

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 899**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6818 (2008.01)

C12Q 1/689 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2014** **PCT/US2014/066189**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015** **WO15077242**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2014** **E 14864352 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020** **EP 3071953**

54 Título: **Ensayo de detección de diana multiplex**

30 Prioridad:

19.11.2013 US 201361906267 P

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

25.03.2021

73 Titular/es:

BRANDEIS UNIVERSITY (100.0%)

415 South Street

Waltham, MA 02453-2728, US

72 Inventor/es:

WANGH, LAWRENCE J.;

PIERCE, KENNETH E. y

RICE, JOHN E.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 813 899 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

Ensayo de detección de diana multiplex

5 Campo

En el presente documento se proporcionan reactivos y kits para el análisis de secuencias diana de ácido nucleico en un ensayo multi sonda, en tubo único, y métodos de uso de los mismos. En realizaciones particulares, se proporcionan ensayos multiplex para la detección de secuencias diana del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (por ejemplo, *katG*, *rpoB*, promotor *inhA*, *pncA*, etc.).

Antecedentes

La detección homogénea de secuencias de ácido nucleico es bien conocida. La detección puede incluir un colorante, por ejemplo, verde SYBR que emite fluorescencia en presencia del producto de reacción de amplificación de doble cadena o una sonda de hibridación de oligonucleótidos marcada. Para las sondas de hibridación, "detección homogénea" significa detección que no requiere separación de sondas unidas (hibridadas con diana) de sondas no unidas. Entre las sondas adecuadas para la detección homogénea están las sondas doblemente marcadas (por ejemplo, sondas de cadena sencilla que comprenden un resto de marcaje (por ejemplo, fluoróforo y/o amortiguador) en ambos extremos 5' y 3'), comprendidas de oligonucleótidos de cadena sencilla con un fluoróforo covalentemente unido a uno extremo y amortiguador (*quencher*) covalentemente unido al otro extremo (por ejemplo, la sonda amortiguada o sonda de autoamortiguación) cuyo espectro de absorción básicamente solapa el espectro de emisión del fluoróforo para la amortiguación (*quenching*) por FRET cuando la sonda no está unida a una diana (sondas de 5' exonucleasa descritas en, por ejemplo, Livak et al. (1995) *PCR Methods Appl.* 4:357-362;), sondas horquilla marcadas en un extremo con un fluoróforo y en el otro extremo con un amortiguador (sondas de baliza molecular descritas en, por ejemplo, Tyagi et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:303-308). A una temperatura apropiada una sonda horquilla tiene una estructura tallo/bucle cuando no está unida a una diana y en esta estructura el fluoróforo y el amortiguador interactúan tan cerca que se acoplan en amortiguación por contacto en lugar de amortiguación por FRET. Las sondas de doble cadena también se pueden usar en reacciones homogéneas. Estas sondas tienen un fluoróforo covalentemente ligado a una cadena y un amortiguador covalentemente ligado al extremo complementario de la otra cadena (las sondas yin-yang descritas, por ejemplo, Li et al. (2002) *Nucl. Acids Res.* 30, N.º 2 e5), además sondas lineales que tienen un fluoróforo que absorbe la emisión de un fluoróforo y vuelve a emitir a una longitud de onda mayor (las sondas descritas en, por ejemplo, la solicitud de patente publicada de los Estados Unidos US2002/0110450;), y pares de sondas lineales, una marcada con un fluoróforo donante y una marcada con un fluoróforo aceptor que hibridan una cerca de la otra en una cadena diana de manera que sus marcadores interactúan por FRET (pares de sondas de FRET descritos en, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N.º 6.140.054). Los métodos de detección incluyen métodos para la detección de sondas unidas a secuencias de ácido nucleico de cadena sencilla (incluyendo secuencias diana variantes), dianas de doble cadena incluyendo heteroduplexes comprendidos de cadenas complementarias imperfectas, o ambas.

