa el dúplex de cebador. En algunas realizaciones, se diseña una región de equilibrio de tal manera que la energía libre estándar para la reacción en la que la hebra protectora se desplaza de la hebra complementaria por medio de la molécula de ácido nucleico diana sea próxima a cero kcal/mol. Tal como se usa en el presente documento, "próxima a cero" significa que la energía libre estándar para la reacción esté dentro de 3,5 kcal/mol a partir de 0 kcal/mol. En determinadas realizaciones, la energía libre estándar de esta reacción por desplazamiento está dentro de 3,5, 3,0, 2,5, 2,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 ó 0,1 kcal/mol de cero kcal/mol.

45 En otras realizaciones, por ejemplo aquellas en las que los dúplex de cebador están formados por una molécula individual de ácido nucleico (por ejemplo, una región de horquilla que separa la hebra complementaria (o región o dominio) y la hebra protectora (o región o dominio)), el diseño de una región de equilibrio dependerá de la concentración de dúplex de cebador así como de la temperatura de reacción. En tales realizaciones, se diseña una región de equilibrio de modo que la energía libre estándar para la reacción en la que la hebra protectora se desplaza de la hebra complementaria por medio del ácido nucleico diana más  $RT\ln(c)$  sea próxima a cero kcal/mol, donde R es la constante universal de los gases (0,0019858775(34) kcal/mol•K), T es la temperatura a la que se usa el dúplex de cebador, y c es la concentración a la que se usa el dúplex de cebador. En algunas realizaciones, la temperatura a la que se usan los dúplex de cebador es de aproximadamente 273K (0 °C), 277K, 283K, 288K, 293K, 298K, 303K, 308K, 313K, 318K, 323K, 328K, 333K, 338K, 343K, 348K, 353K, 358K o 363K (90 °C). En algunas realizaciones la concentración (c) a la que se usan los dúplex de cebador es de aproximadamente 1 nM, 2 nM, 3 nM, 4 nM, 5 nM, 10 nM, 15 nM, 20 nM, 25 nM, 30 nM, 35 nM, 40 nM, 45 nM, 50 nM, 55 nM, 60 nM, 65 nM, 70 nM, 75 nM, 80 nM, 85 nM, 90 nM, 95 nM, 100 nM, 125 nM, 150 nM, 175 nM, 200 nM, 225 nM, 250 nM, 300 nM, 350 nM, 400 nM, 450 nM, 500 nM, 600 nM, 700 nM, 800 nM, 900 nM o 1 mM. En determinadas realizaciones, la energía libre estándar de esta reacción por desplazamiento más  $RT\ln(c)$  está dentro de 3,5, 3,0, 2,5, 2,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 ó 0,1 kcal/mol de cero kcal/mol.

60 En algunas realizaciones, un dúplex de cebador puede incluir una o más regiones de horquilla que conectan la hebra complementaria a la hebra protectora. En determinadas realizaciones, la región de horquilla de un dúplex de cebador puede tener cualquier longitud. En algunas realizaciones, la región de horquilla tiene una longitud de más de 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 ó 3 nucleótidos. En algunas realizaciones, la secuencia de la horquilla no es complementaria a una secuencia de la molécula de ácido nucleico diana.

65



En determinadas realizaciones, la región de horquilla tiene una secuencia de poli-mononucleótido, tal como una secuencia de poli-adenosina, una secuencia de poli-desoxiadenosina, una secuencia de poli-5'-metiluridina, una secuencia de poli-timidina, una secuencia de poli-guanosina, una secuencia de poli-desoxiguanosina, una secuencia de poli-citidina, una secuencia de poli-desoxicitidina, una secuencia de poliuridina o una secuencia de poli-desoxiuridina.

El dúplex de cebador descrito en el presente documento puede estar en una de al menos dos orientaciones. Por ejemplo, en una orientación, la región de extremos cohesivos está ubicada en el extremo 5', inmediatamente adyacente a la región de migración de rama complementaria (es decir, sin nucleótidos participantes entre las dos regiones), y la región de equilibrio complementaria está ubicada en el extremo 3', inmediatamente adyacente a la región de migración de rama complementaria. En esta orientación, la región de equilibrio protectora está en el extremo 5' de la hebra protectora, inmediatamente adyacente a la región de migración de rama protectora (Figura 1A). En otra orientación, la región de extremos cohesivos está ubicada en el extremo 3', inmediatamente adyacente a la región de migración de rama complementaria, y la región de equilibrio complementaria está ubicada en el extremo 5', inmediatamente adyacente a la región de migración de rama complementaria. En esta orientación, la región de equilibrio protectora está en el extremo 3' de la hebra protectora, inmediatamente adyacente a la región de migración de rama protectora (Figura 1B).

Independientemente de la orientación, la secuencia de la región de equilibrio complementaria es tal que:

$$\left| \Delta G_1^o - \Delta G_2^o - \Delta G_3^o \right| \leq \Delta G_R^o,$$

donde:

$\Delta G_1^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de equilibrio protectora con la región de equilibrio complementaria;

$\Delta G_2^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de equilibrio protectora con la secuencia inmediatamente adyacente en la primera dirección con respecto a la secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna;

$\Delta G_3^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de extremos cohesivos con la segunda secuencia de ácido nucleico diana; y

$\Delta G_R^o$  es de 3,5 kcal/mol.

En algunas realizaciones, un dúplex de cebador comprende una hebra complementaria más larga que la región protectora, de manera que la diferencia de longitud depende de la longitud de la región de extremos cohesivos de la hebra complementaria. Las longitudes de los cebadores se diseñan de tal manera que la hibridación del complemento con la diana de interés tenga una energía libre estándar ( $\Delta G^o$ ) próxima a cero. La liberación de la hebra protectora (a partir del dúplex de cebador) garantiza que esta reacción de hibridación sea entrópicamente neutra y robusta con respecto a la concentración. Como resultado de ello, en algunas realizaciones, esta reacción a temperatura ambiente (por ejemplo, a aproximadamente 25 °C o aproximadamente 298K) iguala la especificidad de hibridación lograda cerca de la temperatura de fusión en muchas condiciones.

Tal como se pretende en el presente documento, una  $\Delta G^o$  (cambio en la energía libre estándar) "próxima a cero" se refiere a un valor absoluto (cantidad) de menos de o aproximadamente de 1 kcal/mol, menos de o aproximadamente 2 kcal/mol, menos de o aproximadamente 3 kcal/mol, o menos de o aproximadamente 3,5 kcal/mol. En algunas realizaciones, la energía libre estándar de una región de equilibrio o región de extremos cohesivos es  $>-1$  kcal/mol a  $< 1$  kcal/mol  $>-3$  kcal/mol a  $< 3$  kcal/mol o  $>-3,5$  kcal/mol a  $< 3,5$  kcal/mol.

Los dúplex de cebador se pueden preparar a una proporción de hebra protectora con respecto a hebra complementaria de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 5:1. En algunas realizaciones, la proporción de hebra protectora con respecto a hebra complementaria es de aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1 o aproximadamente 5:1. En algunas realizaciones, la proporción de hebra protectora con respecto a hebra complementaria es de 2:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1, 2,5:1, 2,6:1, 2,7:1, 2,8:1, 2,9:1, 3:1, 3,1:1, 3,2:1, 3,3:1, 3,4:1, 3,5:1, 3,6:1, 3,7:1, 3,8:1, 3,9:1, 4:1, 4,2:1, 4,3:1, 4,4:1, 4,5:1, 4,6:1, 4,7:1, 4,8:1, 4,9:1 ó 5:1. Los dúplex de cebador también pueden usarse junto con hebra protectora en exceso en cualquiera de los ensayos o las reacciones descritos en el presente documento. La hebra protectora puede estar en un exceso molar aproximadamente igual a o más de 2, 5, 10, 20, 50, 100 ó 500 veces con relación al cebador.

*Sistemas de dúplex de cebador de horquilla (por ejemplo, sistemas de hebra individual)*

En determinadas realizaciones, un dúplex de cebador incluye un solo ácido nucleico que comprende una región o un dominio complementario, una región de horquilla y una región o un dominio protector. En algunas realizaciones, el dominio complementario se hibrida con el dominio protector, formando un dúplex de cebador que tiene una región de bucle de horquilla participante. Como otros sistemas de cebador divulgados en el presente documento, tales sistemas de cebador de horquilla se diseñan para hibridarse específicamente con una molécula de ácido nucleico diana. En el presente documento, un “sistema de dúplex de cebador de horquilla” o un “sistema de horquilla” incluye una región de equilibrio complementaria, una región de migración de rama complementaria, una región de extremos cohesivos, una región de equilibrio protectora y una región de migración de rama protectora. Tal como se describió anteriormente, una región de equilibrio complementaria es complementaria a una región de equilibrio protectora; una región de migración de rama complementaria es complementaria a una región de migración de rama protectora y una región diana de ácido nucleico; y una región de extremos cohesivos es complementaria a una región diana de ácido nucleico. Una región de migración de rama protectora corresponde a una región diana de ácido nucleico y es complementaria a una región de migración de rama complementaria. Dado que los sistemas de dúplex de cebador de horquillas descritos en el presente documento están formados por una molécula individual de ácido nucleico, el diseño de la región de equilibrio complementaria dependerá de la temperatura y concentración a las que va a usarse el sistema de cebador, tal como se describe en el presente documento. Ha de entenderse que aunque puede usarse la secuencia de la molécula de ácido nucleico diana para describir las características de los sistemas de cebador, en algunas realizaciones, el propio ácido nucleico diana puede ser o no un componente del sistema de cebador (por ejemplo, sistemas de doble hebra o de hebra individual).

Para los dúplex de cebador que tienen una región de horquilla, puede considerarse la energía libre estándar del confinamiento de la región de horquilla cuando se determina la energía libre estándar para la reacción en la que la hebra protectora se desplaza de la hebra complementaria por parte del ácido nucleico diana. En la tabla 1 se proporcionan valores aproximados para la energía libre estándar de confinamiento de horquilla para horquillas de diversos tamaños (de SantaLucia y Hicks, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 33:414-440, (2004)).

Tamaño de horquilla	$\Delta G^\circ$ de confinamiento de horquilla
3 nt	3,5 kcal/mol
4 nt	3,5 kcal/mol
5 nt	3,3 kcal/mol
6 nt	4,0 kcal/mol
7 nt	4,2 kcal/mol
8 nt	4,3 kcal/mol
9 nt	4,5 kcal/mol
10 nt	4,6 kcal/mol
12 nt	5,0 kcal/mol
14 nt	5,1 kcal/mol
16 nt	5,3 kcal/mol
18 nt	5,5 kcal/mol
20 nt	5,7 kcal/mol
25 nt	6,1 kcal/mol
30 nt	6,3 kcal/mol

La energía libre estándar del confinamiento de las regiones de horquilla que tienen longitudes no proporcionadas en la Tabla 1 (por ejemplo, una longitud de  $n$ ) se puede estimar usando la siguiente ecuación:

$$\Delta G^\circ(\text{bucle} - n) = \Delta G^\circ(\text{bucle} - x) + 2,44RT \ln(n/x)$$

donde  $\Delta G^\circ(\text{bucle} - n)$  es la energía libre estándar desconocida del confinamiento de una región de horquilla de  $n$  nucleótidos de longitud,  $\Delta G^\circ(\text{bucle} - x)$  es la energía libre estándar conocida del confinamiento de una región de horquilla de  $x$  nucleótidos de longitud (por ejemplo, tal como se proporciona en la Tabla 1),  $R$  es la constante de los gases ideales, y  $T$  es la temperatura a la que va a usarse el dúplex de cebador. Se proporciona información adicional sobre el cálculo de energías libres estándar de la región de confinamiento de horquilla en SantaLucia y Hicks, *id.*

Los sistemas de dúplex de cebador de horquilla descritos en el presente documento pueden estar en una de al menos dos orientaciones. Por ejemplo, en una orientación mostrada en la Figura 2A, la región de extremos cohesivos está ubicada en el extremo 5' de la molécula de ácido nucleico. El extremo 5' de la región de migración de rama complementaria es inmediatamente adyacente al extremo 3' de la región de extremos cohesivos; el extremo 5' de la región de equilibrio complementaria es inmediatamente adyacente al extremo 3' de la región de migración de rama complementaria; el extremo 5' de la región de horquilla es inmediatamente adyacente al extremo 3' de la región de equilibrio complementaria; el extremo 5' de la región de equilibrio protectora es inmediatamente adyacente al extremo 3' de la región de horquilla; y el extremo 5' de la región de migración de rama protectora es

inmediatamente adyacente al extremo 3' de la región de equilibrio protectora. En esta orientación, cuando la molécula de ácido nucleico se somete a condiciones que permiten la hibridación, la región de horquilla forma un bucle que se extiende desde la región de equilibrio complementaria y la región de equilibrio protectora. En otra orientación mostrada en la Figura 2B, la región de extremos cohesivos está ubicada en el extremo 3' de la molécula de ácido nucleico. El extremo 3' de la región de migración de rama complementaria es inmediatamente adyacente al extremo 5' de la región de extremos cohesivos; el extremo 3' de la región de equilibrio complementaria es inmediatamente adyacente al extremo 5' de la región de migración de rama complementaria; el extremo 3' de la región de horquilla es inmediatamente adyacente al extremo 5' de la región de equilibrio complementaria; el extremo 3' de la región de equilibrio protectora es inmediatamente adyacente al extremo 5' de la región de horquilla; y el extremo 3' de la región de migración de rama protectora es inmediatamente adyacente al extremo 5' de la región de equilibrio protectora.

Independientemente de la orientación, la región de equilibrio complementaria del sistema de dúplex de cebador de horquilla tiene una secuencia tal que:

$$\left| \Delta G_1^{\circ} - \Delta G_2^{\circ} - \Delta G_3^{\circ} + \Delta G_4^{\circ} + RT \ln(c) \right| \leq \Delta G_R^{\circ},$$

donde:

$\Delta G_1^{\circ}$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de equilibrio protectora con la región de equilibrio complementaria;

$\Delta G_2^{\circ}$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de equilibrio protectora con la secuencia inmediatamente adyacente en la primera dirección con respecto a la secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna; y

$\Delta G_3^{\circ}$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de extremos cohesivos con la segunda secuencia de ácido nucleico diana;

$\Delta G_4^{\circ}$  es la energía libre estándar de confinamiento de la región de horquilla;

$R$  es la constante de los gases ideales;

$T$  es la temperatura a la que va a usarse el sistema de cebador;

$c$  es la concentración a la que va a usarse el sistema de cebador; y

$\Delta G_R^{\circ}$  es de 3,5 kcal/mol.

#### Otros sistemas de cebador

Se representan sistemas de cebador adicionales en las Figuras 4-7. Cada uno de estos sistemas de cebador incluye un dominio complementario y dos dominios protectores. El dominio complementario tiene una región individual de extremos cohesivos que está flanqueada por dos regiones de migración de rama complementarias y dos regiones de equilibrio complementarias. Cada uno de los dominios protectores incluye una región de migración de rama protectora que tiene una secuencia complementaria a la secuencia de una de las regiones de migración de rama complementaria, y una región de equilibrio protectora que tiene una secuencia que es complementaria a la secuencia de una de las regiones de equilibrio complementarias. La diferencia entre los sistemas de cebador de las Figuras 4-7 está en el número y ubicación de las regiones de horquilla, lo que afecta a su vez el diseño de las regiones de equilibrio complementarias. Como los demás sistemas de cebador divulgados en el presente documento, estos sistemas de cebador se diseñan para hibridarse específicamente con un ácido nucleico diana. Aunque se usa la secuencia del ácido nucleico diana para describir las características de un sistema de cebador, en algunas realizaciones, el ácido nucleico diana no es un componente del sistema de cebador.

Tal como se representa en la Figura 4, un sistema de cebador puede tener, en el orden de 3' a 5', un primer dominio protector, una primera región de horquilla, un dominio complementario, una segunda región de horquilla y un segundo dominio protector.

En dichas realizaciones, el primer dominio protector incluye una primera región de migración de rama protectora y una primera región de equilibrio protectora. La primera región de migración de rama protectora tiene una secuencia

que corresponde a una primera secuencia de ácido nucleico diana. La primera región de equilibrio protectora está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de migración de rama protectora y tiene una secuencia que no corresponde a la secuencia inmediatamente en 5' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna, en el ácido nucleico diana.

5 En esta realización, la primera región de horquilla está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de equilibrio protectora.

10 El dominio complementario de tales ácidos nucleicos diana comprende una primera región de equilibrio complementaria, una primera región de migración de rama complementaria, una región de extremos cohesivos, una segunda región de migración de rama complementaria y una segunda región de equilibrio complementaria. La primera región de equilibrio complementaria está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de horquilla y tiene una secuencia complementaria a la secuencia de la primera región de equilibrio protectora. La primera región de migración de rama complementaria está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de equilibrio complementaria y tiene una secuencia complementaria a una primera región de migración de rama protectora. La región de extremos cohesivos está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de migración de rama complementaria y tiene una secuencia que es complementaria a una segunda secuencia de ácido nucleico diana que está inmediatamente en 3' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana en el ácido nucleico diana. La segunda región de migración de rama complementaria está inmediatamente en 5' con respecto a la región de extremos cohesivos y tiene una secuencia complementaria a una tercera secuencia de ácido nucleico diana que está inmediatamente en 3' con respecto a la segunda secuencia de ácido nucleico diana en el ácido nucleico diana. La segunda región de equilibrio complementaria está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de migración de rama complementaria y tiene una secuencia que es no complementaria a una secuencia inmediatamente en 3' con respecto a la tercera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna, en el ácido nucleico diana.

En dichas realizaciones, la segunda región de horquilla está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de equilibrio complementaria.

30 En esta realización, el segundo dominio protector incluye una segunda región de equilibrio protectora y una segunda región de migración de rama protectora. La segunda región de equilibrio protectora está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de horquilla y tiene una secuencia complementaria a la segunda región de equilibrio complementaria. La segunda región de migración de rama protectora está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de equilibrio protectora y tiene una secuencia complementaria a la segunda región de migración de rama complementaria.

Según esta realización, la primera región de equilibrio complementaria y la segunda región de equilibrio complementaria tienen secuencias tales que:

$$40 \quad \left| \Delta G_1^o - \Delta G_2^o + \Delta G_3^o - \Delta G_4^o - \Delta G_5^o + \Delta G_6^o + \Delta G_7^o + RT \ln(c) \right| \leq \Delta G_R^o$$

donde:

45  $\Delta G_1^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la primera región de equilibrio protectora con la primera región de equilibrio complementaria;

$\Delta G_2^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la primera región de equilibrio complementaria con la secuencia inmediatamente en 5' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna;

50  $\Delta G_3^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la segunda región de equilibrio protectora con la segunda región de equilibrio complementaria;

$\Delta G_4^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la segunda región de equilibrio complementaria con la secuencia inmediatamente en 3' con respecto a la tercera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna;

55  $\Delta G_5^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de extremos cohesivos con la segunda secuencia de ácido nucleico diana;

$\Delta G_6^o$  es la energía libre estándar de confinamiento de la primera región de horquilla;

$\Delta G_7^o$  es la energía libre estándar de confinamiento de la segunda región de horquilla;

$R$  es la constante de los gases ideales;

$T$  es la temperatura a la que va a usarse el sistema de cebador;

$c$  es la concentración a la que va a usarse el sistema de cebador; y

$\Delta G_R^o$  es de 3,5 kcal/mol.

Tal como se representa en la Figura 5, en determinadas realizaciones, un sistema de cebador puede tener un cebador de horquilla y un protector, en el que el cebador de horquilla es un ácido nucleico que incluye un primer dominio protector, una primera región de horquilla, un dominio complementario y el protector es un ácido nucleico que incluye un segundo dominio protector.

En dichas realizaciones, el primer dominio protector incluye una primera región de migración de rama protectora y una primera región de equilibrio protectora. La primera región de migración de rama protectora tiene una secuencia que corresponde a una primera secuencia de ácido nucleico diana. La primera región de equilibrio protectora está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de migración de rama protectora y tiene una secuencia que no corresponde a la secuencia inmediatamente en 5' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna, en el ácido nucleico diana.

En esta realización, la región de horquilla está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de equilibrio protectora.

El dominio complementario de tales ácidos nucleicos diana comprende una primera región de equilibrio complementaria, una primera región de migración de rama complementaria, una región de extremos cohesivos, una segunda región de migración de rama complementaria y una segunda región de equilibrio complementaria. La primera región de equilibrio complementaria está inmediatamente en 5' con respecto a la región de horquilla y tiene una secuencia complementaria a la secuencia de la primera región de equilibrio protectora. La primera región de migración de rama complementaria está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de equilibrio complementaria y tiene una secuencia complementaria a una primera región de migración de rama protectora. La región de extremos cohesivos está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de migración de rama complementaria y tiene una secuencia que es complementaria a una segunda secuencia de ácido nucleico diana que está inmediatamente en 3' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana en el ácido nucleico diana. La segunda región de migración de rama complementaria está inmediatamente en 5' con respecto a la región de extremos cohesivos y tiene una secuencia complementaria a una tercera secuencia de ácido nucleico diana que está inmediatamente en 3' con respecto a la segunda secuencia de ácido nucleico diana en el ácido nucleico diana. La segunda región de equilibrio complementaria está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de migración de rama complementaria y tiene una secuencia que no es complementaria a una secuencia inmediatamente en 3' con respecto a la tercera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna, en el ácido nucleico diana.

En esta realización, el segundo dominio protector incluye una segunda región de equilibrio protectora y una segunda región de migración de rama protectora. La segunda región de equilibrio protectora tiene una secuencia complementaria a la segunda región de equilibrio complementaria. La segunda región de migración de rama protectora está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de equilibrio protectora y tiene una secuencia complementaria a la segunda región de migración de rama complementaria.

Según esta realización, la primera región de equilibrio complementaria y la segunda región de equilibrio complementaria tienen secuencias tales que:

$$\left| \Delta G_1^o - \Delta G_2^o + \Delta G_3^o - \Delta G_4^o - \Delta G_5^o + \Delta G_6^o \right| \leq \Delta G_R^o,$$

donde:

$\Delta G_1^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la primera región de equilibrio protectora con la primera región de equilibrio complementaria;

$\Delta G_2^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la primera región de equilibrio complementaria con la secuencia inmediatamente en 5' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna;

5  $\Delta G_3^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la segunda región de equilibrio protectora con la segunda región de equilibrio complementaria;

$\Delta G_4^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la segunda región de equilibrio complementaria con la secuencia inmediatamente en 3' con respecto a la tercera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna;

10  $\Delta G_5^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de extremos cohesivos con la segunda secuencia de ácido nucleico diana;

$\Delta G_6^o$  es la energía libre estándar de confinamiento de la región de horquilla; y

15  $\Delta G_R^o$  es de 3,5 kcal/mol.

Tal como se representa en la Figura 6, en determinadas realizaciones un sistema de cebador puede tener un protector y un cebador de horquilla, en el que el protector es un ácido nucleico que incluye un primer dominio protector y el cebador de horquilla es un ácido nucleico que incluye un dominio complementario, la región de horquilla y un segundo dominio protector.

En tales realizaciones, el primer dominio protector incluye una primera región de migración de rama protectora y una primera región de equilibrio protectora. La primera región de migración de rama protectora tiene una secuencia que corresponde a una primera secuencia de ácido nucleico diana. La primera región de equilibrio protectora está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de migración de rama protectora y tiene una secuencia que no corresponde a la secuencia inmediatamente en 5' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna, en el ácido nucleico diana.

