

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 583**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6816 (2008.01)

C12Q 1/6844 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2015 PCT/GB2015/051545**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2015 WO15181547**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2015 E 15727439 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3149197**

54 Título: **Método de detección molecular mejorado**

30 Prioridad:

28.05.2014 GB 201409427

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

03.09.2020

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF BIRMINGHAM (100.0%)
Edgbaston
Birmingham B15 2TT, GB**

72 Inventor/es:

**DAFFORN, TIMOTHY y
HICKS, MATTHEW**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 781 583 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de detección molecular mejorado

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere a un sensor molecular, que utiliza el dicroísmo para identificar la presencia de una molécula de ácido nucleico en una muestra, en particular, pero no exclusivamente, durante o tras una reacción de amplificación que incluye, pero sin limitación, reacciones de PCR/termociclado y reacciones isotérmicas. La divulgación también se refiere a un elemento sensor para su uso en el sensor. El método de la presente invención se define en las reivindicaciones 1 a 8 adjuntas.

Antecedentes de la invención

15 Debido a su naturaleza, los organismos contienen gran cantidad de moléculas complejas y ensamblajes moleculares. Parte de las moléculas y de los ensamblajes más importantes, entre los que se incluye el ADN, tienen altas relaciones de aspecto (es decir, un eje de una longitud significativamente superior a la de cualquier otro). Se conoce el uso de un aparato óptico para detectar de forma específica estas moléculas con alta relación de aspecto. Dicho aparato se basa en el modo en que estas moléculas largas interactúan con la luz polarizada (es decir, la luz con un campo eléctrico establecido en una sola dirección).

El fenómeno que se utiliza en el aparato anterior se conoce como dicroísmo. La luz incidente puede estar polarizada linealmente, dando lugar a un dicroísmo lineal (DL) o puede estar polarizada circularmente, dando lugar a un dicroísmo circular (DC). El DL es la propiedad presentada por algunas estructuras moleculares, mediante la que la luz polarizada linealmente es absorbida de forma diferencial a lo largo de dos ejes ortogonales. El DC se refiere a la diferencia de absorción de la luz polarizada circularmente hacia la derecha o hacia la izquierda. Una molécula que es capaz de absorber la luz de forma selectiva se denomina cromóforo. Las moléculas dicroicas, es decir, aquellas que presentan propiedades dicroicas, son un tipo particular de cromóforo. Los ejemplos de materiales dicroicos son determinados cristales naturales, polímeros estirados y otras moléculas no isotrópicas. Las biomoléculas contienen un amplio intervalo de cromóforos (que incluyen cadenas laterales aromáticas, nucleótidos y cadenas principales peptídicas).

Para poderse observar un efecto dicroico, es necesario que los cromóforos estén alineados, o al menos parcialmente alineados, con respecto a los haces de la luz polarizada incidentes. Algunos ejemplos de fracciones de interés que se han alineado con éxito incluyen biomoléculas lineales en forma de ADN, proteínas fibrosas y membranas (que incluyen proteínas de la membrana) (Marrington R., Small E., Rodger A., Dafforn T. R., Addinall S. G., "FtsZ fiber bundling is triggered by a conformational change in bound GTP" *J Biol Chem* 2004;279(47):48821-48829; Dafforn T. R., Rajendra J., Halsall D. J., Serpell L. C., Rodger A., "Protein fiber linear dichroism for structure determination and kinetics in a low-volume, low-wavelength cuvette flow cell" *Biophys J* 2004;86(1 Pt 1):404-410; Dafforn T. R., Rodger A., "Linear dichroism of biomolecules: which way is up?" *Curr Opin Struct Biol* 2004;14(5):541-546; Halsall D. J., Rodger A., Dafforn T. R., "Linear dichroism for the detection of single base pair mutations" *Chem Commun* (Camb) 2001 (23):2410-2411).

Un método particularmente conveniente para alinear dichas moléculas es el de preparar una solución que incluya las moléculas y, después, hacer fluir la solución. Debido a la naturaleza alargada de las moléculas, el alineamiento se produce como resultado de fuerzas de cizalla generadas por el flujo, haciendo que la muestra sea adecuada para presentar el efecto de dicroísmo lineal.