Las secuencias diana de ácido nucleico adecuadas para sondear se pueden obtener directamente en algunos casos por aislamiento y purificación de ácido nucleico en una muestra. En otros casos se requiere amplificación de ácido nucleico. Los métodos de amplificación para su uso con detección homogénea incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), incluyendo PCR simétrica, PCR asimétrica y LATE-PCR, cualquiera de las cuales se puede combinar con transcripción inversa para la amplificación de secuencias de ARN, NASBA, SDA, y amplificación por círculo rodante. Los métodos de detección por amplificación pueden depender de la fluorescencia debido a la hibridación de la sonda, o pueden depender de la digestión de las sondas hibridadas durante la amplificación, por ejemplo, el método de detección por amplificación de la 5' nucleasa. Si una muestra contiene o se amplifica para contener, diana de doble cadena, por ejemplo, el producto de amplificación de una reacción de PCR simétrica, pero se desea diana de cadena sencilla, la separación de cadenas más y menos se puede conseguir por métodos conocidos, por ejemplo, marcando un cebador con biotina y separando las cadenas producto que contienen biotina de las otras cadenas por captura sobre una superficie que contiene avidina, la cual luego se lava.

Ciertas sondas fluorescentes útiles para la detección homogénea contienen una cadena marcada con fluoróforo que emite una señal detectable cuando hibrida con su secuencia diana en una muestra. Por ejemplo, una sonda de baliza molecular es de cadena sencilla y emite una señal fluorescente detectable tras la hibridación. Una sonda ResonSense® también es de cadena sencilla y da señal solamente cuando hibrida siempre y cuando la muestra contenga un colorante, generalmente un colorante SYBR, el cual estimula las sondas hibridadas por FRET cuando se estimula el colorante. Las sondas Yin-yang son sondas de doble cadena amortiguadas que incluyen una cadena marcada con fluoróforo que emite una señal detectable cuando hibrida con su diana. Los pares de sondas de FRET, por otro lado, son pares de sondas que emiten una señal fluorescente detectable cuando ambas sondas del par hibridan con sus secuencias diana. Algunos ensayos de amplificación, particularmente el ensayo con 5' nucleasa, incluyen generación de señal causada por corte de sonda para generar fragmentos de sonda fluorescentes en lugar de simplemente hibridación de sonda.

Ciertas sondas que generan una señal tras la hibridación se pueden construir para ser "específica a alelo", es decir,

para hibridar solamente con secuencias diana perfectamente complementarias, o para ser tolerantes a emparejamiento incorrecto, es decir, para hibridar con secuencias diana que o bien son perfectamente complementarias a la secuencia sonda o, para hibridar a una temperatura en cierto modo inferior con secuencias diana que generalmente son complementarias pero contienen uno o mas emparejamientos incorrectos. Las sondas de baliza molecular específicas a alelo tienen secuencias sonda relativamente cortas, generalmente bucles de cadena sencilla de no más de 25 nucleótidos de largo con tallos de horquilla de 4-6 nucleótidos de largo, y son útiles para detectar, por ejemplo, polimorfismos de nucleótido único. Marras et al. (1999) *Genetic Analysis Biomolecular Engineering* 14: 151-156 desvela un ensayo de PCR simétrica a tiempo real que incluye en la mezcla de reacción cuatro balizas moleculares que tienen secuencias de sonda de 16 nucleótidos de largo y tallos de 5-nucleótidos, en el que cada sonda es de un color diferente, es decir, incluye un fluoróforo que es distinguible de manera detectable por su longitud de onda de emisión, y una secuencia sonda que difiere de las otras por un único nucleótido. La muestra se analiza después de cada ciclo de PCR para detectar qué color surge y de ese modo para identificar cuál de las cuatro posibles secuencias diana perfectamente complementarias a una de las sondas está presente en una muestra. Las sondas de baliza molecular tolerantes a emparejamiento incorrecto tienen secuencias sonda más largas, generalmente bucles de cadena sencilla de hasta 50 o incluso 60 nucleótidos con tallos de horquilla mantenidos a 4-7 nucleótidos. Tyagi et al. patente europea N.º 1230387 desvela una amplificación por PCR simétrica y ensayo de detección homogénea usando un conjunto de cuatro sondas de baliza molecular tolerantes a emparejamiento incorrecto coloreadas de manera diferente que tienen diferentes secuencias sonda de 40-45 nucleótidos de largo y tallos de 5-7 nucleótidos de largo, para hibridar de manera competitiva con, y de ese modo interrogar, una secuencia hipervariable de 42 nucleótidos de largo de los genes del ARNr 16S micobacteriano para determinar cuál de las ocho especies micobacterianas está presente en una muestra. La muestra se analiza determinando una relación de las intensidades de fluoróforo a una o más temperaturas para identificar la especie que está presente. El-Hajj et al (2009) *J. Clin. Microbiology* 47:1190-1198 desvela una ampliación por LATE-PCR y ensayo de detección homogénea usando de manera similar cuatro sondas de baliza molecular tolerantes a emparejamiento incorrecto coloreadas de manera diferente que tienen diferentes secuencias sonda de 36-39 nucleótidos de largo y tallos de 5 nucleótidos de largo para hibridar de manera competitiva con, y de ese modo interrogar, una secuencia hipervariable de 39 nucleótidos de largo de los genes de ARNr 16S micobacteriano para determinar cuál de las veintisiete especies micobacterianas está presente en una muestra. Cada una de las cuatro sondas es una "sonda consenso", es decir, tiene un bucle de cadena sencilla complementario a múltiples especies pero perfectamente complementario a ninguna de ellas. El ADN genómico de algunas 27 especies diferentes se amplificaron por separado, la Tm de cada sonda se determinó mediante análisis de fusión después de la amplificación, y se tabularon los datos. Para analizar una muestra que contenía una especie desconocida, la muestra se amplificó y analizó como anteriormente. Las Tm de todas las cuatro sondas se compararon a los resultados tabulados para identificar las especies presentes en la muestra.