El dominio complementario de dichos ácidos nucleicos diana comprende una primera región de equilibrio complementaria, una primera región de migración de rama complementaria, una región de extremos cohesivos, una segunda región de migración de rama complementaria y una segunda región de equilibrio complementaria. La primera región de equilibrio complementaria tiene una secuencia complementaria a la secuencia de la primera región de equilibrio protectora. La primera región de migración de rama complementaria está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de equilibrio complementaria y tiene una secuencia complementaria a una primera región de migración de rama protectora. La región de extremos cohesivos está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de migración de rama complementaria y tiene una secuencia que es complementaria a una segunda secuencia de ácido nucleico diana que está inmediatamente en 3' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana en el ácido nucleico diana. La segunda región de migración de rama complementaria está inmediatamente en 5' con respecto a la región de extremos cohesivos y tiene una secuencia complementaria a una tercera secuencia de ácido nucleico diana que está inmediatamente en 3' con respecto a la segunda secuencia de ácido nucleico diana en el ácido nucleico diana. La segunda región de equilibrio complementaria está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de migración de rama complementaria y tiene una secuencia que no es complementaria a una secuencia inmediatamente en 3' con respecto a la tercera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna, en el ácido nucleico diana.

Según dichas realizaciones, la región de horquilla está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de equilibrio complementaria.

En esta realización el segundo dominio protector incluye una segunda región de equilibrio protectora y una segunda región de migración de rama protectora. La segunda región de equilibrio protectora está inmediatamente en 5' con respecto a la región de horquilla y tiene una secuencia complementaria a la segunda región de equilibrio complementaria. La segunda región de migración de rama protectora está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de equilibrio protectora y tiene una secuencia complementaria a la segunda región de migración de rama complementaria.

Según esta realización, la primera región de equilibrio complementaria y la segunda región de equilibrio complementaria tienen secuencias tales que:

$$\left| \Delta G_1^o - \Delta G_2^o + \Delta G_3^o - \Delta G_4^o - \Delta G_5^o + \Delta G_6^o \right| \leq \Delta G_R^o,$$

donde:

5  $\Delta G_1^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la primera región de equilibrio protectora con la primera región de equilibrio complementaria;

$\Delta G_2^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la primera región de equilibrio complementaria con la secuencia inmediatamente en 5' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna;

10  $\Delta G_3^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la segunda región de equilibrio protectora con la segunda región de equilibrio complementaria;

15  $\Delta G_4^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la segunda región de equilibrio complementaria con la secuencia inmediatamente en 3' con respecto a la tercera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna; y

$\Delta G_5^o$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de extremos cohesivos con la segunda secuencia de ácido nucleico diana;

20  $\Delta G_6^o$  es la energía libre estándar de confinamiento de la región de horquilla; y

$\Delta G_R^o$  es de 3,5 kcal/mol.

25 Tal como se representa en la Figura 7, en determinadas realizaciones un sistema de cebador puede tener una primera región protectora, un cebador complementario y un segundo protector, en el que el primer protector es un ácido nucleico que incluye un primer dominio protector, el cebador complementario es un ácido nucleico que incluye un dominio complementario, y el segundo protector es un ácido nucleico que incluye un segundo dominio protector.

30 En dichas realizaciones, el primer dominio protector incluye una primera región de migración de rama protectora y una primera región de equilibrio protectora. La primera región de migración de rama protectora tiene una secuencia que corresponde a una primera secuencia de ácido nucleico diana. La primera región de equilibrio protectora está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de migración de rama protectora y tiene una secuencia que no corresponde a la secuencia inmediatamente en 5' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna, en el ácido nucleico diana.

35 El dominio complementario de tales ácidos nucleicos diana comprende una primera región de equilibrio complementaria, una primera región de migración de rama complementaria, una región de extremos cohesivos, una segunda región de migración de rama complementaria y una segunda región de equilibrio complementaria. La primera región de equilibrio complementaria tiene una secuencia complementaria a la secuencia de la primera región de equilibrio protectora. La primera región de migración de rama complementaria está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de equilibrio complementaria y tiene una secuencia complementaria a una primera región de migración de rama protectora. La región de extremos cohesivos está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de migración de rama complementaria y tiene una secuencia que es complementaria a una segunda secuencia de ácido nucleico diana que está inmediatamente en 3' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana en el ácido nucleico diana. La segunda región de migración de rama complementaria está inmediatamente en 5' con respecto a la región de extremos cohesivos y tiene una secuencia complementaria a una tercera secuencia de ácido nucleico diana que está inmediatamente en 3' con respecto a la segunda secuencia de ácido nucleico diana en el ácido nucleico diana. La segunda región de equilibrio complementaria está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de migración de rama complementaria y tiene una secuencia que es no complementaria a una secuencia inmediatamente en 3' con respecto a la tercera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna, en el ácido nucleico diana.

55 En esta realización, el segundo dominio protector incluye una segunda región de equilibrio protectora y una segunda región de migración de rama protectora. La segunda región de equilibrio protectora tiene una secuencia complementaria a la segunda región de equilibrio complementaria. La segunda región de migración de rama protectora está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de equilibrio protectora y tiene una secuencia complementaria a la segunda región de migración de rama complementaria.

Según esta realización, la primera región de equilibrio complementaria y la segunda región de equilibrio complementaria tienen secuencias tales que:

$$\left| \Delta G_1^{\circ} - \Delta G_2^{\circ} + \Delta G_3^{\circ} - \Delta G_4^{\circ} - \Delta G_5^{\circ} - RT \ln(c) \right| \leq \Delta G_R^{\circ},$$

donde:

5  $\Delta G_1^{\circ}$  es la energía libre estándar de hibridación de la primera región de equilibrio protectora con la primera región de equilibrio complementaria;

10  $\Delta G_2^{\circ}$  es la energía libre estándar de hibridación de la primera región de equilibrio complementaria con la secuencia inmediatamente en 5' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna;

$\Delta G_3^{\circ}$  es la energía libre estándar de hibridación de la segunda región de equilibrio protectora con la segunda región de equilibrio complementaria;

15  $\Delta G_4^{\circ}$  es la energía libre estándar de hibridación de la segunda región de equilibrio complementaria con la secuencia inmediatamente en 3' con respecto a la tercera secuencia de ácido nucleico diana, si hubiera alguna; y

20  $\Delta G_5^{\circ}$  es la energía libre estándar de hibridación de la región de extremos cohesivos con la segunda secuencia de ácido nucleico diana;

$R$  es la constante de los gases ideales;

$T$  es la temperatura a la que va a usarse el sistema de cebador;

25  $c$  es la concentración a la que va a usarse el sistema de cebador; y

$\Delta G_R^{\circ}$  es de 3,5 kcal/mol.

*Sistemas de dúplex de cebador que carecen de dominios de equilibrio*

30 En algunas realizaciones, los sistemas de cebador pueden carecer de dominios de equilibrio. Dichos ácidos nucleicos se hibridarán con un ácido nucleico diana con cinética rápida si el ácido nucleico diana tiene una secuencia complementaria a la secuencia de la región de extremos cohesivos del sistema de cebador, pero con cinética lenta si el ácido nucleico diana se muta de modo que no contenga una secuencia complementaria a la  
35 región de extremos cohesivos del sistema de cebador. Dichos sistemas de cebador son por tanto útiles, por ejemplo, para localizar diferencias y/o mutaciones en dianas de ácido nucleico usando discriminación cinética.

Tal como se representa en la Figura 8, en determinadas realizaciones, un sistema de cebador puede incluir un ácido nucleico que tenga, en el orden de 3' a 5', un primer dominio protector, una primera región de horquilla, un dominio  
40 complementario, una segunda región de horquilla y un segundo dominio protector. El primer dominio protector de dichos sistemas de cebador tiene una secuencia que corresponde a una primera secuencia de ácido nucleico diana. La primera región de horquilla está inmediatamente en 5' con respecto al primer dominio protector. El dominio complementario tiene una primera región de migración de rama complementaria, una región de extremos cohesivos y una segunda región de migración de rama complementaria. La primera región de migración de rama  
45 complementaria está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de horquilla y tiene una secuencia complementaria a la secuencia de migración de rama del primer dominio protector. La región de extremos cohesivos está inmediatamente en 5' con respecto a la primera región de migración de rama complementaria y tiene una secuencia complementaria a una segunda secuencia de ácido nucleico diana que está inmediatamente en 3' con respecto a la primera secuencia de ácido nucleico diana en la molécula de ácido nucleico diana. La segunda región de migración de rama complementaria está inmediatamente en 5' con respecto a la región de extremos cohesivos y tiene una secuencia complementaria a una tercera secuencia de ácido nucleico diana que está inmediatamente en 3' con respecto a la segunda secuencia de ácido nucleico. La segunda región de horquilla está inmediatamente en 5' con respecto a la segunda región de migración de rama complementaria. El segundo dominio protector tiene una  
50 secuencia que es complementaria a la secuencia de la segunda región de migración de rama complementaria.

*Modificaciones de cebador en general*

55 Cada cebador descrito en el presente documento puede comprender ADN, ARN, o análogos de los mismos, y/o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, un cebador comprende uno o más nucleótidos no



naturales. La incorporación de nucleótidos no naturales en los cebadores puede aumentar adicionalmente el rendimiento de los dúplex de cebador. En particular, puede suceder que la hebra protectora, mientras que no se pretenda que sirva para iniciar la transcripción, sea complementaria a otras regiones de la diana u otras moléculas de fondo, y pueda iniciar falsamente la replicación/transcripción. Para impedir esto, el uso de un nucleótido no natural o un didesoxinucleótido en el extremo 3' de la segunda hebra protectora puede servir para impedir el cebado no deseado por esa hebra. Los ejemplos de nucleótidos no naturales incluyen, pero no se limitan a, iso-C, iso-G, desoxiuridina (véase también Krueger *et al. Chem Biol.* 16:242-48 (2009).

En algunas realizaciones, por ejemplo, en una reacción en cadena de polimerasa (PCR) en la que se usa una función enzimática cebada repetida, la hebra complementaria extendida puede convertirse en una diana para la hibridación posterior del cebador. Para preservar la especificidad de hibridación del cebador para tandas de amplificación posteriores, no puede replicarse una región de equilibrio de un cebador. La introducción de un nucleótido no natural en la interfaz entre las regiones de migración de rama y de equilibrio de la hebra complementaria, por ejemplo, puede evitar que se replique la región de equilibrio.

En determinadas realizaciones, los cebadores descritos en el presente documento sirven como puntos de partida para extensiones de polimerasa. Para facilitar el análisis de los fragmentos amplificados (ácido nucleico), también pueden usarse cebadores marcados en reacciones PCR. Los cebadores marcados son aquellos que se acoplan (o conjugan) a un resto detectable. Los ejemplos incluyen colorantes fluorescentes, marcadores radiactivos y metales identificables, secuencias de ácido nucleico y proteínas. Cuando se lleva a cabo una reacción con cebadores marcados con fluorescencia, pueden generarse amplicones (productos de ácido nucleico) con un marcador fluorescente.

Los cebadores descritos en el presente documento se pueden sintetizar mediante cualquier método conocido en la técnica (véanse, por ejemplo, Ogilvie *et al. J. Amer. Chem. Soc.* 99 (23): 7741-7743; Reese, C. B. *Tetrahedron* 34(21): 3143 (1978); Efimov *et al. Nucleic Acids Res.* 11(23): 8369-8387 (1983); Garegg *et al. Tetrahedron Lett.* 27(34): 4051 (1986); Beaucage *et al. Tetrahedron* 48(12): 2223 (1992); Efimov *et al. Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 26 (8-9): 1087-93 (2007).

### Moléculas de ácido nucleico diana

Una "diana" puede ser un ácido nucleico de hebra individual (mc) o de doble hebra (bc). Los ácidos nucleicos diana pueden ser, por ejemplo, ADN, ARN, o el producto de ADN de ARN sometido a transcripción inversa. En algunas realizaciones, una diana puede ser una mezcla (quimera) de ADN y ARN. En otras realizaciones, una diana comprende análogos artificiales de ácido nucleico, por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos (Nielsen *et al. Science* 254(5037): 1497-500 (1991)) o ácidos nucleicos bloqueados (Alexei *et al. Tetrahedron* 54(14): 3607-30 (1998)). En algunas realizaciones, se puede producir una diana de manera natural (por ejemplo, ADN genómico) o puede ser sintética (por ejemplo, a partir de una biblioteca genómica). Tal como se usa en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico "de origen natural" es una secuencia que está presente en moléculas de ácido nucleico de organismos o virus que existen en la naturaleza en ausencia de intervención humana. En algunas realizaciones, una diana es ADN genómico, ARN mensajero, ARN ribosómico, micro-ARN, pre-micro-ARN, pro-micro-ARN, ADN vírico, ARN vírico o ARN asociado a Piwi. En determinadas realizaciones, un ácido nucleico diana es un ácido nucleico de origen natural en un organismo o virus. En algunas realizaciones, un ácido nucleico diana es el ácido nucleico de un organismo o virus patógeno. En determinadas realizaciones, la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana en un sujeto es indicativa de que el sujeto tiene una enfermedad o un trastorno o está predispuesto a adquirir una enfermedad o un trastorno. En determinadas realizaciones, la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana en un sujeto es indicativa de que el sujeto responderá bien o escasamente a un tratamiento, tal como un fármaco, para tratar una enfermedad o un trastorno.

Los términos "polinucleótido", "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" se usan indistintamente. Se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, o bien desoxirribonucleótidos o bien ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional, y pueden realizar cualquier función. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: regiones codificantes o no codificantes de un gen o fragmento génico, loci (locus) definidos a partir del análisis de unión, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si están presentes, las modificaciones a la estructura de nucleótidos pueden conferirse antes o después del ensamblaje del polímero. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente, tal como mediante conjugación con un componente de marcaje. El término polinucleótido "recombinante" significa un polinucleótido de origen genómico, ADNc, semisintético o sintético que, bien no se produce en la naturaleza o bien se une a otro polinucleótido en una configuración no natural. La expresión "ácido nucleico aislado" se refiere a un polinucleótido de origen natural o sintético o alguna combinación de los mismos, que (1) no se asocia con la célula en la que el "ácido nucleico aislado" se encuentra en la naturaleza, y/o (2) está operativamente unido a un polinucleótido al que no se une en la naturaleza.

Un ácido nucleico también puede englobar ADN y ARN de hebra individual o doble, así como todas y cada una de las formas de ácido nucleico alternativo que contienen cadenas principales, bases y azúcares modificados. Por tanto, se entenderá que la expresión “ácido nucleico” incluye, pero no se limita a, ADN o ARN de hebra individual o doble (y formas de los mismos que pueden ser parcialmente de hebra individual o parcialmente de doble hebra), ADNc, aptámeros, ácidos nucleicos peptídicos (“PNA”), ADN 2'-5' (un material sintético con una cadena principal acortada que tiene un espaciado de bases que concuerda con la conformación A de ADN; el ADN 2'-5' no se hibrida normalmente con ADN en la forma B, pero se hibrida fácilmente con ARN), y ácidos nucleicos bloqueados (“LNA”). Los análogos de ácido nucleico incluyen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades similares o mejoradas de unión, hibridación de apareamiento de bases. Las formas “análogas” de purinas y pirimidinas se conocen bien en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, aziridinilcitosina, 4-acetilcitosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5-metoxiuracilo, 2-metil-5-isopenteniladenina, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, ácido uracil-5-oxiacético y 2,6-diaminopurina. Los análogos de cadena principal de ADN proporcionados en el presente documento incluyen fosfodiéster, fosforotioato, fosforditioato, metilfosfonato, fosforamidato, alquilfosfotriéster, sulfamato, 3'-tioacetal, metilen(metilimino), 3'-N-carbamato, morfolinocarbamato, y ácidos nucleicos peptídicos (PNA), uniones metilfosfonato o uniones alternas metilfosfonato y fosfodiéster (Strauss-Soukup, 1997, *Biochemistry* 36:8692-8698), y uniones bencilfosfonato, tal como se comenta en la patente de EE.UU. N.º 6.664.057; véase también OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES, A PRACTICAL APPROACH, editado por F. Eckstein, IRL Press en Oxford University Press (1991); Antisense Strategies, *Annals of the New York Academy of Sciences*, Volumen 600, Eds. Baserga y Denhardt (NYAS 1992); Milligan, 1993, *J. Med. Chem.* 36:1923-1937; Antisense Research and Applications (1993, CRC Press). Los ácidos nucleicos del presente documento pueden extraerse a partir de células o se pueden preparar de manera sintética según cualquier medio conocido por los expertos en la técnica; por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden sintetizarse químicamente o transcribirse o someterse a transcripción inversa a partir de ADNc o ARNm, entre otras fuentes.

Tal como se usa en el presente documento, dos ácidos nucleicos o regiones de ácido nucleico “se corresponden” entre sí en caso de que ambas sean complementarias con respecto a la misma secuencia de ácido nucleico. Dos ácidos nucleicos o regiones de ácido nucleico son “complementarias” entre sí en caso de presentar apareamiento de bases entre sí para formar una molécula de ácido nucleico de doble hebra.

Los ácidos nucleicos diana utilizados en el presente documento pueden ser cualquier ácido nucleico, por ejemplo, ácidos nucleicos humanos, ácidos nucleicos bacterianos o ácidos nucleicos víricos. Una muestra de ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, una muestra de ácido nucleico de una o más células, tejidos o fluidos corporales. Las muestras diana pueden proceder de cualquier fuente incluyendo, pero sin limitarse a, eucariotas, plantas, animales, vertebrados, peces, mamíferos, humanos, animales no humanos, bacterias, microbios, virus, fuentes biológicas, suero, plasma, sangre, orina, semen, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, biopsias, biopsias por punción con aguja, cánceres, tumores, tejidos, células, lisados celulares, lisados celulares en bruto, lisados tisulares, células en cultivo tisular, frotis bucales, enjuagues bucales, deposiciones, tejido momificado, fuentes forenses, autopsias, fuentes arqueológicas, infecciones, infecciones hospitalarias, fuentes de producción, preparaciones farmacológicas, producciones de moléculas biológicas, preparaciones de proteínas, preparaciones de lípidos, preparaciones de hidratos de carbono, objetos inanimados, aire, suelo, savia, metal, fósiles, materiales de excavación, y/o otros materiales y fuentes terrestres o extraterrestres. La muestra también puede contener mezclas de un material de una fuente o diferentes fuentes. Por ejemplo, pueden amplificarse ácidos nucleicos de una bacteria o virus infectivo junto con ácidos nucleicos humanos cuando se amplifican ácidos nucleicos de dichas células o tejidos infectados usando los métodos divulgados. Los tipos de muestras diana útiles incluyen muestras de eucariotas, muestras de plantas, muestras de animales, muestras de vertebrados, muestras de peces, muestras de mamíferos, muestras humanas, muestras no humanas, muestras bacterianas, muestras microbianas, muestras víricas, muestras biológicas, muestras de suero, muestras de plasma, muestras de sangre, muestras de orina, muestras de semen, muestras de líquido linfático, muestras de líquido cefalorraquídeo, muestras de líquido amniótico, muestras de biopsia, muestras de biopsia por punción con aguja, muestras de cáncer, muestras de tumor, muestras de tejido, muestras de células, muestras de lisado celular, muestras de lisado celular en bruto, muestras de lisado tisular, muestras de células en cultivo tisular, muestras de frotis bucal, muestras de enjuague bucal, muestras de deposiciones, muestras de tejido momificado, muestras de autopsia, muestras arqueológicas, muestras de infección, muestras de infección hospitalaria, muestras de producción, muestras de preparación farmacológica, muestras de producción de moléculas biológicas, muestras de preparación de proteínas, muestras de preparación de lípidos, muestras de preparación de hidratos de carbono, muestras de objeto inanimado, muestras de aire, muestras de suelo, muestras de savia, muestras de metal, muestras de fósiles, muestras de material de excavación y/u otras muestras terrestres o extraterrestres.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos diana utilizados en el presente documento comprenden una secuencia repetitiva, estructura secundaria y/o un alto contenido de G/C.

En determinadas realizaciones, una molécula de ácido nucleico diana de interés tiene una longitud de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000.000 nucleótidos (nt). En algunas realizaciones, la diana tiene una longitud de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000, de aproximadamente 1000 a aproximadamente 10.000, de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 100.000, o de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 1.000.000 nucleótidos. En algunas realizaciones, la diana tiene una longitud de aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800, aproximadamente 900, aproximadamente 1.000, aproximadamente 2.000, aproximadamente 3.000, aproximadamente 4.000, aproximadamente 5.000, aproximadamente 6.000, aproximadamente 7.000, aproximadamente 8.000, aproximadamente 9000, aproximadamente 10.000, aproximadamente 20.000, aproximadamente 30.000, aproximadamente 40.000, aproximadamente 50.000, aproximadamente 60.000, aproximadamente 70.000, aproximadamente 80.000, aproximadamente 90.000, aproximadamente 100.000, aproximadamente 200.000, aproximadamente 300.000, aproximadamente 400.000, aproximadamente 500.000, aproximadamente 600.000, aproximadamente 700.000, aproximadamente 800.000, aproximadamente 900.000 o aproximadamente 1.000.000 nucleótidos. Ha de entenderse que el ácido nucleico diana puede proporcionarse en el contexto de un ácido nucleico más largo (por ejemplo, tal como una secuencia de codificación o un gen dentro de un cromosoma o un fragmento de cromosoma).

En determinadas realizaciones, una diana de interés es lineal, mientras que en otras realizaciones, una diana es circular (por ejemplo, ADN de plásmido, ADN mitocondrial o ADN plástido).

#### *Sistemas cebador-diana combinados*

En algunas realizaciones, se proporcionan en el presente documento sistemas cebador-diana. Un sistema cebador-diana comprende una o más dianas de ácido nucleico, una polimerasa y uno o más cebadores (por ejemplo, dúplex de cebador y/o dúplex de cebador de horquilla). El término "cebador" engloba uno cualquiera de los cebadores o sistemas de cebador descritos en el presente documento (por ejemplo, cebadores de hebra individual, dúplex de cebador de doble hebra y dúplex de cebador de horquilla). En determinadas realizaciones, los sistemas cebador-diana descritos en el presente documento comprenden una pluralidad de diferentes cebadores. En algunas realizaciones, un sistema cebador-diana puede comprender al menos dos cebadores, que pueden usarse para identificar y, por ejemplo amplificar, una molécula de ácido nucleico diana. Una molécula de ácido nucleico diana puede estar presente entre una pluralidad de moléculas de ácido nucleico que no sean diana, por ejemplo, como una copia individual o en un bajo número de copias. Uno cualquiera de los sistemas cebador-diana descritos en el presente documento puede comprender condiciones similares a las usadas en reacciones de secuenciación o amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, reactivos, temperatura de reacción similares, etc.).

#### *Métodos de uso*

Los sistemas de cebador descritos en el presente documento son capaces de discriminar una diana específica de dianas falsas bien a través de un mecanismo termodinámico o bien a través de un mecanismo cinético. En la distinción de la diana frente a dianas falsas usando un mecanismo termodinámico (descrito a continuación), se ejecuta la reacción por desplazamiento de hebra hasta que se completa y se distingue la diana de las dianas falsas basándose en diferencias de afinidad de unión en equilibrio. Para distinguir la diana de dianas falsas usando un mecanismo cinético (descrito a continuación), la reacción por desplazamiento de hebra se detiene antes de alcanzar el equilibrio, y se usa la tasa diferencial para completar la reacción con objeto de distinguir las dianas de las dianas falsas.

#### *Separación termodinámica*

La estrategia general para el mecanismo tanto termodinámico como cinético consiste en usar reacciones de desplazamiento de hebra de intercambio de extremos cohesivos. En general, el intercambio de extremos cohesivos implica la extensión de un complemento de la diana con una región adicional que no es complementaria a la diana, y la pre-hibridación de una hebra protectora con esta hebra complementaria extendida y un gran número de bases adyacentes a la región extendida, pero no con una región de extremos cohesivos de hebra individual.

