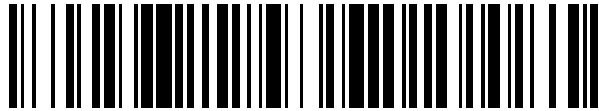


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 679**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6858 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2014 PCT/GB2014/050650**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014 WO14135872**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2014 E 14717167 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 2964784**

54 Título: **Sistema de detección de la reacción en cadena de la polimerasa**

30 Prioridad:

06.03.2013 GB 201304030

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

24.11.2020

73 Titular/es:

**LGC GENOMICS LIMITED (100.0%)
Queens Road Teddington
Middlesex TW11 0LY, GB**

72 Inventor/es:

**JAIN, NISHA y
HOLME, JOHN EDMOND**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 795 679 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

Sistema de detección de la reacción en cadena de la polimerasa

5 **Introducción**

La presente invención se refiere a métodos y kits para la detección de ácidos nucleicos en un sistema de ensayo.

10 **Antecedentes de la invención**

10 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método potente para la amplificación rápida de secuencias diana de ácidos nucleicos. La PCR ha facilitado el desarrollo de la caracterización de genes, incluyendo la expresión y/o regulación de genes, y las tecnologías de clonación molecular, incluyendo la secuenciación directa del ADN amplificado por PCR, la determinación de la variación alélica y la detección de enfermedades infecciosas y genéticas. La PCR se realiza mediante ciclos repetidos de desnaturalización térmica de un ADN molde que contiene la secuencia diana, anillado de cebadores opuestos a las cadenas de ADN complementarias, y extensión de los cebadores anillados con una polimerasa de ADN. Múltiples ciclos de PCR dan como resultado la amplificación de la secuencia de nucleótidos delimitada por los cebadores de amplificación flanqueantes. La introducción de una ADN polimerasa termoestable en el protocolo de PCR evita la necesidad de adiciones enzimáticas repetidas y permite 15 temperaturas elevadas de anillado y de extensión de los cebadores que mejoran la especificidad de las asociaciones cebador:molde. Las polimerasas termoestables, tales como la Taq ADN polimerasa, sirven por tanto para aumentar la especificidad y la simplicidad de la PCR.

25 En muchas amplificaciones basadas en la PCR, se emplea un sistema productor de señales, por ejemplo, para detectar la producción de producto amplificado. Un tipo de sistema productor de señales que se utiliza en las reacciones basadas en la PCR es el sistema de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), en el que un detector de ácidos nucleicos incluye grupos donantes y aceptores de fluorescencia. Los sistemas de marcaje FRET incluyen una serie de ventajas sobre otros sistemas de marcaje, que incluyen la capacidad de realizar ensayos homogéneos en los que no se requiere un paso de separación de detector de ácido nucleico marcado 30 ligado vs. no ligado. Un problema fundamental de muchas técnicas de la técnica anterior está relacionado con la síntesis de oligonucleótidos fluorescentes de marcaje doble. La solicitud de patente europea EP1726664 desvela un sistema de detección que soluciona este problema utilizando secuencias oligonucleotídicas de un solo marcaje y de diferente temperatura de fusión (T_m) que hibridan entre sí en solución libre para formar un par fluorescente desactivado (casete fluor/desactivador) que, al introducir una secuencia complementaria a una de las secuencias, genera una señal medible, una de las secuencias es de una T_m que está por debajo de la temperatura de anillado (Ta) del proceso de PCR. En este sistema, una de las secuencias oligonucleotídicas de un solo marcaje es preferentemente más de 10 bases más larga que la otra y, más preferentemente, al menos 15 bases más larga.

40 En los sistemas de detección que utilizan un detector de ácidos nucleicos marcados, la amplificación de alta fidelidad es crítica. Debido a la naturaleza del proceso de PCR y de la Taq ADN polimerasa, estos métodos pueden sufrir reacciones colaterales alternativas a la reacción de polimerización deseada. Por ejemplo, la PCR puede sufrir una amplificación inespecífica cuando la reacción se monta a temperatura ambiente. La Taq polimerasa conserva una fracción de su actividad a todas las temperaturas y, por lo tanto, puede extender cebadores que no están anillados de forma complementaria, induciendo la formación de productos no deseados. La región recién sintetizada actúa 45 entonces como un molde para una extensión adicional de cebadores y síntesis de productos de amplificación no deseados. Sin embargo, si la reacción se calienta a temperaturas de alrededor de 50 °C o más antes de que comience la polimerización, la especificidad del anillado de los cebadores aumenta y se evita o reduce la síntesis de productos de PCR no deseados.

50 El dímero de cebadores también es una reacción colateral común que afecta a la PCR. La acumulación de dímeros de cebadores se produce por la hibridación y la extensión de los cebadores entre sí. La formación de dímeros de cebadores da lugar al agotamiento de los reactivos y, por tanto, a la reducción general de la eficacia de la PCR y/o a la producción de resultados falsos positivos.

55 La PCR de arranque en caliente es un método para reducir la amplificación inespecífica y, por lo tanto, limitar la formación de productos de PCR inespecíficos, incluyendo a los dímeros de cebadores. Se han desarrollado muchas estrategias diferentes para lograr esto; véase, por ejemplo, Moretti, T. et al. Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold DNA polymerase. *BioTechniques* 25, 716-22 (1998) y Hot Start PCR with heat-activatable primers: a novel approach for improved PCR performance *Nucleic Acids Res* (2008) 36(20): e131. Estos métodos reducen la extensión de los cebadores tras una hibridación inespecífica previa al inicio de la PCR. Sin embargo, dichas técnicas solo logran mitigar parcialmente dichos problemas, ya que pueden producirse acontecimientos de cebado erróneo, que incluyen, aunque en menor medida, la formación de dímeros de cebadores, durante la amplificación de la PCR. El uso de sondas de PCR para detectar la presencia de una secuencia interna en los cebadores de PCR ayuda a evitar la detección de cualquiera de esos productos no específicos, pero añade 60 un costo significativo al proceso, ya que requiere una sonda dedicada para detectar cada secuencia individual. Un análisis genético de alto rendimiento y rentable requiere el uso de un sistema de detección universal, pero en

principio esto puede verse afectado por la detección de productos de amplificación no específicos. El documento WO2012/154876 desvela un método de detección que utiliza una sonda y un oligonucleótido regulador, en donde la sonda comprende una secuencia de reconocimiento de etiquetas de nucleótidos y una secuencia reguladora complementaria al oligonucleótido regulador,

5 Se necesitan sistemas de detección específicos, fáciles de sintetizar, de bajo costo y fiables, para su uso en la detección de productos de extensión de cebadores, por ejemplo, en ensayos de PCR homogéneos, que aborden los problemas con los que se enfrentan los sistemas de detección existentes para la PCR. El término ensayo de PCR homogéneo es muy conocido en la técnica, y es uno en el que no es necesario separar físicamente los componentes de la reacción para obtener el resultado de la misma. La presente invención se basa en el descubrimiento de que la selección de las longitudes relativas de las secuencias oligonucleotídicas marcadas que hibridan entre sí para formar un par fluorescente desactivado da lugar a mejoras en los sistemas de ensayo de detección de ácidos nucleicos, particularmente cuando se utilizan en una configuración a tiempo real. En la invención, la T_m del casete fluor/desactivador está diseñada para estar por encima de la T_a de la amplificación de manera que cualquier oligonucleótido fluorescente no incorporado hibrida con el oligonucleótido desactivador a la temperatura de registro de la fluorescencia, permitiendo monitorizar la reacción a tiempo real o en el punto final. Al ajustar la longitud y la T_m del oligonucleótido desactivador se esperaría que el aumento de la estabilidad del casete fluor/desactivador simplemente inhibiera la PCR. Sin embargo, se ha descubierto inesperadamente que la especificidad de la amplificación del cebador fluorescente ha mejorado, como lo demuestra el aumento significativo de la diferencia de los valores C_q (también conocidos como valores C_t) entre las muestras y los controles sin molde a tiempo real, o la reducción de la detección de los controles sin muestra en las aplicaciones en el punto final.

Sumario de la invención

25 El alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

De acuerdo con la divulgación, se proporciona un método para la detección de un producto de extensión de cebador, comprendiendo el método las etapas de:

- 30 a) proporcionar uno o más grupos de oligonucleótidos cebadores, comprendiendo cada grupo uno o más conjuntos de oligonucleótidos cebadores, cada conjunto estando caracterizado por
- i) un primer oligonucleótido cebador (cebador directo) que tiene una porción específica de diana y una porción secuencia arriba en dirección 5' específica del casete de fluorescencia, y
 - 35 ii) un segundo oligonucleótido cebador (cebador inverso) con una porción específica de diana

en donde los oligonucleótidos cebadores de un conjunto concreto son adecuados respectivamente para la hibridación en cadenas complementarias de una secuencia de nucleótidos diana correspondiente para permitir la formación de un producto de extensión de cebador, por ejemplo, un producto de PCR

40 y en donde el primer oligonucleótido cebador de cada conjunto del mismo grupo contiene una porción específica de casete de fluorescencia que es capaz de hibridar con el complemento de la porción específica del casete de fluorescencia del primer oligonucleótido cebador de cualquier conjunto del mismo grupo

b) proporcionar uno o más conjuntos de oligonucleótidos de casete, cada conjunto estando caracterizado por

- 45 i) un primer oligonucleótido del casete marcado con un resto fluorescente (resto donador) y que tiene una secuencia capaz de hibridar con el complemento de la porción específica del casete de fluorescencia del primer oligonucleótido cebador de cualquier conjunto en un grupo de oligonucleótidos cebadores determinado; y
- 50 ii) un segundo oligonucleótido del casete marcado con un resto aceptor (por ejemplo, un resto desactivador)

donde cada conjunto de oligonucleótidos del casete hibridan entre sí para formar un par fluorescente desactivado, en donde el par fluorescente desactivado tiene una T_m A,

- c) iniciar la reacción de extensión del cebador, generando de esta manera una secuencia complementaria al primer oligonucleótido cebador relevante (si el polinucleótido diana relevante está presente),
- 55 de tal manera que el segundo oligonucleótido del casete (aceptor, por ejemplo desactivador, marcado) relevante es menos capaz de hibridar con el primer oligonucleótido del casete (marcado con fluorescencia), de manera que se genera una señal; y
- d) detectar la señal que se genera,

60 en donde la reacción de extensión del cebador se realiza, al menos en parte, a una T_a que es menor que la T_m A o las T_m A para dicho uno o más pares fluorescentes desactivados.

También se proporcionan kits adecuados para su uso en dicho método.

65 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un esquema de reacción simple para la detección de una secuencia de ADN en el genotipado de SNP que representa un método de la presente invención.

5 La figura 2 muestra los datos generados utilizando el ensayo descrito en el ejemplo 2 más adelante. Datos de genotipado del ejemplo para los productos de amplificación del casete fluor/desactivador 5 (izquierda) y del casete fluor/desactivador 1 (derecha). Los tres grupos presentes en cada ejemplo representan los tres genotipos posibles que se pueden detectar. Los controles sin molde están representados en negro oscuro y rodeados con un círculo para más claridad.

10 La figura 3 muestra los datos generados utilizando el ensayo descrito en el ejemplo 3 más adelante. Datos de genotipado del ejemplo para los productos de amplificación del casete fluor/desactivador 5 (izquierda) y del casete fluor/desactivador 1 (derecha). Los dos grupos presentes en cada ejemplo representan los dos genotipos posibles que se pueden detectar. Los controles sin molde están representados en negro oscuro y rodeados con un círculo para más claridad.

15 La figura 4 muestra los datos generados utilizando el ensayo descrito en el ejemplo 4 más adelante. Ejemplo de datos de genotipado para los productos de amplificación de los casetes fluor/desactivador 1 a 4. En todos los casos se demuestra la amplificación alelo-específica en ausencia de detección con control sin molde. Los controles sin molde están representados en negro oscuro y rodeados con un círculo para más claridad.

20 La figura 5 se muestra ejemplos esquemáticos de posibles combinaciones de oligonucleótidos para su uso en la presente invención. Los cebadores inversos mostrados para analizar múltiples alelos de un gen pueden ser comunes, pero no tienen por qué serlo.

25 Descripción detallada de la invención

Un primer aspecto de la divulgación proporciona un método para la detección de un producto de extensión de cebador, comprendiendo el método las etapas de:

30 a) proporcionar uno o más grupos de oligonucleótidos cebadores, comprendiendo cada grupo uno o más conjuntos de oligonucleótidos cebadores, cada conjunto estando caracterizado por

- i) un primer oligonucleótido cebador (cebador directo) que tiene una porción específica de diana y una porción secuencia arriba en dirección 5' específica del casete de fluorescencia, y
- 35 ii) un segundo oligonucleótido cebador (cebador inverso) con una porción específica de diana

en donde los oligonucleótidos cebadores de un conjunto concreto son adecuados respectivamente para la hibridación en cadenas complementarias de una secuencia de nucleótidos diana correspondiente para permitir la formación de un producto de extensión de cebador, por ejemplo, un producto de PCR

40 y en donde el primer oligonucleótido cebador de cada conjunto del mismo grupo contiene una porción específica de casete de fluorescencia que es capaz de hibridar con el complemento de la porción específica del casete de fluorescencia del primer oligonucleótido cebador de cualquier conjunto del mismo grupo

b) proporcionar uno o más conjuntos de oligonucleótidos de casete, cada conjunto estando caracterizado por

- 45 i) un primer oligonucleótido del casete marcado con un resto fluorescente (resto donador) y que tiene una secuencia capaz de hibridar con el complemento de la porción específica del casete de fluorescencia del primer oligonucleótido cebador de cualquier conjunto en un grupo de oligonucleótidos cebadores determinado; y
- 50 ii) un segundo oligonucleótido del casete marcado con un resto aceptor (por ejemplo, un resto desactivador)

donde cada conjunto de oligonucleótidos del casete hibridan entre sí para formar un par fluorescente desactivado, en donde el par fluorescente desactivado tiene una T_m A,

- c) iniciar la reacción de extensión del cebador, generando de esta manera una secuencia complementaria al primer oligonucleótido cebador relevante (si el polinucleótido diana relevante está presente),
- 55 de tal manera que el segundo oligonucleótido del casete (aceptor, por ejemplo desactivador, marcado) relevante es menos capaz de hibridar con el primer oligonucleótido del casete (marcado con fluorescencia), de manera que se genera una señal; y
- d) detectar la señal que se genera,

60 en donde la reacción de extensión del cebador se realiza, al menos en parte, a una T_a que es menor que la T_m A o las T_m A para dicho uno o más pares fluorescentes desactivados.

La señal puede medirse en tiempo real. Como alternativa, la señal puede medirse en el punto final de la reacción.

65 El o un primer oligonucleótido del casete marcado con un resto fluorescente puede ser capaz de actuar como cebador en una reacción de extensión de cebador (por ejemplo, puede tener un grupo 3' OH). Como alternativa, el o

un primer oligonucleótido del casete marcado con un resto fluorescente puede no ser capaz de actuar como cebador en la reacción de extensión de cebador (o puede no importar si es capaz o no de actuar como cebador). Se considera que, en general, se forma más producto de extensión de cebador y, por lo tanto, se obtiene una mejor señal, si el o un primer oligonucleótido del casete marcado con un resto fluorescente es capaz de actuar como un
 5 cebador en la reacción de extensión de cebador. El oligonucleótido del casete marcado con aceptor/desactivador puede no ser capaz de actuar como cebador en una reacción de extensión de cebador, por ejemplo, porque el aceptor/desactivador puede impedir que el oligonucleótido actúe como cebador.

La T_m de un oligonucleótido es la temperatura en °C a la que el 50 % de las moléculas de una población de un
 10 oligonucleótido de cadena simple se hibridan con su secuencia complementaria y el otro 50 % de las moléculas de la población no se hibrida con dicha secuencia complementaria. La T_m del par fluorescente desactivado (por ejemplo) puede medirse empíricamente, por ejemplo, la T_m puede medirse utilizando el análisis de la curva de fusión, por ejemplo, utilizando un instrumento Roche LightCycler 480 en una placa blanca de 96 pocillos. La T_m puede medirse preferentemente con el mismo instrumento que el utilizado para llevar a cabo la reacción de extensión del cebador.
 15 La T_m de los pares fluorescentes desactivados (casetes) puede probarse en un tampón de reacción estándar en ausencia de polimerasa. El tampón de reacción estándar se indica en los ejemplos. En los ejemplos también se proporcionan detalles representativos adicionales. Los picos de fusión pueden generarse a partir de los datos de la curva de fusión mediante la función de análisis del LightCycler 480 (-dF/dt). Las T_m se calculan utilizando una opción de T_m manual para identificar el punto más bajo en el pico de fusión inverso.
 20

Cuando se hace referencia a una T_m para la hibridación que implica parte de un oligonucleótido, se considera que la T_m correspondiente es la T_m que puede determinarse para una hibridación utilizando un oligonucleótido de prueba correspondiente a la parte relevante al primer oligonucleótido.