Las sondas múltiples, tanto tolerantes a emparejamiento incorrecto como específicas a alelo, se han usado para interrogar múltiples secuencias diana. El-Hajj et al (2001) *J. Clin. Microbiology* 39:4131-4137 desvela la realización de un único ensayo de PCR simétrica, multiplex, a tiempo real, que contiene cinco balizas moleculares específicas a alelo, coloreadas de manera diferente, tres complementarias a una cadena amplicón y dos complementarias a la otra cadena amplicón, las cuales juntas abarcan una región de 81 nucleótidos de largo de la región central del gen *rpoB* de *M. tuberculosis* de manera solapada. Se obtuvieron las intensidades de fluorescencia de sonda, y el fracaso de cualquiera de las sondas para hibridar y producir señal se tomó como un indicio de resistencia a fármaco. Wittwer et al. patente de los Estados Unidos N.º 6.140.054 desvela un ensayo de PCR simétrica multiplex para la detección de emparejamientos incorrectos de par de bases sencilla y doble en dos secuencias (sitios C282Y y H63D) del gen HFE humano usando un par de cebadores para cada sitio, un par de sondas de FRET para cada sitio, y ciclación térmica rápida. Cada par de sondas incluye una sonda donante de fluoresceína tolerante a emparejamiento incorrecto de 20-30 nucleótidos de longitud, colocada para hibridar con sitios diana de posibles variaciones, y una sonda aceptora Cy5 de 35-45 nucleótidos de largo, denominada la sonda "ancla", debido a que permanece hibridada cuando su sonda de fluoresceína pareja se funde fuera de la secuencia diana a una temperatura de fusión dependiente de su grado de complementariedad.

El documento WO-2012/064978 proporciona reacciones multiplex, en tubo único que pueden identificar simultáneamente y distinguir múltiples especies de micobacteria diferentes y perfiles de resistencia a fármacos en muestras complejas usando ensayos y equipo de detección rápidos y eficaces.

Ensayos en tubo único útiles que proporcionan caracterización detallada de secuencias diana múltiples usando un único indicador de color reduciría el coste y la complejidad del análisis.