La Figura 9 representa una implementación de intercambio de extremos cohesivos. En esta implementación, se usa un sistema de dúplex de cebador de doble hebra (tal como se describió anteriormente y se representa en la Figura 1A) para distinguir entre un ácido nucleico diana y una diana falsa. La región de migración de rama complementaria y la región de extremos cohesivos de la hebra complementaria tienen secuencias que corresponden a una primera secuencia diana y una segunda secuencia diana, respectivamente. Se diseñó una región de equilibrio complementaria para que tuviese la misma longitud y distribución de bases de nucleótido que la región de extremos cohesivos. De este modo, la energía libre estándar de la reacción por desplazamiento de hebra mostrada en la Figura 9A entre la diana verdadera y el complemento protegido es de aproximadamente  $\Delta G^\circ = 0$  kcal/mol.

La reacción por desplazamiento de hebra puede escribirse como:

Diana + complemento / protector  $\leftrightarrow$  Diana / complemento + protector

$\Delta G^\circ$  está relacionada con la constante de equilibrio  $K_{eq}$  mediante la siguiente relación:

$$\Delta G^\circ = RT \ln(K_{eq}).$$

5 Para una reacción con  $\Delta G^\circ = 0$ , la constante de equilibrio ( $K_{eq}$ ) es 1. La constante de equilibrio también está relacionada con el equilibrio; para esta reacción,  $K_{eq} = [TC] [P] / [T] [PC] = 1$ . Para un ensayo en el que [PC] y [P] están en exceso con respecto a [T],  $[TC] / [T] = 1$ , lo que significa que exactamente la mitad de todas las moléculas diana se hibridan en el equilibrio. En el ejemplo mostrado en la Figura 9A,  $\Delta G^\circ = +0,1$  kcal/mol, lo que corresponde a  $K_{eq} = 0,85$ , lo que significa que el 46 % de las moléculas diana se hibridan en el equilibrio.

10 La hebra protectora cambia de manera correspondiente la energía libre estándar de la reacción de desplazamiento de hebra con dianas falsas. En el ejemplo mostrado en la Figura 9B, la diana falsa difiere de la diana verdadera en una base individual, lo que da como resultado que la reacción de desplazamiento de hebra con el mismo sistema de cebador de ácido nucleico de doble hebra que tiene un valor de  $\Delta G^\circ$  de +3,7 kcal/mol, que corresponde a  $K_{eq} = 1,9 \cdot 10^{-3}$ . En el equilibrio, únicamente el 0,19 % de la diana falsa se hibrida con el complemento. Por tanto, el sistema de cebador de ácido nucleico a modo de ejemplo representado en la Figura 8 se une preferentemente a su diana frente a una diana falsa que únicamente tiene un apareamiento erróneo de un solo nucleótido en más de 200 veces.

20 La Figura 10 es un diagrama de la afinidad de unión en equilibrio en función de la energía libre estándar de la reacción. Cuando la energía libre estándar de la reacción es muy negativa (como en el caso en una reacción de hibridación pura), tanto la diana como las dianas falsas se unen de manera muy fuerte, y es difícil para distinguir entre las dos, lo que conduce a falsos positivos. Por otra parte, cuando la energía libre estándar de la reacción es muy positiva, el cebador se une a la diana de manera muy débil, lo que conduce a falsos negativos. El diseño de un sistema de dúplex de cebador para que tenga una energía libre estándar casi cero da como resultado una discriminación óptima entre dianas y dianas falsas, minimizando de ese modo los falsos positivos y falsos negativos.

#### *Separación cinética*

30 La separación cinética se basa en la cinética diferencial de intercambio de extremos cohesivos. La cinética de la reacción de intercambio de extremos cohesivos depende de las intensidades de unión de las regiones de extremos cohesivos. Cada kcal/mol de diferencia en la energía de unión de extremos cohesivos puede afectar a la cinética en un factor de 5,4 (Figura 11), de modo que el apareamiento erróneo de +3,6 kcal/mol mostrado en la Figura 9B produciría una ralentización cinética de 434.

35 A diferencia de en la discriminación termodinámica, la discriminación cinética se produce únicamente cuando el apareamiento erróneo está en la región de extremos cohesivos. Es improbable que las dianas falsas que difieren de la diana verdadera en una posición complementaria a la región de migración de rama complementaria produzcan una cinética de reacción significativamente diferente. Como consecuencia, son útiles métodos que usan el mecanismo cinético de distinción de diana con respecto a diana falsa junto con separación termodinámica como medio de identificación precisa de las ubicaciones de apareamientos erróneos de diana/cebador.

40 Significativamente, pueden usarse sistemas de dúplex de cebador que carecen de regiones de equilibrio complementarias, tales como los sistemas de cebador representados en la Figura 8, en métodos que aprovechan el mecanismo cinético para identificar con precisión la ubicación de apareamientos erróneos de diana/cebador.

#### *Micromatrices*

50 A menudo se usan de micromatrices de ácido nucleico para la detección de ácido nucleicos de alto rendimiento, pero a menudo son incapaces de distinguir entre secuencias de ácido nucleico estrechamente relacionadas. En algunas realizaciones, los sistemas de dúplex de cebador descritos en el presente documento pueden usarse en micromatrices de ácido nucleico para mejorar, por ejemplo, la especificidad de análisis de las micromatrices. En algún caso, pueden realizarse ensayos de micromatrices usando métodos bien conocidos en la técnica, con la excepción de que los sistemas de dúplex de cebador descritos en el presente documento pueden usarse en lugar de los cebadores de ácido nucleico convencionales.

60 Por ejemplo, tal como se representa en la Figura 12A, en determinadas realizaciones, un sistema de dúplex de cebador de horquilla puede sintetizarse o inmovilizarse directamente en un chip de micromatriz usando técnicas convencionales. En otras realizaciones, puede usarse un sistema de dúplex de cebador de doble hebra en una micromatriz de ácido nucleico. En alguna realización, pueden sintetizarse estructuras de horquilla que incluyen dos bases fotoescindibles en posiciones predefinidas como en la Figura 12A. La exposición posterior a luz escinde la horquilla, produciendo los complejos de doble hebra funcionalizados en la superficie del alineamiento (Figura 12B). También pueden usarse otros métodos, tales como el uso de enzimas de corte o restricción, para preparar complejos de doble hebra.

65

*Reacciones de síntesis de ácido nucleico, incluyendo reacciones de amplificación*

Los sistemas y dúplex de cebador divulgados en el presente documento pueden usarse en algunas realizaciones para mejorar la especificidad de una reacción de amplificación basada en cebador, incluyendo la reacción en cadena de polimerasa (PCR), amplificación por desplazamiento de hebra o amplificación mediada por transcripción, sustituyendo los cebadores de ácido nucleico por un sistema de dúplex de cebador descrito en el presente documento en una reacción de amplificación basada en cebador conocida en la técnica.

Por ejemplo, tal como se representa en la Figura 13, usando como cebadores de PCR los sistemas de dúplex de cebador de horquilla del tipo representado en la Figura 4, es posible mejorar la especificidad de PCR para una variedad de aplicaciones (por ejemplo, biotecnológicas). En este ejemplo, se amplifica una secuencia de ácido nucleico diana formando una disolución que comprende un sistema de dúplex de cebador con el ácido nucleico diana y reactivos convencionales para realizar una reacción de amplificación e incubando la disolución en condiciones tales que se produzca una reacción de amplificación. En determinadas realizaciones, se incorporan bases no naturales en un sistema de dúplex de cebador de horquilla para impedir la replicación de la propia horquilla.

En algunas realizaciones, los dúplex de cebador descritos en el presente documento pueden adaptarse para su uso en la amplificación de ácidos nucleicos diana que normalmente requieren amplificación mediante uno cualquiera o más de los siguientes métodos de PCR: PCR específica de alelo, PCR de ensamblaje, PCR asimétrica, amplificación dependiente de helicasa, PCR específica de intersecuencias (ISSR), PCR inversa, PCR mediada por unión, PCR específica de metilación (MSP), PCR de minicebadores, PCR múltiplex, PCR anidada, PCR de extensión por solapamiento, PCR cuantitativa (Q-PCR), PCR con transcripción inversa (RT-PCR), PCR en fase sólida, PCR térmica de entrelazado asimétrico (TAIL-PCR), o PCR *touchdown* (con rampa decreciente de temperatura). En algunos casos, los dúplex de cebador y los métodos descritos en el presente documento se pueden usar o adaptar para su uso en uno cualquiera de los métodos de PCR anteriores o pueden sustituir (usarse en lugar de) a uno cualquiera de los métodos de PCR anteriores. A continuación se presenta una breve descripción de cada uno de los métodos de PCR anteriores.

La PCR específica de alelo es una técnica de diagnóstico o clonación basada en polimorfismos de nucleótido individual (SNP) (diferencias de base individual en el ADN). Requiere normalmente el conocimiento previo de una secuencia de ADN, incluyendo diferencias entre alelos.

La PCR de ensamblaje o ensamblaje cíclico de polimerasa (PCA) es una síntesis artificial de secuencias de ADN largas realizando PCR en una combinación de oligonucleótidos largos con segmentos solapantes cortos. Los oligonucleótidos se alternan entre direcciones sentido y antisentido, y los segmentos solapantes determinan el orden de los fragmentos de PCR, generando de ese modo selectivamente el producto de ADN largo final (Stemmer *et al. Gene* 164(1): 49-53 (1995)).

La PCR asimétrica amplifica preferentemente una hebra de ADN en un ADN diana de doble hebra. Se puede usar en la detección con sonda de hibridación y secuenciación cuando se requiere la amplificación únicamente de una de las dos hebras complementarias (Innis *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(24): 9436-40 (1988)).

La amplificación dependiente de helicasa es similar a la PCR tradicional, pero normalmente usa una temperatura constante en lugar del funcionamiento cíclico a través de ciclos de desnaturalización e hibridación/extensión. La ADN helicasa, una enzima que desenrolla el ADN, se usa en lugar de la desnaturalización térmica (Vincent *et al. EMBO Reports* 5(8): 795-800 (2004)).

La PCR específica de intersecuencias (ISSR) es un método de PCR para el análisis de la huella de ADN que amplifica regiones entre repeticiones de secuencia simple para producir una huella única de longitudes de fragmentos amplificados (Zietkiewicz *et al. Genomics* 20(2): 176-83 (1994)).

La PCR inversa se usa comúnmente para identificar las secuencias flanqueantes alrededor de insertos genómicos. Implica una serie de digestiones ADN y auto-unión, lo que da como resultado secuencias conocidas en ambos extremos de la secuencia desconocida (Ochman *et al. Genetics* 120 (3): 621-623 (1988)).

La PCR mediada por unión usa pequeños agentes de unión de ADN ligados al ADN de interés y múltiples cebadores que se hibridan con los agentes de unión de ADN; se ha usado para la secuenciación de ADN, paseo genómico y análisis de la huella de ADN (Mueller *et al. Science* 246(4931): 780-786 (1988)).

La PCR específica de metilación (MSP) se usa para detectar la metilación de islas de CpG en ADN genómico. En primer lugar se trata ADN con bisulfito de sodio, que convierte bases de citosina no metiladas en uracilo, que lo reconocen los cebadores como timina.

La PCR de minicebadores usa una polimerasa termoestable (S-Tbr) y se usa para amplificar secuencias de ADN conservadas, tales como el gen de ARNr 16S (o 18S eucariota) (Isenbarger *et al. Applied and Environmental*

*Microbiology* 74(3): 840-9. (2008)).

La PCR múltiple selecciona como diana múltiples genes a la vez, adquiriendo información adicional a partir de una ejecución de una prueba individual, lo que, en caso contrario requeriría para llevarse a efecto, los reactivos varias veces y más tiempo.

La PCR anidada aumenta la especificidad de amplificación de ADN, reduciendo el fondo debido a la amplificación no específica de ADN. Se usan dos conjuntos de cebadores en dos PCR sucesivas. En la primera reacción, se usa un par de cebadores para generar productos de ADN, que además de la diana pretendida, pueden consistir todavía en fragmentos de ADN amplificados de manera no específica. El/los producto(s) se usa(n) entonces en una segunda PCR con un conjunto de cebadores cuyos sitios de unión son completa o parcialmente diferentes de y están ubicados en 3' con respecto a cada uno de los cebadores usados en la primera reacción.

La PCR de extensión por solapamiento o corte y empalme mediante extensión por solapamiento (SOE) es una técnica de ingeniería genética que se usa para someter conjuntamente a corte y empalme dos o más fragmentos de ADN que contienen secuencias complementarias. Se usa para unir trozos de ADN que contienen genes, secuencias reguladoras o mutaciones; la técnica permite la creación de montajes de ADN largos y específicos.

La PCR cuantitativa (Q-PCR) se usa para medir la cantidad de un producto de PCR (comúnmente en tiempo real). Mide cuantitativamente cantidades iniciales de ADN, ADNc o ARN. Q-PCR se usa comúnmente para determinar si una secuencia de ADN está presente en una muestra y el número de sus copias en la muestra.

La PCR con transcripción inversa (RT-PCR) se usa para amplificar ADN a partir de ARN. La transcriptasa inversa transcribe de manera inversa ARN para dar ADNc, que se amplifica entonces mediante PCR. La RT-PCR se usa ampliamente en la obtención de perfiles de expresión, para determinar la expresión de un gen o para identificar la secuencia de un transcrito de ARN, incluyendo sitios de inicio y de terminación de la transcripción. Si se conoce la secuencia de ADN genómico de un gen, se puede usar la RT-PCR establecer el mapa de la ubicación de exones e intrones en el gen. El extremo 5' de un gen (correspondiente al sitio de inicio de la transcripción) se identifica normalmente mediante RACE-PCR (Amplificación Rápida de Extremos de ADNc).

La PCR en fase sólida engloba múltiples significados, incluyendo amplificación de colonias (en la que se derivan colonias de PCR en una matriz de gel, por ejemplo), PCR de puente (los cebadores se unen covalentemente a una superficie de soporte sólido), PCR en fase sólida convencional (en la que se aplica PCR asimétrica en presencia de un soporte sólido que porta el cebador con secuencia que coincide con uno de los cebadores acuosos) y PCR en fase sólida mejorada (en la que puede mejorarse la PCR en fase sólida convencional empleando una alta temperatura de fusión ( $T_f$ ) y un cebador de soporte sólido anidado con la aplicación opcional de una "etapa" térmico para favorecer el cebado del soporte sólido).

La PCR térmica de entrelazado asimétrico (TAIL-PCR) se usa para el aislamiento de una secuencia desconocida que flanquea una secuencia conocida. Dentro de la secuencia conocida, la TAIL-PCR usa un par anidado de cebadores con diferentes temperaturas de hibridación; se usa un cebador degenerado para amplificar en la otra dirección desde la secuencia desconocida (Liu *et al. Genomics* 25 (3): 674-81. (1995)).

La PCR *touchdown* (PCR de disminución progresiva (*step-down*)) es una variante de PCR que tiene como objetivo reducir el fondo no específico disminuyendo gradualmente la temperatura de hibridación a medida que avanzan los ciclos de PCR. La temperatura de hibridación en los ciclos iniciales está habitualmente unos cuantos grados (3-5 °C) por encima de la  $T_f$  de los cebadores usados, mientras que en los últimos ciclos, está unos cuantos grados (3-5 °C) por encima de la  $T_f$  del cebador. Las temperaturas elevadas proporcionan mayor especificidad para la unión al cebador, y las temperaturas bajas permiten una amplificación más eficaz de los productos específicos formados durante los ciclos iniciales.

La temperatura de las disoluciones de reacción se puede ciclar secuencialmente entre un estado de desnaturalización, un estado de hibridación y un estado de extensión para un número predeterminado de ciclos. Las temperaturas y los tiempos reales pueden depender de enzima, cebador y diana.

Para cualquier reacción dada, los estados de desnaturalización pueden oscilar en determinadas realizaciones desde aproximadamente 75 °C hasta aproximadamente 100 °C. La temperatura y el tiempo de hibridación pueden influir en la especificidad y eficiencia de la unión al cebador en un locus particular dentro de un ácido nucleico diana y pueden ser importantes para reacciones de PCR particulares.

Para cualquier reacción dada, los estados de hibridación pueden oscilar en determinadas realizaciones desde aproximadamente 20 °C hasta aproximadamente 75 °C. En algunas realizaciones, el estado de hibridación puede realizarse a de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 30 °C, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 35 °C, o de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 40 °C, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 45 °C, de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 50 °C. En determinadas realizaciones, el estado de hibridación puede realizarse a temperatura ambiente (por ejemplo,

20 °C o 25 °C). En algunas realizaciones, el estado de hibridación puede realizarse a una temperatura de 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 46 °C, 47 °C, 48 °C, 49 °C o 50 °C.

- 5 La temperatura y el tiempo de extensión pueden tener un impacto sobre el rendimiento de producto alélico y se entiende que son una propiedad inherente de la enzima objeto de estudio. Para una enzima dada, los estados de extensión pueden oscilar en determinadas realizaciones desde aproximadamente 60 °C hasta aproximadamente 75 °C.
- 10 En cualquiera de las realizaciones anteriores, se puede utilizar cualquier ADN o ARN polimerasa (enzima que cataliza la polimerización de nucleótidos en una hebra de ácido nucleico), incluyendo polimerasas termoestables y transcriptasa inversas (RTasas). Los ejemplos incluyen pol I de *Bacillus stearothermophilus*, pol I de *Thermus aquaticus* (Taq), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Pyrococcus woesei* (Pwo), *Thermus flavus* (Tfl), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus litoris* (Tli) y *Thermotoga maritima* (Tma). Estas enzimas, versiones modificadas de estas enzimas, y combinación de enzimas, están disponibles comercialmente de proveedores que incluyen Roche, Invitrogen, Qiagen, Stratagene y Applied Biosystems. Las enzimas representativas incluyen PHUSION® (New England Biolabs, Ipswich, MA), Hot MasterTaq™ (Eppendorf), PHUSION® Mpx (Finnzymes), PyroStart® (Fermentas), KOD (EMD Biosciences), Z-Taq (TAKARA) y CS3AC/LA (KlenTaq, Universidad City, MO).
- 15
- 20 Las sales y los tampones incluyen aquellos con los que están familiarizados los expertos en la técnica, incluyendo los que comprenden MgCl<sub>2</sub> y Tris-HCl y KCl, respectivamente. Los tampones pueden contener aditivos tales como tensoactivos, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, albúmina sérica bovina (BSA) y polietilenglicol (PEG), así como otros con los que están familiarizados los expertos en la técnica. Los nucleótidos son generalmente trifosfatos de desoxirribonucleósido, tales como desoxiadenosina trifosfato (dATP), desoxicitidina trifosfato (dCTP),
- 25 desoxiguanosina trifosfato (dGTP), y desoxitimidina trifosfato (dTTP), y también se añaden a una reacción en cantidad adecuada para la amplificación del ácido nucleico diana.

También se proporcionan en el presente documento métodos que comprenden (1) hibridar una hebra complementaria de un dúplex de cebador con un ácido nucleico diana, disociando de ese modo la hebra complementaria de su hebra protectora, y (2) extender la hebra complementaria en su extremo 3', de manera complementaria a la diana, en presencia de una polimerasa.

30

También se proporcionan en el presente documento métodos que comprenden realizar una reacción de síntesis de ácido nucleico en presencia de un ácido nucleico diana, una polimerasa y uno o más de los dúplex de cebador de una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento.

35

Una "reacción de síntesis de ácido nucleico" se refiere a cualquier reacción en la que se sintetiza un ácido nucleico. Los ejemplos incluyen reacciones de amplificación de ácido nucleico tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o una variación de la misma (descrita en otra parte en el presente documento), una reacción de transcripción, una reacción de transcripción inversa, secuenciación mediante síntesis, u otras reacciones de extensión del cebador (véase también, Lizardi *et al. Nat. Genet.* 19: 225-32 (1998)).

40

En algunos casos, se proporciona un método que comprende (1) sintetizar una hebra complementaria que tiene una región de equilibrio no específica de diana, una región de migración de rama específica de diana, y una región de extremos cohesivos específica de diana; (2) sintetizar una hebra protectora que tiene una región de equilibrio complementaria a la hebra complementaria y una región de migración de rama complementaria a la hebra complementaria; e (3) hibridar la hebra complementaria con la hebra protectora para formar un dúplex de cebador.

45

En algunos casos, se proporciona un método que comprende (1) proporcionar una hebra complementaria que tiene una región de equilibrio no específica de diana, una región de migración de rama específica de diana y una región de extremos cohesivos específica de diana; (2) proporcionar una hebra protectora que tiene una región de equilibrio complementaria a la hebra complementaria y una región de migración de rama complementaria a la hebra complementaria; y (3) combinar la hebra complementaria con la hebra protectora para formar un dúplex de cebador.

50

En algunos casos, se proporciona un método que comprende (1) proporcionar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico que comprenden un ácido nucleico diana; (2) proporcionar al menos un dúplex de cebador que tiene (i) una región de equilibrio, (ii) una región de migración de rama complementaria al ácido nucleico diana y (iii) una región de extremos cohesivos; y (3) combinar en una reacción individual la pluralidad de ácidos nucleicos diana, al menos un dúplex de cebador y una polimerasa en condiciones adecuadas para la hibridación de ácidos nucleicos.

55

También se proporcionan en el presente documento métodos de amplificación de al menos un ácido nucleico diana de interés, que comprende (1) proporcionar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico que comprenden al menos un ácido nucleico diana, (2) proporcionar al menos un dúplex de cebador que tiene (i) una región de equilibrio, (ii) una región de migración de rama y (iii) una región de extremos cohesivos; y (3) combinar en una reacción individual la pluralidad de moléculas diana de ácido nucleico, al menos un dúplex de cebador y una polimerasa en condiciones adecuadas para la amplificación del al menos un ácido nucleico diana. En determinadas

60

65

realizaciones, se amplifican múltiples ácidos nucleicos diana únicos en una sola reacción o en múltiples reacciones, por ejemplo, en una o más reacciones de amplificación de PCR multiplexada. En algunas realizaciones, se amplifican de aproximadamente 10 a 100, de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000, de aproximadamente 1000 a aproximadamente 10.000, o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 100.000 dianas de ácido nucleico. El número de diferentes dúplex de cebador en una reacción dependerá del número de dianas deseadas.

En algunas realizaciones, se proporcionan en el presente documento métodos de discriminación frente a moléculas falsas de ácido nucleico que tienen uno o más cambios de nucleótidos con relación a una molécula de ácido nucleico diana, que comprenden (1) proporcionar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico que comprenden al menos un ácido nucleico diana, (2) proporcionar al menos un dúplex de cebador que tiene (i) una región de equilibrio, (ii) una región de migración de rama y (iii) una región de extremos cohesivos; y (3) combinar en una reacción individual la pluralidad de moléculas diana de ácido nucleico, al menos un dúplex de cebador y una polimerasa en condiciones adecuadas para la amplificación de la al menos una molécula de ácido nucleico diana.

Uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede comprender además proporcionar o combinar en una reacción individual uno o más de los siguientes reactivos: tampón (por ejemplo, KCl, MgCl<sub>2</sub>, Tris-HCl), dNTP (por ejemplo, dATP, dCTP, dGTP, dTTP a concentraciones, por ejemplo, de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 μM), polimerasa (por ejemplo, a concentraciones de aproximadamente 0,5-2,0 unidades por 50 μl de reacción) y/o agua. La concentración de cada hebra de un dúplex de cebador en una sola reacción varía dependiendo de, por ejemplo, la concentración de ácido nucleico diana. En algunas realizaciones se pueden usar de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 pg de diana vírica o plásmido, o se pueden usar de aproximadamente 50 ng a aproximadamente 500 ng de diana genómica. En dichos casos, la concentración cada cebador (la primera hebra y la segunda hebra) puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,05 μM a aproximadamente 1 μM. En realizaciones particulares, la concentración de cada cebador es de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 1 μM.