La T_m ($T_m A$) del par o pares fluorescentes desactivados es preferentemente menor o igual a 15 °C, por ejemplo, menor o igual a 10 °C, por encima de la T_a de la reacción de extensión de cebador, por ejemplo, entre 1 y 15 °C, tal como entre 1 y 10 °C, por encima de la T_a de la reacción de extensión de cebador. La $T_m A$ o las $T_m A$ deben seleccionarse de manera que sean lo suficientemente altas para evitar la detección no específica y lo suficientemente bajas para no inhibir la detección (se considera que es por inhibir la reacción de extensión de
 30 cebador). El término T_a será muy conocido para los expertos en la materia y se refiere a la temperatura (normalmente fijada o programada en el aparato que controla los parámetros de la reacción) a la que se produce una amplificación significativa durante la reacción de extensión de cebador. Normalmente se utilizará sustancialmente la misma T_a durante la reacción de extensión de cebador. A veces se utilizará una T_a diferente (normalmente más alta) en las rondas iniciales de una reacción de extensión de cebador. La T_m del par fluorescente desactivado (o de los pares, si se utilizan varios pares fluorescentes desactivados) suele estar por encima de cualquier T_a utilizada durante el transcurso de una reacción de extensión de cebador, o por encima de la T_a utilizada para la preponderancia de los ciclos de la reacción de extensión de cebador, por ejemplo es menor o igual a 15 °C, por ejemplo, menor o igual a 10 °C, por encima de la T_a más alta o preponderante de la reacción de extensión de
 35 cebador, por ejemplo, entre 1 y 15 °C, tal como entre 1 y 10 °C, por encima de la T_a más alta o preponderante de la reacción de extensión de cebador. Normalmente la T_a puede estar entre aproximadamente 46 y 65 °C, por ejemplo, entre 50 y 60 °C.
 40

En la presente invención, uno o ambos oligonucleótidos marcados del par de oligonucleótidos del casete marcado fluorescente (o los oligonucleótidos cebadores) pueden contener bases modificadas tales como bases modificadas
 45 con fosforotioato. El número de enlaces fosfodiéster sustituidos por fosforotioatos en cualquier oligonucleótido/cebador determinado puede variar de ninguno a todos los enlaces fosfodiéster sustituidos por fosforotioatos, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o más. El o los oligonucleótidos/cebadores pueden contener fosforotioatos en los extremos 5' y/o 3', sin embargo se prefiere que, como alternativa o además de tales modificaciones terminales, al menos una de las bases internas del oligonucleótido/cebador sea un fosforotioato. Por
 50 ejemplo, 10-90 %, 20-80 %, 30-70 % o 40-60 % de las bases pueden ser fosforotioatos. En una realización, las bases modificadas con fosforotioato (cuando hay más de una) están separadas por al menos una, por ejemplo, de una a tres, bases no modificadas (fosfodiéster), por ejemplo, las bases alternativas dentro del o de los oligonucleótidos/cebadores pueden ser fosforotioatos. En un ejemplo, puede ser particularmente útil que el oligonucleótido o los oligonucleótidos del casete marcados fluorescente (donadores) contengan bases modificadas
 55 con fosforotioato. Se considera que la presencia de bases modificadas con fosforotioato puede ayudar a reducir la formación de productos aberrantes que pueden ser fluorescentes y, por lo tanto, dar lugar a la generación de una señal de fluorescencia errónea. Véase, por ejemplo, el documento WO/2013/140107, para un análisis de los patrones de incorporación del fosforotioato que se consideran también útiles en relación con la presente invención.

La señal que se genera en los métodos de la invención puede detectarse midiendo la señal en cualquier punto durante o después de la reacción de extensión de cebador. La medición de la señal puede ser cualitativa o cuantitativa. No se considera necesario tener que adaptar la temperatura de la reacción específicamente para poder medir la señal. La señal puede detectarse durante el transcurso normal de la reacción de extensión de cebador.
 60

La presente invención encuentra utilidad en varias aplicaciones diferentes, y es particularmente adecuada para su uso en reacciones basadas en la PCR, y para aplicaciones que incluyen aplicaciones de detección de SNP,
 65

aplicaciones de detección de variaciones alélicas, estudios de expresión génica, estudios de variación del número de copias, PCR en tiempo real y en punto final, y similares.

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención encuentra utilidad en las reacciones de extensión de los cebadores dependientes de molde y para determinar la producción de los productos de extensión de los cebadores en una mezcla de reacción de extensión de cebadores, por ejemplo, detectando si los productos de extensión de los cebadores se producen en una reacción de extensión de cebadores. Por producto de extensión de cebador se entiende una molécula de ácido nucleico que resulta de una reacción de extensión de cebador dependiente de molde. Las reacciones de extensión de cebadores dependientes de molde son aquellas reacciones en las que una polimerasa extiende una molécula de cebador de ácido nucleico que hibrida con una molécula molde de ácido nucleico, donde la secuencia de bases que se añade al final de la molécula de ácido nucleico del cebador se determina por la secuencia de bases en la cadena molde. Las reacciones de extensión de cebadores dependientes de molde incluyen reacciones de extensión de cebadores tanto con como sin amplificación. En algunas realizaciones de la presente invención, la reacción de extensión de cebador dependiente de molde en la que se detecta la producción de productos de extensión del cebador es una reacción de amplificación, por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Entre los ácidos nucleicos diana que pueden identificarse utilizando los métodos de la invención figura cualquier diana que contenga ácidos nucleicos, tales como el ADN o el ARN nativo. Los ácidos nucleicos pueden incluir, cuando proceda, secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base conocidos del ADN y el ARN, tales como la 4 acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudocitosina, 5-(carboxihidroxil-metil)uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetil-aminometiluracilo, dihidouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudo-uracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetil-guanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiamino-metil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N-isopenteniladenina, éster metílico de ácido uracilo-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutuosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico de ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina; pueden contener PNA.

Los oligonucleótidos utilizados en el método de la invención pueden incluir tales análogos de bases o PNA, según proceda, aunque esto puede no ser normal.

En la práctica de los métodos de la invención, el primer paso es producir una mezcla de extensión de cebador, por ejemplo, una composición que incluye todos los elementos necesarios para que se produzca una reacción de extensión de cebador. En un ejemplo, la mezcla de extensión de cebadores normalmente incluye al menos un par de oligonucleótidos marcados (el conjunto o conjuntos de oligonucleótidos del casete) para su utilización en una reacción de extensión de cebador, en la que los oligonucleótidos hibridan entre sí para formar un par fluorescente desactivado, en donde un oligonucleótido está marcado con un resto fluorescente y el otro oligonucleótido está marcado con un resto desactivador, en donde el par fluorescente desactivado tiene una T_m ($T_m A$) que está por encima de la T_a de la reacción de extensión de cebador. El oligonucleótido marcado fluorescente de cada conjunto comprende una secuencia capaz de hibridar con el complemento o complementos de la región específica secuencia arriba en dirección 5' del casete de fluorescencia del primer oligonucleótido cebador (cebador directo) de cada conjunto de cebadores de un grupo particular. Cada uno de los cebadores directos de un grupo tiene una porción (normalmente diferente) específica de la diana y una porción (normalmente idéntica o estrechamente relacionada) específica del casete de fluorescencia secuencia arriba en dirección 5'. Tras la introducción (por ejemplo, por el progreso de la reacción de extensión de cebador cuando el ácido nucleico diana al que se dirigen los cebadores de un determinado conjunto de cebadores está presente) de una secuencia complementaria a la porción secuencia arriba en dirección 5' específica del casete de fluorescencia (con la que el oligonucleótido del casete de fluorescencia marcado fluorescente es capaz de hibridarse), se genera una señal detectable, porque el oligonucleótido del casete de fluorescencia marcado desactivador) aceptor es menos capaz de unirse al (y desactivar la señal del) oligonucleótido del casete de fluorescencia marcado fluorescente (donador). Generalmente, a medida que avanza la reacción de extensión de cebador y se genera más producto de extensión con el que puede hibridar el oligonucleótido del casete de fluorescencia marcado fluorescente, mayor es la señal producida.

Por tanto, además del dominio de fluoróforos, el oligonucleótido marcado fluorescente también comprende una secuencia que es capaz de hibridar con el complemento de la porción o las porciones de la cola secuencia arriba en dirección 5' (porción o porciones específicas del casete de fluorescencia) de un grupo dado de primeros oligonucleótidos cebadores (cebadores directos). Esta secuencia "etiqueta" se une a una secuencia de ácido nucleico (producto de extensión) que se crea como complemento del o de los cebadores etiquetados incluidos en la reacción (que pueden estar sin marcar, o que pueden ser por ejemplo, el propio oligonucleótido del casete marcado fluorescente en rondas posteriores de la reacción de extensión del cebador), por ejemplo, bajo condiciones de hibridación estrictas, por ejemplo, en la mezcla de reacción de extensión del cebador a una temperatura igual o superior a la T_a , por ejemplo con una T_m que es al menos la T_a .

Como se ha indicado anteriormente, la porción específica del casete de fluorescencia o secuencia "etiqueta" de cada

5 uno de los primeros oligonucleótidos cebadores (cebadores directos) de un grupo determinado puede ser normalmente idéntica o estar estrechamente relacionada, por ejemplo, tener la misma longitud o diferir en longitudes inferiores a aproximadamente 10, más normalmente 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos y tener al menos un 80, 85, 90, más normalmente al menos aproximadamente un 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad entre sí en la región de superposición. Por ejemplo, no puede haber más de 3, 2 o 1 nucleótidos no idénticos. Puede ser más sencillo que estas porciones específicas de casetes de fluorescencia sean idénticas, pero no es esencial, lo que permite más flexibilidad en el diseño de los oligonucleótidos.

10 La porción específica del casete de fluorescencia o secuencia o secuencias etiqueta de un grupo normalmente diferirán significativamente de las de un grupo diferente, de modo que no hay una hibridación prácticamente relevante entre la o las porciones específicas de casetes de fluorescencia de un grupo y los complementos de la o las porciones específicas de casetes de fluorescencia de otro grupo, como será evidente para los expertos en la materia.

15 Además del dominio aceptor, el oligonucleótido del casete marcado con un resto aceptor es capaz de hibridar con el correspondiente oligonucleótido del casete marcado fluorescente correspondiente para formar un par fluorescente desactivado, en donde el par fluorescente desactivado tiene una T_m A.

20 Normalmente, el oligonucleótido del casete marcado fluorescente no comprende una porción específica de la secuencia diana, es decir, no comprende una secuencia de hibridación (a la T_a de la reacción de extensión del cebador) con el polinucleótido diana con el que se pretende hibridar la porción específica del primer oligonucleótido cebador u oligonucleótidos cebadores. Por tanto, en tal disposición, el oligonucleótido del casete marcado fluorescente no está ligado a una secuencia diana concreta, pero puede utilizarse en la detección de un producto de extensión de cebador, resultante de cualquier secuencia diana (con los conjuntos de oligonucleótidos cebadores adecuados). El oligonucleótido del casete marcado fluorescente (y el correspondiente oligonucleótido del casete marcado aceptor/desactivador) puede incluirse en una mezcla de ensayo "maestra", para usarse junto con una mezcla de "ensayo" (específica de la diana). Normalmente, el oligonucleótido del casete marcado aceptor/donador tampoco comprende una porción específica de la secuencia diana.

30 Normalmente, el oligonucleótido del casete marcado fluorescente consiste en el resto fluorescente (resto donador) y la secuencia capaz de hibridar con el complemento de la porción específica del casete de fluorescencia de un primer oligonucleótido cebador. Normalmente, el oligonucleótido del casete marcado aceptor/desactivador consiste en el resto aceptor/desactivador y la secuencia capaz de hibridar con la porción específica del casete de fluorescencia del oligonucleótido del casete marcado fluorescente.

35 Puede ser conveniente que la interacción entre el oligonucleótido del casete de fluorescencia marcado fluorescente (donador) y el casete de fluorescencia marcado aceptor marcado (desactivador) sea menos estable que la interacción entre el oligonucleótido del casete de fluorescencia marcado fluorescente (donador) y el producto de extensión complementario de la porción fluorescente 5' específica de casete del oligonucleótido cebador directo de cada conjunto de cebadores del grupo relevante. Esta disposición puede ser útil para lograr un equilibrio óptimo entre evitar la generación de señales aberrantes y permitir que la reacción de extensión del cebador transcurra de manera eficiente. Por tanto, la T_m para la hibridación entre el oligonucleótido del casete de fluorescencia marcado (donador) fluorescente y el oligonucleótido del casete de fluorescencia marcado aceptor (desactivador) puede ser inferior que la T_m T_m C (o las T_m ; T_m C) para la hibridación entre el oligonucleótido del casete de fluorescencia marcado(donador) fluorescente y el producto de extensión complementario a la porción secuencia arriba en dirección 5' específica del casete de fluorescencia del oligonucleótido cebador directo de cada conjunto de cebadores del grupo relevante. Por tanto, la T_a de la reacción de extensión de cebador es menor que la T_m A o las T_m A para el par o pares fluorescentes desactivados, que a su vez puede ser más baja (por ejemplo, entre 1 y 10 °C más baja) que la T_m C o las T_m C (es decir, para la hibridación entre el o los oligonucleótidos marcados con fluorescencia y el o los productos de extensión del cebador que se están formando).

50 Obsérvese que puede (pero no necesariamente) haber una T_m C diferente para cada conjunto de cebadores, por lo que puede haber múltiples T_m C relevantes para cada grupo (de conjuntos de cebadores) así como múltiples T_m C relevantes para diferentes grupos. Normalmente, las T_m C relevantes para un grupo concreto (de conjuntos de cebadores) son superiores a la T_m A del conjunto de casetes de fluorescencia relevante. Normalmente todas las T_m A de una reacción de extensión de cebador en particular son más altas que la T_a para esa reacción. Normalmente todas las T_m C para una reacción de extensión de cebador en particular tendrán una diferencia entre sí no mayor de aproximadamente 10, más normalmente de 5, 4, 3, 2 o 1 °C. Normalmente todas las T_m A para una reacción de extensión de cebador en particular tendrán una diferencia entre sí no mayor de aproximadamente 10, más normalmente de 5, 4, 3, 2 o 1 °C.

65 En un ejemplo (por ejemplo, cuando el oligonucleótido del casete marcado fluorescente no comprende una secuencia específica de diana), el oligonucleótido del casete marcado desactivador es entre 1 y 5 bases de nucleótidos más corto que el oligonucleótido del casete marcado fluorescente. Normalmente, la porción no apareada (en relación con el oligonucleótido del casete marcado desactivador) del oligonucleótido del casete marcado fluorescente se encuentra en el extremo 3' del oligonucleótido del casete marcado fluorescente u "opuesto" al

extremo 5' del oligonucleótido del casete marcado desactivador. La porción del oligonucleótido cebador (o cebadores) relevante cuyo complemento hibrida con el oligonucleótido del casete marcado fluorescente está normalmente dentro de aproximadamente 5 nucleótidos de longitud (por ejemplo, entre 5, 4, 3, 2, o 1 nucleótido más corto y 5, 4, 3, 2, o 1 nucleótido más largo; por ejemplo la misma longitud) del oligonucleótido del casete marcado con fluorescencia, por ejemplo, con cualquier diferencia de longitud, normalmente en el extremo 5' del oligonucleótido cebador y del oligonucleótido del casete marcado con fluorescencia. En rondas posteriores de la reacción de extensión de cebador, el oligonucleótido del casete marcado fluorescente puede actuar como cebador por sí mismo, por lo que el complemento formado durante la extensión del cebador se extenderá generalmente hasta el extremo 5' del oligonucleótido del casete marcado fluorescente. Por tanto, la porción del complemento que hibrida con el oligonucleótido del casete marcado como desactivador es normalmente tan larga como el oligonucleótido del casete marcado como desactivador.

En otros ejemplos, de forma alternativa o a modo de añadido puede haber más desajustes (o más significativos) entre el oligonucleótido del casete marcado desactivador y el oligonucleótido del casete marcado fluorescente que entre el complemento del oligonucleótido cebador (o cebadores) relevante y el oligonucleótido del casete marcado fluorescente. Tal como conocen bien los expertos en la materia, la posición de un apareamiento erróneo dentro de un par de oligonucleótidos y la naturaleza del apareamiento erróneo (por ejemplo, si se interrumpe un emparejamiento A:T o un emparejamiento G:C) influirán en la importancia del apareamiento erróneo en el cambio en la estabilidad/cambio en la T_m .

En otros ejemplos más, pueden utilizarse como alternativa o además diferentes nucleótidos/bases en el oligonucleótido del casete marcado desactivador en relación a los utilizados en la mezcla de reacción de extensión de cebador (y por lo tanto incorporados en el complemento de los cebadores), alterando de esta manera la estabilidad relativa de las hibridaciones entre el oligonucleótido del casete marcado desactivador y el oligonucleótido del casete marcado fluorescente y el producto de extensión de cebador. Por lo general, la base o bases "no estándar" pueden utilizarse en el oligonucleótido del casete marcado desactivador y las bases "estándar" pueden usarse en la mezcla de extensión de cebadores, pero también son posibles otras disposiciones, como será evidente para la persona experta.