En un aparato conocido, una vez que se han alineado las moléculas de interés, se dirige la luz polarizada linealmente a través de la solución desde una dirección esencialmente perpendicular a los ejes de las moléculas alineadas. La absorción de luz se produce dentro de una molécula, porque, a una determinada longitud de onda, el campo eléctrico de la radiación impulsa a los electrones de la molécula en una determinada dirección. Cuando varias moléculas se alinean de forma similar, todos los electrones de cada una de ellas se caracterizan por la misma dirección preferida de desplazamiento neto. El DL es una medida de la diferencia de absorbancia de la luz incidente entre dos polarizaciones ortogonales. La variación de la longitud de onda de la luz incidente y la detección de la luz que sale de la muestra permiten obtener un espectro que ilustre la absorbancia de la muestra con respecto a la longitud de onda.

Un espectro de DL de una molécula proporciona información sobre los cromóforos que están presentes incluyendo la orientación de los cromóforos (y, por consiguiente, la conformación molecular) y la orientación de los cromóforos con respecto a los ejes de polarización. Esta información es importante para comprender la estructura de la molécula. Cabe señalar que el DL es una medida de una propiedad de volumen de la muestra. La intensidad de la absorbancia se puede usar para cuantificar el número de moléculas diana que están presentes en la muestra. Además, dado que el DL es muy sensible a los cambios en el alineamiento, se puede detectar una anomalía en la estructura de una molécula. Por ejemplo, el DL puede detectar la distorsión causada por un solo enlace de hidrógeno con apareamiento erróneo en un fragmento de ADN de 1.300 pb (pares de bases).

Además, el DL es sumamente sensible a la formación de un complejo, ya que la unión de una molécula alineada a una segunda molécula tiene los dos siguientes efectos medibles:

- 5 1) Se modifica la forma de la fracción alineada y esto también produce una modificación del alineamiento, lo que conduce a un cambio en el espectro de DL observado.
- 2) La propia segunda molécula llega a alinearse gracias a su unión con la molécula alineada. Esto conduce a la generación de una señal de DL para los cromóforos previamente sin alinear de la segunda molécula. Así pues, se puede obtener información de la estructura del complejo.

10 Ambos efectos anteriores dan lugar a fenómenos detectables que se pueden usar para detectar la formación de complejos. No solo se puede deducir la información estructural relativa a la naturaleza del complejo, sino que también se puede determinar la afinidad de la interacción.

15 Hay muchas áreas en las que es deseable detectar la presencia de una secuencia específica de ácido nucleico. Por ejemplo, en la detección de enfermedades o marcadores biológicos para determinados genes, la secuencia de ácido nucleico puede usarse para detectar la presencia de un patógeno o de un gen. Además, se puede cuantificar la cantidad de la secuencia específica que está presente.

20 Un ejemplo de un método para detectar pequeñas cantidades de ADN es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la que el ADN se amplifica, mediante un proceso de replicación usando una enzima y sustratos adecuados. La secuencia bicatenaria original (diana), si está presente, se separa en dos cadenas sencillas, mediante el uso de calor. Cada ADN monocatenario está unido por un oligonucleótido (cebador) corto (normalmente de 10-30 bases). El ADN es replicado por una enzima ADN polimerasa (estable al calor) usando la diana para determinar la secuencia y el cebador como punto de partida para dar una nueva molécula de ADN (amplificador). Este proceso se repite a través de varios ciclos, produciendo un crecimiento exponencial de la concentración de amplificador. Los componentes básicos son nucleótidos.

30 La detección del amplificador se ha llevado a cabo previamente de diferentes maneras, siendo los principales métodos:

La detección solo al final de la PCR:

- 1) Separación electroforética de los componentes de la reacción al final de la reacción para detectar la presencia o ausencia de la secuencia diana de ácido nucleico
- 35 Para detectar las cantidades crecientes del producto durante la reacción (q-PCR) y posiblemente usar esto para inferir la concentración inicial de la diana:
- 2) Uso de un colorante que solo se une a ácidos nucleicos bicatenarios, pero no a monocatenarios
- 3) Uso de un colorante que cambia su fluorescencia cuando se une al ácido nucleico bicatenario
- 4) Marcaje de los cebadores oligonucleotídicos que se usan en la amplificación, de manera que haya dos moléculas de colorante en los extremos opuestos del oligonucleótido que apaguen una señal de fluorescencia en su forma libre, pero que den una gran señal al unirse a su secuencia complementaria.