En una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, una sola reacción puede someterse a cambios cíclicos de temperatura de tal manera que una estructura de ADNbc experimente múltiples tandas de desnaturalización, hibridación con cebador posterior y extensión basada en polimerasa, por ejemplo, de manera similar a las condiciones usadas para PCR convencional. En algunas realizaciones, el intervalo de temperatura para una etapa de desnaturalización es de aproximadamente 90 a aproximadamente 95 °C. En determinadas realizaciones, se requiere una etapa de desnaturalización inicial de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 minutos antes de los ciclos; la cantidad exacta de tiempo puede depender del contenido de GC del ácido nucleico diana de interés. En determinadas realizaciones, la etapa de desnaturalización durante una reacción de ciclado es de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 segundos. En algunas realizaciones, el intervalo de temperatura para una etapa de hibridación es de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C. En algunas realizaciones, la etapa de hibridación es de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 40 °C. En realizaciones particulares, la etapa de hibridación es a temperatura ambiente (a aproximadamente 20 °C o aproximadamente 25 °C). En determinadas realizaciones, la etapa de hibridación durante una reacción de ciclado es de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 segundos. En algunas realizaciones, el intervalo de temperatura para una etapa de extensión es de aproximadamente 70 °C a aproximadamente 75 °C. En determinadas realizaciones, la etapa de extensión durante una reacción de ciclado es de aproximadamente 45 a aproximadamente 60 segundos. La temperatura, el tiempo de cada etapa y el número de ciclos de una reacción de ciclado pueden depender de la longitud del/de los ácido(s) nucleico(s) diana de interés así como de la polimerasa que se use. Una diana más larga puede requerir, por ejemplo, tiempos de extensión más largos. En la Tabla 2 se expone un ejemplo de condiciones de ciclado para una diana de 500 nucleótidos.

Tabla 2

1 ciclo	98 °C	2 minutos
25 ciclos	98 °C	15 segundos
	30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C o 60 °C	15 segundos
	72 °C	45 segundos
1 ciclo	72 °C	5 minutos
1 ciclo	4 °C	indefinido

En una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, una reacción individual (por ejemplo, amplificación de ácido nucleico) puede transcurrir a temperatura ambiente (por ejemplo, a aproximadamente 20 °C o aproximadamente 25 °C). En determinadas realizaciones, una reacción individual avanza a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora.

En uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la segunda hebra protectora de un dúplex de cebador puede proporcionarse en exceso con respecto a la primera hebra complementaria o en exceso con respecto al dúplex de cebador hibridado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la segunda hebra se proporciona a una



concentración de aproximadamente 1x a aproximadamente 10x (por ejemplo, 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x o 10x) la concentración de la primera hebra, o de aproximadamente 1x a aproximadamente 10x (por ejemplo, 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x o 10x) la concentración del dúplex de cebador hibridado. En algunas realizaciones, la primera hebra se proporciona a una concentración de aproximadamente 0,05  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1  $\mu\text{M}$ , mientras que la segunda hebra se proporciona a una concentración de aproximadamente 0,10  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 2  $\mu\text{M}$ , o de aproximadamente 0,15  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 3  $\mu\text{M}$ , de aproximadamente 0,2  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 4  $\mu\text{M}$  o de aproximadamente 0,25  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{M}$ .

Uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede comprender un método escogido entre: PCR específica de alelo, PCR de ensamblaje, PCR asimétrica, amplificación dependiente de helicasa, PCR específica de intersecuencias (ISSR), PCR inversa, PCR mediada por unión, PCR específica de metilación (MSP), PCR de minicebadores, PCR múltiplex, PCR anidada, PCR de extensión por solapamiento, PCR cuantitativa (Q-PCR), PCR con transcripción inversa (RT-PCR), PCR en fase sólida, PCR térmica con entrelazado asimétrico (TAIL-PCR) y PCR *touchdown*.

En uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el rendimiento de ácido nucleico diana amplificado puede ser de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 100 %. En algunas realizaciones, el rendimiento es de al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o al menos el 100 %.

En uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el producto de ácido nucleico amplificado se puede purificar. Los métodos de purificación de ácido nucleico los conocen bien los expertos en la técnica e incluyen, extracción con fenol, isotiocianato de guanidinio, precipitación con alcohol, DEAE (intercambio iónico), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), cloruro de cesio, extracción de agarosa, sílice, y otros métodos de purificación basados en columna.

En uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, un ácido nucleico diana amplificado purificado puede tener una pureza de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 100 %. En algunas realizaciones, la pureza es de al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o el 100 % puro.

#### *Formación de imágenes*

Los sistemas y dúplex de cebador descritos en el presente documento también pueden usarse para mejorar la especificidad de ensayos de formación de imágenes *in situ*. Las interacciones no específicas entre ARN biológicos y cebadores marcados con fluoróforo son frecuentemente una fuente de ruido de fondo. De este modo, tal como se representa en la Figura 14, el uso de sistemas de cebador de ácido nucleico marcados con fluoróforo descritos en el presente documento en lugar de los cebadores convencionales, en algunas realizaciones, mejora en gran medida el rendimiento de las técnicas existentes de formación de imágenes *in situ*. Particularmente, marcando la hebra o el dominio complementario con un fluoróforo y la hebra o el dominio protector con un agente de inactivación, el sistema de dúplex de cebador sólo producirá una señal detectable cuando se una a la diana.

#### *Detección de polimorfismos de nucleótido individual (SNP)*

La detección exacta de la ubicación e identidad de polimorfismos de nucleótido individual (SNP) es de gran interés para los fines tanto investigadores como terapéuticos. Por tanto, los métodos de discriminación cinética descritos en el presente documento son útiles para la identificación apropiada de SNP.

#### *Estuches*

Se proporcionan en el presente documento estuches que comprenden (1) al menos una hebra complementaria que tiene una región de equilibrio, una región de migración de rama y una región de extremos cohesivos, y (2) al menos una hebra protectora que tiene una región de equilibrio y una región de migración de rama.

Se proporcionan en el presente documento estuches que comprenden al menos un dúplex de cebador que comprende (1) al menos una hebra o región complementaria que tiene una región de equilibrio, una región de migración de rama y una región de extremos cohesivos, y (2) al menos una hebra o región protectora que tiene una región de equilibrio y una región de migración de rama.

Uno cualquiera de los estuches descritos en el presente documento puede comprender además una polimerasa. Uno cualquiera de los estuches proporcionados en el presente documento puede comprender además uno o más agentes escogidos entre tampón (por ejemplo, KCl,  $\text{MgCl}_2$ , Tris-HCl), dNTP (por ejemplo, dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y agua. Uno cualquiera de los estuches proporcionados en el presente documento puede comprender una hebra protectora en exceso molar con respecto al cebador. Uno cualquiera de los estuches proporcionados en el presente

documento puede comprender además instrucciones o indicaciones para obtener instrucciones (por ejemplo, de un sitio web) para usar los componentes de los estuches. Uno cualquiera de los estuches proporcionados en el presente documento puede comprender además al menos un tubo, pocillo, cámara o similar.

- 5 Uno cualquiera de los cebadores o sistemas de cebador descritos en el presente documento puede proporcionarse en forma de un estuche o estar presente dentro de un estuche.

### Ejemplos

10 Según la divulgación, las limitaciones anteriores de PCR, transcripción y transcripción inversa pueden solucionarse a través del uso de dúplex de cebador altamente específicos. Los experimentos descritos en el presente documento demuestran que los dúplex de cebador pueden discriminar de manera fiable frente a dianas con cambios de base individual (Figura 16) tanto para dianas como cebadores de ADN y ARN (Figura 17). La diana verdadera se hibrida con los cebadores 7/5 con un rendimiento de aproximadamente el 50 %, pero incluso un gran exceso (200x) de dianas con un cambio de base individual es insuficiente para hibridar de forma significativa. Se diseñaron los dúplex de cebador y se sometieron a ensayo para múltiples dianas diferentes, y cada dúplex de cebador logró factores de discriminación elevados frente a cambios de nucleótido individual (Figura 17). Cuantitativamente, la discriminación media en el rendimiento de hibridación a una diana falsa con un cambio de nucleótido individual es de 26.

20 Se usaron los dúplex de cebador para PCR en una demostración de prueba de principio (Figuras 18A y 18B). Se diseñó un ácido nucleico diana semi-repetitivo, que es difícil de amplificar mediante PCR tradicional (PCR sin el uso de los presentes dúplex de cebador). Se calculó el rendimiento de cebadores de 21 nucleótidos convencionales y los dúplex de cebador. Se determinaron muchos programas de ciclado térmico diferentes para investigar el intervalo de función. Basándose en la longitud y el contenido de nucleótidos de los dúplex de cebador, las condiciones de PCR convencionales predecirían que la temperatura de hibridación de los cebadores sería de 55 °C. Sorprendentemente, como ejemplo, incluso en las condiciones más desfavorables para la hibridación de dúplex de cebador (35 °C y 40 °C), la fracción (50,2 %) de producto de longitud correcta amplificado usando los dúplex de cebador fue mayor que la fracción (31,0 %) de producto de longitud correcta amplificado usando los cebadores convencionales en sus condiciones de PCR más favorables (45 °C). Además, en este experimento particular, se diseñaron arbitrariamente los dúplex de cebador (región de extremos cohesivos de 7 nucleótidos y región de equilibrio de 5 nucleótidos), y no se optimizaron para el desempeño de rendimiento de PCR. Por tanto, es probable que pueda lograrse una especificidad de PCR incluso mayor a través de la optimización de los presentes dúplex de cebador.

35 La Figura 15 muestra PCR altamente específica usando los dúplex de cebador proporcionados en el presente documento. En la Figura 5A, el cebador "PC" se compone de una hebra complementaria "C" y una hebra protectora "P". Cuando PC se une a la diana pretendida en la posición correcta "X", el oligonucleótido protector de hebra individual "P" se libera como producto residual inerte, y la diana cebada se alarga por medio de la ADN polimerasa. En la Figura 5B, cuando el cebador PC se une a una diana no deseada o a la diana correcta en una posición incorrecta (en cualquier caso, indicada como "Y"), el desplazamiento de la región protectora de la hebra complementaria "C" es termodinámicamente desfavorable, y cinéticamente revierte de forma rápida. Por consiguiente, se espera que se reduzca significativamente la amplificación fuera de diana (por ejemplo, amplificación de Y en vez de X).

45 La Figura 16 muestra una demostración experimental de hibridación de cebador con discriminación de nucleótido individual. En la Figura 16A, la diana de ADN sintético corto "X" o la diana falsa "Y" se hacen reaccionar con el cebador. (La cola de poli-T en la hebra protectora "P" sirve para distinguir productos de reactantes en un gel). Se muestran en recuadros rojos las posiciones de cambios de una sola base para la diana falsa Y. La Figura 16B muestra los resultados de gel de poliacrilamida nativo. Se preparó el cebador "PC" a una proporción de 2:1 de protector P con respecto a complemento C, y se hibridó a una concentración de 1 μM de PC. Se añadieron bien la diana correcta o bien la diana falsa para lograr concentraciones finales de diana 200 nM (X o Y), PC 100 nM y P 100 nM. En algunas realizaciones, una reacción puede tener un exceso de cebador protector (P). Por ejemplo, en algunas realizaciones, la hebra protectora se proporciona a una concentración de aproximadamente 1x a aproximadamente 10x (por ejemplo, 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x o 10x) de la hebra complementaria. Todas las reacciones transcurrieron a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 hora. Como ejemplo, la designación "7/4" indica un cebador que presenta 7 nucleótidos de nucleótidos de hebra individual (como proyección en 3') para iniciar la hibridación con la diana, y el protector disocia espontáneamente para que se liberen 4 nucleótidos. La Figura 16C es un diagrama de rendimientos de hibridación deducidos a partir de los datos mostrados en la Figura 16B. "La hibridación del cebador con la diana correcta X se muestra como diagrama "X", mientras que los diagramas "de puntos" restantes muestran la hibridación con las dianas falsas Y. Los cebadores 7/4, 7/5 y 7/6 discriminan todos en cuanto a sus rendimientos de hibridación ( $\chi$ ) entre las dianas correcta y falsa. La diana 7/0 no lo hace. En la Figura 16D, el factor de discriminación (Q) es una medición cuantitativa de la especificidad del cebador, y se calcula como el rendimiento de hibridación ( $\chi$ ) de la diana correcta dividido entre el rendimiento de hibridación ( $\chi$ ) de la diana falsa. En 16E, hay poca hibridación del cebador 7/5 a una diana falsa Y incluso cuando dicha diana está presente en un gran exceso (es decir, 200 veces).

65 La Figura 17 muestra resultados experimentales adicionales y datos estadísticos sobre las capacidades de

discriminación de base individual de los dúplex de cebador. La Figura 17A muestra que se construyeron cuatro dianas y conjuntos de cebadores adicionales y se sometieron a ensayo: dos basados en secuencias de microARN de origen natural y dos diseñados para presentar intencionadamente una estructura secundaria significativa. La Figura 17B muestra un histograma de los factores de discriminación (Q) logrados por los cebadores 7/5 para cada diana. Debido a las limitaciones del aparato de exploración de geles, no fue posible medir de manera fiable los factores de discriminación por encima de 100, y estos se agruparon todos como "+100." La Figura 17C muestra una diana de ARN y un cebador. La secuencia diana es un oligonucleótido de ARN sintético con secuencia idéntica al microARN de let7 g humano. La Figura 17D muestra resultados de PAGE nativa. Se preparó el cebador PC a una razón de 2:1 de protector P con respecto a complemento C, y se hibridó a una concentración de 3  $\mu$ M. Se añadieron bien la diana correcta o bien la diana falsa para lograr concentraciones finales de X o Y de 2  $\mu$ M, PC de 1  $\mu$ M y P de 1  $\mu$ M. La diana correcta se une satisfactoriamente al cebador; el rendimiento de hibridación de dianas con apareamientos erróneos de nucleótido individual es bajo.

La Figura 18 muestra los resultados experimentales usando cebadores de dúplex para mejorar el rendimiento de PCR de una diana cuasi repetitiva. La Figura 18A muestra una diana de PCR cuasi repetitiva (168 nt) con la que los cebadores de PCR tradicionales tienen problemas para amplificarla con alto rendimiento. En este caso, a\* es la diana correcta para X1. Los sitios restantes marcados como a\*m1 (que es X1-m17G), a\*m2 (que es X1-m9T) y a\*m3 (que es X1-m11G) no son las dianas correctas. De manera similar, b\* es la diana correcta para X2, y b\*m1 (que es X2-m3T), b\*m2 (que es X2-m11C) y b\*m3 (que es X2-m18T) no son las dianas correctas. De este modo, los sitios de unión más externos son los sitios de unión perfectos para los cebadores, pero también hay 3 sitios adicionales de unión a cebador con apareamiento erróneo de base individual entre los sitios perfectos. Los dúplex de cebador se unen mediante 7 nucleótidos a la diana, y el protector debe disociarse espontáneamente para que se liberen 5 nucleótidos. Se diseñó el dúplex de cebador de modo que su extremo 3' no pudiera extenderse por medio de la polimerasa. Se diseñó la región de extremos cohesivos de la hebra complementaria en el extremo 3', en vez de en el extremo 5' como en diseños previos. En la Figura 18B, los dúplex de cebador muestran un rendimiento significativamente mayor de producto de longitud correcta, en comparación con los cebadores convencionales. Cada carril se marca con los cebadores usados así como el programa de ciclado térmico (por ejemplo, "98-40-72" indica desnaturalización a 98 °C, hibridación a 40 °C y alargamiento a 72 °C). El carril más a la izquierda muestra la referencia de oligonucleótido sintético. Los números más bajos marcados como "% correcto" indican la intensidad relativa de la banda correspondiente al producto de longitud correcta en comparación con la intensidad integrada de todas las bandas en el carril. El producto de PCR del dúplex de cebador aparece como 10 nucleótidos más largo que la referencia y el producto de PCR convencional debido a los 5 nucleótidos de las proyecciones (región de extremos cohesivos) en cada cebador.

### Equivalentes

Los expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de determinar, usando sólo experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas descritas en el presente documento.

Los artículos "un(o)" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Se consideran conformes las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en, o son relevantes para un producto o procedimiento dado a menos que se indique lo contrario o resulte evidente a partir del contexto. La invención incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente en, se emplea en, o es relevante para un producto o procedimiento dado. La invención incluye realizaciones en las que más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en, o son relevantes para un producto o procedimiento dado.

Cuando se presentan elementos como listas, por ejemplo, en el formato de grupos de Markush, ha de entenderse que también se divulga cada subgrupo de los elementos, y cualquier(cualesquiera) elemento(s) puede(n) eliminarse del grupo. Ha de entenderse que, en general, cuando se hace referencia a que la invención, o aspectos de la invención, comprende(n) elementos, características particulares, determinadas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente en, tales elementos y/o características. Con propósitos de simplicidad, esas realizaciones no se han expuesto específicamente de manera textual en el presente documento. También se observa que el término "comprender" pretende ser abierto y permite la inclusión de elementos o etapas adicionales.

Cuando se facilitan intervalos, están incluidos los extremos. Además, ha de entenderse que a menos que se indique lo contrario o resulte evidente lo contrario a partir del contexto y el entendimiento de un experto habitual en la técnica, los valores que se expresan como intervalos pueden adoptar cualquier valor específico o subintervalo dentro de los intervalos establecidos en diferentes realizaciones de la invención, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior del intervalo, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" puede referirse generalmente a cualquier valor dentro de un intervalo del 10 % del valor citado. En algún caso, sin embargo, "aproximadamente" puede englobar un intervalo del 20 % del valor citado.

5 Además, debe entenderse que cualquier realización particular de la presente invención que se encuentre dentro de la técnica anterior puede excluirse explícitamente de una cualquiera o más de las reivindicaciones. Cualquier  
 10 realización particular de los métodos de la invención puede excluirse de una cualquiera o más reivindicaciones, por cualquier motivo, relacionadas o no con la existencia de la técnica anterior. La invención es capaz de otras realizaciones y de ser practicada o llevada a cabo de diversas maneras. Además, la fraseología y la terminología  
 15 usadas en este documento son con el propósito de descripción no deben considerarse limitativas. El uso de "que incluye", "que comprende" o "que tiene", "que contiene", "que implica" y variaciones de los mismos en el presente documento, pretende abarcar los elementos enumerados a continuación y equivalentes de los mismos, así como  
 20 elementos adicionales.

15 **Lista de secuencias**

<110> Universidad de Harvard

<120> COMPOSICIONES DE DÚPLEX DE CEBADOR DE EXTREMOS COHESIVOS Y MÉTODOS DE USO

20

<130> H0498. 70420WO00

<140> TBD

25

<141> 27-10-2011

<150> Documento US 61/407-291

30

<151> 27-10-2010

<160> 149

<170> Patente versión 3.5

35

<210> 1

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 1

attcagacat tcaataccct acgtctcca 29

45

<210> 2

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 2

55

tcgtcacat tcaataccct ac 22

<210> 3

<211> 29

<212> ADN

60

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

65

<400> 3

agcagtgga agttatgga tgcagaggt 29

<210> 4  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 10 <400> 4  
 cattcaatac cctactagat gt 22  
  
 <210> 5  
 <211> 29  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 20  
 <400> 5  
 taagtcgga agttatggga tgatctaca 29  
  
 <210> 6  
 <211> 49  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 30 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 6  
 tggagacgta gggattgaa tgaggTTTT tcctattca atacctac 49  
  
 35 <210> 7  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 7  
 cattcaatac cctactagtt tttctagta gggattgaa tgtctgaat 49  
 45  
 <210> 8  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 8  
 55 ttacattcaa taccctacgt ctccatga 28  
  
 <210> 9  
 <211> 61  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 65 <400> 9  
 cgtctccaac ctttttggg tgagacgta gggattgaa tgaggTTTT tcctattca 60

a

61

- 5 <210> 10  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético
- <400> 10  
 cgtctccaac c 11
- 15 <210> 11  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético
- <400> 11  
 ggttgagac gtaggtatt gaatgaggt tttcctcat tcaa 44
- 25 <210> 12  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético
- <400> 12  
 cctcattcaa 10
- 35 <210> 13  
 <211> 46  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético
- 45 <400> 13  
 cgtctccaac ctttttggt tgaagacgt aggtattga atgagg 46
- <210> 14  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético
- 55 <400> 14  
 ggagtaagtt atgggatgca gaggttg 28
- 60 <210> 15  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 15  
 cgtctccatt ttttggaga cgtagggtat tgaatgttt ttcattcaa 49

5 <210> 16  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 16  
 cattcaatac cctacgtctc ca 22

15 <210> 17  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 17  
 cattcaatac cctacgtatc ca 22

25 <210> 18  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 18  
 tcgacacat tcaatacct ac 22

35 <210> 19  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 19  
 agctgtgga agttatggga tgcagaggt 29

<210> 20  
 <211> 36  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 20  
 gatcgacat cattcaatac cctacgtctc acgatc 36

60 <210> 21  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 65 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 21  
 ttgcatccac tcattcaata cc 22

5 <210> 22  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 22  
 aacgtagtg agtaagttat gggatgcag 29

15 <210> 23  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 23  
 aacgtagtg agtaagttat gggatgcaga gtgct 35

25 <210> 24  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 24  
 gatcgacact cattcattac cctacgtcaa acttga 36

35 <210> 25  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 25  
 cactcattca atacctacg tc 22

<210> 26  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 26  
 tgaggtagta gttgtacag tt 22

60 <210> 27  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético



<400> 27  
 ttaatgctaa tcgtgatagg gt 22

5 <210> 28  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 28  
 cacttgatac aagcttacca tc 22

15 <210> 29  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 29  
 caagaacaga tgtaccatca ca 22

25 <210> 30  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 30  
 ugagguagua guuugacagu u 21

35 <210> 31  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 31  
 uuuaugauug agguaguagu uug 23

<210> 32  
 <211> 27  
 50 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 32  
 uacuaacucc aucaucaaac augucaa 27

60 <210> 33  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 33  
 tgcattccact cattcaatac c 21

5 <210> 34  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 34  
 gcatccactc attcaatacc 20

15 <210> 35  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 35  
 catccactca ttcaatacc 19

25 <210> 36  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 36  
 cactcattca atacc 15

35 <210> 37  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 37  
 atgattgagg tagtagttg 20

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

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 38  
 tgattgaggt agtagttg 19

<210> 39  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <400> 38  
 tgattgaggt agtagttg 19

<210> 39  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 39  
 aggatttaat gctaatcgtg 20

5 <210> 40  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 40  
 ggatttaatg ctaatcgtg 19

15 <210> 41  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 41  
 ctcatcactt gatacaagct 20

25 <210> 42  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 42  
 tcatcacttg atacaagct 19

35 <210> 43  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 43  
 cgtccaaga acagatgtac 20

<210> 44  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 44  
 gttccaagaa cagatgtac 19

60 <210> 45  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 45  
 gactcattca atacctacg tc 22

5 <210> 46  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 46  
 cactctttca atacctacg tc 22

15 <210> 47  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 47  
 cactcattca ttaccctacg tc 22

25 <210> 48  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 48  
 cactcattca ctaccctacg tc 22

35 <210> 49  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 49  
 cactcattca gtaccctacg tc 22

<210> 50  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 50  
 cactcattca taccctacgt c 21

<210> 51  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 51  
 cactcattca aataccctac gtc 23

5 <210> 52  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 52  
 cactcattca tataccctac gtc 23

15 <210> 53  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 53  
 cactcattca cataccctac gtc 23

25 <210> 54  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 54  
 cactcattca gataccctac gtc 23

35 <210> 55  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 55  
 cactcattca ataccgtacg tc 22