Se entenderá que si, en una disposición diferente, el oligonucleótido del casete marcado fluorescente comprende no solo una secuencia "etiqueta", sino también una secuencia complementaria al ácido nucleico diana que se va a detectar (véase la realización "directa" que se describe más adelante), habrá una región de complementariedad considerablemente más larga entre el oligonucleótido del casete marcado fluorescente y el producto de extensión, que si el oligonucleótido del casete marcado fluorescente tiene una secuencia "etiqueta" pero no una secuencia complementaria del ácido nucleico diana que se va a detectar. Se considera que en esta disposición hay menos ventajas que derivadas de la T_m A para que el par fluorescente desactivado se reduzca. Por tanto, no se considera que proporciona un beneficio particular para, por ejemplo, que la región correspondiente a la "etiqueta" en el oligonucleótido del casete marcado aceptor sea más corta o tenga desajustes o una composición de bases diferente en comparación con la "etiqueta" en el oligonucleótido del casete marcado con el fluoróforo. Debe tenerse en cuenta que esta disposición (denominada disposición "directa" a continuación) se considera potencialmente útil, pero significa que, por lo general, se necesita al menos un oligonucleótido marcado fluorescente/donador diferente para cada secuencia diana que se vaya a detectar, mientras que en la disposición anterior ("indirecta") en la que no hay una secuencia específica de diana (por ejemplo, capaz de hibridar con la Ta de la reacción de extensión del cebador) no es necesario sintetizar un oligonucleótido diferente marcado fluorescente/donador (u oligonucleótido marcado aceptor/desactivador) para cada secuencia diana que se vaya a detectar (de la que puede haber muchos cientos o miles de posibilidades). En una reacción de extensión de cebador dada, normalmente se necesita un oligonucleótido diferente marcado fluorescente/donador para cada secuencia diana (por ejemplo 2, 3, 4 o 5, como se discute más adelante) que se analiza en esa reacción de extensión de cebador en particular, pero puede utilizarse potencialmente la misma colección de oligonucleótidos de casete marcados con fluorescencia con cualquier secuencia diana.

Dependiendo de la naturaleza del oligonucleótido y del propio ensayo (por ejemplo, si se utiliza la disposición "directa" o "indirecta"), al menos la región "etiqueta" del oligonucleótido del casete marcado fluorescente puede hibridarse con una región del producto de extensión del cebador. Por ejemplo, cuando el ensayo es un ensayo de genotipado de SNP, por ejemplo, en el que se emplea un sistema universal ("indirecto") de notificación en casetes, la región etiqueta hibrida bajo condiciones estrictas con la región etiqueta del producto de extensión del cebador.

Como se ha indicado anteriormente, en los ejemplos, la región de hibridación en el oligonucleótido del casete marcado con molécula aceptor puede ser más corta (por ejemplo, de 1 a 5 nucleótidos más corta) que la secuencia en el oligonucleótido del casete marcado con fluoróforo que hibrida con el producto de extensión, o puede tener un apareamiento erróneo, o un tipo diferente de base, de modo que la T_m A para la hibridación entre los oligonucleótidos del casete es menor que la T_m C (o las T_m C) para la hibridación entre el oligonucleótido del casete marcado fluorescente y el producto de extensión (o productos de extensión).

La transferencia de energía fluorescente se produce cuando un donador de energía fluorescente adecuado y un resto aceptor de energía se encuentran muy cerca uno del otro. La energía de excitación absorbida por el donador

se transfiere al aceptor, que puede disipar entonces esta energía, ya sea por emisión fluorescente si es un fluoróforo, o por mecanismos no fluorescentes si es un desactivador. Un par donador-aceptor comprende dos: un grupo fluorescente y un grupo modificador de la fluorescencia con espectros superpuestos, donde la emisión del donador (grupo fluorescente) se superpone a la absorción del receptor (modificador de la fluorescencia), de forma que hay una transferencia de energía desde el fluoróforo excitado al otro miembro del par. De esta forma, el par o los pares de oligonucleótidos marcados (conjuntos de oligonucleótidos de casetes de fluorescencia) de la invención son detectores de ácidos nucleicos que incluyen un dominio fluoróforo en los oligonucleótidos separados, donde se posiciona el donador de energía fluorescente, es decir el donador, y un segundo oligonucleótido con un dominio aceptor donde se posiciona el aceptor de energía fluorescente, es decir, el aceptor. Como se mencionó anteriormente, el oligonucleótido donador incluye el fluoróforo donador. El fluoróforo donador se puede posicionar en cualquier lugar del detector de ácidos nucleicos, pero está normalmente presente en el extremo 5' del oligonucleótido.

El dominio del aceptor incluye el aceptor de energía de fluorescencia. El aceptor se puede posicionar en cualquier lugar del dominio del aceptor, pero está normalmente presente en el extremo 3' del oligonucleótido.

En la presente invención, en un par de oligonucleótidos marcados cada uno de los oligonucleótidos del casete puede contener uno o más marcadores, por ejemplo 1, 2 o 3 marcadores. Uno o ambos oligonucleótidos del casete contienen preferentemente un solo marcador, más preferentemente ambos oligonucleótidos contienen un solo marcador.

Por ejemplo, el oligonucleótido del casete marcado fluorescente contiene preferentemente un marcador en el extremo 5' del oligonucleótido o dentro de él, y el oligonucleótido del casete marcado desactivador contiene un marcador en el extremo 3' del oligonucleótido o dentro de él.

Los fluoróforos de los pares de oligonucleótidos marcados pueden seleccionarse de modo que pertenezcan a una familia química similar o a una diferente, tales como los tintes de cianina, xantenos o similares. Los fluoróforos de interés incluyen, pero no se limitan a, colorantes fluorescentes (por ejemplo, la 5-carboxifluoresceína (5-FAM), 6-carboxifluoresceína (6-FAM), 2',4',1,4,-tetraclorofluoresceína (TET), 2',4',5',7',1,4-hexaclorofluoresceína (HEX), y 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE)), tintes de cianina tales como el Cy5, derivados de dansilo, colorantes de rodamina (por ejemplo, tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA) y tetrapropano-6-carboxirodamina (ROX)), DABSYL, DABCYL, cianina, tal como Cy3, antraquinona, nitrotiazol, y compuestos de nitroimidazol, u otros colorantes no intercalantes. Se describen fluoróforos de interés con más detalle en las solicitudes de patentes internacionales WO 01/42505 y WO 01/86001.

Si se utiliza más de un grupo de cebadores (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) y, por consiguiente, varios conjuntos de oligonucleótidos de casete, el grupo de fluoróforos puede ser normalmente diferente para cada uno de los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o más) conjuntos de oligonucleótidos de casete.

El grupo aceptor (por ejemplo, el desactivador) puede ser el mismo o diferente siempre que sean capaces de modular la fluorescencia del grupo de fluoróforos emparejados de manera satisfactoria. Normalmente pueden usarse 1, 2, 3 o 4 grupos de cebadores diferentes (cada uno de los cuales puede tener uno o más conjuntos de cebadores, normalmente un conjunto de cebadores) y, por consiguiente, 1, 2, 3 o 4 grupos de oligonucleótidos de casete en un solo tubo de reacción. Un factor limitante puede ser el número de espectros diferentes que es posible distinguir, que puede depender de las características del equipo de generación/medición de fluorescencia disponible. Los expertos en la materia conocerán las consideraciones para elegir conjuntos compatibles de fluoróforos y aceptores/desactivadores.

En los métodos de la invención, la polimerasa empleada en la reacción de extensión del cebador incluye al menos una Familia A, donde los términos "Familia A" y "Familia B" corresponden al esquema de clasificación presentado en Braithwaite & Ito, *Nucleic Acids Res.* (1993) 21:787-802. La Familia A de polimerasas de interés incluye: Polimerasas de *Thermus aquaticus*, incluyendo la polimerasa de origen natural (Taq) y sus derivados y homólogos, tales como Klentaq (como se describe en *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (1994) 91:2216-2220); Polimerasas de *Thermus thermophilus*, incluyendo la polimerasa de origen natural (Tth) y sus derivados y homólogos, y similares. La polimerasa para su uso en la invención puede utilizarse en forma purificada o no purificada. Normalmente la polimerasa carece de actividad exonucleasa. Esto puede otorgar una mejor especificidad, por ejemplo en un ensayo de tipaje de SNP, como será evidente para los expertos en la materia,

Otro componente de la mezcla de reacción producida en el primer paso de los métodos, es el ácido nucleico molde. El ácido nucleico que sirve de molde puede ser de cadena sencilla o de cadena doble, donde el ácido nucleico es normalmente ácido desoxirribonucleico (ADN). La longitud del ácido nucleico molde puede ser tan corta como 20 pb, pero normalmente tienen una longitud de al menos aproximadamente 50 o 100 pb, y más normalmente de al menos aproximadamente 150 pb, y pueden llegar a las 1000 o 10000 pb o más, por ejemplo, 50000 pb de longitud o más, incluyendo un extracto de ADN genómico, una digestión del mismo o un lisado en bruto, etc. El ácido nucleico puede estar libre en solución, flanqueado en uno o ambos extremos por ácido nucleico no molde, presente en un vector, por ejemplo, un plásmido y similares, con el único criterio de que el ácido nucleico esté disponible para participar en

la reacción de extensión del cebador. El ácido nucleico molde puede estar presente en forma purificada o en una mezcla compleja con otros ácidos nucleicos no molde, por ejemplo, en una preparación de ADN celular, etc.

5 El ácido nucleico molde puede derivar de varias fuentes diferentes, dependiendo de la aplicación para la que se realice la PCR, donde tales fuentes incluyen organismos que comprenden ácidos nucleicos, es decir, virus; procariontas, por ejemplo bacterias, arqueas y cianobacterias; y eucariotas, por ejemplo miembros del reino protista, tales como flagelados, amebas y sus parientes, parásitos ameboides, ciliados y similares; miembros del reino fungi, tales como mohos del limo, mohos del limo acelulares, mohos del limo celulares, oomicetos, mohos verdaderos, zigomicotas, ascomicotas, basidiomicotas, hongos imperfectos y similares; plantas, tales como algas, musgos, 10 hepáticas, antocerofitas, licopodios, equisetos, helechos, gimnoespermas y plantas con flor, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas; y animales, incluyendo esponjas, miembros del filo cnidaria, por ejemplo medusas, corales y similares, cnetóforos, gusanos, rotíferos, lombrices intestinales, anélidos, moluscos, artrópodos, equinodermos, enteropneustos, y vertebrados, incluyendo reptiles, peces, aves, serpientes, y mamíferos, por ejemplo roedores, primates, incluyendo a los seres humanos. El ácido nucleico molde puede utilizarse directamente de su fuente de origen natural, por ejemplo, como lisado bruto y/o se puede preprocesar de diferentes maneras, como se conoce en la técnica. En algunas realizaciones, el ácido nucleico molde puede ser de una fuente sintética.

Un componente de la mezcla de reacción producida en el primer paso de los métodos expuestos son los cebadores empleados en la reacción de extensión de los cebadores, por ejemplo, los cebadores de PCR (tales como los 20 cebadores directos e inversos empleados en la amplificación geométrica). Como ya se indicó, se pueden utilizar uno o más grupos de oligonucleótidos cebadores, comprendiendo cada grupo uno o más conjuntos de oligonucleótidos cebadores. Cada conjunto puede tener normalmente un cebador directo y otro inverso. Como se ha indicado anteriormente, normalmente se pueden utilizar 1, 2, 3, 4 o más grupos de cebadores. Cada grupo puede incluir normalmente un conjunto de cebadores (a menos que, por ejemplo, exista una razón por la que se desea medir los productos de amplificación combinados que surgen de dos conjuntos separados de cebadores). Cada mezcla de 25 reacción de extensión de cebadores normalmente comprenderá al menos un cebador directo y normalmente dos o tres cebadores directos y más normalmente cinco o siete cebadores directos en el caso de una reacción de genotipado de SNP. También puede haber un cebador inverso correspondiente para cada cebador directo, pero puede que no sean diferentes, por ejemplo en una reacción de genotipado de SNP, donde se puede utilizar un cebador inverso común con varios cebadores directos diferentes. La mezcla de reacción de extensión de los 30 cebadores comprenderá por lo menos un cebador marcado con fluorescencia (donador) y un aceptor complementario, un oligonucleótido marcado desactivador (que normalmente no es capaz de actuar como cebador), por ejemplo, porque el desactivador está colocado en el extremo 3' e impide que el oligonucleótido pueda actuar como cebador).

Más habitualmente, por ejemplo, en el caso de la amplificación exponencial, la mezcla de extensión del cebador puede comprender, por lo general, al menos un cebador marcado fluorescente/donador y un oligonucleótido 35 complementario marcado aceptor/desactivador, así como un cebador inverso sin marcar, donde uno o cualquiera de los oligonucleótidos o cebadores puede contener al menos un grupo modificado, por ejemplo, el fosforotioato. Por lo general, en el caso de la amplificación exponencial utilizando un sistema indicador universal, la mezcla de extensión del cebador comprenderá al menos un cebador aceptor marcado con fluorescencia y un donador complementario, un oligonucleótido marcado desactivador, un cebador inverso sin marcar y un cebador directo etiquetado sin marcar. Los cebadores pueden tener una longitud mínima de 15 pb, por ejemplo, al menos 20 pb o 22 pb de longitud. Los 40 cebadores pueden tener 30 pb de longitud o más, por ejemplo, la longitud de los cebadores puede ser de 18 a 60 pb de longitud, tal como de aproximadamente 20 a 35 pb de longitud. El cebador etiquetado será normalmente más largo que los oligonucleótidos del casete fluorescente (ya que normalmente necesitará contener una secuencia de etiquetado lo suficientemente larga para hibridar con su complemento a la Ta de la reacción de extensión del cebador; así como una porción específica de la secuencia diana que también tiene que ser lo suficientemente larga para hibridar con su complemento a la Ta de la reacción de extensión del cebador) o el cebador inverso 50 (normalmente no etiquetado).

Puede ser conveniente que haya un exceso en la reacción de extensión del cebador (y, por tanto, en la mezcla de reacción antes del inicio de la reacción de extensión del cebador) del oligonucleótido del casete marcado aceptor en relación con el oligonucleótido del casete marcado con fluoróforo. Una proporción de al menos 1:1, 1,5:1, 2:1, 3:1, 55 4:1 o 5:1, por ejemplo entre 1:1 y 10:1 o 15:1, por ejemplo, entre 1,5:1 y 5:1 del oligonucleótido del casete marcado con aceptor con respecto al marcado con fluoróforo en un conjunto de casetes de oligonucleótidos puede ser útil optimizando la señal obtenida y/o minimizando la señal generada en un "control sin molde" (NTC).

Como se usa en este documento, "ácido nucleico" significa o bien ADN, o ARN, de cadena sencilla o de cadena 60 doble, y cualquier modificación química de los mismos. Las modificaciones incluyen, pero no se limitan a, las que proporcionan otros grupos químicos que incorporan carga adicional, polarizabilidad, enlaces de hidrógeno, interacción electrostática, y funcionalidad al ácido nucleico. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, modificaciones del azúcar en la posición 2', modificaciones de pirimidina en posición 5, modificaciones de purina en posición 8, modificaciones en aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, la sustitución de 5-bromo o de 5-yodo- 65 uracilo; modificaciones de la cadena principal, metilaciones, combinaciones inusuales de pares de bases como las isobases isocitidina e isoguanidina y similares. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones 3' y 5' tales

como el encapuchado.

5 Como se usa en este documento, "complementario" se refiere al par de bases nitrogenadas, que consiste en una purina unida por enlaces de hidrógeno a una pirimidina, que conecta las cadenas complementarias de ADN o de moléculas híbridas que unen el ADN y el ARN.

10 Como se usa en este documento, "grupo fluorescente" se refiere a una molécula que, cuando se excita con una luz que tiene una longitud de onda seleccionada, emite luz de una longitud de onda diferente. A los grupos fluorescentes también se les puede llamar "fluoróforos".

15 Como se usa en este documento, "grupo modificador de la fluorescencia" se refiere a una molécula que puede alterar de alguna manera la emisión de fluorescencia de un grupo fluorescente. Un grupo modificador de la fluorescencia generalmente logra esto a través de un mecanismo de transferencia de energía. Dependiendo de la identidad del grupo modificador de la fluorescencia, la emisión de fluorescencia puede sufrir una serie de alteraciones, que incluyen, pero sin limitarse a, atenuación, desactivación completa, mejora, un cambio en la longitud de onda, un cambio de polaridad, un cambio en la duración de la fluorescencia. Un ejemplo de un grupo modificador de la fluorescencia es un grupo de desactivación.

20 Como se usa en este documento, La "transferencia de energía" se refiere al proceso por el cual un grupo modificador de la fluorescencia altera la emisión de fluorescencia de un grupo fluorescente. Si el grupo modificador de la fluorescencia es un grupo de desactivación, entonces la emisión de fluorescencia del grupo fluorescente se atenúa (se desactiva). La transferencia de energía puede ocurrir a través de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, o a través de la transferencia directa de energía. Los mecanismos exactos de transferencia de energía en estos dos casos son diferentes. Debe entenderse que cualquier referencia a la
25 transferencia de energía en la presente solicitud abarca todos estos fenómenos distintos en cuanto a mecanismo. La transferencia de energía también se denomina aquí como transferencia de energía fluorescente o FET.