Sumario

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. En el presente documento se proporcionan reactivos y kits para el análisis de secuencias diana de ácido nucleico en un ensayo multi sonda, en tubo único, y métodos de uso de los mismos. En realizaciones particulares, se proporcionan ensayos multiplex para la detección de secuencias diana del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (por ejemplo, *katG*, *rpoB*, promotor *inhA*, *pncA*, etc.).

En realizaciones particulares, se proporciona un ensayo en tubo único, de un solo color, multiplex (por ejemplo, tetraplex) para la detección de secuencias diana del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (por ejemplo, *katG*, *rpoB*,

promotor *inhA*, etc.), por ejemplo, junto con una secuencia diana del 1.^{er} control interno (amplificable). Los múltiples productos de cadena sencilla (por ejemplo, cuatro) de dicho multiplex (por ejemplo, tetraplex) se detectaron usando conjuntos de sondas marcadas con un fluoróforo en un color. Los componentes de reacción también pueden incluir un segundo control (no amplificable), también marcado en el mismo color (o marcado en un color diferente). En el presente documento se proporciona el uso de tales reactivos y métodos con otros ensayos de detección y caracterización (por ejemplo, detección del gen *pncA* micobacteriano con un color adicional).

En otras realizaciones, en el presente documento se proporcionan ensayos multiplex, multicolor, para la detección y/o caracterización de, por ejemplo, el gen *pncA* micobacteriano. En algunas realizaciones, estos ensayos multicolor utilizan sondas múltiples, marcadas con un solo color, que se unen a dos o más dianas diferentes (por ejemplo, por ejemplo, diferentes amplicones diana) durante distintos intervalos de temperaturas. Además, en algunas de tales realizaciones, una única diana se une por sondas marcadas con múltiples diferentes marcadores de color.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporciona un método de ensayo homogéneo para analizar múltiples secuencias diana de ácido nucleico de cadena sencilla en una muestra, que comprende: (a) proporcionar: (i) una muestra que contiene múltiples secuencias diana de ácido nucleico en forma de cadena sencilla, y (ii) para cada secuencia diana de ácido nucleico al menos un conjunto distinguible de manera detectable de dos sondas de hibridación que interactúan, cada una de las cuales se hibrida con al menos una diana, comprendiendo dichas sondas de hibridación que interactúan: (A) una sonda amortiguadora marcada con un amortiguador no fluorescente, y (B) una sonda señalizadora que tras la hibridación con al menos una secuencia diana en la muestra en ausencia de la sonda amortiguadora emite una señal por encima de la señal ruido, en el que, si ambas sondas están hibridadas con al menos una secuencia diana, el amortiguador no fluorescente de la sonda amortiguadora amortigua la señal de la sonda señalizadora por amortiguación por contacto; y (b) analizar la hibridación de las sondas señalizadora y amortiguación con la al menos una secuencia diana en función de la temperatura, incluyendo el análisis de un efecto sobre cada sonda señalizadora debido a su sonda amortiguadora asociada, haciendo posible detectar los incrementos dependientes de temperatura, las disminuciones, o ambos o ninguno, los cambios en la señal que proviene del fluoróforo de la sonda señalizadora en ausencia de la amortiguación por contacto (Véase, por ejemplo, publicación de patente de los Estados Unidos N.º 2012/0282611;).

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos para analizar múltiples secuencias diana de ácido nucleico de cadena sencilla en una muestra, que comprenden: (a) poner en contacto una muestra que comprende secuencias diana de ácido nucleico de cadena sencilla (por ejemplo, dos o más) con reactivos de detección, comprendiendo dichos reactivos de detección un conjunto de pares de sondas para cada una de las secuencias diana, comprendiendo cada uno de dicho par de sondas: (i) una sonda amortiguadora marcada con un amortiguador no fluorescente, y (ii) una sonda señalizadora marcada con un fluoróforo, en los que la señal ruido es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora no se une a la secuencia diana, en los que la señal ruido anterior es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora se une a la secuencia diana pero la sonda amortiguadora no se une a la secuencia diana, en los que la señal de la sonda señalizadora se amortigua por el amortiguador no fluorescente cuando tanto la sonda señalizadora como la sonda amortiguadora se unen a la secuencia diana; en los que las sondas señalizadoras de cada uno de los conjuntos de sondas están marcados con el mismo fluoróforo; y (b) analizar la señal de las sondas señalizadoras en función de la temperatura. En ciertas realizaciones, el análisis comprende determinar un efecto sobre cada sonda señalizadora debido a su sonda amortiguadora asociada, haciendo posible detectar los incrementos dependientes de temperatura, las disminuciones, o ambos o ninguno, los cambios en la señal que proviene del fluoróforo de la sonda señalizadora en ausencia de la amortiguación por contacto (Véase, por ejemplo, publicación de patente de los Estados Unidos N.º 2012/0282611;).