<210> 56  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 56  
 tcaggtagta gttgtacag tt 22

<210> 57  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 57  
 tgaggttgta gttgtacag tt 22

5 <210> 58  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 58  
 tgaggtagta gattgtacag tt 22

15 <210> 59  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 59  
 tgaggtagta gttgttcag tt 22

25 <210> 60  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 60  
 tgaggtagta gttgtccag tt 22

35 <210> 61  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 61  
 tgaggtagta gttgtgcag tt 22

<210> 62  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 62  
 tgaggtagta gttgtcagt t 21

<210> 63  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 63  
 tgaggtagta gttgtaaca gtt 23

5 <210> 64  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 64  
 tgaggtagta gttgttaca gtt 23

15 <210> 65  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 65  
 tgaggtagta gttgtgaca gtt 23

25 <210> 66  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 66  
 tgaggtagta gttgtcaca gtt 23

35 <210> 67  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 67  
 tttatgctaa tcgtgatagg gt 22

<210> 68  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 68  
 ttaatgcaaa tcgtgatagg gt 22

60 <210> 69  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 69  
 ttaatgcgaa tcgtgatagg gt 22

5 <210> 70  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 70  
 ttaatgcaa tcgtgatagg gt 22

15 <210> 71  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 71  
 ttaatgcaat cgtgataggg t 21

25 <210> 72  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 72  
 ttaatgcata atcgtgatag ggt 23

35 <210> 73  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 73  
 ttaatgcta atcgtgatag ggt 23

<210> 74  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 74  
 ttaatgcgta atcgtgatag ggt 23

<210> 75  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético



<400> 75  
 ttaatgccta atcgtgatag ggt 23

5 <210> 76  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 76  
 ttaatgctaa tcctgatagg gt 22

15 <210> 77  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 77  
 ttaatgctaa tcgtgattgg gt 22

25 <210> 78  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 78  
 cacatgatac aagcttacca tc 22

35 <210> 79  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 79  
 cacttgattc aagcttacca tc 22

<210> 80  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 80  
 cactgatac aaggttacca tc 22

<210> 81  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 81  
cacttgatac aagcttacga tc 22

5 <210> 82  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 82  
cacttgatac aagcttaca tc 22

15 <210> 83  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 83  
cacttgatac aagcttacta tc 22

25 <210> 84  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 84  
cacttgatac aagcttaccat c 21

35 <210> 85  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 85  
cacttgatac aagcttacc atc 23

<210> 86  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 86  
cacttgatac aagcttacgc atc 23

<210> 87  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

60 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

65 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

- <400> 87  
cacttgatag aagcttacac atc 23
- 5 <210> 88  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético
- <400> 88  
cacttgatag aagcttactc atc 23
- 15 <210> 89  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético
- <400> 89  
catgaacaga tgtaccatca ca 22
- 25 <210> 90  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético
- <400> 90  
caagaactga tgtaccatca ca 22
- 35 <210> 91  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético
- 45 <400> 91  
caagaacaga tgaaccatca ca 22
- <210> 92  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético
- 55 <400> 92  
caagaacaga tgcaccatca ca 22
- <210> 93  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 60 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético
- 65 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

- <400> 93  
caagaacaga tggacatca ca 22
- 5 <210> 94  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético
- <400> 94  
caagaacaga tgacatcac a 21
- 15 <210> 95  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético
- <400> 95  
caagaacaga tgataccatc aca 23
- 25 <210> 96  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético
- <400> 96  
caagaacaga tgtaccatc aca 23
- 35 <210> 97  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético
- 45 <400> 97  
caagaacaga tgctaccatc aca 23
- <210> 98  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético
- 55 <400> 98  
caagaacaga tggacatc aca 23
- <210> 99  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 60 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético
- 65 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 99  
 caagaacaga tgtaccaaca ca 22

5 <210> 100  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 100  
 cactcattca atacctacg tctttt 26

15 <210> 101  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 101  
 cactcattca atacctacg tc 22

25 <210> 102  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 102  
 tttatgattg aggtagtagt ttg 23

35 <210> 103  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 103  
 tactaactcc atcatcaaac atgtcaa 27

<210> 104  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 104  
 tttaggattt aatgctaac gtg 23

60 <210> 105  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 105  
 tcctaaatta cgattagcac tatccca 27

5 <210> 106  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 106  
 tttcgtccca agaacagatg tac 23

15 <210> 107  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 107  
 gcagggttct tgtctacatg gtagtgt 27

25 <210> 108  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 108  
 ttttgcattcc actcattcaa tacc 24

35 <210> 109  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 109  
 acgtaggtga gtaagttatg gtagtcag 28

<210> 110  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 110  
 tttgcatcca ctattcaat acc 23

60 <210> 111  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 111  
 cgtaggtgag taagttatgg gatgcag 27

5 <210> 112  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 112  
 ggacgttgat atgggacgta gggattgaa tgagtg 36

15 <210> 113  
 <211> 61  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 113  
 gcttaagcct tcactattca atgatgaga ataaaccctc ctctgttaga ggctaagtac 60

25 t 61

<210> 114  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 114  
 cgtcgcctcgg ttgtctctg catggagggt gaggacttt atacacaggg aagcgagctc 60

40 <210> 115  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 115  
 tgaggtagta gttgtacag ttgagaagtt aggttg 36

50 <210> 116  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 116  
 caacctaact tctcaactgt acaaactact acctca 36

60 <210> 117  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>

## ES 2 774 447 T3

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 117  
gagctcgctt ccctgtgat aaaagtcctc acctccatg cagaagcaaa cggagcgacg 60

5

<210> 118  
<211> 61  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 118  
15 agtacttagc ctctaacaga ggagggtta ttctataca ttgaatagtg aaggcttaag 60

c 61

<210> 119  
20 <211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
25 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 119  
cactcattca ataccctacg tcccatatca acgtcc 36

30 <210> 120  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 120  
40 ggacgttgat atgggacgtc gggattgaa tgagtg 36

<210> 121  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45

<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 121  
50 tgacctaatg ctaactcgtg tcgctctcgc gcttc 35

<210> 122  
<211> 35  
<212> ADN  
55 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 122  
60 tctactgac gtatcggtc tagctgccac ggagg 35

<210> 123  
<211> 36  
65 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial



<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 123  
 tgtgtagta gttgtacag ttgagaagtt aggttg 36

<210> 124  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <400> 124  
 caacctaact tctcaactgt acaaactact accaca 36

<210> 125  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 125  
 cctccgtggc agctagaccg tatacgtaa gtaga 35

<210> 126  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 126  
 gaagccgcag agcgacacga gtagcatta ggtca 35

40
 <210> 127  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 127  
 cactcattca ataccgacg tcccatatca acgtcc 36

<210> 128  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

60 <400> 128  
 gacgtagggt attgaatgag tg 22

<210> 129  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 129  
 aactgtacaa actactacct ca 22

<210> 130  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <400> 130  
 ggtcagacgt aggtattga atgagtg 27

<210> 131  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 131  
 tcaataccct acgtctgacc 20

<210> 132  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 132  
 tcaataccct acgtctgacc 20

40 <210> 133  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 133  
 gtagtttga cagttagtcg 20

<210> 134  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

60 <400> 134  
 gtagtgacgt aggtattga atgagtgac gtcgggtatt gaatgagtg 49

<210> 135  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 135  
 gacgtagggt attaaatgag tggacgtagg gtactgaatg agtg 44

<210> 136  
 <211> 44  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <400> 136  
 tgaggtagta gttgtatag tttgaggtag tactttgtac agtt 44

<210> 137  
 <211> 49  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 25 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 137  
 tgtggtagta gttgtacag tttgaggtag tagttgtac agttgagg 49

<210> 138  
 <211> 49  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 35 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 138  
 cctcaaactg tacaactac tacctcaaac tgtacaaact actaccaca 49

<210> 139  
 <211> 44  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 139  
 50 aactgtacaa agtactacct caaactatac aaactactac ctca 44

<210> 140  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 140  
 60 cactcattca gtaccctacg tccactcatt taatacccta cgtc 44

<210> 141  
 <211> 49  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 141  
 cactcatfca ataccgacg tccactcatt caatacccta cgtccactc 49

<210> 142  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <400> 142  
 gagtggacgt cgggtattga atgagtggac gtaggtatt gaatgagtg 49

<210> 143  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 143  
 gacgtagggt attaaatgag tggacgtagg gtactgaatg agtg 44

<210> 144  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 144  
 tgaggtagta gttgtatag tttgaggtag tactttgtac agtt 44

40

<210> 145  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 145  
 tgaggtagta gttgtacag tttgtgtag tagttgtac agttgagg 49

<210> 146  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

60 <400> 146  
 cctcaaactg tacaactac tacctcaaac gtacaaact actaccaca 49

<210> 147  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65

<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 147  
aactgtacaa agtactacct caaactatac aaactactac ctca 44

<210> 148  
<211> 44  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

15 <400> 148  
cactcattca gtacctacg tccactcatt taataccta cgtc 44

<210> 149  
<211> 49  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
25 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 149  
cactcattca ataccgacg tccactcatt caataccta cgtccactc 49

## REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de hibridación de un cebador con un ácido nucleico diana en una muestra, que comprende poner en contacto un cebador de hebra individual con una muestra, y detectar la hibridación del cebador con una diana en la muestra, en el que el cebador de hebra individual se autohibrida parcialmente para formar
- (a) una o más regiones no específicas de diana de doble hebra,
- (b) una o más regiones específicas de diana de doble hebra,
- (c) una o más regiones específicas de diana de hebra individual, y
- (d) una o más regiones de bucle de horquilla,
- en el que la una o más regiones no específicas de diana de doble hebra tienen una energía libre estándar ajustada a la concentración que está dentro del 10 % de la energía libre estándar ajustada a la concentración para la una o más regiones específicas de diana de hebra individual unidas a un ácido nucleico diana, en el que el uno o más cebadores de hebra individual se marcan con un resto detectable, y opcionalmente en el que el resto detectable comprende un fluoróforo o un radioisótopo.
2. El método según la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico diana está presente como una copia individual en la muestra.
3. Un método para llevar a cabo una reacción de síntesis de ácido nucleico, que comprende llevar a cabo una reacción de síntesis de ácido nucleico en presencia de un ácido nucleico diana, una polimerasa y un cebador de hebra individual, en el que el cebador de hebra individual se autohibrida para formar
- (a) una o más regiones no específicas de diana de doble hebra,
- (b) una o más regiones específicas de diana de doble hebra,
- (c) una o más regiones específicas de diana de hebra individual, y
- (d) una o más regiones de bucle de horquilla,
- en el que la una o más regiones no específicas de diana de doble hebra tienen una energía libre estándar ajustada a la concentración que está dentro del 10 % de la energía libre estándar ajustada a la concentración para la una o más regiones específicas de diana de hebra individual unidas a un ácido nucleico diana.
4. El método según la reivindicación 2, en el que la reacción de síntesis de ácido nucleico es una reacción de amplificación de ácido nucleico, una reacción de transcripción o una reacción de transcripción inversa.
5. El método según la reivindicación 3, en el que la reacción de amplificación de ácido nucleico es la reacción en cadena de polimerasa (PCR).
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en el que se usan dos cebadores de hebra individual.
7. Un método de realización de una reacción de amplificación de ácido nucleico multiplexado que comprende amplificar múltiples moléculas de ácido nucleico únicas usando un o más cebadores de hebra individual que se autohibrida parcialmente para formar
- (1) una o más regiones no específicas de diana de doble hebra,
- (2) una o más regiones específicas de diana de doble hebra,
- (3) una o más regiones específicas de diana de hebra individual, y
- (d) una o más regiones de bucle de horquilla,
- en el que la una o más regiones no específicas de diana de doble hebra tienen una energía libre estándar ajustada a la concentración que está dentro del 10 % de la energía libre estándar ajustada a la concentración para la una o más regiones específicas de diana de hebra individual unidas a un ácido nucleico diana.

8. El método de realización de una reacción de amplificación de ácido nucleico multiplexado según la reivindicación 7, en el que la una o más regiones no específicas de diana de doble hebra del cebador de hebra individual tienen una longitud de 4-21 nucleótidos, y/o en el que la una o más regiones específicas de diana de hebra individual del cebador de hebra individual tienen una longitud de 4-192 nucleótidos, preferiblemente una longitud de 4 - 20 nucleótidos.
- 5
9. Método de realización de una reacción de amplificación de ácido nucleico multiplexado según la reivindicación 7 u 8 , en el que el uno o más cebadores de hebra individual se componen de ADN o ARN.
- 10

Fig. 1A

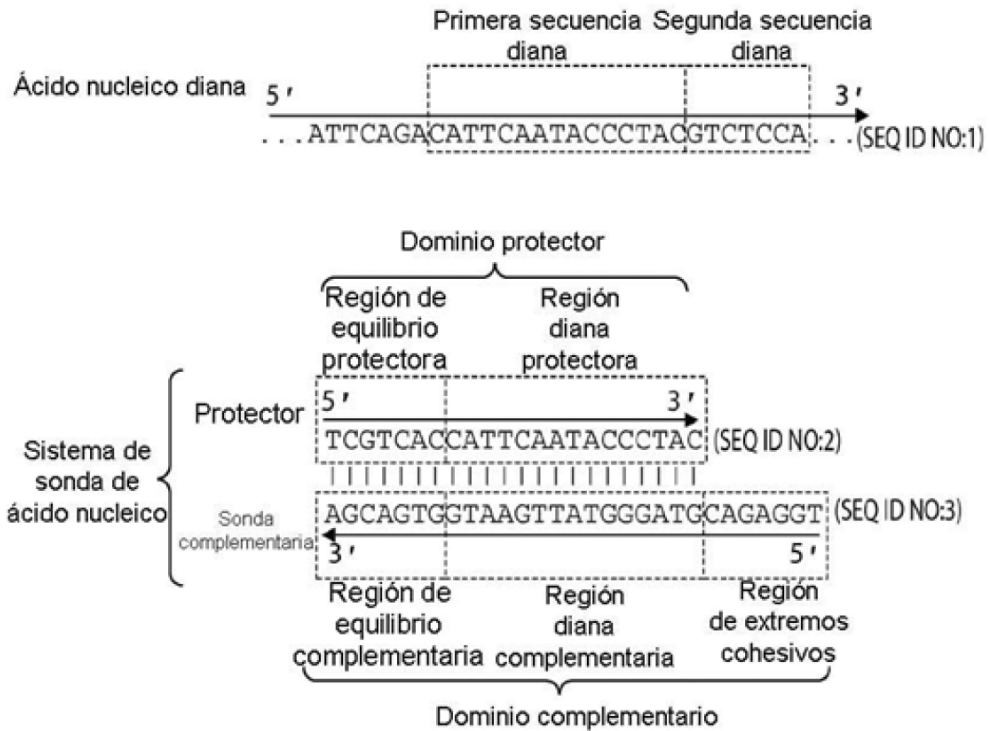


Fig. 1B

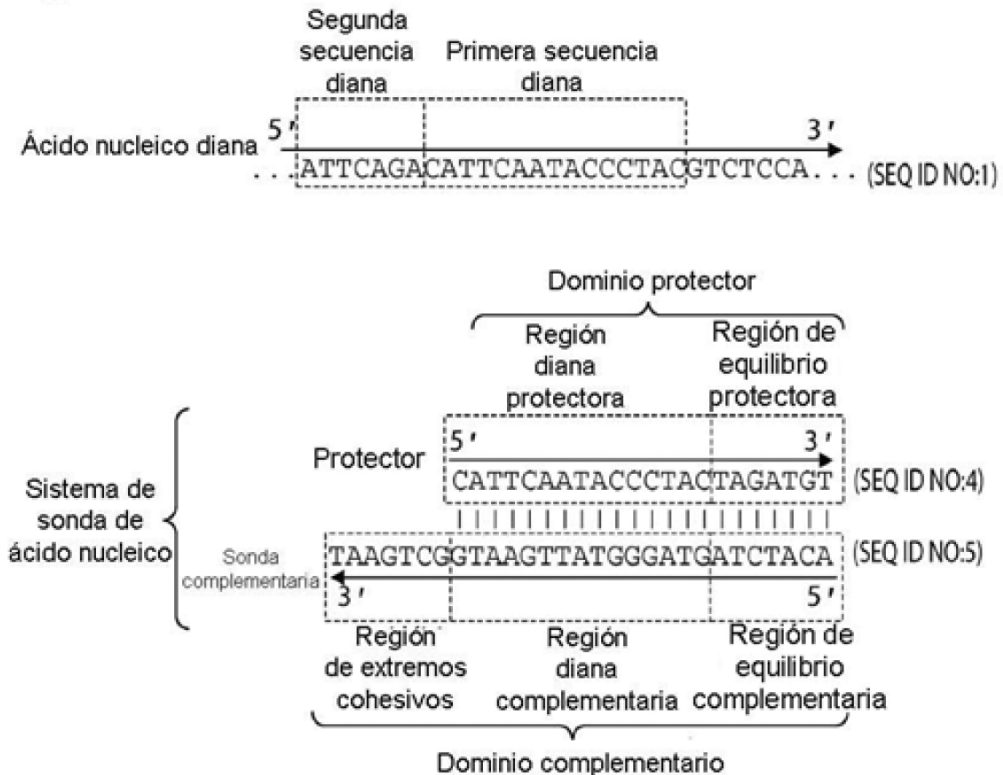




Fig. 2A

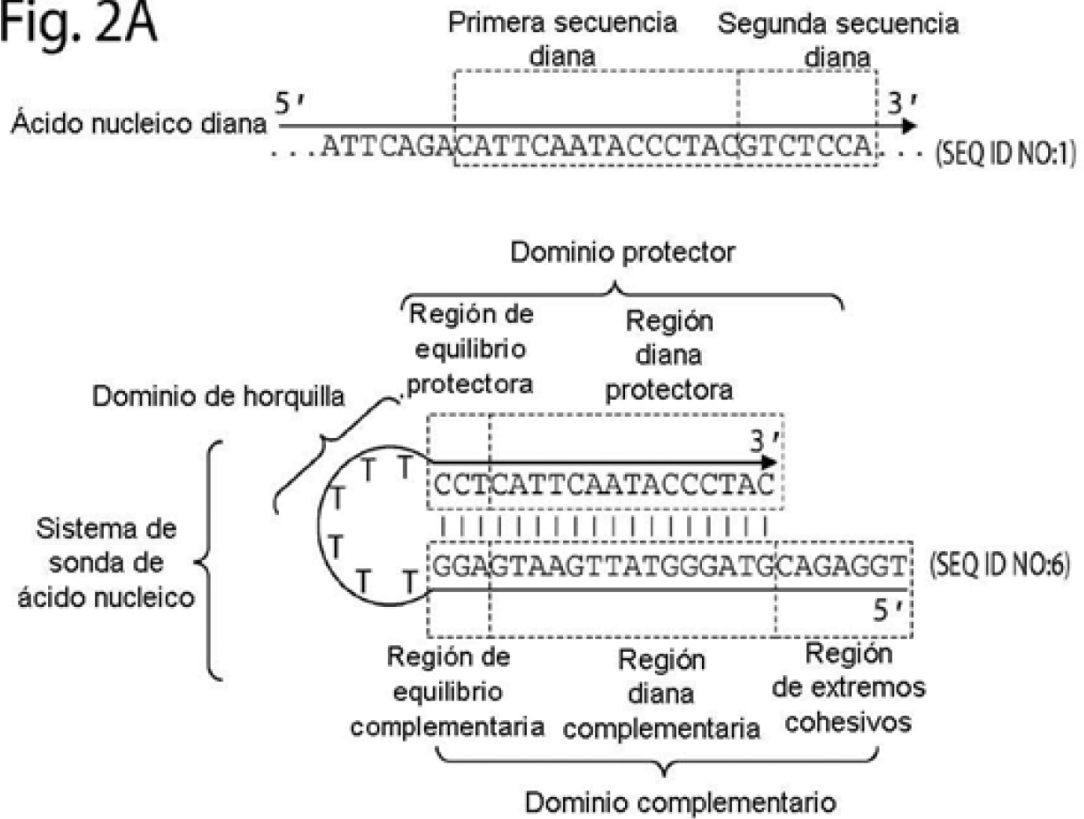
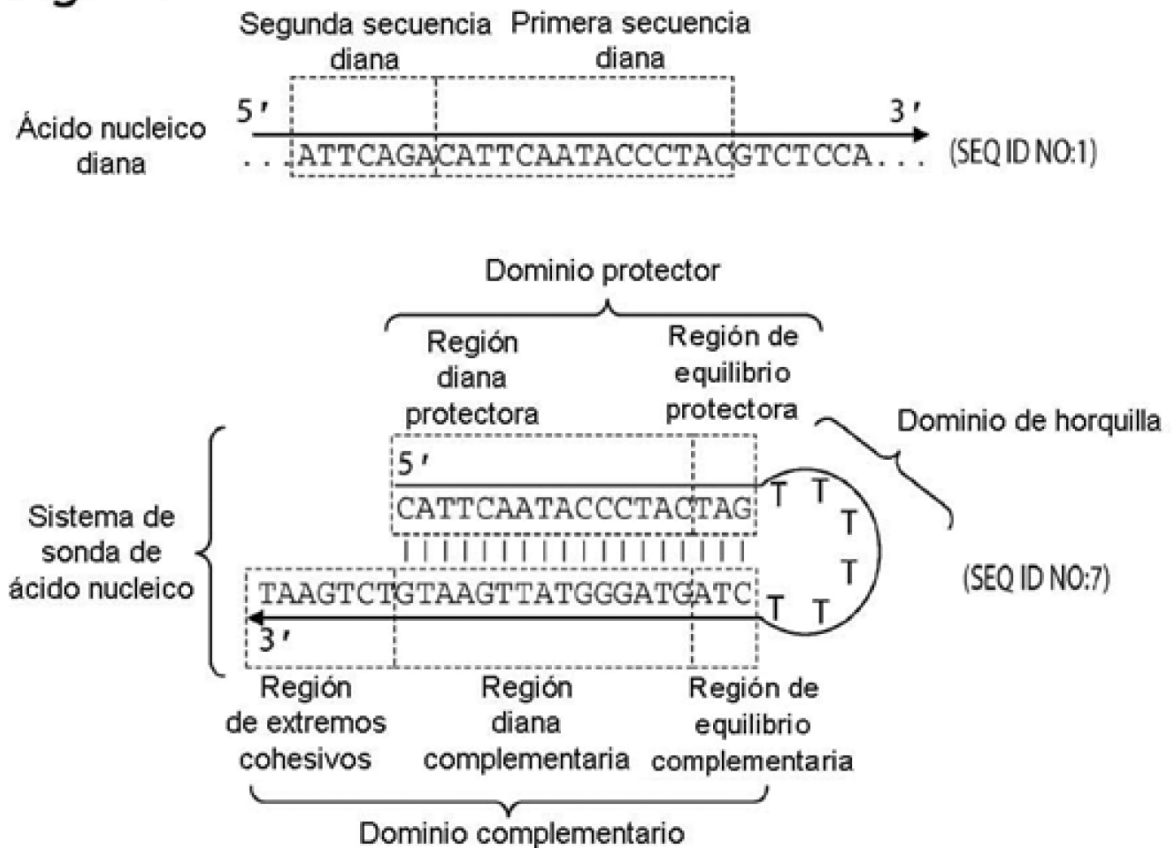