30 Como se usa en este documento, "par de transferencia de energía" se refiere a dos moléculas cualquiera que participan en la transferencia de energía. Normalmente, una de las moléculas actúa como un grupo fluorescente, y la otra actúa como un grupo modificador de la fluorescencia. Tales pares pueden comprender, por ejemplo, dos grupos fluorescentes que pueden ser diferentes entre sí y un grupo de desactivación, dos grupos de desactivación y un grupo fluorescente, o múltiples grupos fluorescentes y múltiples grupos de desactivación. En los casos en que hay múltiples grupos fluorescentes y/o múltiples grupos de desactivación, los grupos individuales de fluorescencia y/o desactivación pueden ser diferentes entre sí. Los pares de transferencia de energía preferentes de la invención comprenden un grupo fluorescente y un grupo de desactivación. En algunos casos, la distinción entre el grupo
35 fluorescente y el grupo de modificadores de fluorescencia puede ser confusa. Por ejemplo, bajo ciertas circunstancias, dos grupos de fluoresceína adyacentes pueden desactivar la emisión de fluorescencia del otro a través de la transferencia directa de energía. Por este motivo, en esta aplicación no hay ninguna limitación en la identidad de los miembros individuales del par de transferencia de energía. Todo lo que se requiere es que, si la distancia entre los miembros individuales se altera en alguna cantidad crítica, las propiedades espectroscópicas del par de transferencia de energía en su conjunto cambien de alguna manera medible.

45 Como se usa en este documento, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que puede producirse la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario de una cadena de ácido nucleico. Por tanto, un oligonucleótido capaz de actuar como cebador puede tener normalmente un grupo 3' OH.

50 Como se usa en este documento, por "grupo de desactivación" se entiende cualquier grupo modificador de la fluorescencia que pueda atenuar, al menos parcialmente, la luz emitida por un grupo fluorescente. Nos referimos a esta atenuación como "desactivación". Por tanto, la iluminación del grupo fluorescente en presencia del grupo de desactivación conduce a una señal de emisión menos intensa de lo esperado, o incluso completamente ausente. La desactivación ocurre a través de la transferencia de energía entre el grupo fluorescente y el grupo de desactivación.

55 Como se usa en este documento, "transferencia de energía por resonancia de fluorescencia" o "FRET" se refiere a un fenómeno de transferencia de energía en el que la luz emitida por el grupo fluorescente excitado es absorbida, al menos parcialmente, por un grupo modificador de la fluorescencia. Si el grupo modificador de la fluorescencia es un grupo de desactivación, entonces ese grupo puede o bien irradiar la luz absorbida como luz de una longitud de onda diferente, o puede disiparla como calor. la FRET depende de una superposición entre el espectro de emisión del grupo fluorescente y el espectro de absorción del grupo de desactivación. La FRET también depende de la distancia entre el grupo de desactivación y el grupo fluorescente. Por encima de una cierta distancia crítica, el grupo de desactivación es incapaz de absorber la luz emitida por el grupo fluorescente, o solo puede hacerlo de manera pobre.

65 Tal como se utiliza aquí, "cebador cola" se refiere a un oligonucleótido que contiene al menos dos dominios, uno específico para el ácido nucleico diana, por ejemplo, ADN, de interés, es decir, es capaz de hibridar con dicho ácido nucleico diana, y la otra secuencia (normalmente 5' de la secuencia específica de diana), que sirve como molde para

la producción del producto de extensión que comprende el complemento de la secuencia "etiqueta". El complemento de la secuencia "etiqueta" puede entonces unirse a, por ejemplo, la porción "etiqueta" del correspondiente oligonucleótido del casete marcado fluorescente (que puede carecer de cualquier otra secuencia que no sea la porción "etiqueta"). Los cebadores etiquetados también pueden comprender regiones adicionales tales como un
5 enlazador entre los dos dominios mencionados anteriormente y/o etiquetas.

En el presente documento, la "transferencia directa de energía" se refiere a un mecanismo de transferencia de energía en el que no se produce el paso de un fotón entre el grupo fluorescente y el grupo que modifica la fluorescencia. Sin estar ligado a un solo mecanismo, se cree que en la transferencia directa de energía, el grupo
10 fluorescente y el grupo modificador de la fluorescencia interfieren en la estructura electrónica del otro. Si el grupo modificador de la fluorescencia es un grupo de desactivación, esto hará que el grupo de desactivación impida que el grupo fluorescente emita luz.

En general, La desactivación por transferencia directa de energía es más eficiente que el desactivado por FRET. De hecho, algunos grupos de desactivación que no desactivan grupos fluorescentes concretos por FRET (porque no tienen la superposición espectral necesaria con el grupo fluorescente) pueden hacerlo eficientemente por
15 transferencia directa de energía. Asimismo, algunos grupos fluorescentes pueden actuar como grupos de desactivación por ellos mismos si están lo suficientemente cerca de otros grupos fluorescentes como para causar una transferencia directa de energía. Por ejemplo, bajo estas condiciones, dos grupos de fluoresceína adyacentes
20 pueden desactivar la fluorescencia del otro de forma efectiva. Por estas razones, no hay ninguna limitación en la naturaleza de los grupos fluorescentes y los grupos de desactivación útiles para la práctica de esta invención.

Cuando se hace referencia a la "hibridación" o a la capacidad de un oligonucleótido y/o cebador para "hibridar" con otra secuencia de nucleótidos, el experto entenderá que dicha hibridación es capaz de producirse en las condiciones
25 que prevalecen en la reacción de extensión del cebador, por ejemplo, la reacción PCR, en la que se utiliza el oligonucleótido y/o el cebador.

La invención también proporciona un kit adecuado para su uso en un método para la detección de un producto de extensión de cebadores, comprendiendo el método las etapas de:

- 30 a) dos o mas grupos de oligonucleótidos cebadores, comprendiendo cada grupo uno o más conjuntos de oligonucleótidos cebadores, cada conjunto estando caracterizado por
- i) un primer oligonucleótido cebador (cebador directo) que tiene una porción específica de diana y una porción
35 secuencia arriba en dirección 5' específica del casete de fluorescencia, y
 - ii) un segundo oligonucleótido cebador (cebador inverso) con una porción específica de diana

en donde los oligonucleótidos cebadores de un conjunto concreto son adecuados respectivamente para la hibridación en cadenas complementarias de una secuencia de nucleótidos diana correspondiente para permitir la
40 formación de un producto de extensión de cebador, por ejemplo, un producto de PCR y en donde el primer oligonucleótido cebador de cada conjunto del mismo grupo contiene una porción específica de casetes de fluorescencia que es capaz de hibridar con el complemento de la porción específica de casetes de fluorescencia del primer oligonucleótido cebador de cualquier conjunto del mismo grupo; y

- 45 b) dos o más conjuntos de oligonucleótidos de casete, cada conjunto estando caracterizado por
- i) un primer oligonucleótido del casete marcado con un resto fluorescente (resto donador) y que tiene una secuencia capaz de hibridar con el complemento de la porción específica del casete de fluorescencia del primer oligonucleótido cebador de cualquier conjunto en un grupo de oligonucleótidos cebadores
50 determinado; y
 - ii) un segundo oligonucleótido del casete marcado con un resto aceptor (por ejemplo, un resto desactivador)

donde cada conjunto de oligonucleótidos del casete hibridan entre sí para formar un par fluorescente desactivado, en donde el par fluorescente desactivado tiene una $T_m A$,
55 en donde cada una de las $T_m A$ para los pares fluorescentes desactivados está por encima de una temperatura adecuada para su uso como T_a de una reacción de extensión del cebador utilizando los oligonucleótidos del kit, por ejemplo, por encima de una temperatura entre 46 y 65 °C, por ejemplo, entre 50 y 60 °C.

Los primeros oligonucleótidos cebadores pueden estar normalmente sin marcar. El oligonucleótido del casete marcado fluorescente no suele comprender una secuencia específica de diana. La $T_m A$ para la hibridación entre el oligonucleótido del casete de fluorescencia marcado(donador) fluorescente y el oligonucleótido del casete de fluorescencia marcado(desactivador) aceptor puede ser inferior a la $T_m T_m C$ (o a las T_m ; $T_m C$) para la hibridación
60 entre el oligonucleótido del casete de fluorescencia marcado(donador) fluorescente y el producto de extensión complementario a la porción secuencia arriba en dirección 5' específica del casete de fluorescencia del oligonucleótido cebador directo de cada conjunto de cebadores del grupo relevante. El oligonucleótido del casete marcado desactivador puede ser entre 1 y 5 bases de nucleótidos más corto que el oligonucleótido del casete
65 marcado fluorescente,

Las preferencias adicionales para los oligonucleótidos y la reacción de extensión del cebador son las indicadas anteriormente.

5 Los kit de acuerdo con la invención también pueden contener una polimerasa y/u otros componentes adecuados para su uso en reacciones de extensión de cebador tales como cationes divalentes, por ejemplo, derivados de sales de magnesio, desoxirribonucleótidos 5' trifosfatos (dNTP), agentes tamponantes, etc.

10 El kit puede comprender opcionalmente, uno o más conjuntos de casetes de oligonucleótidos en un primer recipiente, en donde el primer recipiente comprende otros componentes para realizar una reacción de extensión del cebador, tales como el tampón, la polimerasa de ADN termoestable y, opcionalmente, en donde los primeros casetes de oligonucleótidos no comprenden una porción específica de diana; y uno o más grupos de oligonucleótidos cebadores en un recipiente o recipientes separados adicionales.

15 Otro aspecto adicional de la divulgación proporciona un método para la detección de un producto de extensión de cebador, comprendiendo el método las etapas de:

20 a) proporcionar uno o más grupos de oligonucleótidos cebadores, comprendiendo cada grupo uno o más conjuntos de oligonucleótidos cebadores, cada conjunto estando caracterizado por

- i) un primer oligonucleótido cebador marcado (cebador directo) que tiene una porción específica de diana y una porción secuencia arriba en dirección 5' específica del casete de fluorescencia, y
- ii) un segundo oligonucleótido cebador (cebador inverso) con una porción específica de diana

25 en donde los oligonucleótidos cebadores de un conjunto concreto son adecuados respectivamente para la hibridación en cadenas complementarias de una secuencia de nucleótidos diana correspondiente para permitir la formación de un producto de extensión de cebador, por ejemplo, un producto de PCR

30 y en donde el primer oligonucleótido cebador de cada conjunto del mismo grupo contiene una porción específica de casete de fluorescencia que es capaz de hibridar con el complemento de la porción específica del casete de fluorescencia del primer oligonucleótido cebador de cualquier conjunto del mismo grupo

b) proporcionar uno o más conjuntos de oligonucleótidos de casete, cada conjunto estando caracterizado por

- 35 i) un primer oligonucleótido u oligonucleótidos de casete marcados con un resto fluorescente (resto donador) que es el primer oligonucleótido u oligonucleótidos cebadores marcados de un grupo de cebadores (cebador o cebadores directos)
- ii) un segundo oligonucleótido del casete marcado con un resto aceptor (por ejemplo, un resto desactivador)

donde cada conjunto de oligonucleótidos del casete hibridan entre sí para formar un par fluorescente desactivado, en donde el par fluorescente desactivado tiene una T_m A,

40 c) iniciar la reacción de extensión del cebador, generando de esta manera una secuencia complementaria al primer oligonucleótido cebador relevante (si el polinucleótido diana relevante está presente),

de tal manera que el segundo oligonucleótido del casete (aceptor, por ejemplo desactivador, marcado) relevante es menos capaz de hibridar con el primer oligonucleótido del casete (marcado con fluorescencia), de manera que se genera una señal; y

45 d) detectar la señal que se genera,

en donde la reacción de extensión del cebador se realiza, al menos en parte, a una T_a que es menor que la T_m A o las T_m A para dicho uno o más pares fluorescentes desactivados.

50 Esto puede determinarse como un método de detección "directo".

Los métodos o kits de la invención se consideran útiles en diversas circunstancias, por ejemplo, para su uso en el genotipado de SNP basado en la PCR de alelos específicos, en estudios de expresión génica o estudios de variación del número de copias.

55 Entre los ejemplos de la utilización de la presente invención figuran los siguientes:

Detección directa (en tiempo real) de productos de PCR:

60 Esta realización utiliza un oligonucleótido cebador de cola marcado con fluorescencia para iniciar el proceso de PCR y generar la fluorescencia. Por tanto, el primer oligonucleótido cebador y el correspondiente primer oligonucleótido del casete marcado con un resto fluorescente son normalmente la misma entidad. Este cebador se dirige a la región de interés del molde (polinucleótido diana) y, por lo tanto, determina la especificidad de la reacción. También se utiliza un oligonucleótido complementario marcado desactivador de la invención. Dado que la longitud del oligonucleótido marcado desactivador es lo suficientemente larga como para dar una T_m por encima de la T_a de la reacción, la generación del producto puede evaluarse en cada ciclo del proceso de PCR en cualquier instrumento de

PCR en tiempo real (tal como un instrumento ABI 7900 Prism) o al final de la reacción.

Debido a la complementariedad de los dos oligonucleótidos marcados (desactivador y cebador de cola marcado con fluorescencia), se hibridan entre sí. Esta hibridación lleva el marcador desactivador muy cerca del fluoróforo, de manera que reproduce todas las señales fluorescentes del fluoróforo, cuando se excita en una longitud de onda adecuada, por ejemplo, 488 nm cuando el fluoróforo es FAM.

También se incluye en la reacción un cebador convencional inverso para crear un par de cebadores de PCR. Entonces se inicia el proceso de PCR y el producto de PCR comienza a generarse.

Durante la amplificación por PCR y la formación de PCR, se genera la secuencia complementaria al cebador fluorescente. Esta secuencia amplificada, sin el desactivador, compete con el oligonucleótido desactivador para unirse con el cebador de cola marcado con fluorescencia. Los cebadores de cola incorporados marcados con fluorescencia ya no se desactivan, sino que producen una señal fluorescente que es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR generado.

Detección indirecta de productos de PCR (en tiempo real)

Esta realización utiliza un oligonucleótido (cebador) convencional (no marcado) para iniciar el proceso de PCR. A este cebador convencional se le marca con una cola de una secuencia de ADN que no se dirige a la región de interés del amplicón. Esta secuencia etiqueta está posicionada en la porción 5' del cebador. La reacción también incluye un oligonucleótido de cadena sencilla marcado con fluorescencia que es capaz de hibridar con el complemento de la región de la secuencia etiqueta del cebador convencional generado en la reacción. Existen varios fluoróforos adecuados, con el FAM siendo una elección popular (un derivado de fluoresceína). Finalmente, la reacción incluye un oligonucleótido marcado en 3' con un desactivador en antisentido con respecto al oligonucleótido marcado con FAM. Existen varios marcadores adecuados, de los cuales, las series de marcadores desactivadores Black Hole son una elección popular.

Como la longitud del oligonucleótido desactivador es lo suficientemente larga como para dar una Tm por encima de la Ta de la reacción, la generación del producto puede evaluarse en cada ciclo del proceso de PCR en cualquier instrumento de PCR en tiempo real (tal como un instrumento LC480 o ABI 7900 Prism de Roche).

Debido a la complementariedad de los dos oligonucleótidos marcados, se hibridan entre sí. Esta hibridación lleva el marcador desactivador muy cerca del fluoróforo, de manera que reproduce todas las señales fluorescentes del fluoróforo. Entonces se inicia el proceso de PCR y el producto de PCR comienza a generarse. Después de los primeros ciclos de PCR se genera la secuencia complementaria del cebador fluorescente. El cebador de PCR fluorescente es capaz de iniciar entonces la síntesis durante la PCR, y lo hace. No es esencial que el oligonucleótido fluorescente sea capaz de actuar como cebador, pero se considera que se puede generar más producto de PCR si el oligonucleótido fluorescente actúa como cebador, lo que puede proporcionar una mejor señal. Esto produce un amplicón que contiene una molécula fluorescente. Una vez que esto ocurre, el oligo de desactivación es menos capaz de hibridar con el oligonucleótido marcado fluorescente, dado que el proceso de PCR produce un amplicón de ADN de doble cadena. Dado que el oligonucleótido de desactivación ya no hibrida con el oligonucleótido marcado fluorescente, se genera entonces una señal que es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR generado y que puede medirse ciclo a ciclo.

No es necesario que la región etiqueta del cebador de cola sea idéntica a la del oligonucleótido de cadena sencilla marcado con fluorescencia, siempre y cuando una secuencia complementaria de la región de la cola generada se hibride al oligonucleótido marcado con fluorescencia.

Detección indirecta de productos de PCR - Genotipado de SNP (punto final):

Esta realización, ilustrada en la figura 1, utiliza el mismo par de oligonucleótidos marcados con un fluoróforo y con un desactivador como se ha descrito anteriormente.