En algunas realizaciones, las secuencias diana de ácido nucleico de cadena sencilla se producen mediante amplificación de un ácido nucleico muestra (por ejemplo, de una muestra biológica, clínica, o ambiental) usando reactivos de amplificación. En algunas realizaciones, el ácido nucleico muestra comprende ácido nucleico genómico del complejo *M. tuberculosis* (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, etc.). En algunas realizaciones, el ácido nucleico muestra se obtiene de una muestra biológica, clínica, o ambiental que contiene bacteria del complejo *M. tuberculosis* (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, etc.). En algunas realizaciones, el ácido nucleico muestra comprende uno o más (por ejemplo, todos) de los genes *katG*, *rpoB*, promotor *inhA* y/o *pncA*. En algunas realizaciones, el ácido nucleico muestra comprende uno o más de los genes *katG*, *rpoB*, promotor *inhA*, *pncA*, *mabA*, *embB*, *rpsL*, *rss*, *gyrA*, *gyrB*, *eis*, *tlyA*, ADNr 16s.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporciona un kit o una mezcla de reactivos para analizar secuencias diana de ácido nucleico de cadena sencilla que comprenden: (a) reactivos de amplificación que comprenden pares de cebadores específicos para cada una de las secuencias diana, comprendiendo dichos pares de cebadores un cebador en exceso y un cebador limitante; y (b) reactivos de detección que comprenden conjuntos de pares de sondas para cada una de las secuencias diana, comprendiendo cada uno de dicho par de sondas: (i) una sonda amortiguadora marcada con un amortiguador no fluorescente, y (ii) una sonda señalizadora marcada con un fluoróforo, en los que la señal ruido es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora no se une a la secuencia diana, en los que la señal ruido anterior es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora se une a la secuencia diana pero la sonda amortiguadora no se une a la secuencia diana, en los que la señal de la sonda señalizadora se amortigua por el amortiguador no fluorescente cuando tanto la sonda señalizadora

como la sonda amortiguadora se unen a secuencias adyacentes en la secuencia diana, en los que las sondas señalizadoras de cada uno de los conjuntos de sondas están marcadas con el mismo fluoróforo, y en los que los cebadores específicos a diana tienen temperaturas de fusión con las secuencias diana por encima de las temperaturas de fusión de la sonda señalizadora y la sonda de amortiguación para la respectiva secuencia diana.

En algunas realizaciones, las secuencias diana son secuencias de ácido nucleico del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, etc.). En algunas realizaciones, una secuencia diana comprende todo o una parte de un gen *katG*, *rpoB*, promotor *inhA* o *pncA*. En algunas realizaciones, una secuencia diana comprende todo o una parte de los genes *katG*, *rpoB*, promotor *inhA*, *pncA*, *mabA*, *embB*, *rpsL*, *rss*, *gyrA*, *gyrB*, *eis*, *tlyA*, ADNr 16s. En algunas realizaciones, se proporciona un método o kit para la detección/caracterización de 2 o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) secuencias diana (por ejemplo, seleccionadas de partes de los genes anteriormente mencionados).