Fig. 2B



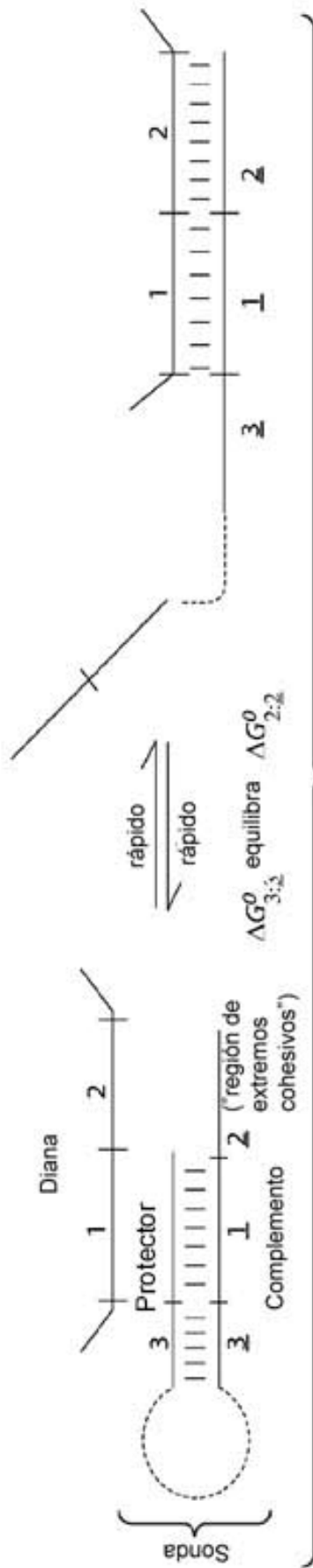


Fig. 3A

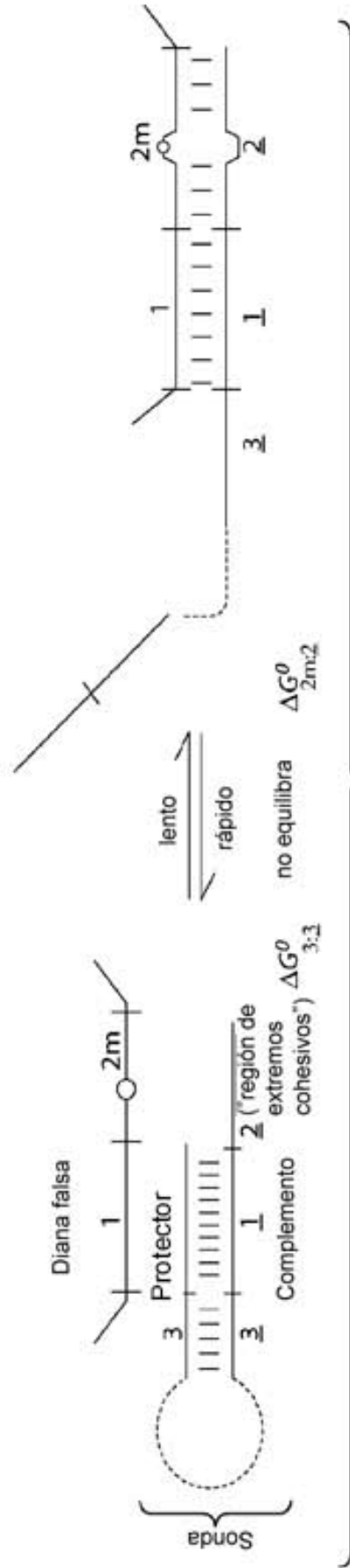


Fig. 3B

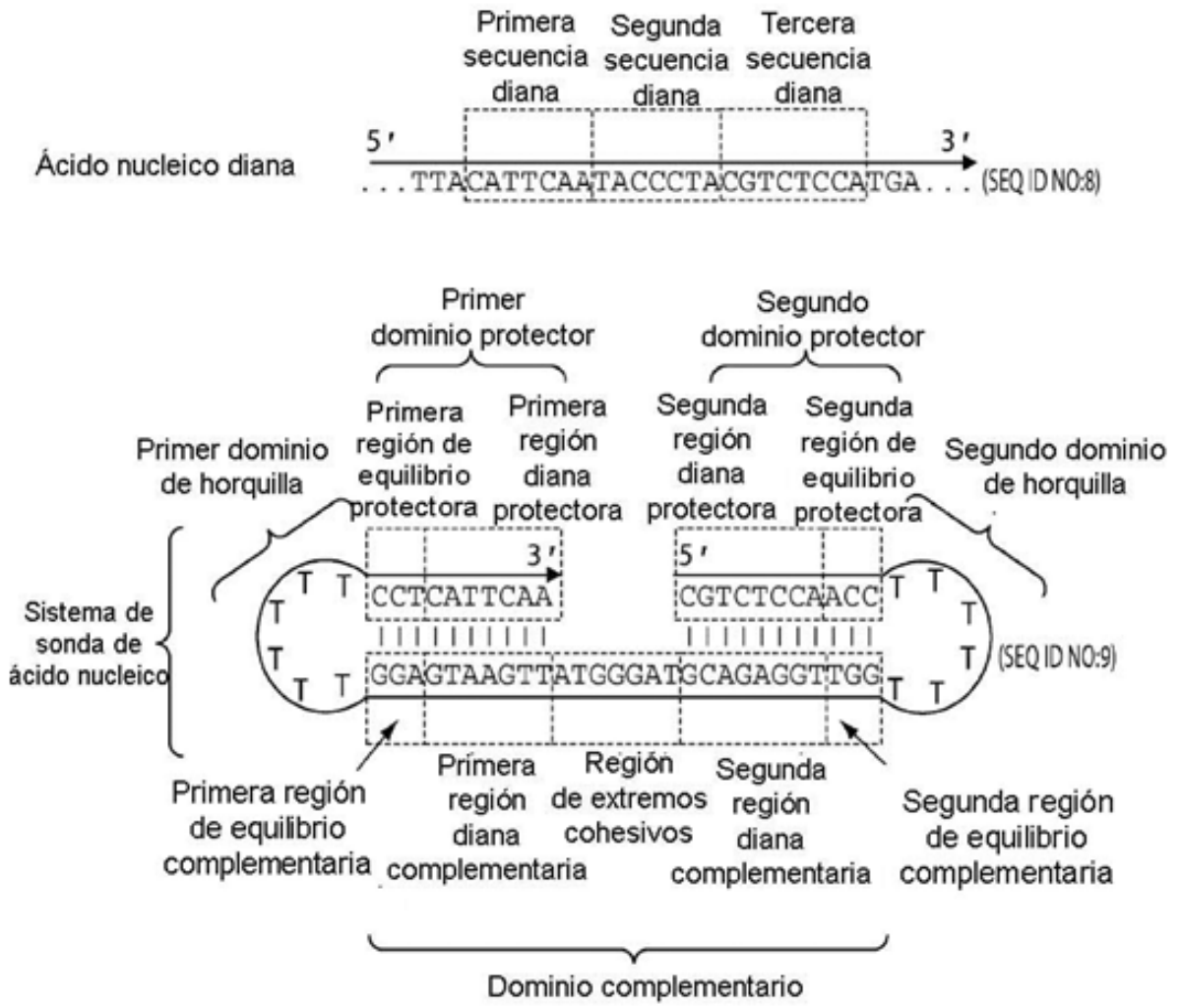


Fig. 4

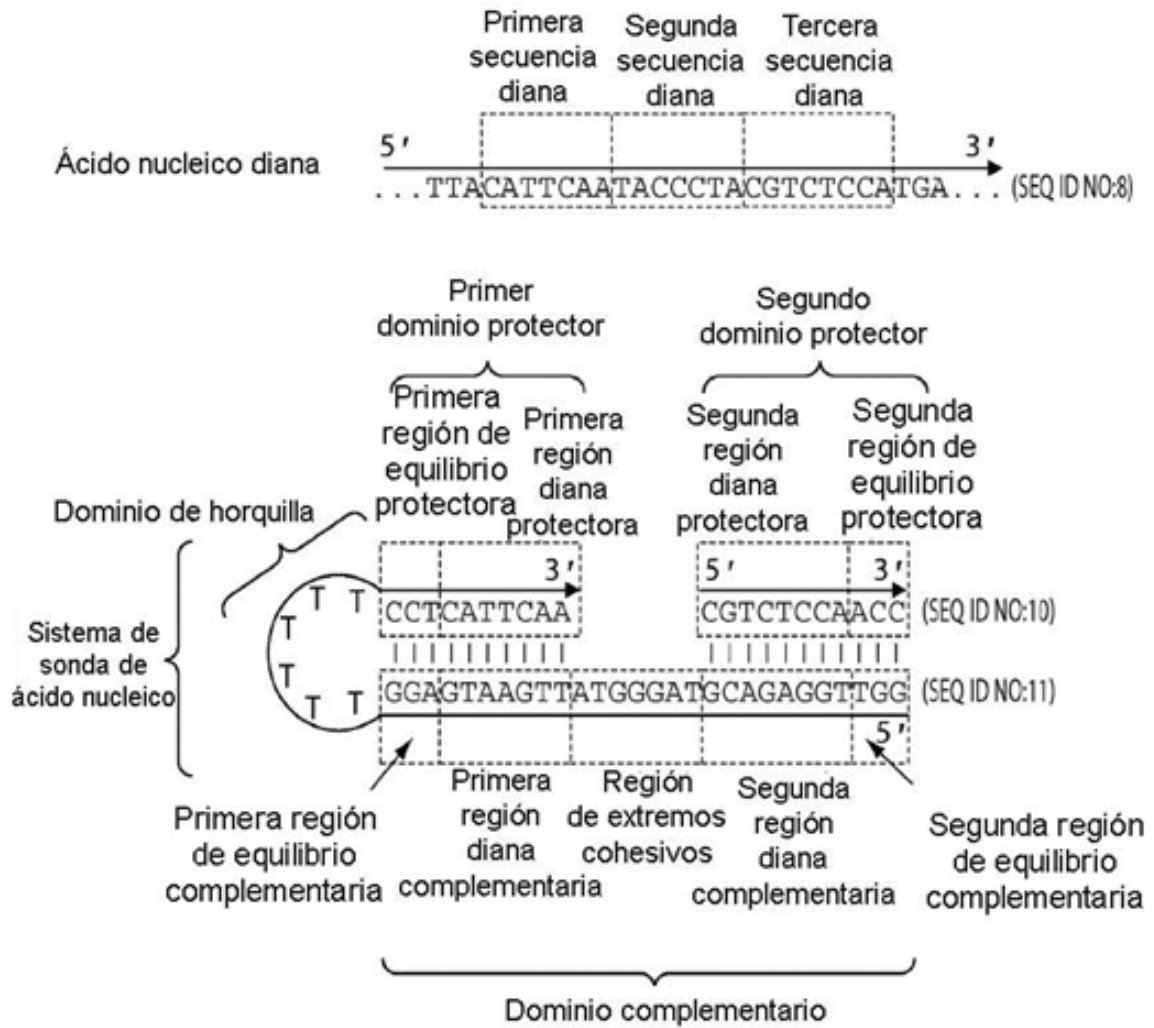


Fig. 5

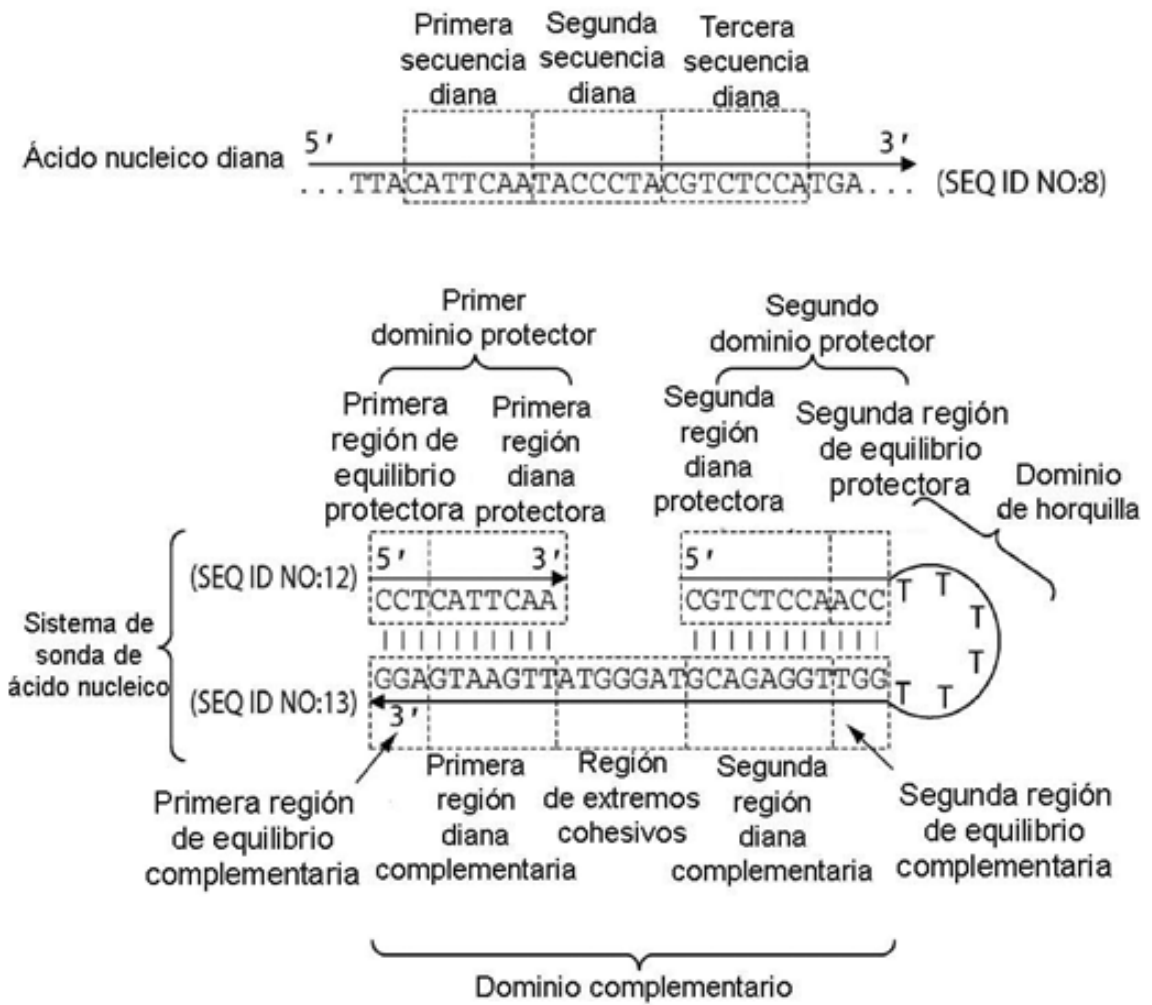


Fig. 6

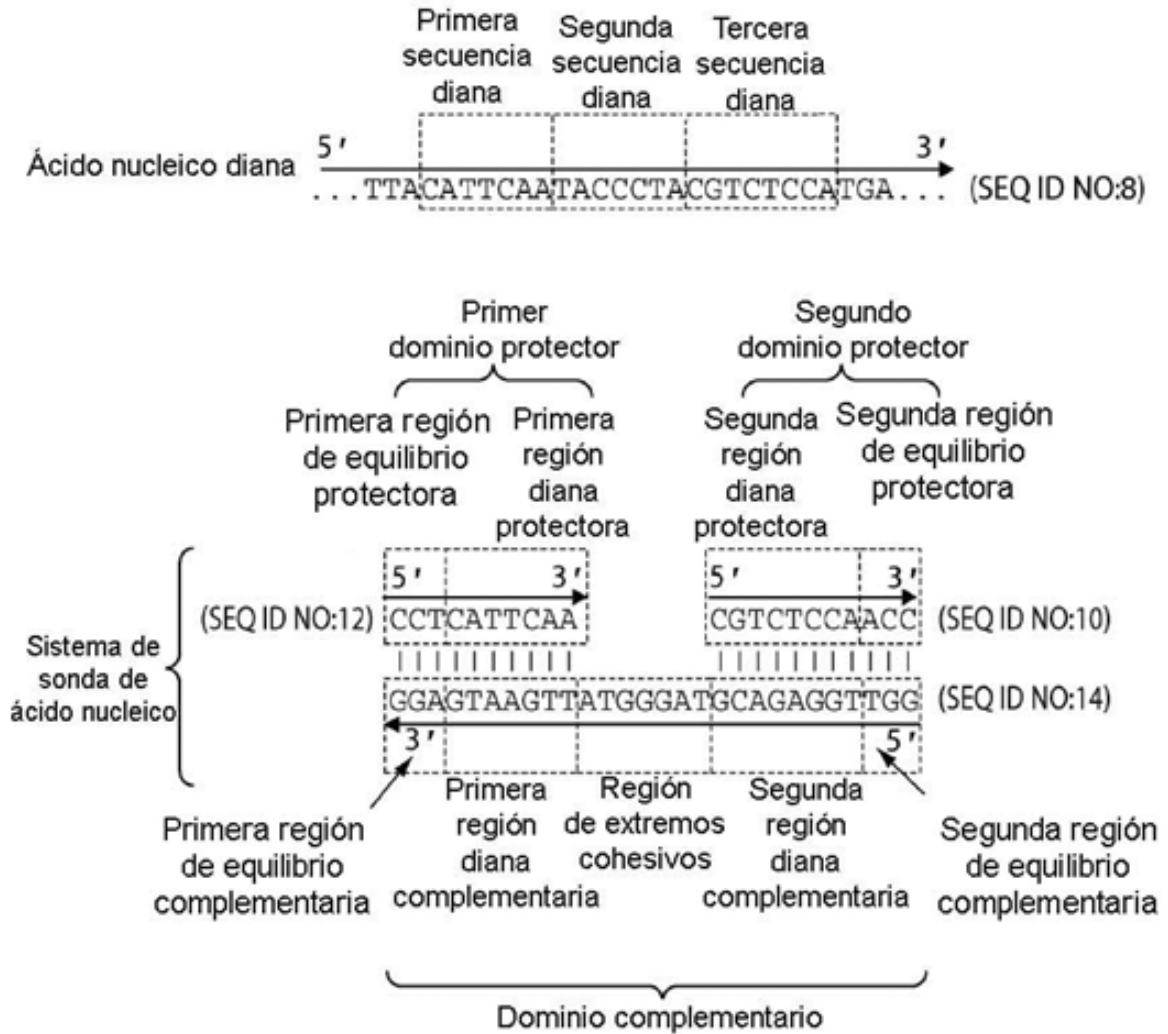


Fig. 7

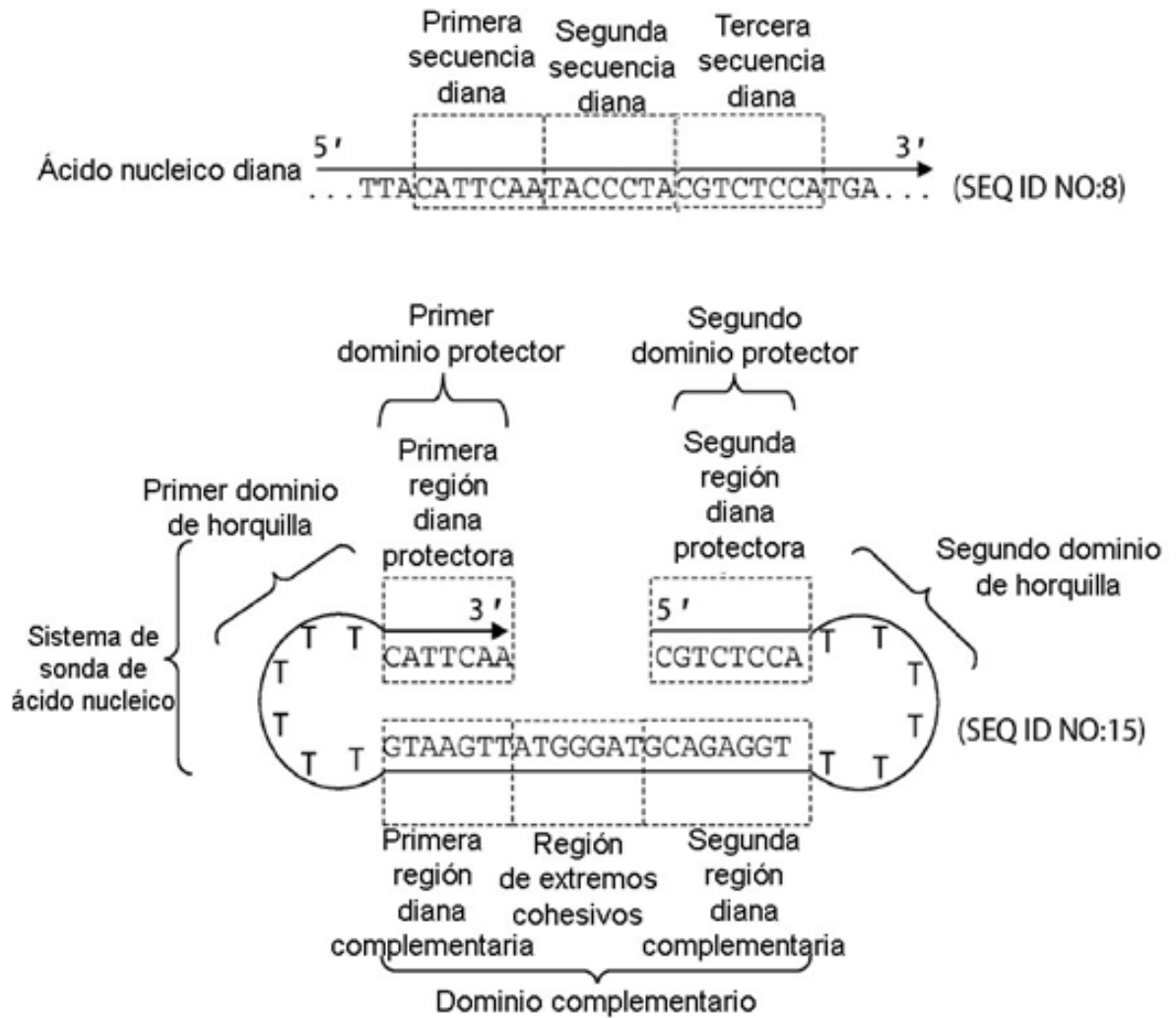


Fig. 8

Fig. 9A

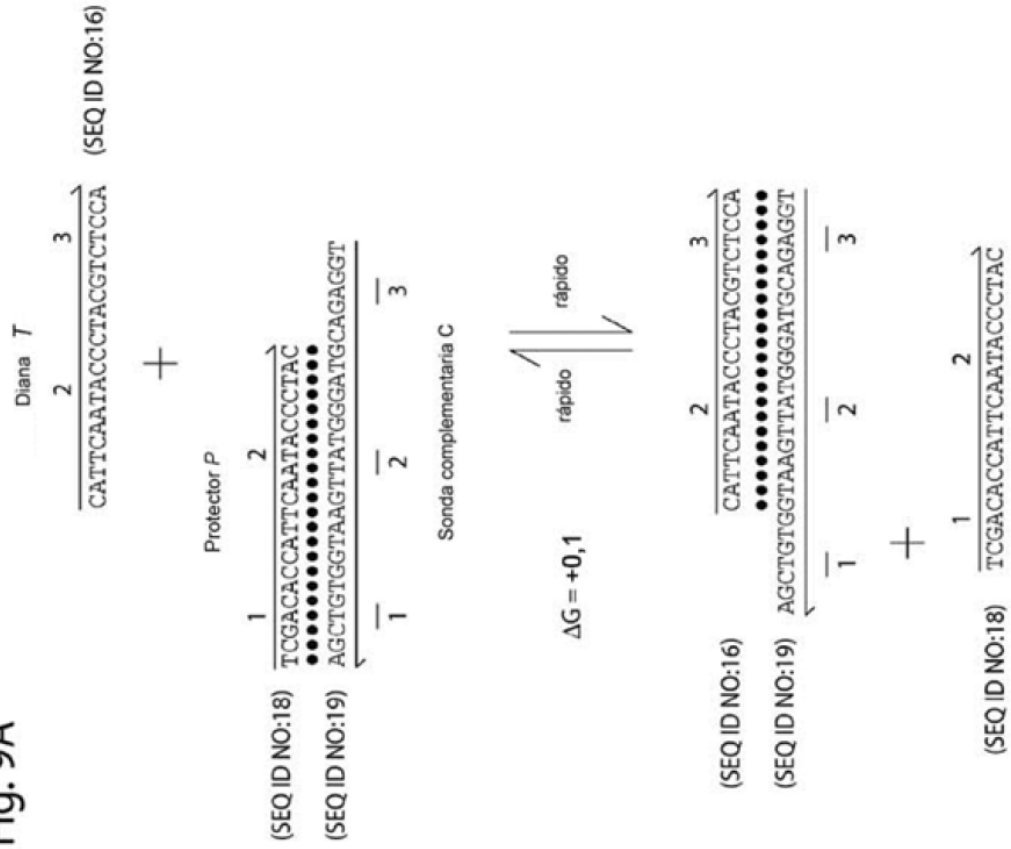
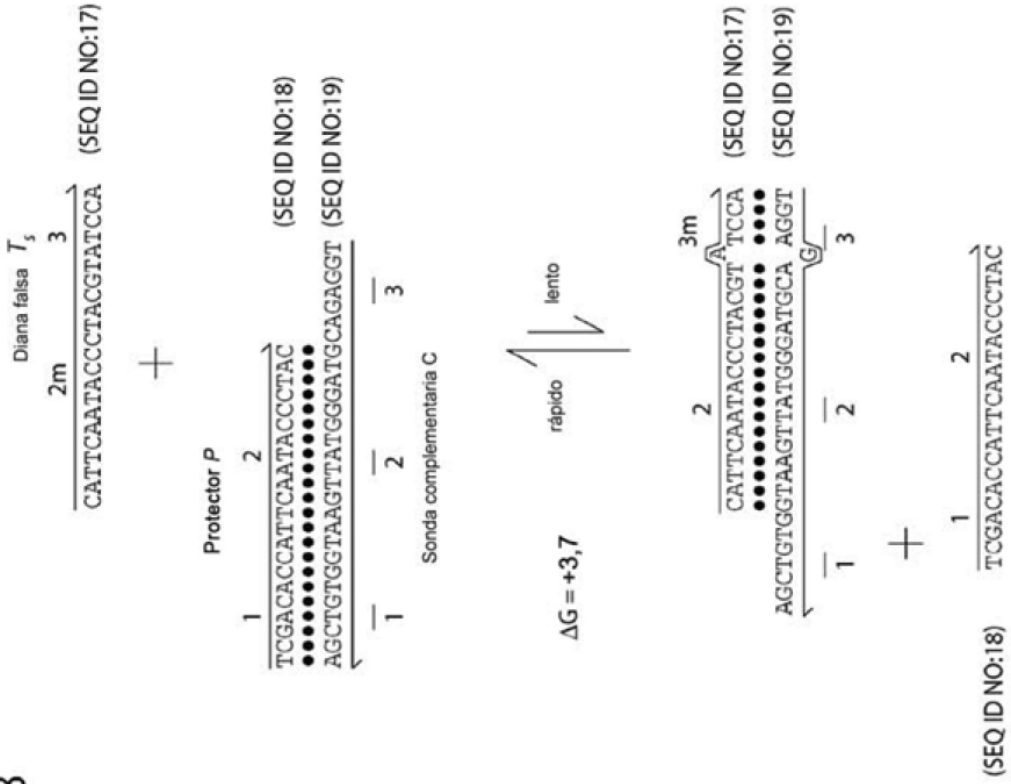
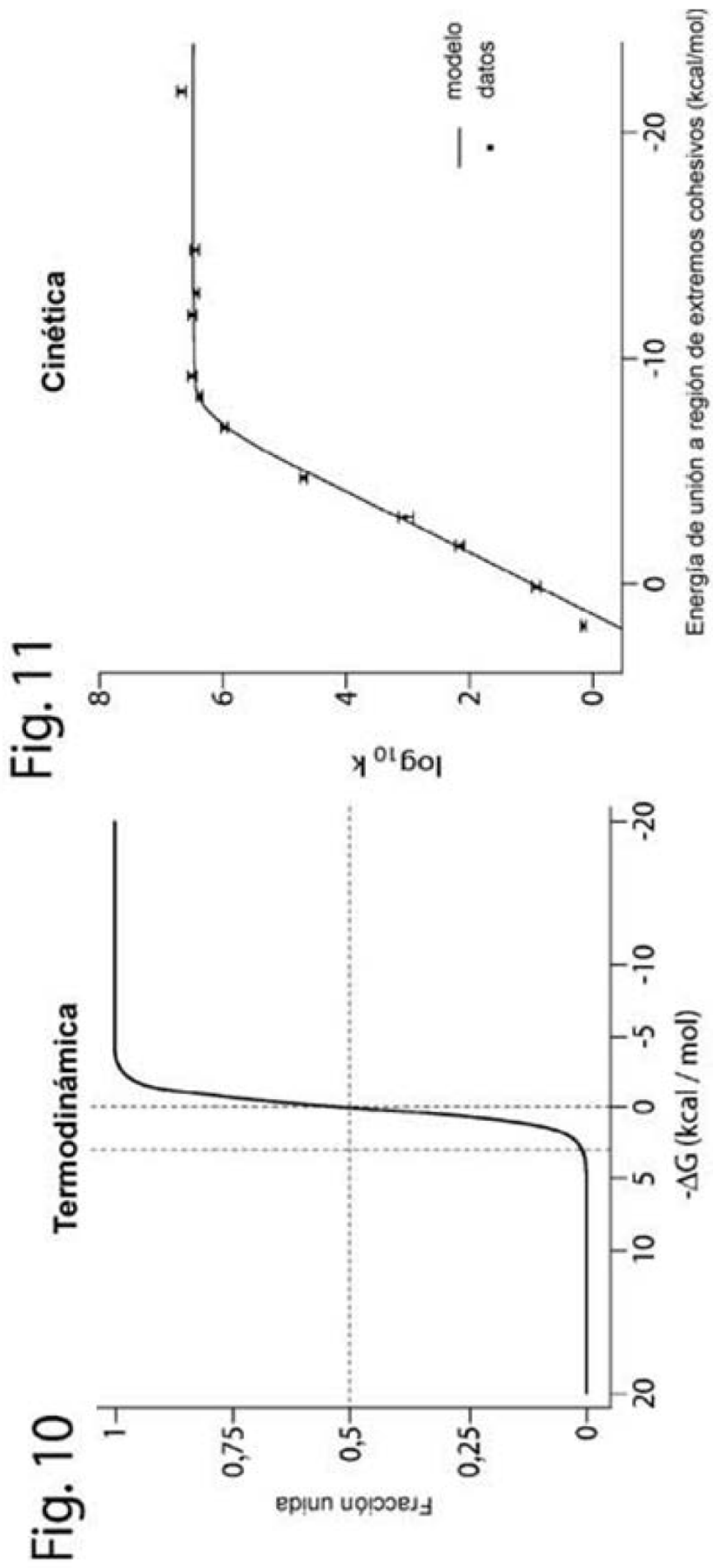
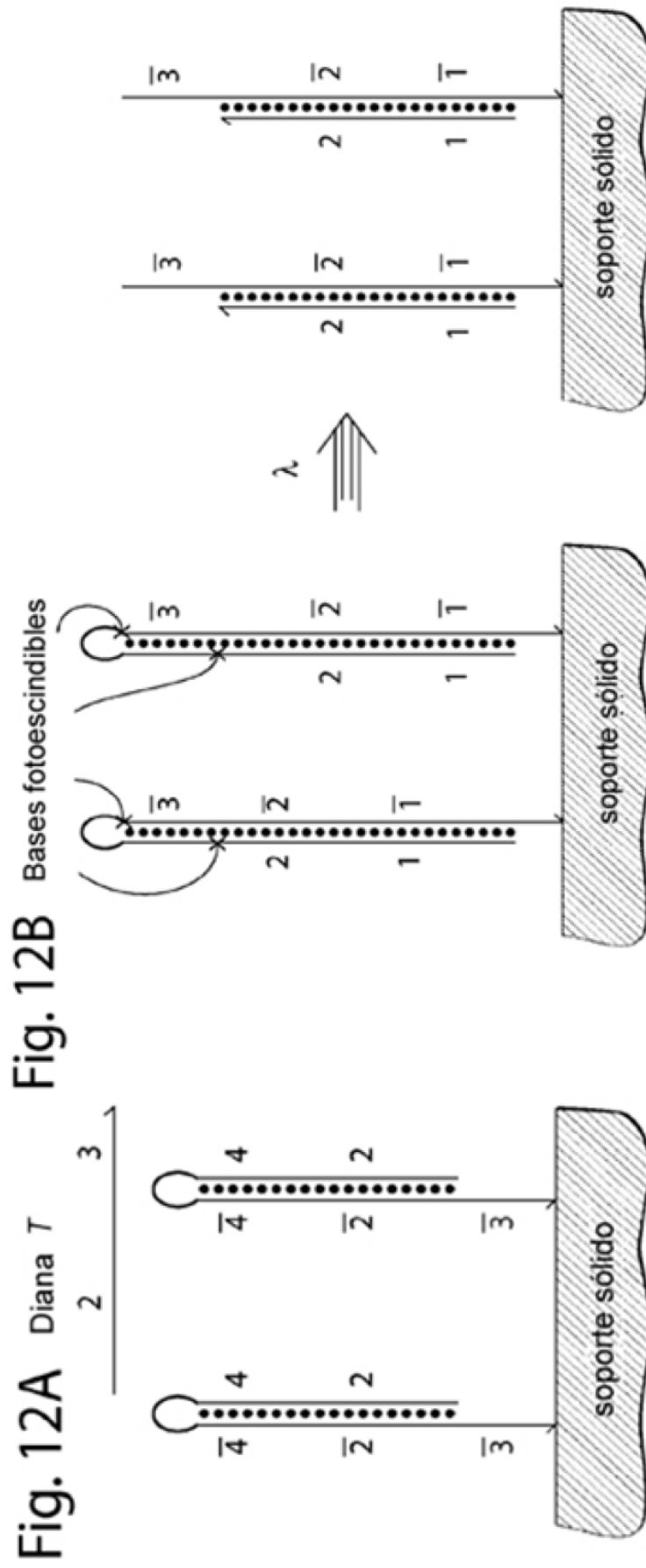