45 Como se ha mencionado anteriormente, es posible detectar el ADN directamente de su señal de DL. En este enfoque, el amplificador se detecta directamente, sin el uso de colorantes, gracias a su capacidad de alinearse en flujo de cizalla en solución en mayor medida que los cebadores o nucleótidos. El alineamiento es inducido por el flujo a través de un tubo fino (capilar) o por el flujo de Couette. Esto último se logra, mediante el uso de dos cilindros coaxiales (uno dentro del otro) con un espacio anular entre ellos. Se hace girar un cilindro con respecto al otro y se forma un gradiente de cizalla que produce el alineamiento de algunas moléculas que tienen un eje mucho más largo que el otro. En las muestras en donde hay mucho amplificador, la diferencia en la absorbancia será amplia, dando una gran señal de DL. Además de poder detectar el amplificador en diferentes números de ciclo, recientemente, a través de avances técnicos en la velocidad de calentamiento y enfriamiento de las células de DL, ha sido posible llevar a cabo la reacción de amplificación en la célula de alineamiento de DL y realizar la q-PCR. Sin embargo, este enfoque de detección directa del amplificador tiene dos grandes desventajas:

- 55 1) El amplificador debe ser largo (> aproximadamente 400 pares de bases)
- 2) No hay margen para la multiplexación (véase más adelante).

60 El documento WO 2008/059280 desvela un sensor molecular en el que el elemento sensor comprendía una fracción de estructura base con una alta relación de aspecto que tenía una fracción receptora unida a la misma. El uso de una fracción de estructura base alineable como sustrato para la unión de una fracción receptora significaba que ni la propia fracción receptora ni la molécula diana requerían propiedades de alineamiento inherentes. Además de para poder identificar las moléculas alineadas, mediante el espectro de dicróismo resultante, el sensor se puede usar para cuantificar las moléculas alineadas y para detectar la presencia de anomalías moleculares tales como apareamientos erróneos. También se pueden estudiar las propiedades de unión de la fracción receptora y la molécula diana usando el sensor. La naturaleza inherente de las moléculas dicróicas significa que el sensor es sumamente sensible.

La presente invención representa un desarrollo adicional del sensor desvelado en el documento WO 2008/059280, y tiene por objeto mejorar la aplicación del análisis dicróico en las moléculas de ácido nucleico.

5 Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método de detección de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho método;

10 proporcionar una pluralidad de complejos de estructura base/receptor alineables, comprendiendo cada uno de dichos complejos una fracción de estructura base a la que está unido un receptor que comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a al menos una parte de la molécula de ácido nucleico diana, en donde la fracción de estructura base del complejo de estructura base/receptor tiene una relación de aspecto superior a 5:1, exponer el complejo de estructura base/receptor a la muestra, mediante lo que el receptor se une a la molécula de ácido nucleico diana si está presente,

15 inducir el alineamiento entre los complejos de estructura base/receptor/diana, y usar el dicróismo lineal (DL) para detectar un cambio en el alineamiento de los complejos de estructura base/receptor efectuado por la unión de la molécula de ácido nucleico diana, si está presente, con el receptor,

20 en donde se proporcionan al menos un primer y un segundo complejo de estructura base/receptor alineable y en donde cada uno de entre el primer y el segundo complejo de estructura base/receptor se une al mismo ácido nucleico diana, comprendiendo el receptor del primer complejo una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una primera parte del ácido nucleico diana, y comprendiendo el receptor del segundo complejo una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una segunda parte del ácido nucleico diana.

25 La molécula de ácido nucleico diana puede ser monocatenaria o bicatenaria, en donde, en el caso de esta última, la molécula de ácido nucleico bicatenaria bien i) se desnaturaliza parcialmente para permitir la unión del receptor a la cadena complementaria o ii) se produce la formación de un complejo de triple cadena en donde el receptor se une a la diana bicatenaria.

30 El cambio en el alineamiento del complejo de estructura base/receptor causado por la unión de la molécula diana puede ser una reducción del alineamiento o un aumento del alineamiento. La primera se lleva a cabo, mediante la interrupción del alineamiento debido a i) el entrecruzamiento de los complejos de estructura base/receptor por parte de la diana o ii) un cambio en las propiedades hidrodinámicas del complejo de estructura base/receptor/diana que produce un menor alineamiento. Este último se lleva a cabo, mediante un cambio en las propiedades hidrodinámicas del complejo de estructura base/receptor/diana que produce un mayor alineamiento, por ejemplo, mediante la asociación de una molécula diana muy larga con la estructura base/el receptor.