El genotipado de SNP utiliza al menos dos pares de oligonucleótidos marcados, por ejemplo 2, 3 o 4 pares, en donde cada par comprende preferentemente un fluoróforo diferente, y en los que los fluoróforos son espectralmente resolubles entre sí, por ejemplo, FAM y HEX. Los cebadores de cola (correspondiendo cada uno a un grupo de oligonucleótidos cebadores diferentes, como se ha indicado anteriormente) se unen a la cola con una secuencia distinta, la porción de los cebadores no unida a la cola (generalmente denominada directa) se dirige al ADN de interés. En esta porción del cebador pueden diferir entre sí solo por un solo nucleótido, por ejemplo, en su base 3' terminal. Cada cebador se dirige a la base polimórfica del ADN de interés, como es bien sabido por los expertos en la materia. La PCR se lleva a cabo de modo que los cebadores inician la síntesis cuando se emparejan con la secuencia diana de interés, por ejemplo, cuando la base 3' está perfectamente emparejada. Cuando se produce un emparejamiento erróneo, la síntesis no avanza.

Durante la reacción, Dependiendo del genotipo, la porción no de cola (específica de diana) es capaz de iniciar la

síntesis (o ambas porciones son capaces, en el caso de un heterocigoto). Esto da lugar a la incorporación de la porción de cola fluorescente distinta del cebador en el producto de PCR de manera que impide la hibridación del oligonucleótido desactivador con el correspondiente oligonucleótido fluorescente. Por lo tanto, se genera una señal de acuerdo con la de los oligonucleótidos específicos de alelo que iniciaron la síntesis. Los productos de
 5 amplificación que incorporan uno o más de los fluoróforos pueden leerse entonces en un lector de placas fluorescentes. Los datos resultantes pueden representarse entonces y se genera un gráfico de agrupación de un fluoróforo sobre el otro. Los genotipos resultantes pueden determinarse entonces basándose en los gráficos de agrupación.

10 En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones anexas, las formas en singular "un", "una" y "el" incluyen la referencia al plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

15 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta el décimo de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo, y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido, está comprendido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse de forma independiente en los intervalos, y también están comprendidos dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente
 20 excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en la invención.

La invención se describirá ahora por referencia a los ejemplos proporcionados a continuación, que son para fines ilustrativos y no deben interpretarse como una limitación del alcance de la presente invención.

25

Ejemplos:

Abreviaturas:

30 6FAM: 6-carboxifluoresceína
 HEX: 2',4',5',7',1,4-hexaclorofluoresceína
 Dab: desactivador oscuro no fluorescente
 *: Incorporación de fosfortioato (los fosfortioatos (o S-oligos) son una variante del ADN normal en la que uno de los oxígenos que no forma un enlace se sustituye por azufre).
 35 T_m: Temperatura de fusión del oligonucleótido
 T_a: temperatura de anillado de una reacción de amplificación

Se utilizó una serie de cinco casetes fluorescentes/desactivadores para demostrar el efecto de la temperatura de fusión de los casetes en el control de la amplificación no específica. A continuación se detallan las secuencias de
 40 estos casetes fluorescentes/desactivadores.

Casete del par 1:

45 Oligonucleótido fluorescente FAM: /6FAM /TGA GCG ATT AGC CGT TAG GAT GA
 Oligonucleótido de desactivación complementario FAM: AAC CTA ACG GCT AAT CGC TCA/Dab/
 Oligonucleótido fluorescente HEX: /HEX/GCT GGT CGG TGA ACA GGT TAG AGA
 Oligonucleótido de desactivación complementario HEX: TAA CCT GTT CAC CGA CCA GC/Dab/

50 Casete del par 2:

Oligonucleótido fluorescente FAM: /6FAM/TCA GTG AGC GAT TAG CCG TTA GGA TGA
 Oligonucleótido de desactivación complementario FAM: AAC CTA ACG GCT AAT CGC TCA CTG A/Dab
 Oligonucleótido fluorescente HEX: /HEX/TAC AGC TGG TCG GTG AAC AGG TTA GAG A
 Oligonucleótido de desactivación complementario HEX: TAA CCT GTT CAC CGA CCA GCT GTA /Dab/

55

Casete del par 3:

Oligonucleótido fluorescente FAM: /6FAM/TGT CTC AGT GAG CGA TTA GCC GTT AGG ATG A
 60 Oligonucleótido de desactivación complementario FAM: AAC CTA ACG GCT AAT CGC TCA CTG AGA CA/Dab
 Oligonucleótido fluorescente HEX: /5HEX/ATG CTA CAG CTG GTC GGT GAA CAG GTT AGA GA
 65 Oligonucleótido de desactivación complementario HEX: TAA CCT GTT CAC CGA CCA GCT GTA GCA T/Dab/

Casete del par 4:

5 Oligonucleótido fluorescente FAM: /6FAM /ATG CTG TCT CAG TGA GCG ATT AGC CGT TAG GAT GA
 Oligonucleótido de desactivación complementario FAM: AAC CTA ACG GCT AAT CGC TCA CTG AGA CAG
 CAT/Dab/
 Oligonucleótido fluorescente HEX: /5HEX/AAG CAT GCT ACA GCT GGT CGG TGA ACA GGT TAG AGA
 Oligonucleótido de desactivación complementario HEX: TAA CCT GTT CAC CGA CCA GCT GTA GCA TGC
 10 TT/Dab/

Casete del par 5:

15 Oligonucleótido fluorescente FAM: /6FAM/G*CG*AT*TA*GC*CG*TT*AG*GA*TG*A
 Oligonucleótido de desactivación complementario FAM: CCTAACGGCTAATCGC/Dab/
 Oligonucleótido fluorescente HEX: /5HEX/ G*TC*GG*TG*AA*CA*GG*TT*AG*AG*A
 Oligonucleótido de desactivación complementario HEX: 5'AACCTGTTCACCGAC/Dab/

20 La incorporación del fosfortioato en el casete de fluor/desactivador se describe en la solicitud de patente
 PCT/GB2012/050645. También se podrían utilizar una serie de variantes del casete 5 en lugar de las enumeradas.
 Una selección de las variantes de la secuencia que podrían utilizarse para sustituir a las enumeradas son:

- 1) /6FAM/ GCGATTAGCCGTTAGGATGA
- 2) /6FAM/GCGATTAGCCGTTAGGATG*A
- 25 3) /6FAM/ G*C*G*A*T*T*A*G*C*C*G*T*T*AG*G*A*T*G*A
- 4) /HEX/ GTCGGTGAACAGGTTAGAGA
- 30 5) /HEX/GTCGGTGAACAGGTTAGAG*A
- 6) /5HEX/*G*T*C*G*G*T*G*A*A*C*A*G*G*T*T*A*G*A*G*A
- 35 7) C*CT*AA*CG*GC*TA*AT*CG*C /3Dab/
- 8) CC*TA*AC*GG*CT*AA*TC*GC /3Dab/
- 9) C*C*T*A*A*C*G*G*C*T*A*A*T*C*G*C /3Dab/
- 40 10) AA*CC*TG*TT*CA*CC*GA* /3Dab/
- 11) A*AC*CT*GT*TC*AC*CG*AC /3Dab/
- 45 12) A*A*C*C*T*G*T*T*C*A*C*C*G*A*C /3Dab/

Ejemplo 1: determinación de la temperatura de fusión de los casetes de fluor/desactivador

50 Las temperaturas de fusión de los casetes de fluor/desactivador se determinaron experimentalmente. Los casetes 1
 a 5 se incorporaron a una mezcla de reacción que contiene los siguientes componentes en la concentración final:

- 1) Oligonucleótido marcado con FAM 0,1 uM
- 2) Oligonucleótido marcado con HEX 0,1 uM
- 3) Oligonucleótido marcado con desactivador (antisentido con respecto al oligonucleótido marcado con FAM) 0,5
 uM
- 55 4) Oligonucleótido marcado con desactivador (antisentido con respecto al oligonucleótido marcado con HEX) 0,5
 uM
- 5) Tris / HCl pH 8,3 8,5 mM
- 6) KCl 42,5 mM
- 7) Cloruro de magnesio 1,8 mM
- 60 8) dNTP 165,2 uM
- 9) 5-carboxi-X-rodamina 212,5 nM, SE (5-ROX, SE)
- 10) Igepal 0,04 %

65 Las temperaturas de fusión de cada casete se determinaron en ausencia de ADN polimerasa. El análisis de la curva
 de fusión de cada casete de fluorescencia/desactivador se llevó a cabo en un instrumento LightCycler 480 de Roche
 en una placa blanca de 96 pocillos usando 10 ul de la mezcla de reacción por pocillo.

El análisis de la curva de fusión fue precedido por el calentamiento de la mezcla a 95 °C durante 30 segundos. El análisis de la curva de fusión se llevó a cabo de 40 a 95 grados a 0,06 °C/seg. Se analizaron seis réplicas para cada casete. Los picos de fusión se generaron a partir de los datos de la curva de fusión mediante la función de análisis del LightCycler 480 (-dF/dt). Las T_m se calcularon utilizando la opción T_m manual para identificar el punto más bajo en el pico de fusión inverso (esto es necesario porque el cálculo automático de la T_m de los picos inversos no es posible utilizando este software). A continuación se enumeran las T_m determinadas experimentalmente para cada casete de fluor/desactivador:

10 Oligonucleótidos fluorescentes marcados con FAM y los correspondientes desactivadores:

	1	2	3	4	5
Media	63,22	67,42	70,33	73,20	55,81
Mínimo	63,13	67,27	70,31	73,07	55,68
Máximo	63,27	67,55	70,45	73,41	55,95

Oligonucleótidos fluorescentes marcados con HEX y los correspondientes desactivadores:

	1	2	3	4	5
Media	68,65	69,95	72,57	74,88	56,60
Mínimo	68,50	69,81	72,44	74,72	56,53
Máximo	68,91	70,09	72,72	74,93	56,80

15 Ejemplo 2 - detección de la fluorescencia 1 en el punto final

Se realizó una comparación directa entre el casete 1 y el casete 5. El casete 1 tiene una T_m determinada experimentalmente por encima de la temperatura de anillado utilizada para esta reacción de amplificación. El casete 5 tiene una T_m determinada experimentalmente por debajo de la temperatura de anillado de la reacción de amplificación (véase el ejemplo 1).

20 Todos los oligonucleótidos se compraron liofilizados y se resuspendieron a concentraciones iniciales de 200 µM en Tris/HCl pH 8,0 10 mM. Todas las diluciones posteriores se realizaron en este diluyente.

25 La amplificación se llevó a cabo en volúmenes de reacción de 4 µl en placas negras de 384 pocillos. Una mezcla de reacción 1x contenía los siguientes componentes:

- 1) Cebador específico de alelo 1 0,16 uM
- 2) Cebador específico de alelo 2 0,16 uM
- 3) Cebador inverso (común) 0,41 uM
- 30 4) Oligonucleótido marcado con FAM 0,1 uM
- 5) Oligonucleótido marcado con HEX 0,1 uM
- 6) Oligonucleótido marcado con desactivador (antisentido con respecto al oligonucleótido marcado con FAM) 0,5 uM
- 35 7) Oligonucleótido marcado con desactivador (antisentido con respecto al oligonucleótido marcado con HEX) 0,5 uM
- 8) Tris / HCl pH 8,3 8,5 mM
- 9) KCl 42,5 mM
- 10) Cloruro de magnesio 1,8 mM
- 11) dNTP 165,2 uM
- 40 12) 5-carboxi-X-rodamina 212,5 nM, SE (5-ROX, SE)
- 13) Igepal 0,04 %

45 Además de los componentes enumerados, cada mezcla debe contener 2-50 µl/ml de enzima polimerasa truncada en la posición N-terminal sin actividad de exonucleasa. No es esencial que la enzima no tenga actividad exonucleasa, pero es preferible, particularmente para el análisis de SNP.

Se utilizaron cebadores específicos para cada ensayo:

- 50 Cebador específico de alelo 1: 5'GCGATTAGCCGTTAGGATGATGAAGCTCCACAATTTGGTGAATTATCAAT3'
- Cebador específico de alelo 2: 5'GTCGGTGAACAGGTTAGAGATGAAGCTCCACAATTTGGTGAATTATCAAA3'
- [SEQ ID NO: 22]
- Cebador inverso común: 5'CACTCTAGTACTATATCTGTACATGGTA3' [SEQ ID NO: 23]

55 El uso de adiciones de fosforioato a los oligonucleótidos se describe en la solicitud de patente WO/2013/140107. También pueden utilizarse cebadores de ensayo marcados con fosforioato. Algunos ejemplos de cebadores

alternativos que podrían sustituir a los mencionados anteriormente son:

1) 5'GCGATTAGCCGTTAGGATGATGAAGCTCCACAATTTGGTGAATTATCAA*T3' [SEQ ID NO: 21]

5 2) 5'GTCGGTGAACAGGTTAGAGATGAAGCTCCACAATTTGGTGAATTATCAA*A3' [SEQ ID NO: 22]

3)

10 5'G*CG*AT*TA*GC*CG*TT*AG*GA*TG*AT*GA*AG*CT*CC*AC*AA*TT*TG*GT*GA* AT*TA*TC*AA*T3' [SEQ ID NO: 21]

4)

15 5'G*TC*GG*TG*AA*CA*GG*TT*AG*AG*AT*GA*AG*CT*CC*AC*AA*TT*TG*GT*GA* AT*TA*TC*AA*A3' [SEQ ID NO: 22]

5) 5'CA*CT*CT*AG*TA*CT*AT*AT*CT*GT*CA*CA*TG*GT*A3' [SEQ ID NO: 23]

6)

20 5'G*C*G*A*T*T*A*G*C*C*G*T*T*A*G*G*A*T*G*A*A*T*G*A*A*G*C*T*C*A*C*A*A* T*T*T*G*G*T*G*A*A*T*T*A*T*C*A*A*T3' [SEQ ID NO: 21]

7)

25 5'G*T*C*G*G*T*G*A*A*C*A*G*G*T*T*A*G*A*G*A*T*G*A*A*G*C*T*C*A*C*A*A*T* T*T*G*G*T*G*A*A*T*T*A*T*C*A*A*A3' [SEQ ID NO:22]

8) 5'C*A*C*T*C*T*A*G*T*A*C*T*A*T*A*T*C*T*G*T*C*A*C*A*T*G*G*T*A3' [SEQ ID NO: 23]

30 Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en una máquina hidrocicladora de PCR basada en un baño de agua. Las condiciones de amplificación fueron:

94 °C durante 15 minutos (activación de arranque en caliente)

35 60 ciclos de:

94 °C durante 20 segundos

57 °C durante 60 segundos (es decir, una Ta de 57 °C)

40 La fluorescencia del punto final se leyó a temperatura ambiente en el lector de placas fluorescentes BMG Pherastar después de la finalización de la reacción.

45 La figura 2 proporciona datos de ejemplo de cada uno de los tres alelos que pueden generarse utilizando el par de cebadores descrito anteriormente. En la figura también se muestran las posiciones de las muestras sin molde control (NTC) (rodeadas) en relación con las de cada uno de los tres grupos de genotipos. En el ejemplo mostrado, los NTC de la reacción en la que la T_m está por debajo de la T_a de la reacción de amplificación (izquierda) son claramente distintos entre sí y proporcionan pruebas de una amplificación no específica. Los datos de ejemplo para el casete 1 (derecha), para el cual la T_m está por encima de la T_a de la reacción de amplificación, muestran que los NTC en esta reacción permanecen estrechamente agrupados, con una fluorescencia inferior a la del grupo de muestras amplificado apropiado. Esto indica que no se han generado productos no específicos.

50 **Ejemplo 3 - detección de la fluorescencia 2 en el punto final**

Se realizó una comparación directa entre el casete 1 y el casete 5. El casete 1 tiene una T_m determinada experimentalmente por encima de la temperatura de anillado utilizada para esta reacción de amplificación: El casete 55 5 tiene una T_m determinada experimentalmente por debajo de la temperatura de anillado de la reacción de amplificación (véase el ejemplo 1).

Todos los oligonucleótidos se compraron liofilizados y se resuspendieron a concentraciones iniciales de 200 µM en Tris/HCl pH 8,0 10 mM. Todas las diluciones posteriores se realizaron en este diluyente.

60 La amplificación se llevó a cabo en volúmenes de reacción de 4 µl en placas negras de 384 pocillos. Una mezcla de reacción 1x contenía los siguientes componentes:

1) Cebador específico de alelo 1 0,16 µM

2) Cebador específico de alelo 2 0,16 µM

65 3) Cebador inverso (común) 0,41 µM

4) Oligonucleótido marcado con FAM 0,1 µM

- 5) Oligonucleótido marcado con HEX 0,1 uM
- 6) Oligonucleótido marcado con desactivador (antisentido con respecto al oligonucleótido marcado con FAM) 0,5 uM
- 7) Oligonucleótido marcado con desactivador (antisentido con respecto al oligonucleótido marcado con HEX) 0,5 uM
- 8) Tris / HCl pH 8,3 10 mM
- 9) KCl 10 mM
- 10) Cloruro de magnesio 1,8 mM
- 11) dNTP 165,2 uM
- 12) 5-carboxi-X-rodamina 212,5 nM, SE (5-ROX, SE)

Además de los componentes enumerados, cada mezcla debe contener 2-50 µl/ml de enzima polimerasa truncada en la posición N-terminal sin actividad de exonucleasa.