Fig. 9B









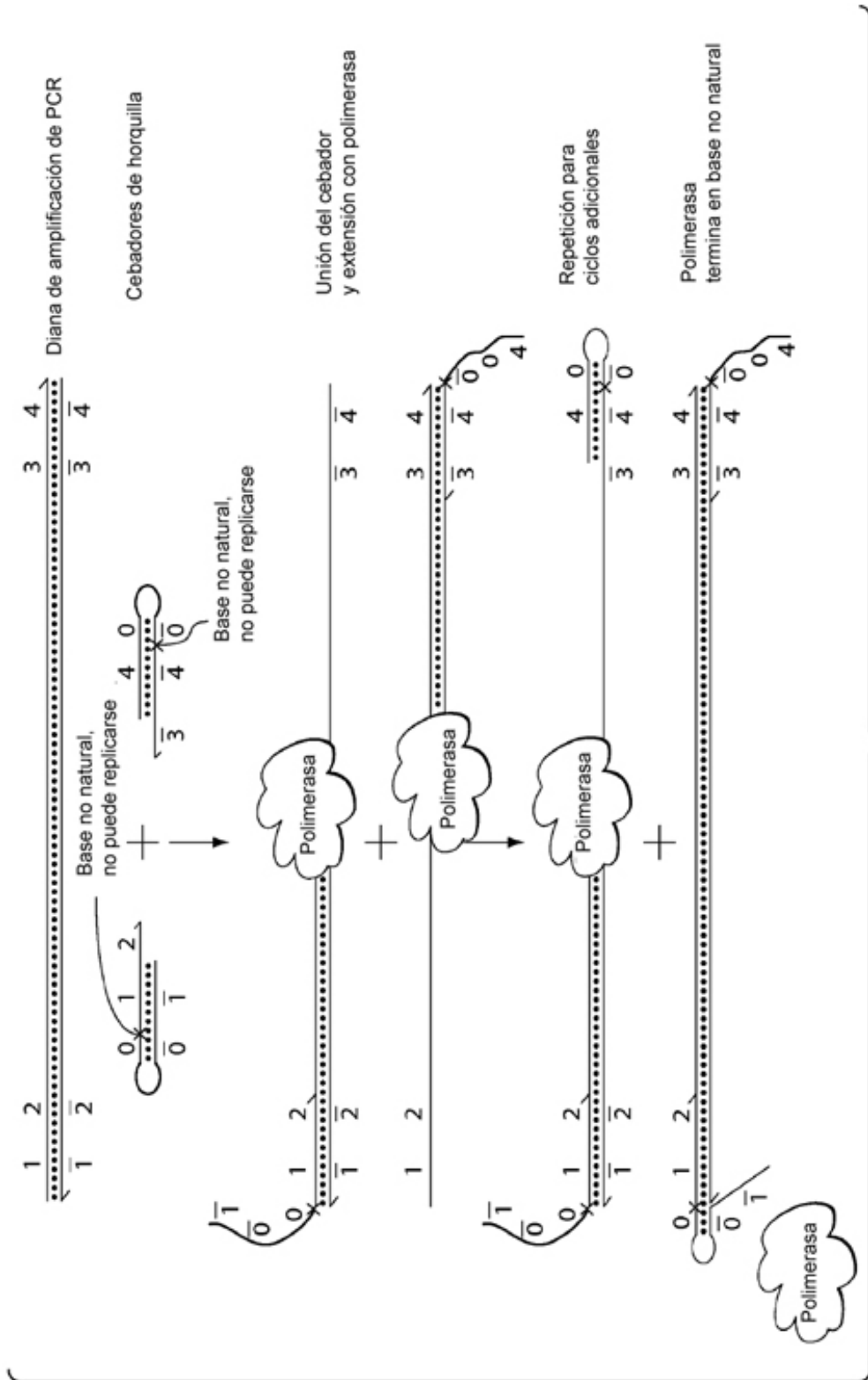


Fig. 13

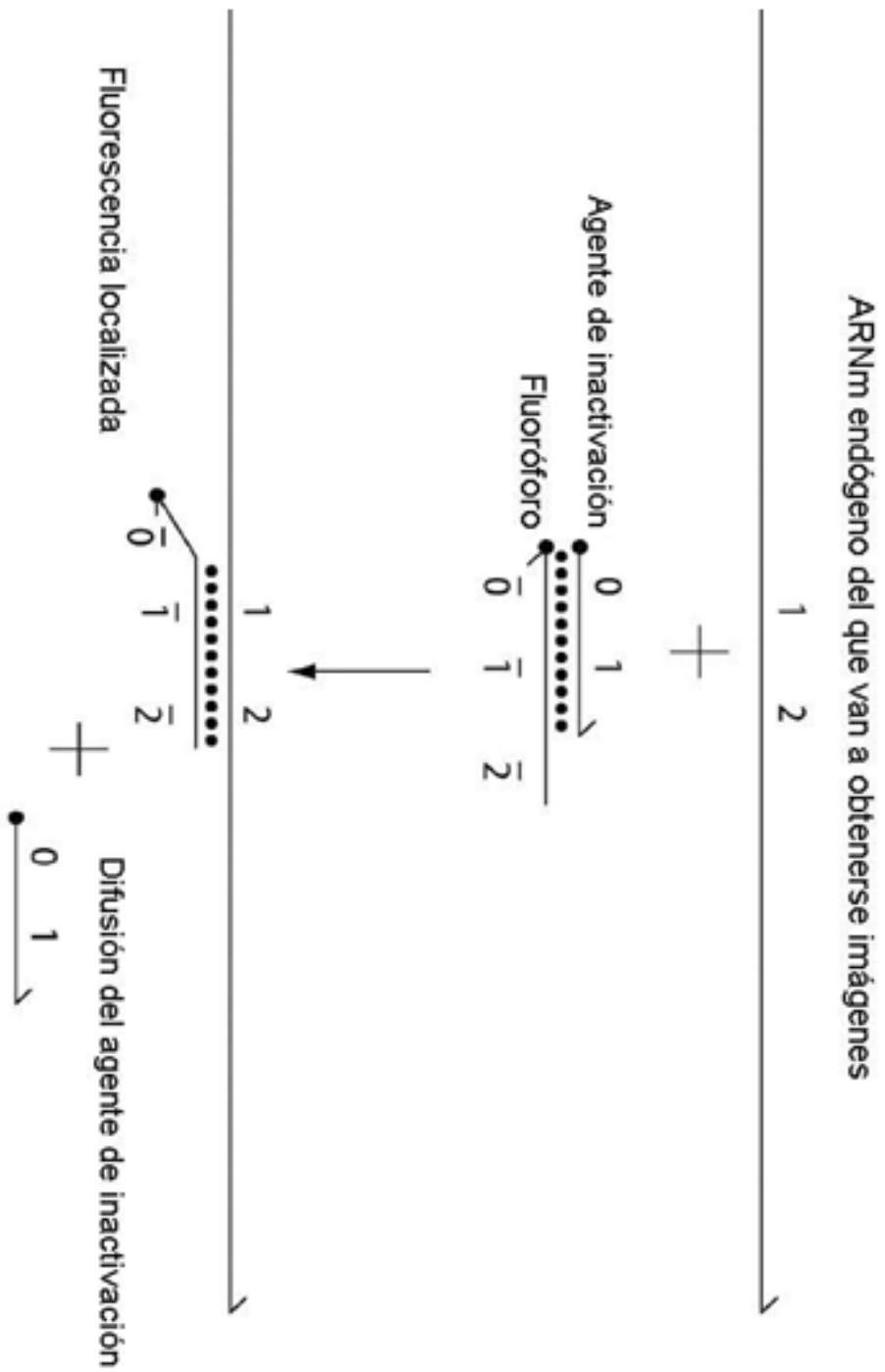


Fig. 14

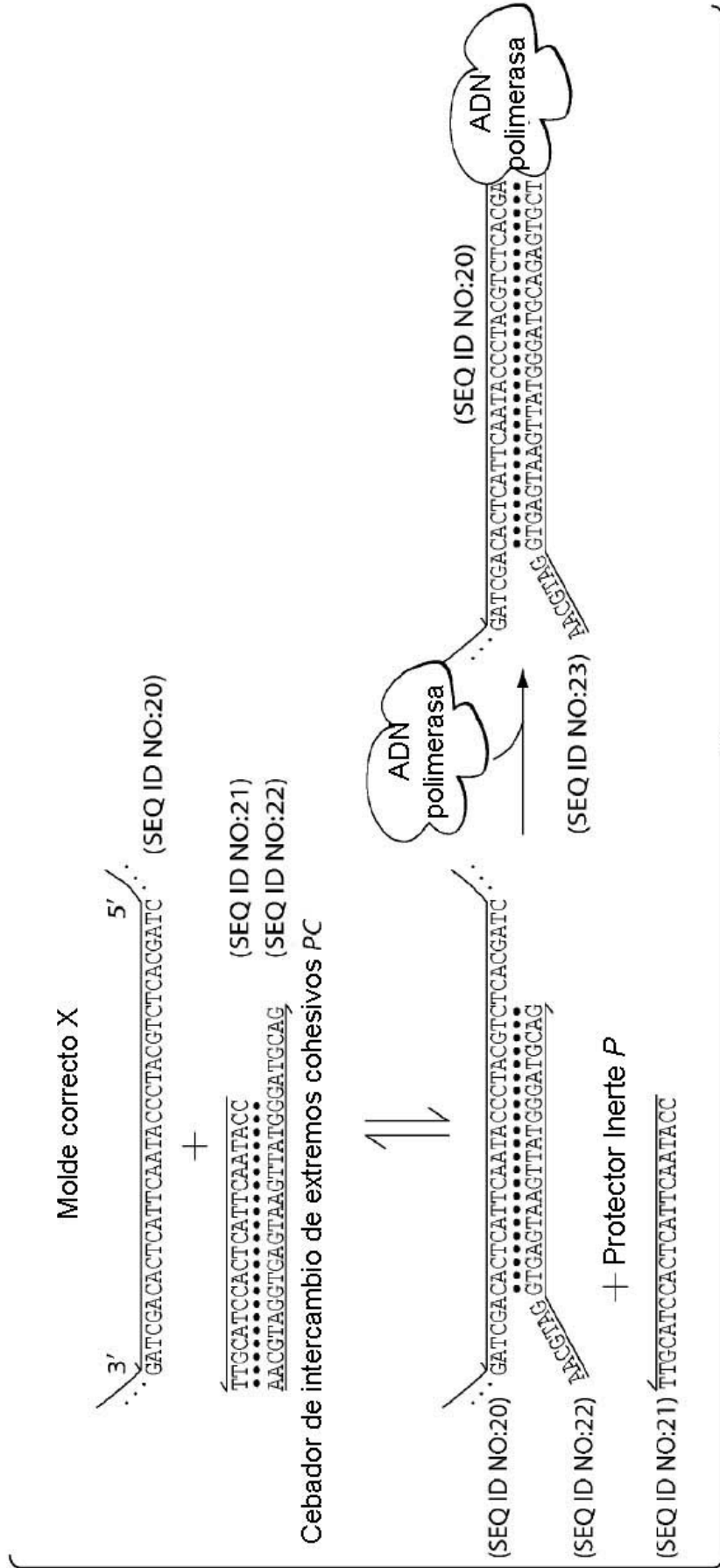


Fig. 15A

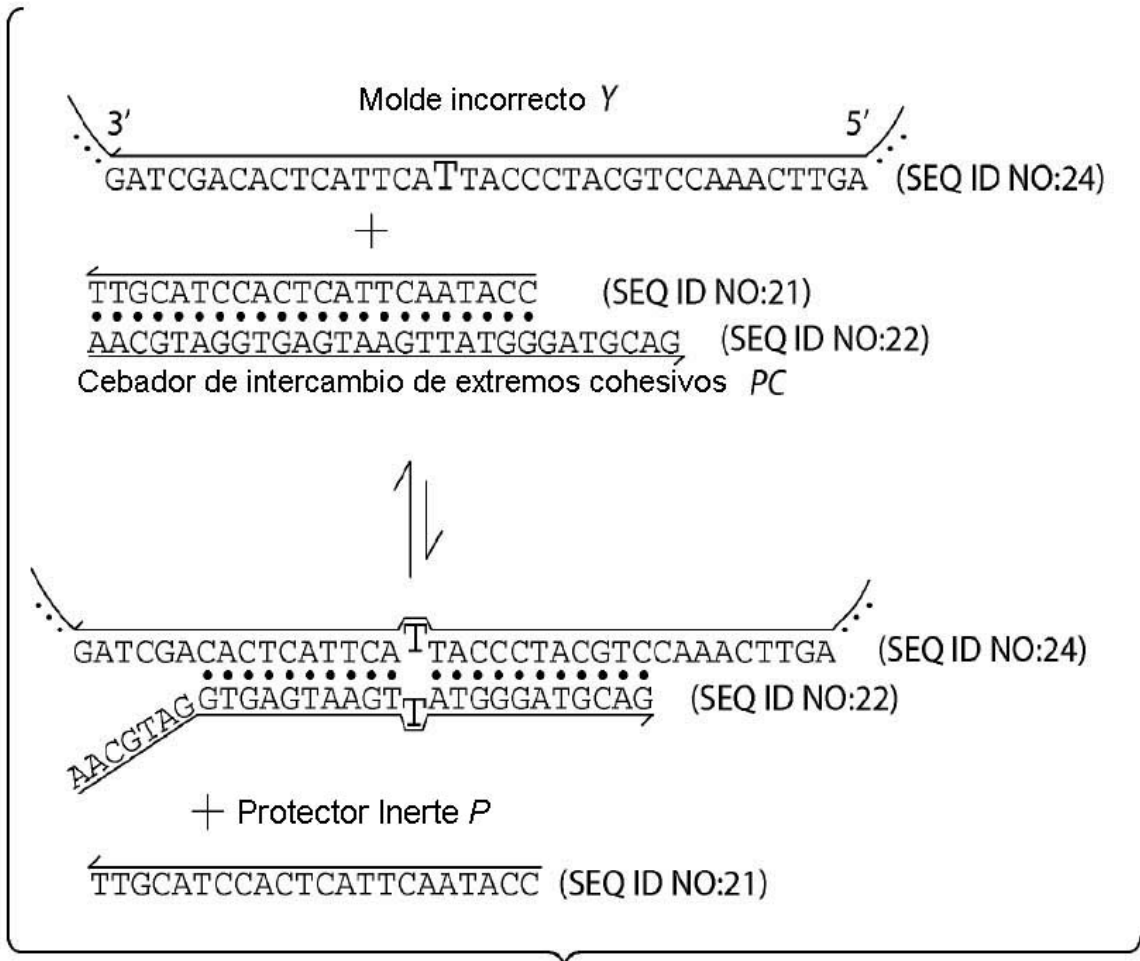


Fig. 15B

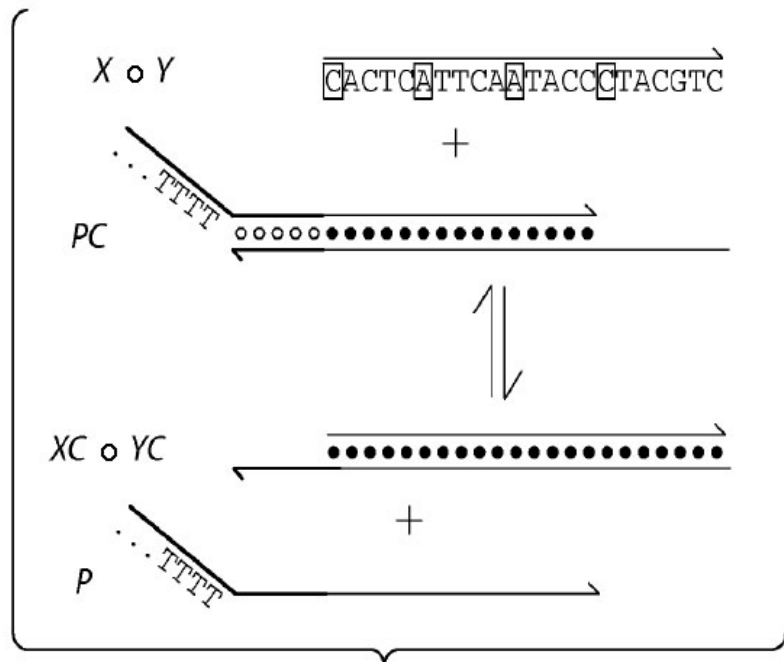


Fig. 16A

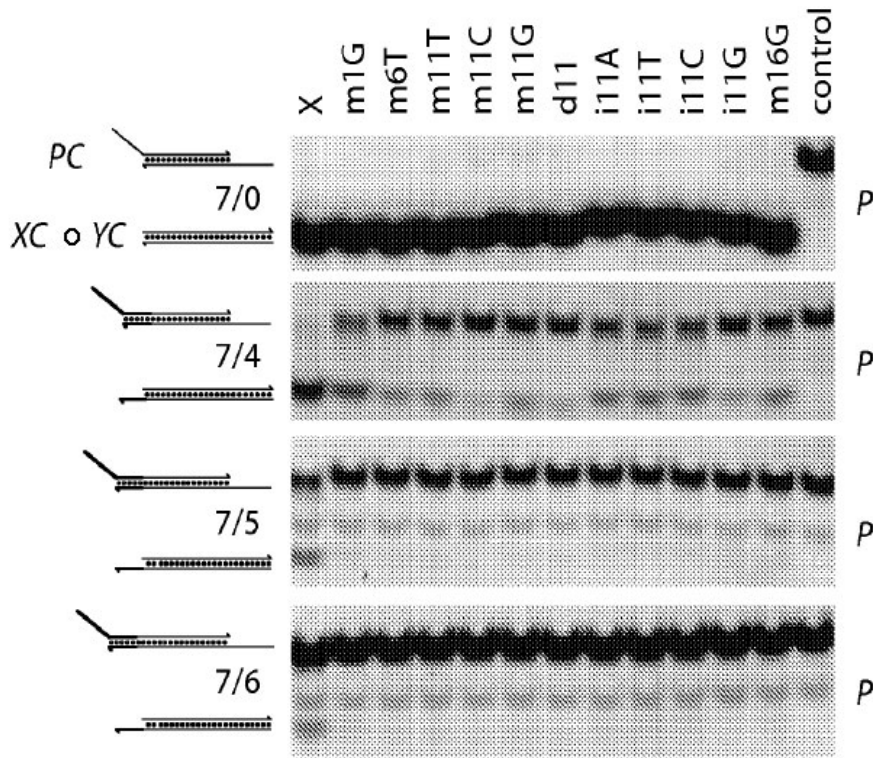


Fig. 16B

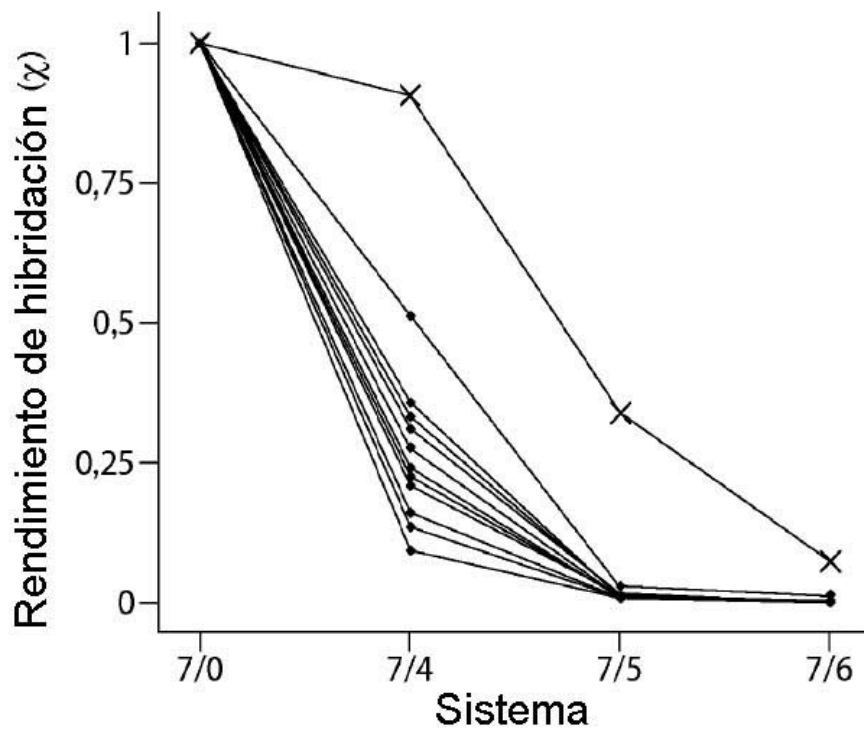


Fig. 16C