35

El alineamiento del complejo de estructura base/receptor puede lograrse, mediante cualquier método conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, el complejo de estructura base/receptor se puede alinear, mediante flujo de cizalla, alineamiento magnético, efectos electroforéticos o mediante el uso de geles exprimidos. Los expertos en la materia conocerán los métodos de detección de la señal de DL del complejo de estructura base/receptor.

40

El método comprende proporcionar al menos un primer y un segundo complejo de estructura base/receptor alineable. En una realización no relacionada con la presente invención, el primer y el segundo complejo de estructura base/receptor se unen a diferentes ácidos nucleicos diana. En esta realización, el receptor del primer complejo comprende una secuencia de ácido nucleico que es diferente de la del receptor del segundo complejo. En una realización particular, se usa una pluralidad de distintos tipos de complejos de estructura base/receptor, en donde los receptores de cada tipo de complejo comprenden una secuencia de ácido nucleico diferente para unir diferentes ácidos nucleicos diana. Esta realización permite la multiplexación, es decir, la detección de múltiples ácidos nucleicos diana diferentes en un solo ensayo. Esto requiere que se unan diferentes cromóforos a los complejos de estructura base/receptor de modo que se detecte una señal de DL diferente para cada diana.

45

50

En una realización de acuerdo con la invención, se proporciona un primer y un segundo complejo de estructura base/receptor, cada uno de los cuales se une al mismo ácido nucleico diana. En esta realización, el receptor del primer complejo comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una primera parte del ácido nucleico diana, y el receptor del segundo complejo comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una segunda parte del ácido nucleico diana.

55

En una realización adicional, en donde el ácido nucleico diana es bicatenario, el receptor del primer complejo comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a al menos una parte de una cadena de la molécula de ácido nucleico diana bicatenaria, y el receptor del segundo complejo comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a al menos una parte de la otra cadena de la molécula de ácido nucleico diana de bicatenaria. Una molécula de ácido nucleico diana bicatenaria puede unirse simultáneamente a un receptor en un primer complejo y a un receptor en un segundo complejo, produciendo así el entrecruzamiento entre el primer y el segundo complejo, dando lugar a una reducción del alineamiento de los complejos que es detectable por el DL.

60

65

El método puede comprender además una etapa de amplificación de la molécula de ácido nucleico diana que puede

estar presente en la muestra. Esto es particularmente útil cuando la concentración de la molécula de ácido nucleico diana en la muestra es baja. La molécula de ácido nucleico diana puede amplificarse usando cualquier método de amplificación conocido por los expertos en la materia, entre los que se incluyen, pero sin limitación, los métodos de termociclado (por ejemplo, PCR) y los métodos isotérmicos (por ejemplo, LAMP - *Loop Mediated Amplification*, amplificación isotérmica mediada por bucle o RPA - *Recombinase Polymerase Amplification*, amplificación de recombinasa polimerasa). Así pues, en una realización, la molécula de ácido nucleico diana es un amplificador. Los cebadores para la amplificación están diseñados de manera que no interfieran con los complejos de estructura base/receptor. La amplificación de la molécula de ácido nucleico diana puede llevarse a cabo antes de la exposición del complejo de estructura base/receptor a la muestra. Como alternativa, la etapa de amplificación puede llevarse a cabo en presencia del complejo de estructura base/receptor. En esta realización, la reacción de amplificación se lleva a cabo en una célula de alineamiento de DL. Después, durante la reacción de amplificación, se pueden controlar los cambios en la alineamiento del complejo de estructura base/receptor, causado por la unión de los amplificadores con el complejo de estructura base/receptor.

15 El receptor puede comprender un oligonucleótido, tal como una molécula de ADN o ARN, o el receptor puede comprender una molécula de ANP (ácido nucleico peptídico).

En una realización, el receptor consiste en una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a al menos una parte de la molécula de ácido nucleico diana. En una realización particular, el receptor consiste en un oligonucleótido u otra molécula que presenta suficiente especificidad por la diana.

El ácido nucleico receptor u otra molécula necesita tener una especificidad suficiente por la diana de manera que lo distinga de otras moléculas no diana. Esto no significa que la secuencia de, por ejemplo, el ácido nucleico, deba tener una complementariedad total con la diana. La cantidad de complementariedad con la diana que comprende suficiente especificidad para la aplicación dependerá de la temperatura, de la fuerza iónica y de otros parámetros fisicoquímicos.

Se entenderá que la fuerza de unión de las secuencias de ácido nucleico entre sí es un parámetro bien conocido que puede calcularse en función de la secuencia.