- 15 Se utilizaron cebadores específicos para cada ensayo:

Cebador específico de alelo 1: 5' GCGATTAGCCGTTAGGATGATCATTCTCATAATCGCCCACGGA 3'

Cebador específico de alelo 2: 5'GTCGGTGAACAGGTTAGAGATCATTCTCATAATCGCCCACGGG 3'

Cebador inverso común: 5' GTAGTTTGAGTTTGCTAGGCAGAATAGTA 3'

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en una máquina hidrocicladora de PCR. Las condiciones de amplificación fueron:

- 94 °C durante 15 minutos (activación de arranque en caliente)
- 10 ciclos de:
 - 94 °C durante 20 segundos
 - Touch Down a 61 °C -55 °C durante 60 segundos (0,6 °C por ciclo)
- 35 ciclos de:
 - 94 °C durante 20 segundos
 - 55 °C durante 60 segundos

La fluorescencia en el punto final se leyó a temperatura ambiente en el lector de placas fluorescentes BMG Pherastar después de la finalización de la reacción.

La figura 3 proporciona datos de ejemplo de cada uno de los dos alelos que pueden generarse utilizando el par de cebadores descrito anteriormente. La figura también muestra las posiciones de las muestras sin molde control (NTC) (rodeadas) en relación con las de cada uno de los dos grupos de genotipos. En el ejemplo mostrado, Los NTC de la reacción donde la T_m está por debajo de la T_a de la reacción de amplificación (izquierda) tienen una fluorescencia FAM sustancialmente superior a la de los productos amplificados con el cebador HEX y una fluorescencia HEX sustancialmente superior a la de los productos amplificados con el cebador FAM. Estos datos proporcionan evidencia de una amplificación no específica. Los datos de ejemplo para el casete 1 (derecha), para el cual la T_m está por encima de la T_a de la reacción de amplificación, muestran que los NTC en esta reacción permanecen estrechamente agrupados hacia la esquina inferior izquierda de la figura. Esto indica que se han generado pocos o ningún producto no específico.

Ejemplo 4 - detección de fluorescencia en tiempo real

- 50 Se llevaron a cabo reacciones de amplificación junto con la detección de fluorescencia en tiempo real a fin de demostrar el efecto del aumento de la temperatura de fusión del casete de fluor/desactivador.

Todos los oligonucleótidos se compraron liofilizados y se resuspendieron a concentraciones iniciales de 200 µM en Tris/HCl pH 8,0 10 mM. Todas las diluciones posteriores se realizaron en este diluyente. La amplificación en tiempo real se llevó a cabo en volúmenes de reacción de 10 µl en placas blancas de 96 pocillos. Una mezcla de reacción 1x contenía los siguientes componentes:

- 14) Cebador específico de alelo 1 0,16 uM
- 15) Cebador específico de alelo 2 0,16 uM
- 16) Cebador inverso (común) 0,41 uM
- 17) Oligonucleótido marcado con FAM 0,1 uM
- 18) Oligonucleótido marcado con HEX 0,1 uM
- 19) Oligonucleótido marcado con desactivador (antisentido con respecto al oligonucleótido marcado con FAM) 0,5 uM
- 20) Oligonucleótido marcado con desactivador (antisentido con respecto al oligonucleótido marcado con HEX) 0,5 uM

ES 2 795 679 T3

- 21) Tris / HCl pH 8,3 8,5 mM
- 22) KCl 42,5 mM
- 23) Cloruro de magnesio 1,8 mM
- 24) dNTP 165,2 uM
- 5 25) 5-carboxi-X-rodamina 212,5 nM, SE (5-ROX, SE)
- 26) Igepal 0,04 %

Además de los componentes enumerados, cada mezcla debe contener 2-50 µl/ml de enzima polimerasa truncada en la posición N-terminal sin actividad de exonucleasa.

10

Se utilizaron cebadores específicos para cada ensayo:

Cebador específico de alelo 1: 5'GCGATTAGCCGTTAGGATGATGAAGCTCCACAATTTGGTGAATTATCAAT3'

15

Cebador específico de alelo 2: 5'GTCGGTGAACAGGTTAGAGATGAAGCTCCACAATTTGGTGAATTATCAAAA3'

Cebador inverso común: 5'CACTCTAGTACTATATCTGTACATGGTA3'

20

Las aplicaciones en tiempo real de la mezcla descrita se probaron en placas blancas de 96 pocillos en el instrumento de PCR en tiempo real LightCycler 480 de Roche. Se añadieron 5 µl de la mezcla del ensayo 2x a 5 µl de ADN genómico humano previamente diluido a una concentración de 3-4 ng/µl. La placa se selló usando el sello LC480 QPCR. La placa se termocicló en una máquina de PCR en tiempo real LC480 (Roche) bajo las siguientes condiciones de ciclo; el cambio en la fluorescencia FAM y HEX se registró en tiempo real en cada ciclo.

25

- 94 °C durante 15 minutos (activación de arranque en caliente)
- 60 ciclos de:
 - 94 °C durante 10 segundos
 - 57 °C durante 60 segundos (lectura de la placa a esta temperatura)

30

La PCR se ejecutó durante 60 ciclos para demostrar la eficiencia de un casete fluor/desactivador de mayor T_m en la reducción de la amplificación NTC. Los resultados de la detección en tiempo real se muestran en la figura 4. Los resultados del control sin molde están marcados con un círculo. La detección en tiempo real de un producto NTC no específico no se produce en tiempo real, ya que la T_m de los casetes fluor-desactivador está por encima de la T_a de la reacción de amplificación.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de un producto de extensión de cebador, comprendiendo el método las etapas de:

5 a) proporcionar uno o más grupos de oligonucleótidos cebadores, comprendiendo cada grupo uno o más conjuntos de oligonucleótidos cebadores, cada conjunto **estando caracterizado por**

i) un primer oligonucleótido cebador que tiene una porción específica de diana y una porción secuencia arriba en dirección 5' específica del casete de fluorescencia, y

10 ii) un segundo oligonucleótido cebador que tiene una porción específica de diana

en donde los oligonucleótidos cebadores de un conjunto concreto son adecuados respectivamente para la hibridación en cadenas complementarias de una secuencia de nucleótidos diana correspondiente para permitir la formación de un producto de extensión de cebador, por ejemplo, un producto de PCR y en donde el primer oligonucleótido cebador de cada conjunto del mismo grupo contiene una porción específica de casete de fluorescencia que es capaz de hibridar con el complemento de la porción específica de casete de fluorescencia del primer oligonucleótido cebador de cualquier conjunto del mismo grupo

15 b) proporcionar uno o más conjuntos de oligonucleótidos de casete, cada conjunto **estando caracterizado por**

20 i) un primer oligonucleótido del casete marcado con un resto fluorescente que es un resto donador y consiste en una secuencia capaz de hibridar con el complemento de la porción específica del casete de fluorescencia del primer oligonucleótido cebador de cualquier conjunto en un grupo de oligonucleótidos cebadores determinado, y que no comprende una porción de una secuencia específica de diana; y

25 ii) un segundo oligonucleótido del casete marcado con un resto aceptor (por ejemplo, un resto desactivador), en donde el segundo oligonucleótido del casete no comprende una secuencia específica de diana y en donde el segundo oligonucleótido del casete es entre 1 y 5 bases de nucleótidos más corto que el primer oligonucleótido del casete correspondiente;

30 donde cada conjunto de oligonucleótidos del casete hibridan entre sí para formar un par fluorescente desactivado, en donde el par fluorescente desactivado tiene una $T_m A$,

c) iniciar la reacción de extensión del cebador, generando de esta manera una secuencia complementaria al primer oligonucleótido cebador relevante (si el polinucleótido diana relevante está presente), de tal manera que, el segundo oligonucleótido del casete relevante es menos capaz de hibridar con el primer oligonucleótido del casete relevante, de manera que se genera una señal; y

35 d) detectar la señal que se genera,

en donde la reacción de extensión del cebador se realiza, al menos en parte, a una T_a que es menor que la $T_m A$ o las $T_m A$ para dicho uno o más pares fluorescentes desactivados.

40 2. El método de la reivindicación 1 en donde la $T_m A$ del par o pares fluorescentes desactivados es menor o igual a 15 °C, opcionalmente entre 1 y 15 °C; o menor o igual a 10 °C, opcionalmente entre 1 y 10 °C por encima de la T_a de la reacción de extensión de cebador.

45 3. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la señal se mide en tiempo real.

4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en donde la señal se mide en el punto final de la reacción.

50 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde el o un primer oligonucleótido de casete marcado con un resto fluorescente es capaz de actuar como cebador en una reacción de extensión de cebador.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde el o un primer oligonucleótido de casete marcado con un resto fluorescente no es capaz de actuar como cebador en la reacción de extensión de cebador.

55 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde la interacción entre el oligonucleótido del casete de fluorescencia marcado donador fluorescente y el oligonucleótido del casete de fluorescencia marcado aceptor es menos estable que la interacción entre el oligonucleótido del casete de fluorescencia marcado donador fluorescente y el producto de extensión complementario de la porción secuencia arriba en dirección 5' específica de casete de fluorescencia del primer oligonucleótido cebador de cada conjunto de cebadores del grupo relevante.

60 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde cada grupo de oligonucleótidos cebadores comprende un conjunto de oligonucleótidos cebadores.

65 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde hay 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 grupos de oligonucleótidos cebadores y los correspondientes conjuntos de casetes de oligonucleótidos.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde uno o ambos oligonucleótidos del casete contienen un solo marcador, opcionalmente en donde ambos oligonucleótidos del casete contienen un solo marcador.

5 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el oligonucleótido del casete marcado fluorescente contiene un marcador en el extremo 5' del oligonucleótido o dentro de él, y/o el oligonucleótido del casete marcado desactivador contiene un marcador en el extremo 3' del oligonucleótido o dentro de él.

10 12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde al menos una de las bases de al menos uno de los oligonucleótidos, por ejemplo, al menos uno de los oligonucleótidos del casete, opcionalmente el oligonucleótido del casete marcado fluorescente, es una base modificada con fosforotioato, opcionalmente en donde el 20-80 % de las bases de al menos uno de los oligonucleótidos, por ejemplo, al menos uno de los oligonucleótidos del casete, opcionalmente el oligonucleótido del casete marcado fluorescente, son bases modificadas con fosforotioato.

15 20 13. Un kit adecuado para su uso en un método para la detección de un producto de extensión de cebador, comprendiendo el kit:

a) dos o mas grupos de oligonucleótidos cebadores, comprendiendo cada grupo uno o más conjuntos de oligonucleótidos cebadores, cada conjunto **estando caracterizado por**

25 i) un primer oligonucleótido cebador que tiene una porción específica de diana y una porción secuencia arriba en dirección 5' específica del casete de fluorescencia, y
ii) un segundo oligonucleótido cebador que tiene una porción específica de diana

30 en donde los oligonucleótidos cebadores de un conjunto concreto son adecuados respectivamente para la hibridación en cadenas complementarias de una secuencia de nucleótidos diana correspondiente para permitir la formación de un producto de extensión de cebador, por ejemplo, un producto de PCR y en donde el primer oligonucleótido cebador de cada conjunto del mismo grupo contiene una porción específica del casete de fluorescencia que es capaz de hibridar con el complemento de la porción específica de casete de fluorescencia del primer oligonucleótido cebador de cualquier conjunto del mismo grupo; y

35 b) dos o más conjuntos de casetes de oligonucleótidos, cada conjunto **estando caracterizado por**

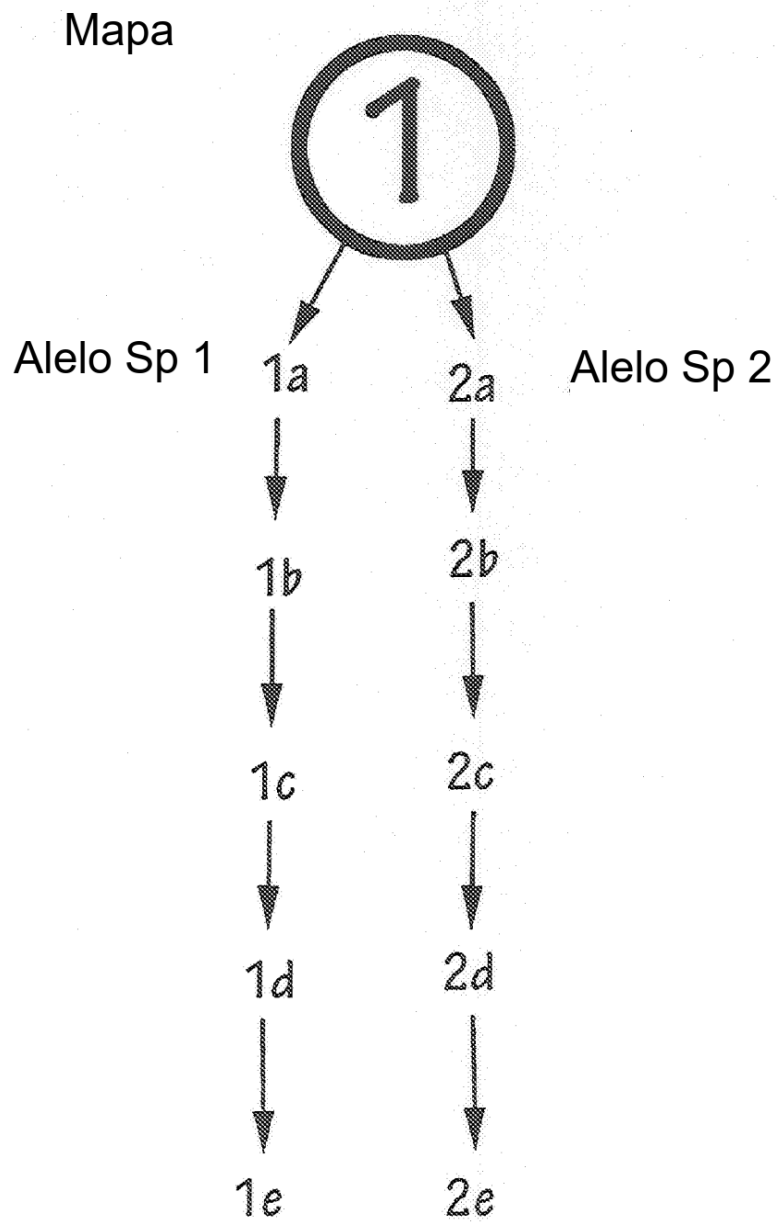
i) un primer oligonucleótido del casete marcado con un resto fluorescente que es un resto donador y que consiste en una secuencia capaz de hibridar con el complemento de la porción específica del casete fluorescente del primer oligonucleótido cebador de cualquier conjunto en un grupo de oligonucleótidos cebadores determinado y que no comprende una porción de una secuencia específica de diana; y
40 ii) un segundo oligonucleótido del casete marcado con un resto aceptor (por ejemplo, un resto desactivador), en donde el segundo oligonucleótido del casete no comprende una secuencia específica de diana y en donde el segundo oligonucleótido del casete es entre 1 y 5 bases de nucleótidos más corto que el primer oligonucleótido del casete correspondiente;

45 donde cada conjunto de oligonucleótidos del casete hibridan entre sí para formar un par fluorescente desactivado, en donde el par fluorescente desactivado tiene una T_m A, en donde cada una de las T_m A para los pares fluorescentes desactivados está por encima de una temperatura adecuada para su uso como T_a de una reacción de extensión del cebador utilizando los oligonucleótidos del kit, por ejemplo, por encima de una temperatura de entre 46 y 65 °C, por ejemplo, de entre 50 y 60 °C.

50 14. El kit de la reivindicación 13 en donde los primeros oligonucleótidos cebadores están sin marcar.

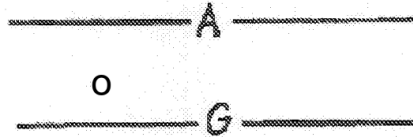
55 15. El método o el kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso en el genotipado de SNP basado en la PCR específica de alelo, en estudios de expresión génica o estudios de variación del número de copias.