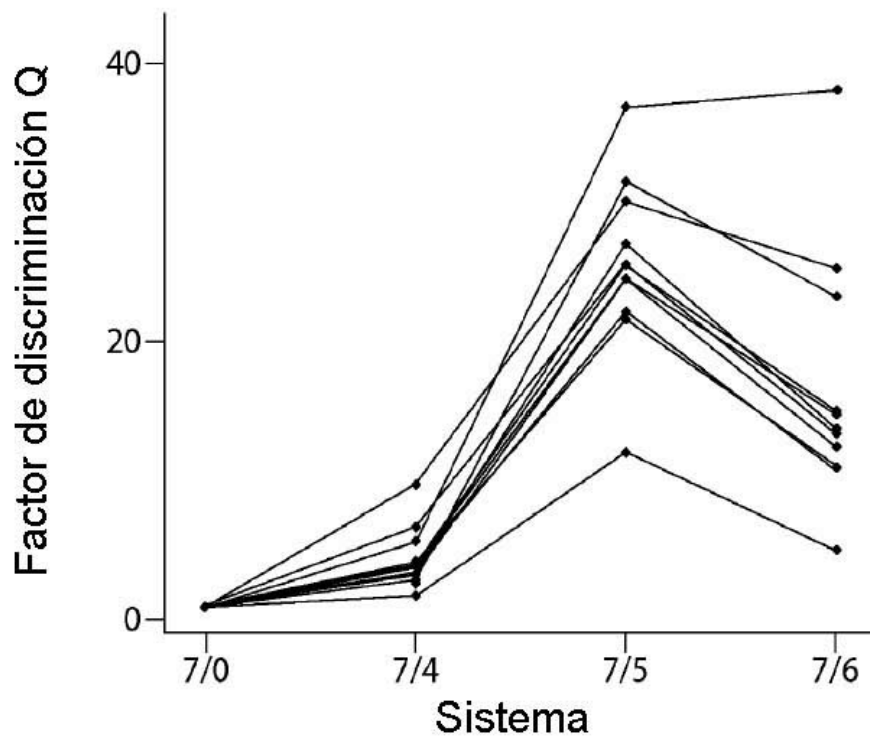


Fig. 16D



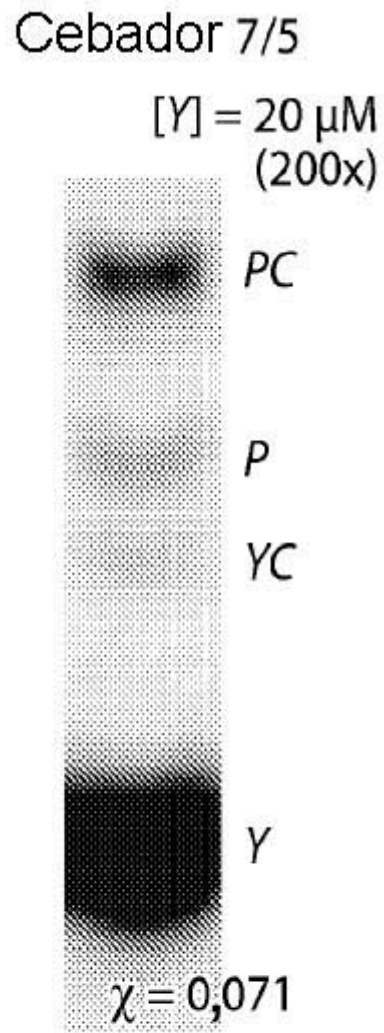


Fig. 16E

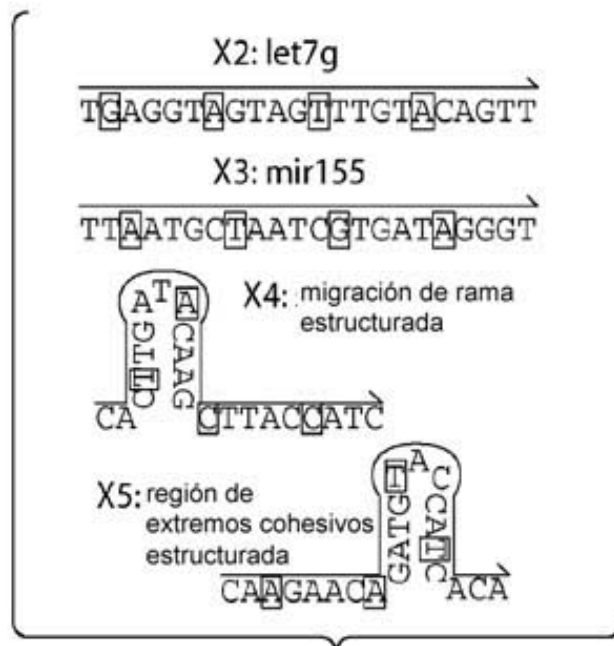


Fig. 17A

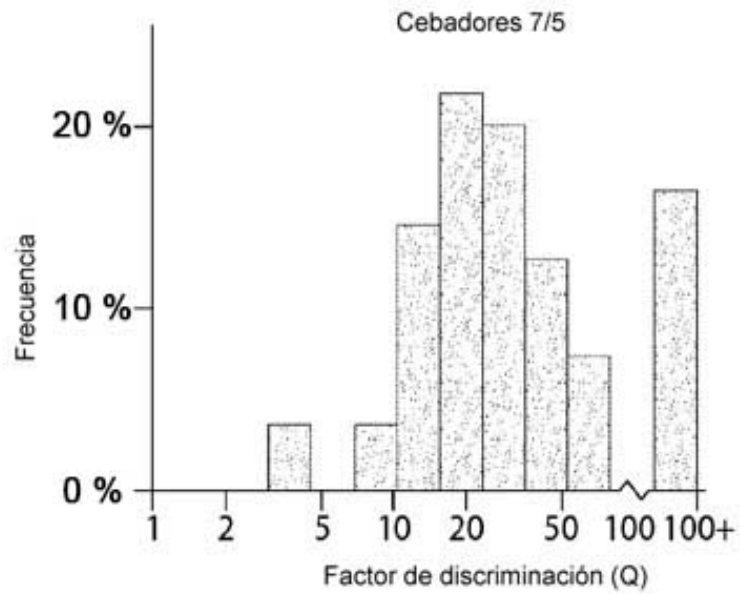


Fig. 17B

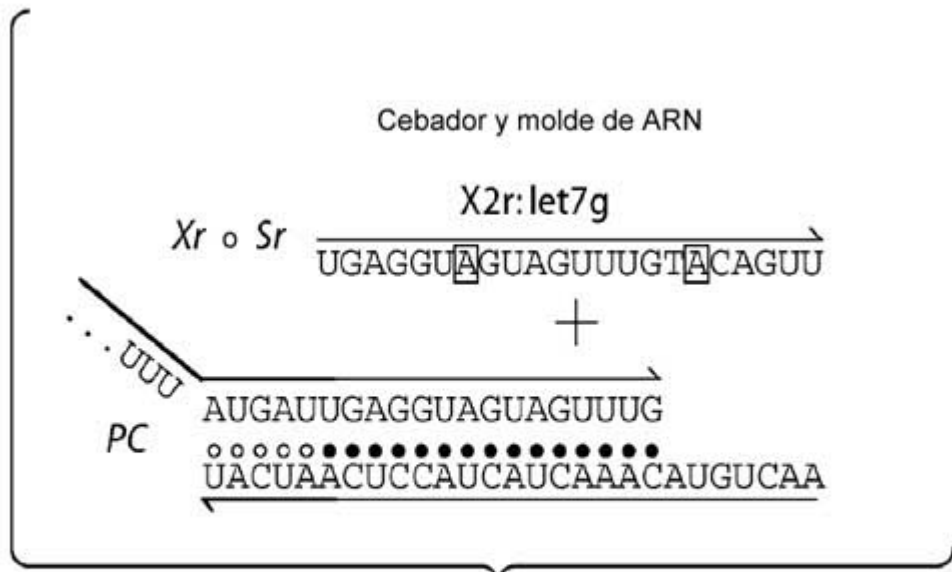


Fig. 17C

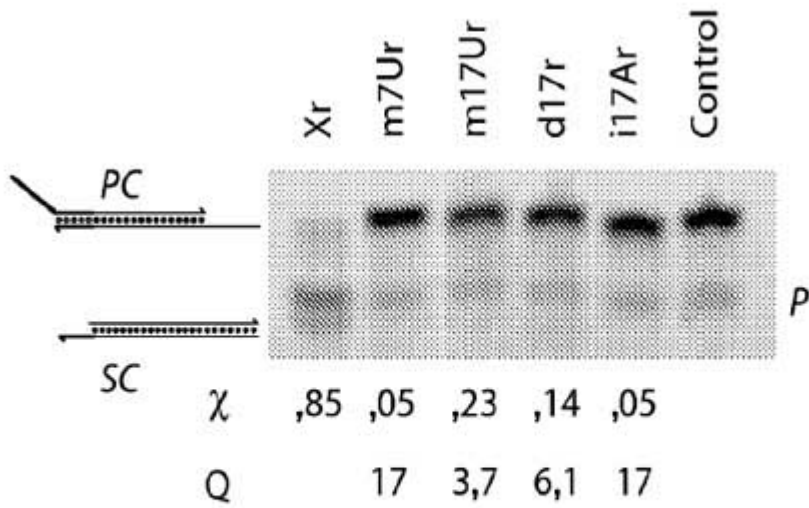


Fig. 17D

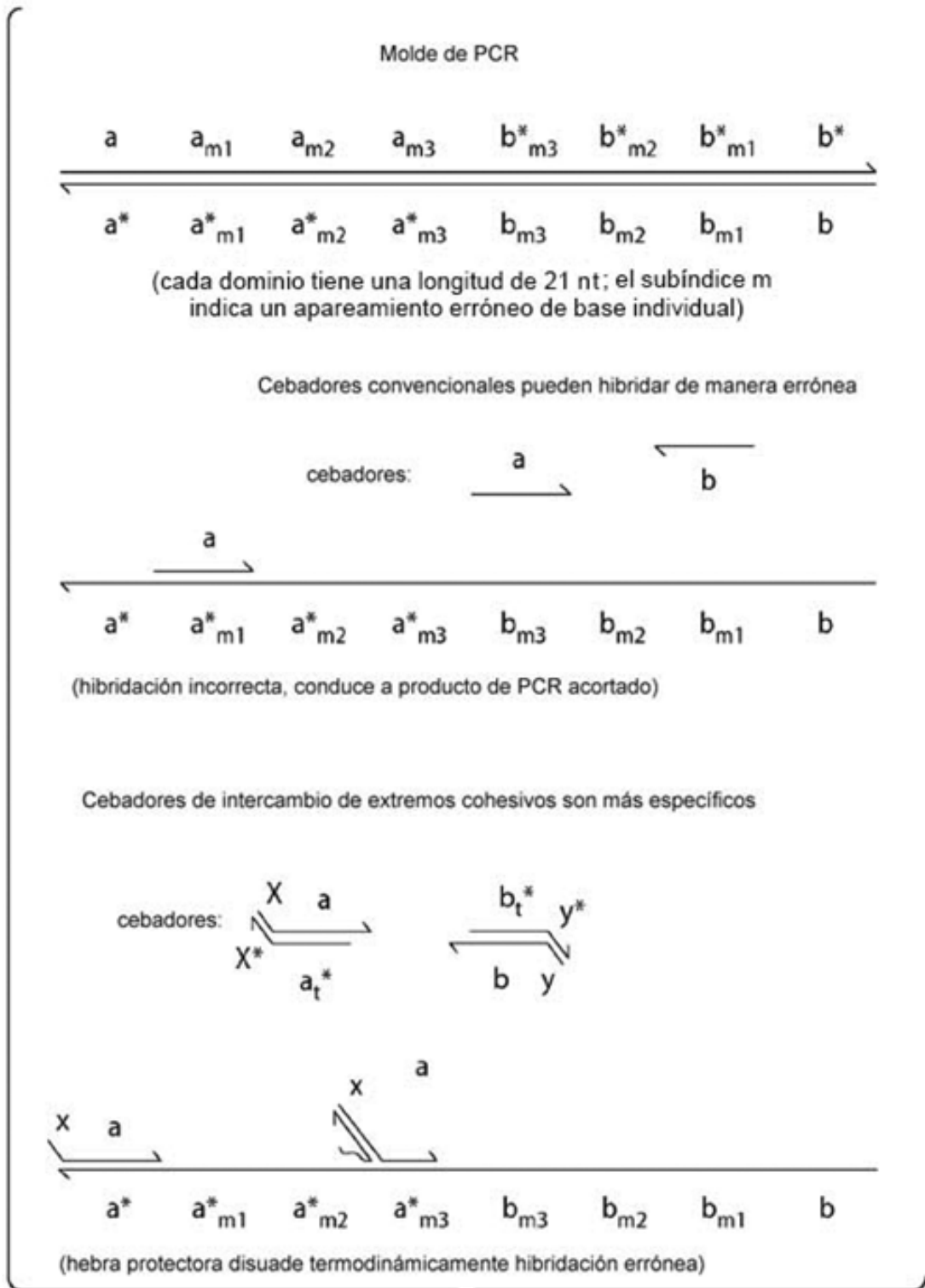


Fig. 18A

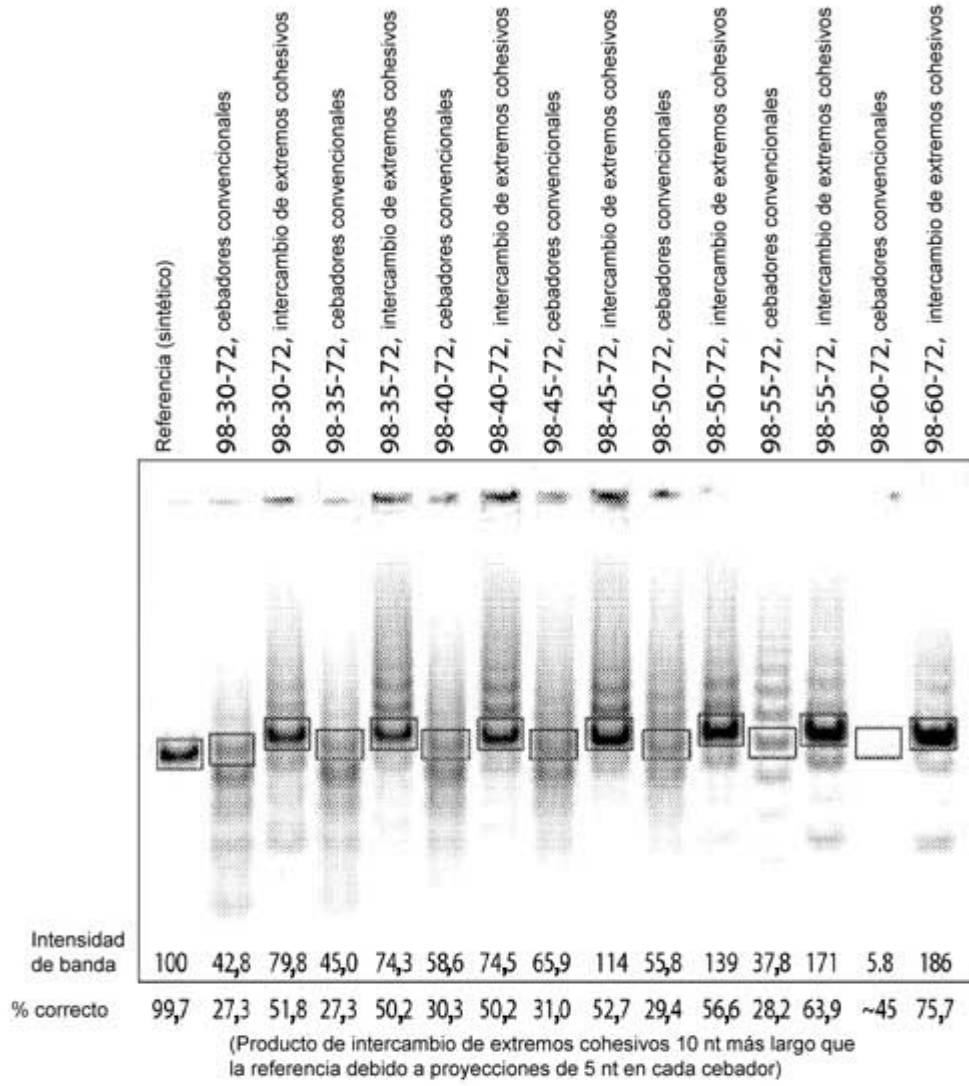


Fig. 18B