Si hay una variación natural en la secuencia diana, entonces es posible producir una multitud de secuencias receptoras que tengan una parte de la secuencia aleatorizada (que tenga cualquiera de las bases en uno o más sitios de la secuencia).

35 Como se usa en el presente documento, una relación de aspecto alta se refiere a una relación de aspecto superior a 5:1, superior a 10:1, superior a 20:1, superior a 50:1, superior a 75:1 y, en algunas realizaciones, superior a 100:1.

La fracción de estructura base puede tener una alta relación de aspecto o el complejo de estructura base/receptor tener una alta relación de aspecto.

40 Los ejemplos de fracciones de estructura base adecuadas incluyen

- polímeros sintéticos,
- nanotubos de carbono,
- 45 • fibras biomoleculares,
- cristales,
- partículas inorgánicas, por ejemplo, fragmentos metálicos
- construcciones biológicas sintéticas.

50 Como se usa en el presente documento, una fibra biomolecular es cualquier biomolécula que tenga la alta relación de aspecto requerida y que pueda alinearse en condiciones de flujo. Los ejemplos de fibras biomoleculares incluyen vesículas de lípidos, bacteriófagos filamentosos y polímeros, tales como polímeros de aminoácidos (es decir, polipéptidos o proteínas) y polímeros de ácidos nucleicos (es decir, ARN o ADN).

55 En determinadas realizaciones, la fibra biomolecular es un bacteriófago filamentosos, tal como M13, f1, fd, I_{ke} y N1.

En algunas realizaciones, la estructura base puede modificarse, mediante la adición de un cromóforo, de modo que la propia estructura base no necesita ser inherentemente dicroica. El cromóforo se une a la fracción de estructura base de modo que no se puede intercambiar libremente con las otras fracciones de estructura base. En determinadas realizaciones, la unión es mediante uno o más enlaces covalentes.

Los ejemplos de cromóforos adecuados incluyen los de la siguiente Tabla 1.

Tabla 1

Clase de cromóforo	Ejemplos (lista no exhaustiva)
AlexaFluor(AF)	AF405, AF488, AF555, AF610, AF647, AF700.
Compuestos espiro	Fluorescamina,
Xantonas	por ejemplo, fluoresceínas (isotiocianato de fluoresceína, N-hidroxisuccinimida-fluoresceína), rodaminas (isotiocianato de rodamina, isotiocianato de tetra-metilrodamina)
Benzopironas	Cumarina
Intercaladores de ADN	Bromuro de etidio

5 De acuerdo con un aspecto no de acuerdo con la presente invención, se proporciona un elemento sensor que comprende un complejo de estructura base/receptor alineable, comprendiendo el receptor de dicho complejo una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a al menos una parte de una molécula de ácido nucleico diana.

10 De acuerdo con un aspecto adicional no de acuerdo con la presente invención, se proporciona un sensor molecular para detectar una molécula de ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo el sensor molecular:

un paso de flujo configurado para hacer fluir una solución que contenga potencialmente una molécula de ácido nucleico diana;
una fuente de luz polarizada;
un detector dispuesto para recibir luz de la fuente después de haber pasado a través del paso de flujo y capaz de
15 medir el grado de polarización de la luz en dos polarizaciones orientadas ortogonalmente; y
un elemento sensor de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención.

20 Se entenderá que la fuente de luz en sí misma puede producir luz polarizada o se puede aplicar un filtro adecuado entre la fuente de luz y el paso de flujo. Como alternativa, el sensor puede usar luz no polarizada, estando la detección de la polarización de la luz completamente dentro del detector.

El paso de flujo puede ser proporcionado convenientemente por una célula Couette o un paso de flujo simple, por ejemplo, en un chip de plástico.

25 Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá además a modo de ejemplo solo con referencia a los dibujos adjuntos, en los que

30 La Figura 1 es un esquema de un sensor para su uso en un método de acuerdo con una realización de la presente invención;

La Figura 2a es un esquema del primer y de un segundo complejo de estructura base/receptor para su uso en un método de acuerdo con una realización de la presente invención, antes de la exposición a una muestra que contiene un ácido nucleico diana;

35 la Figura 2b es un esquema del primer y del segundo complejo de estructura base/receptor que se unen a un ácido nucleico diana, para su uso en un método de acuerdo con una realización de la presente invención;

la Figura 3 es un ejemplo de señales de DL a 220 nm en ausencia y en presencia de la molécula diana con los controles apropiados.