Figura 1



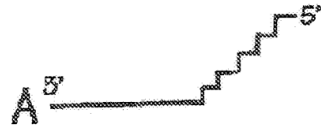


Hay dos resultados posibles por alelo para este SNP

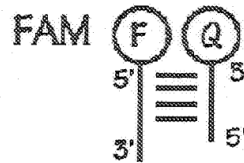


Los cebadores implicados en esta reacción son los siguientes:

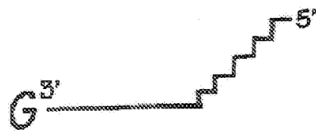
Cebador específico de alelo 1



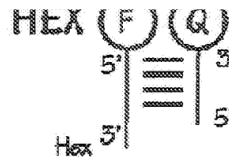
Fluor/desactivador correspondiente



Cebador específico de alelo 2



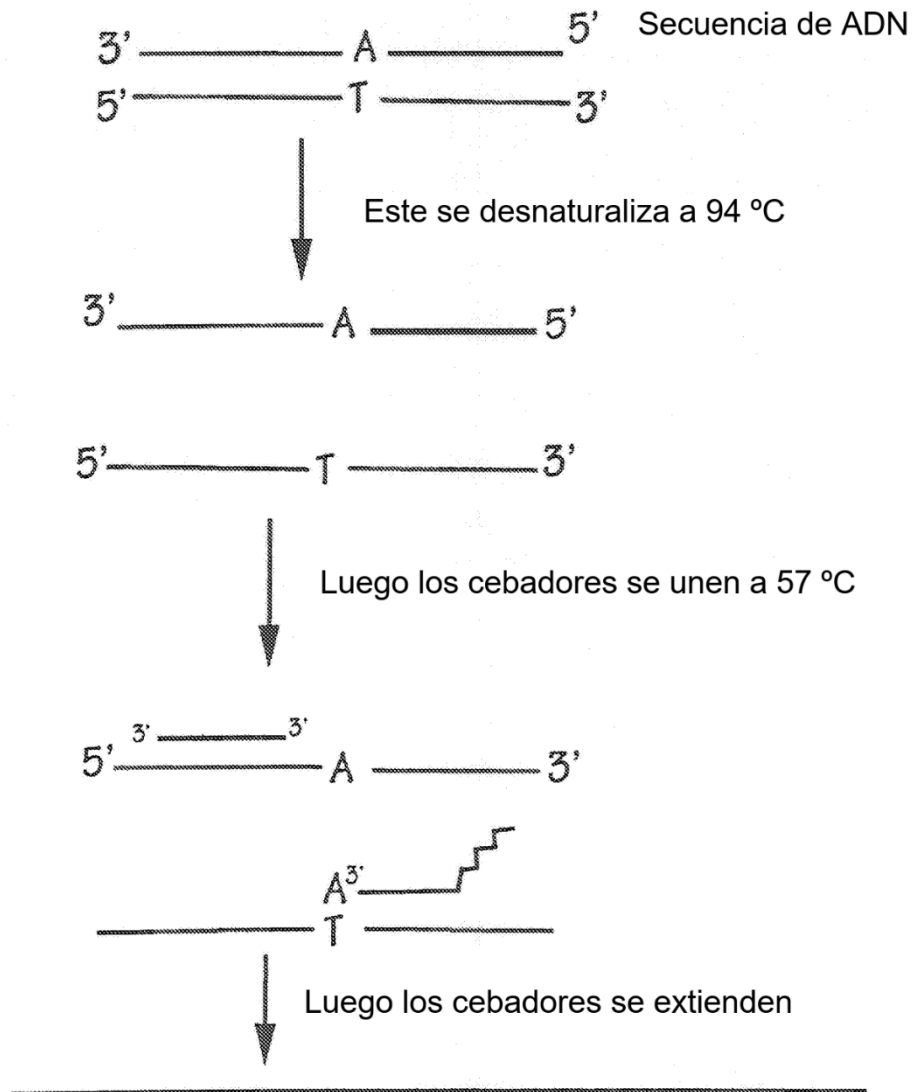
Fluor/desactivador correspondiente



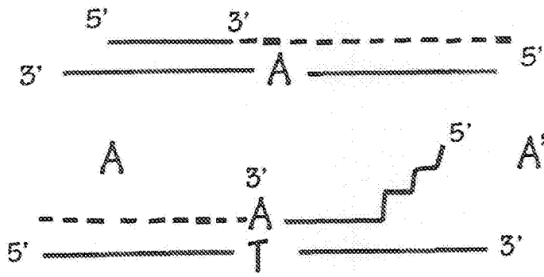
Cebador común 5' ————— 3'

Cebador específico de alelo 1

1a

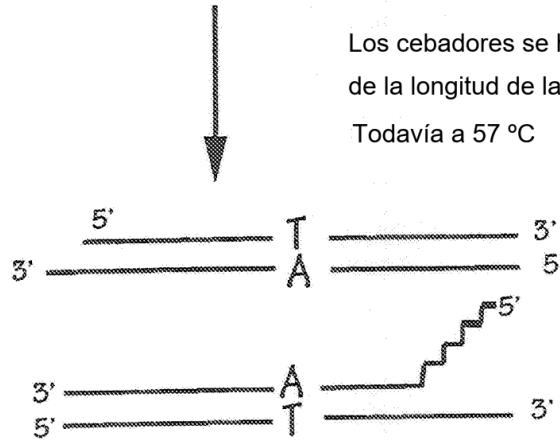


1b

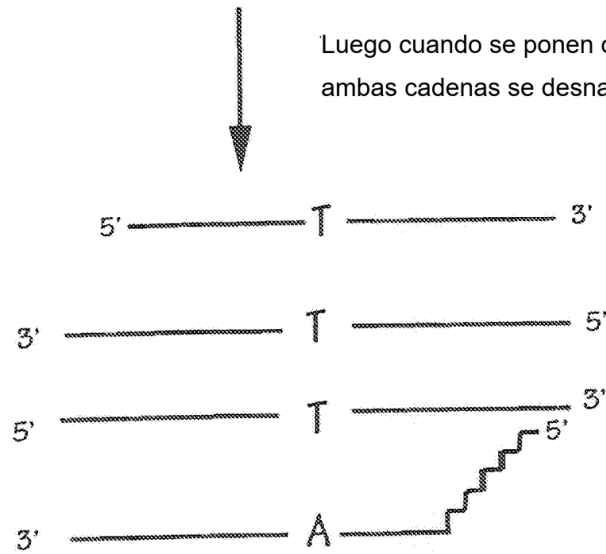


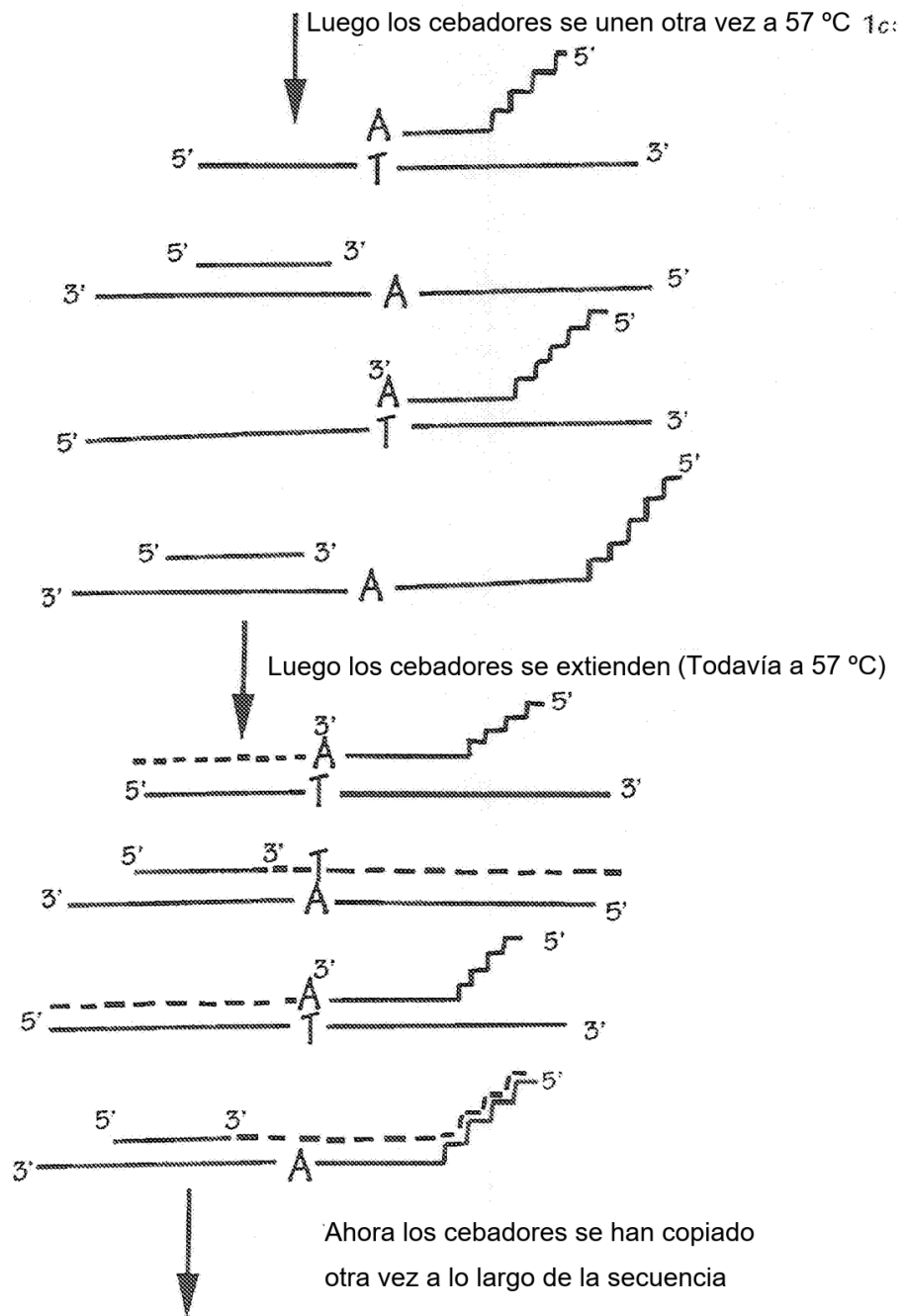
Los cebadores se han copiado a lo largo de la longitud de la secuencia

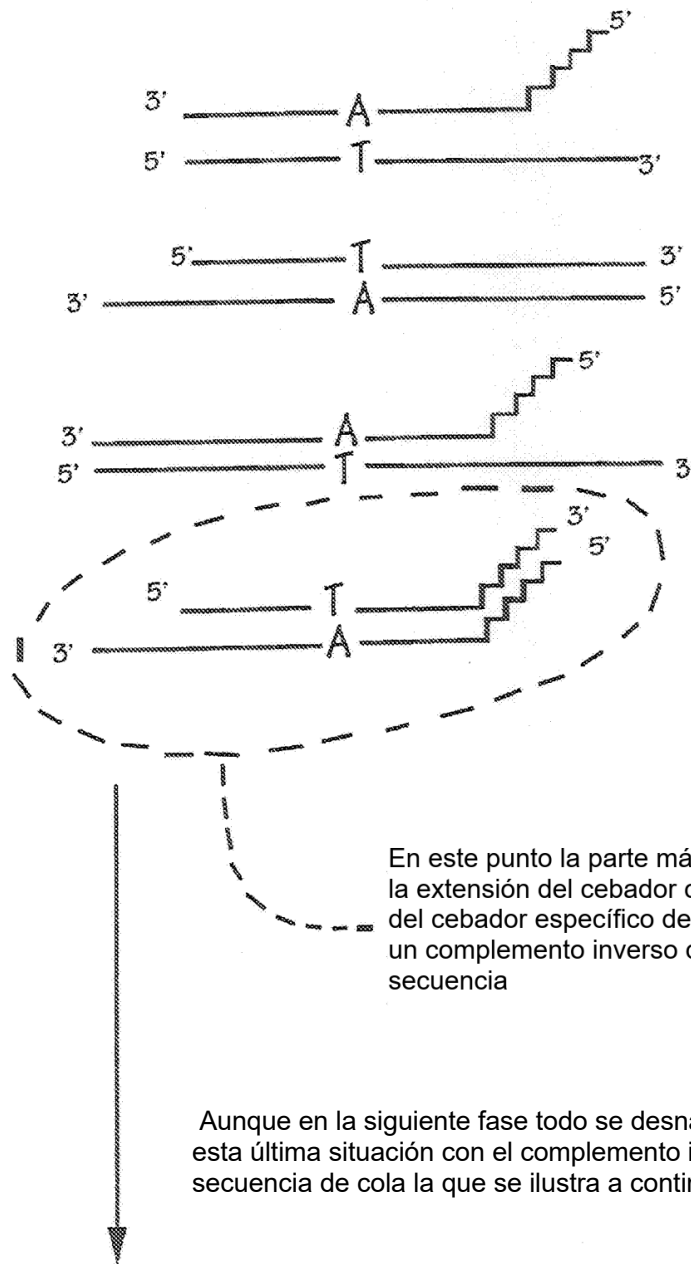
Todavía a 57 °C

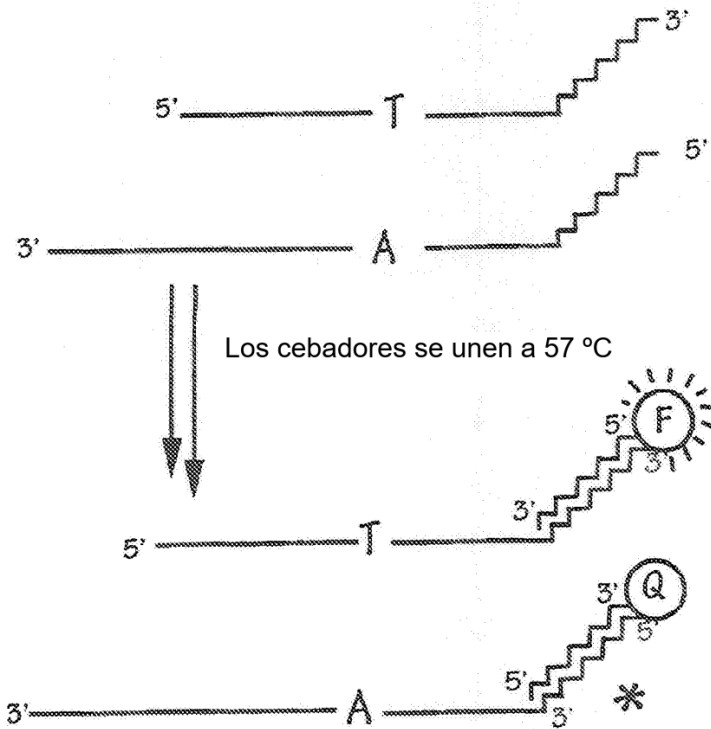


Luego cuando se ponen otra vez a 94 °C
ambas cadenas se desnaturalizan





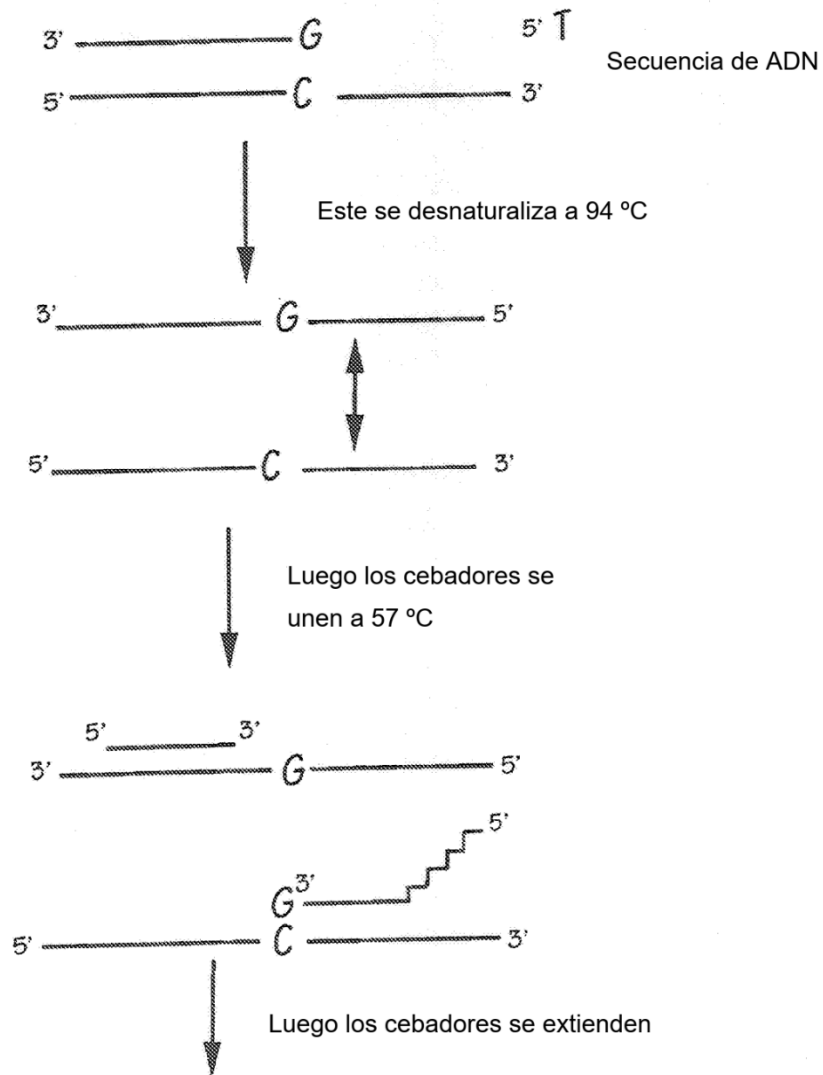


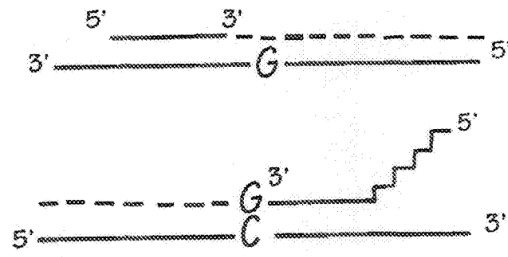


Entonces el cebador fluorescente complementario es capaz de unirse dejándolo libre del efecto de desactivación del desactivador y es capaz de emitir fluorescencia cuando se excita