En algunas realizaciones, cada una de las sondas señalizadoras hibridan con su respectiva secuencia diana a distintos intervalos de temperatura (por ejemplo, la fusión de la sonda de Tm inferior de la diana comienza a aproximadamente una primera temperatura (por ejemplo, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C, o temperaturas entre las mismas) y la fusión de la sonda de Tm superior de la diana se completa a aproximadamente una segunda temperatura (por ejemplo, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C, 90 °C, o temperaturas entre las mismas)). En algunas realizaciones, los distintos intervalos de temperatura de los diversos conjuntos de sondas no son solapantes. En algunas realizaciones, dos o más de los distintos intervalos de temperatura de los diversos conjuntos de sondas solapan parcialmente. En algunas realizaciones, dos o más de los distintos intervalos de temperatura de los diversos conjuntos de sondas solapan. En algunas realizaciones, la señal pico de las sondas señalizadoras de dos conjuntos de sondas se separan por menos de 40 °C (por ejemplo, <35 °C, <20 °C, <25 °C, <20 °C, <15 °C, <10 °C, <5 °C). En algunas realizaciones, la señal pico de las sondas señalizadoras de dos conjuntos de sondas se separan por más de 5 °C (por ejemplo, >10 °C, >15 °C, >20 °C, >25 °C, >30 °C). En algunas realizaciones, la temperatura de fusión para la hibridación de la sonda señalizadora con la secuencia diana es mayor que la temperatura para la hibridación de la sonda amortiguadora con la secuencia diana (por ejemplo, en uno o más conjuntos de sondas, en todos los conjuntos de sondas). En algunas realizaciones, la temperatura de fusión para la hibridación de la sonda señalizadora con la secuencia diana es menor que la temperatura para la hibridación de la sonda amortiguadora con la secuencia diana (por ejemplo, en uno o más conjuntos de sondas, en todos los conjuntos de sondas). En algunas realizaciones, las sondas señalizadoras son sondas de amortiguación que comprenden un amortiguador no fluorescente que reduce la señal de un fluoróforo cuando la sonda señalizadora no se hibrida con una diana. En algunas realizaciones, las sondas de señalización son sondas doblemente marcadas (por ejemplo, 3' y 5' marcadas) comprendidas de un oligonucleótido de cadena sencilla comprendido de ADN que tiene un resto amortiguador no fluorescente que reduce la señal de un resto fluorescente cuando dicha sonda no se hibrida con una diana (por ejemplo, auto-amortiguación). En algunas realizaciones, las sondas señalizadoras son sondas de baliza molecular. En algunas realizaciones, las sondas señalizadoras comprenden una región de unión a diana y una región de no unión entre el amortiguador no fluorescente y el colorante fluorescente.

En algunas realizaciones, analizar la señal de las sondas señalizadoras en función de la temperatura comprende generar una curva de fusión o curva de alineamiento. En algunas realizaciones, analizar la señal de las sondas señalizadoras en función de la temperatura comprende hacer un seguimiento de la señal a múltiples distintas temperaturas. En algunas realizaciones, una curva de fusión, curva de alineamiento, o señal de temperatura única se compara con una curva conocida, curva control, o valor conocido o control. En algunas realizaciones, analizar la señal de las sondas señalizadoras detecta la presencia de las secuencias diana. En algunas realizaciones, analizar la señal de las sondas señalizadoras detecta la presencia de variaciones de secuencia (por ejemplo, mutaciones) dentro de las secuencias diana. En algunas realizaciones, los cambios específicos (por ejemplo, SNP) en la secuencia diana son identificables.