40 Descripción detallada de determinadas realizaciones

Con referencia a la Figura 1, se ilustra un sensor molecular 8 para su uso en un método de acuerdo con la presente invención. El sensor 8 comprende un paso de flujo en forma de un tubo alargado 2 que está fabricado principalmente de material plástico y que es opaco. La parte central del tubo 12 está configurada como una ventana de observación 6 y está fabricada de un material que es transparente a la longitud de onda de la luz empleada. En este ejemplo en particular, la ventana de observación 6 está fabricada de cristal de cuarzo, que es transparente a la luz visible. Así
45 pues, en este ejemplo, la ventana de observación 6 está configurada para permitir que pase a través de la misma luz en un intervalo de longitud de onda de aproximadamente 400 nm a 700 nm. Junto a un lado de la ventana de observación 6 está la fuente de luz 3. La fuente de luz 3 está configurada para que emita dos haces de luz polarizada linealmente ortogonales a través de la ventana de observación 6 y, de este modo, a través del paso de
50 flujo 5. Dispuesto en la parte opuesta a la fuente de luz 3, al otro lado de la ventana de observación 6 y del paso de flujo 5, se encuentra un detector 1. El detector 1 está configurado para detectar los haces de luz emitidos por la fuente de luz 3 una vez que han atravesado la ventana de observación 6 y el paso de flujo 5.

55 Cuando está en uso, una solución líquida que contiene una pluralidad de elementos sensores, comprendiendo cada uno (i) una fracción de estructura base alineable (y cromóforo unido) que tiene una alta relación de aspecto y (ii) uno o más receptores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a al menos una parte de

una molécula de ácido nucleico diana, se expone a una muestra para su análisis. La muestra, que puede incluir el ácido nucleico diana de interés, se hace fluir a través del tubo 2 en la dirección indicada por la flecha 4 en la Figura 1.

5 En referencia a la Figura 2a, un primer complejo 20 de estructura base/receptores alineable comprende una fracción de estructura base 22 a la que está unida una pluralidad de receptores 24, comprendiendo cada receptor una secuencia que es complementaria a una parte de una molécula de ácido nucleico diana (no mostrada). En la realización mostrada, se proporciona un segundo complejo 30 de estructura base/receptores que comprende un fracción de estructura base 32 que tiene unida a la misma una pluralidad de receptores 34. Los receptores 34
10 comprenden una secuencia que también es complementaria a una parte de la molécula de ácido nucleico diana, pero que es diferente a la secuencia de los receptores 24 del primer complejo 20 de estructura base/receptores.

Como se muestra en la Figura 2b, la secuencia de los receptores 24 es complementaria a una parte de una cadena 26 de una molécula de ácido nucleico diana bicatenaria 40, mientras que la secuencia de los receptores 34 es complementaria a una parte de la cadena opuesta 36 de la molécula de ácido nucleico diana 40. Cuando los complejos 20, 30 de estructura base/receptores se exponen a una muestra que contiene las moléculas de ácido nucleico diana 40, los receptores 24, 34 se hibridan con las cadenas de las moléculas de ácido nucleico diana 40 en virtud de las secuencias complementarias. Como se muestra en la Figura 2b, una sola molécula de ácido nucleico diana 40 puede hibridarse con un receptor 24 en un primer complejo 20 de estructura base/receptores y con un receptor 34 en un segundo complejo 30 de estructura base/receptores, haciendo así que los complejos 20, 30 se entrecrucen entre sí. Este entrecruzamiento de los complejos 20, 30 cambia el alineamiento de los complejos 20, 30 de estructura base/receptores en solución. El cambio en el alineamiento es detectado por el DL.