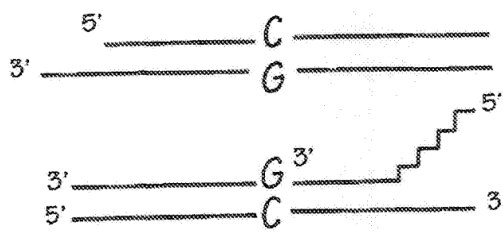
* Nota: Aunque el desactivador se puede unir es incapaz de extenderse en dirección 3' a 5'

Cebador específico de alelo 2

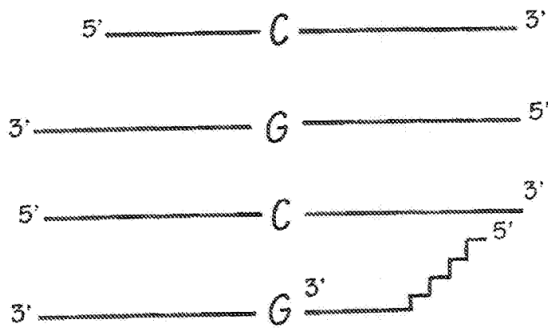




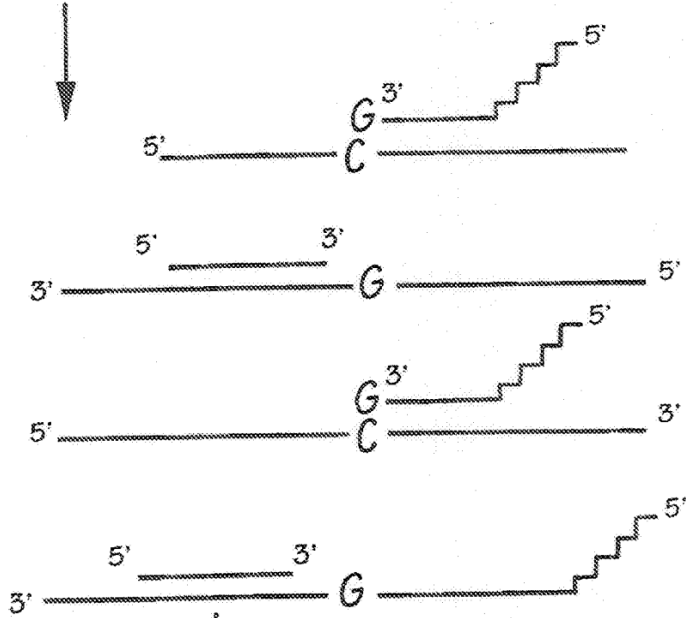
Los cebadores se han copiado a lo largo de la longitud de la secuencia
 Todavía a 57 °C



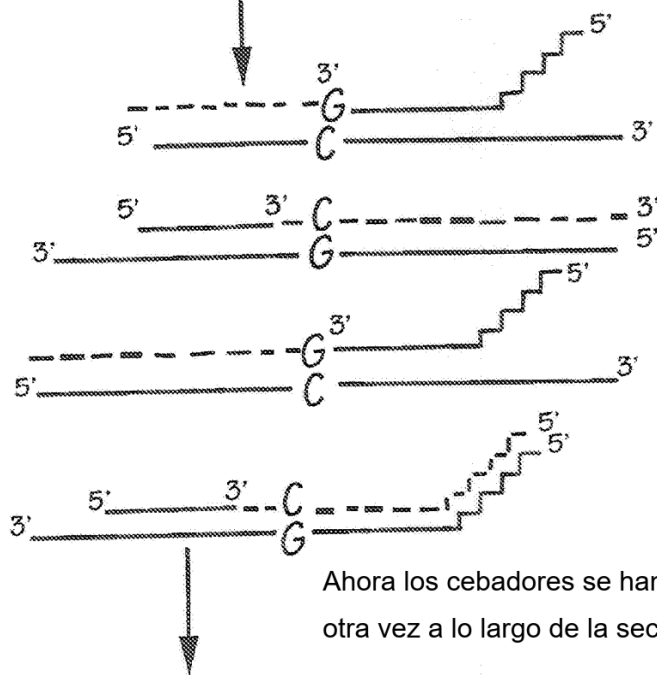
Luego cuando se ponen otra vez a 94 °C
 ambas cadenas se desnaturalizan



Luego los cebadores se unen otra vez a 57 °C

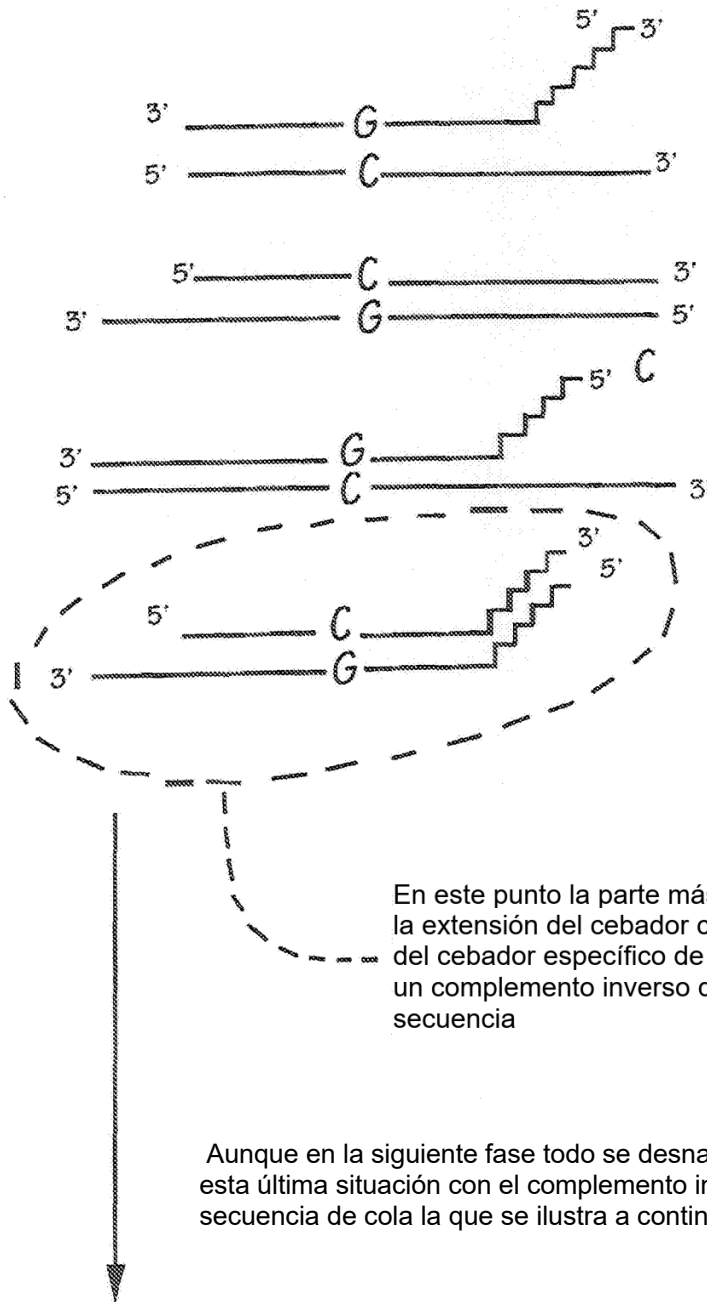


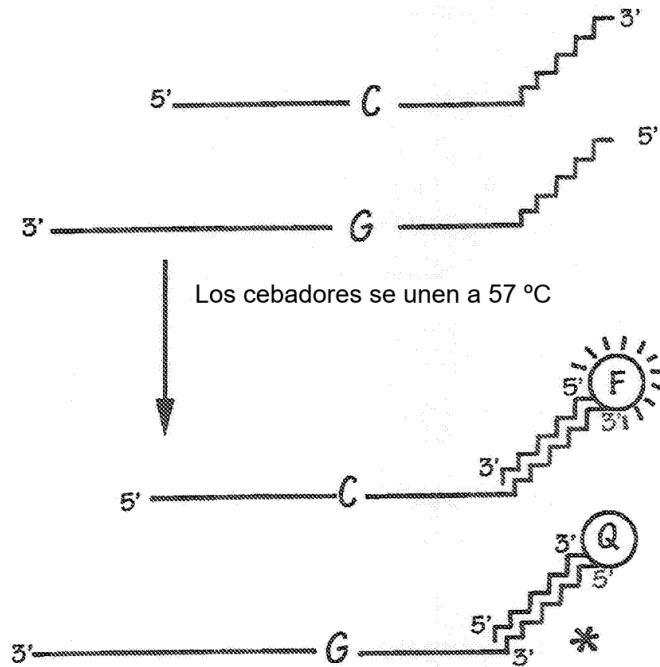
Luego los cebadores se extienden (Todavía a 57 °C)



Ahora los cebadores se han copiado otra vez a lo largo de la secuencia

2d





Entonces el cebador fluorescente complementario es capaz de unirse dejándolo libre del efecto de desactivación del desactivador y es capaz de emitir fluorescencia cuando se excita

* Nota: Aunque el desactivador se puede unir, es incapaz de extenderse en dirección 3' a 5'

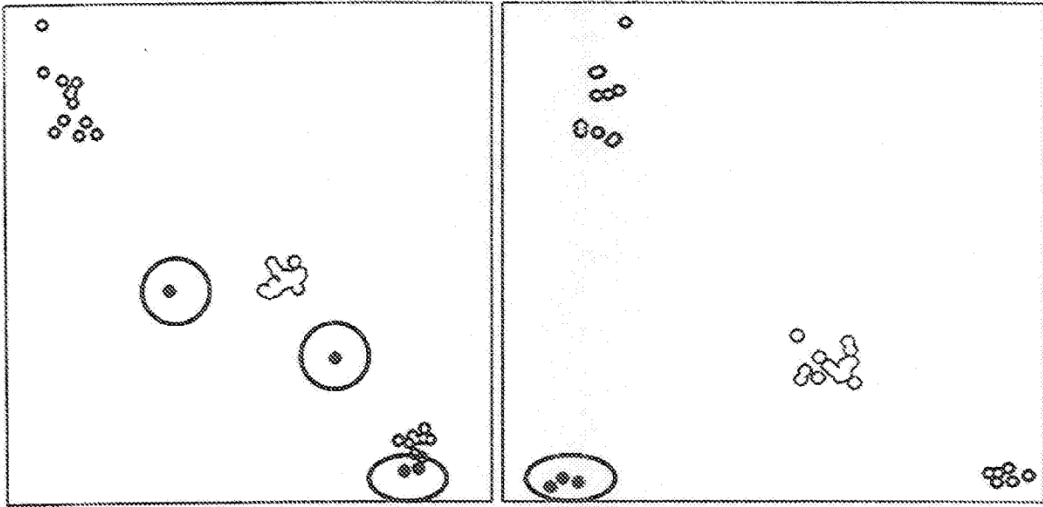


Figura 2:

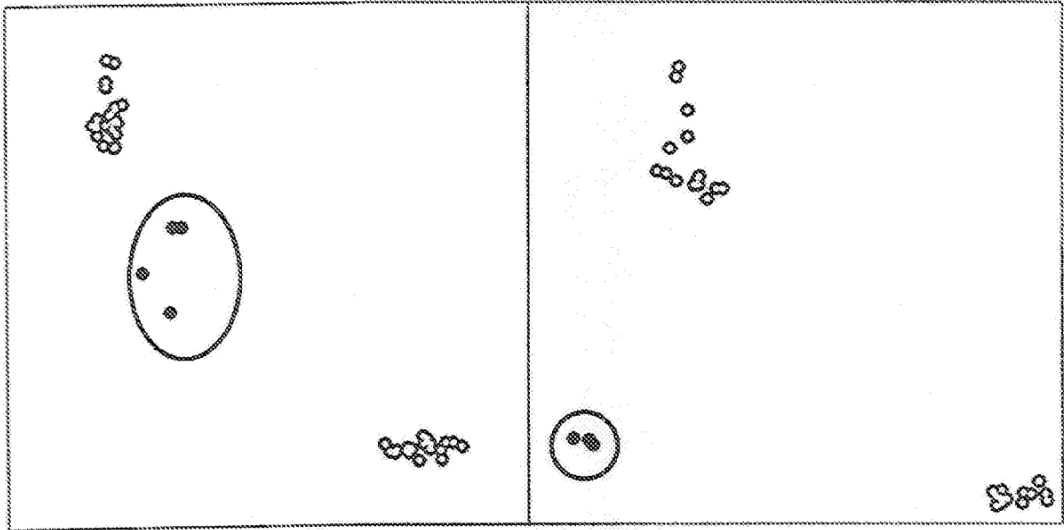


Figura 3:

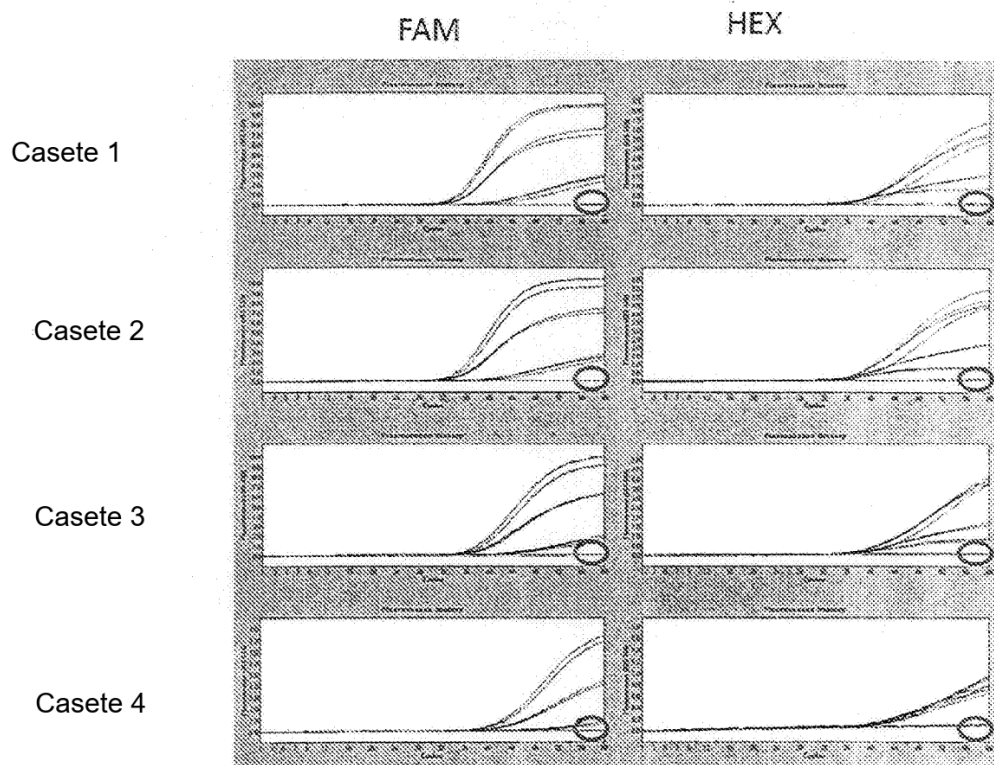
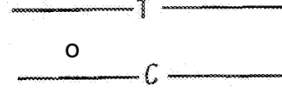
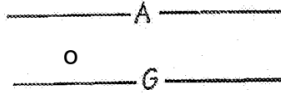


Figura 4:

SNP ———— [A/G/T/C] ————

Hay cuatro posibles resultados por alelo para este SNP

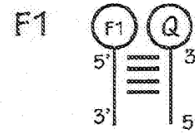


Los cebadores implicados en esta reacción son los siguientes:

Cebador específico de alelo 1



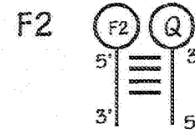
Fluor/desactivador correspondiente



Cebador específico de alelo 2



Fluor/desactivador correspondiente

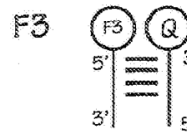


Cebador común 1 5' ————— 3'

Cebador específico de alelo 3



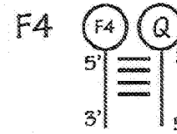
Fluor/desactivador correspondiente



Cebador específico de alelo 4



Fluor/desactivador correspondiente

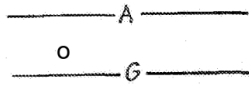


Cebador común 2 5' ————— 3'

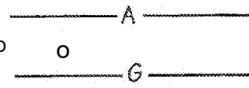
Figura 5



Hay dos posibles resultados por alelo para este SNP



Hay dos posibles resultados por alelo para este SNP

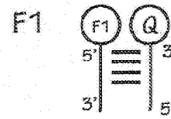


Los cebadores implicados en esta reacción son los siguientes:

Cebador específico de alelo 1



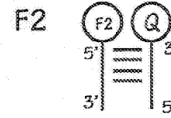
Fluor/desactivador correspondiente



Cebador específico de alelo 2



Fluor/desactivador correspondiente

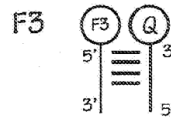


Cebador común 1 5' ————— 3'

Cebador específico de alelo 3



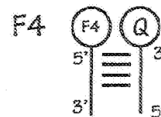
Fluor/desactivador correspondiente



Cebador específico de alelo 4



Fluor/desactivador correspondiente



Cebador común 2 5' ————— 3'