En algunas realizaciones, la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora de un primer conjunto de sondas tienen temperaturas de fusión para la hibridación con una primera secuencia diana en el intervalo de 10-75 °C (por ejemplo, 35-55 °C). En algunas realizaciones, la primera secuencia diana es una parte del gen del promotor *inhA* de *M. tuberculosis*. En algunas realizaciones, la sonda señalizadora del primer conjunto de sondas tiene al menos 70 % de identidad (por ejemplo, >70 %, >75 %, >80 %, >85 %, >90 %, 95 %, >98 %, >99 %) con la SEQ ID NO: 19 y la sonda amortiguadora del primer conjunto de sondas tiene al menos 70 % de identidad (por ejemplo, >70 %, >75 %, >80 %, >85 %, >90 %, 95 %, >98 %, >99 %) con la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora de un segundo conjunto de sondas tienen temperaturas de fusión para la hibridación con una segunda secuencia diana en el intervalo de 10-75 °C (por ejemplo, 45-60 °C). En algunas realizaciones, la segunda secuencia diana es una parte del gen *katG* de *M. tuberculosis*. En algunas realizaciones, la sonda señalizadora del segundo conjunto de sondas tiene al menos 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 17 y la sonda amortiguadora del segundo conjunto de sondas tiene al menos 70 % de identidad (por ejemplo, >70 %, >75 %, >80 %, >85 %, >90 %, 95 %, >98 %, >99 %) con la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora de un tercer conjunto de sondas tienen temperaturas de fusión para la hibridación con una tercera secuencia diana en el intervalo de 10-75 °C (por ejemplo, 55-75 °C). En algunas realizaciones, la tercera secuencia diana es una parte del gen *rpoB* de *M. tuberculosis*. En algunas realizaciones, la sonda señalizadora del tercer conjunto de sondas tiene al

menos 70 % de identidad con una de las SEQ ID NO: 12, 14 o 15 y la sonda amortiguadora del tercer conjunto de sondas tiene al menos 70 % de identidad (por ejemplo, >70 %, >75 %, >80 %, >85 %, >90 %, 95 %, >98 %, >99 %) con una de las SEQ ID NO: 11, 13 o 16. En algunas realizaciones las sondas señalizadoras de *rpoB* 4 y/o 5 y/o la sonda amortiguadora 1 se pueden sustituir con las sondas señalizadoras 4a, 5a, o la sonda amortiguadora 1a que tienen secuencias ligeramente diferentes para lograr la mayor discriminación de alelo en codones específicos. En algunas realizaciones, la cuarta secuencia diana es una parte del gen *pncA* de *M. tuberculosis*. En algunas realizaciones, la sonda señalizadora del cuarto conjunto de sondas tiene al menos 70 % de identidad con una de las SEQ ID NO: 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 42, 44, 46, 48, o 50 y la sonda amortiguadora del tercer conjunto de sondas tiene al menos 70 % de identidad (por ejemplo, >70 %, >75 %, >80 %, >85 %, >90 %, 95 %, >98 %, >99 %) con una de las SEQ ID NO: 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 43, 45, 47, 49, 50, o 51. En algunas realizaciones, los múltiples conjuntos de sondas se usan en la identificación/caracterización del gen *pncA* (por ejemplo, hibridación con la misma diana de cadena sencilla) en un ensayo único (por ejemplo, un solo color, tubo único).

En algunas realizaciones, dos o más conjuntos de sondas se proporcionan para la detección/caracterización de las diferentes partes de una única secuencia diana de cadena sencilla.

En algunas realizaciones, los reactivos de detección además comprenden una o más secuencias control, sondas, etc. En algunas realizaciones, los reactivos de detección además comprenden una primera secuencia de control interno de doble cadena o cadena sencilla y una primera sonda señal control, en los que la sonda señal para la primera secuencia control se marca con el mismo fluoróforo que las sondas señalizadoras para al menos una de las secuencias diana. En algunas realizaciones, los reactivos de detección además comprenden una primera secuencia de control interno de cadena sencilla y un primer conjunto de sondas control que comprende una correspondiente sonda amortiguadora y sonda señal, en los que la sonda señal para la primera secuencia control se marca con el mismo fluoróforo que las sondas señalizadoras para al menos una de las secuencias diana. En algunas realizaciones, la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora de un primer conjunto de sondas control tienen temperaturas de fusión de menos de 35 °C (por ejemplo, <30 °C, 25 °C, 20 °C, 15 °C) para la hibridación con una secuencia de control interno. En algunas realizaciones, la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora de un primer conjunto de sondas control tienen temperaturas de fusión para la hibridación con una secuencia de control interno en el intervalo de 5-15 °C, 10-20 °C, 15-25 °C, 20-30 °C, 25-35 °C, etc. En algunas realizaciones, la secuencia de control interno es una parte de un plásmido de control interno (por ejemplo, proporcionado en una mezcla de reacción). En algunas realizaciones, la sonda señalizadora del primer conjunto de sondas control tiene al menos 70 % de identidad o complementariedad (por ejemplo, >70 %, >75 %, >80 %, >85 %, >90 %, 95 %, >98 %, >99 %) con la SEQ ID NO: 52 y la sonda amortiguadora del primer conjunto de sondas control tiene al menos 70 % de identidad o complementariedad (por ejemplo, >70 %, >75 %, >80 %, >85 %, >90 %, 95 %, >98 %, >99 %) con la SEQ ID NO: 53.