Esto se puede hacer, por ejemplo, para detectar la presencia de un gen, por ejemplo, el gen de resistencia a la ampicilina en *E. coli*. Con referencia a la Figura 3, la señal de DL, en este caso, procede de la señal de DL inherente de los cromóforos de la molécula de estructura base, pero también podría llevarse a cabo usando otros cromóforos que se conjugasen con la molécula de estructura base. La muestra 1 es una PCR llevada a cabo con cebadores directo e inverso en un gen de resistencia a la ampicilina de un plásmido bacteriano, pero sin una molécula de estructura base presente, por lo que se espera una señal mínima de DL. La muestra 2 es una PCR llevada a cabo con el cebador directo conjugado con la molécula de estructura base para formar un complejo de estructura base/receptor, y un cebador inverso que no está conjugado con una molécula de estructura base. Esto se ha llevado a cabo en ausencia del gen de resistencia a la ampicilina diana. Esta muestra representa una muestra negativa en el ensayo. La muestra 3 es una PCR llevada a cabo con el cebador directo conjugado con la molécula de estructura base para formar un complejo de estructura base/receptor, y un cebador inverso que no está conjugado con una molécula de estructura base. Esto se ha llevado a cabo en presencia del gen de resistencia a la ampicilina diana. Esta muestra representa una muestra positiva en el ensayo. La muestra de 1 muestra que el producto de PCR no interfiere significativamente con el ensayo. La reducción en la señal entre las muestras 2 y 3 muestra que el ADN diana que contiene el gen de resistencia a la ampicilina se puede detectar usando este ensayo.

REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho método; proporcionar una pluralidad de complejos de estructura base/receptor alineables, comprendiendo cada uno de dichos complejos una fracción de estructura base, a la que está unido un receptor, que comprende una secuencia de ácido nucleico, que es complementaria a al menos una parte de la molécula de ácido nucleico diana, en donde la fracción de estructura base o el complejo de estructura base/receptor tiene una relación de aspecto superior a 5:1, exponer el complejo de estructura base/receptor a la muestra, mediante lo cual el receptor se une a la molécula de ácido nucleico diana si está presente,
- 5
- 10 inducir el alineamiento entre los complejos de estructura base/receptor/diana, y usar el dicroísmo lineal (DL) para detectar un cambio en el alineamiento de los complejos de estructura base/receptor, provocado por la unión de la molécula de ácido nucleico diana, si está presente, al receptor, en donde se proporcionan al menos un primer y un segundo complejo de estructura base/receptor alineable, y en donde se une cada uno de entre el primer y el segundo complejo de estructura base/receptor al mismo ácido nucleico diana, comprendiendo el receptor del primer complejo una secuencia de ácido nucleico, que es complementaria a una primera parte del ácido nucleico diana, y comprendiendo el receptor del segundo complejo una secuencia de ácido nucleico, que es complementaria a una segunda parte del ácido nucleico diana.
- 15
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se realiza el alineamiento de los complejos de estructura base/receptor mediante flujo de cizalla, alineamiento magnético, efectos electroforéticos o mediante el uso de geles exprimidos.
- 20
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico diana es bicatenario, el receptor del primer complejo comprende una secuencia de ácido nucleico, que es complementaria a al menos una parte de una cadena de la molécula de ácido nucleico diana bicatenaria, y el receptor del segundo complejo comprende una secuencia de ácido nucleico, que es complementaria a al menos una parte de la otra cadena de la molécula de ácido nucleico diana de bicatenaria.
- 25
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una etapa de amplificación de la molécula de ácido nucleico diana, que puede estar presente en la muestra, opcionalmente, en donde la etapa de amplificación se lleva a cabo en presencia de los complejos de estructura base/receptor.
- 30
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el receptor comprende un oligonucleótido o una molécula de ácido nucleico peptídico.
- 35
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la fracción de estructura base se selecciona del grupo, que consiste en polímeros sintéticos, nanotubos de carbono, fibras biomoleculares, cristales, partículas inorgánicas y construcciones biológicas sintéticas.
- 40
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la fibra biomolecular es un bacteriófago filamentoso, tal como M13, f1, fd, I_{ke} y N1.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se modifica la estructura base, mediante la adición de un cromóforo.

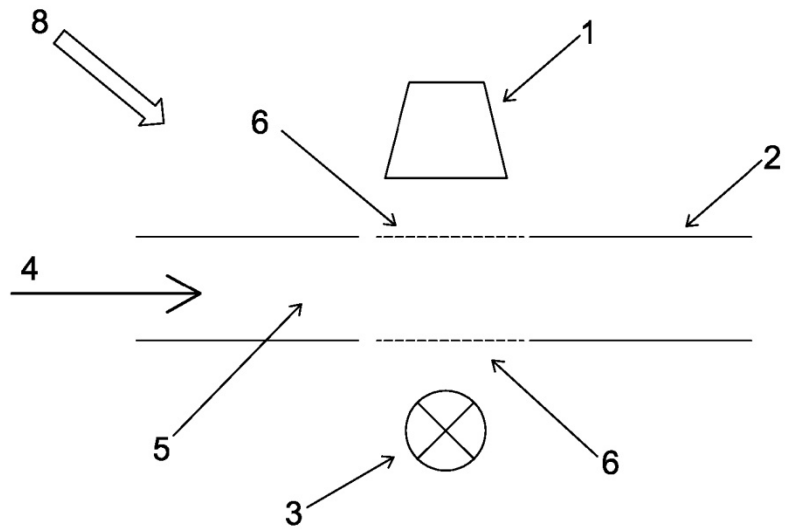


Figura 1

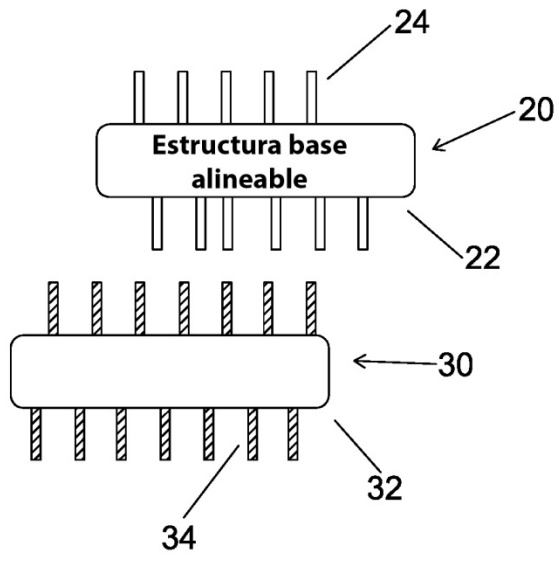


Figura 2a

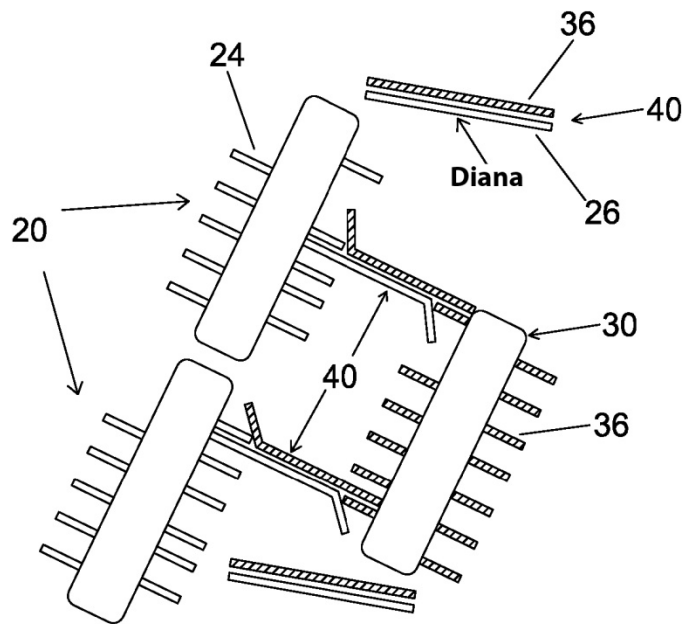


Figura 2b

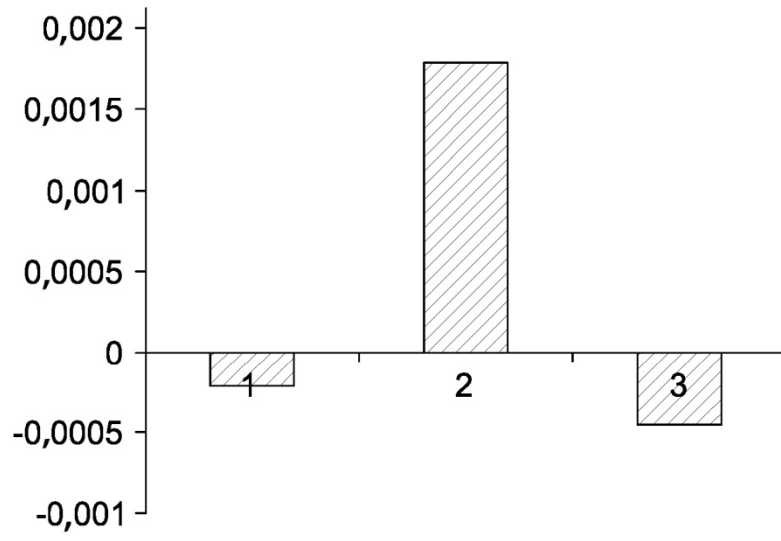


Figura 3