En algunas realizaciones, los reactivos de detección además comprenden una segunda secuencia de control interno de cadena sencilla y un segundo conjunto de sondas control que comprende la correspondiente sonda amortiguadora y sonda señal, en los que la sonda señal para la segunda secuencia control se marca con el mismo fluoróforo que las sondas de señalización para al menos una de las secuencias diana. En algunas realizaciones la sonda amortiguadora se une covalentemente a la secuencia de control interno de manera que el amortiguador puede amortiguar el fluoróforo sobre la cadena sonda complementaria. En algunas realizaciones, la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora del segundo conjunto de sondas control tienen temperaturas de fusión para la hibridación con la secuencia de control interno en el intervalo de 70-80 °C, 75-80 °C, 80-90 °C, etc. En algunas realizaciones, la sonda señalizadora del segundo conjunto de sondas control tiene al menos 70 % de identidad (por ejemplo, >70 %, >75 %, >80 %, >85 %, >90 %, 95 %, >98 %, >99 %) con la SEQ ID NO: 54 y la sonda amortiguadora del conjunto de sondas control tiene al menos 70 % de identidad (por ejemplo, >70 %, >75 %, >80 %, >85 %, >90 %, 95 %, >98 %, >99 %) con la SEQ ID NO: 55.

En algunas realizaciones, los reactivos de amplificación comprenden pares de cebadores (por ejemplo, cebadores específicos a diana o tolerantes a emparejamiento incorrecto diseñados para hibridar con una región específica de un gen). En algunas realizaciones, los pares de cebadores comprenden un cebador en exceso y un cebador limitante (patente de los Estados Unidos N.º 7.198.897;). En algunas realizaciones, los cebadores específicos a diana tienen temperaturas de fusión con las secuencias diana por encima de las temperaturas de fusión de la sonda señalizadora y la sonda de amortiguación para la respectiva secuencia diana. En algunas realizaciones, la amplificación es amplificación no simétrica para producir secuencias diana de ácido nucleico de cadena sencilla. En algunas realizaciones, la amplificación es mediante LATE-PCR. En algunas realizaciones, un primer par de cebadores específico a diana comprende un cebador en exceso con al menos 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 6 y un cebador limitante con al menos 70 % de identidad (por ejemplo, >70 %, >75 %, >80 %, >85 %, >90 %, 95 %, >98 %, >99 %) con la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, un segundo par de cebadores específico a diana comprende un cebador en exceso con al menos 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 4 y un cebador limitante con al menos 70 % de identidad (por ejemplo, >70 %, >75 %, >80 %, >85 %, >90 %, 95 %, >98 %, >99 %) con la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, un tercer par de cebadores específico a diana comprende un cebador en exceso con al menos 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 2 y un cebador limitante con al menos 70 % de identidad (por ejemplo, >70 %, >75 %, >80 %, >85 %, >90 %, 95 %, >98 %, >99 %) con la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, un cuarto par de cebadores específico a diana comprende un cebador en exceso con al menos 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 7 y un cebador limitante con al menos 70 % de identidad (por ejemplo, >70 %, >75 %, >80 %, >85 %, >90 %, 95 %, >98 %, >99 %) con la SEQ ID NO: 8.

>98 %, >99%) con la SEQ ID NO: 8.

En algunas realizaciones, los reactivos de amplificación comprenden un reactivo oligonucleotídico para: suprimir el cebado incorrecto, incrementar la selectividad de la polimerasa frente a emparejamientos incorrectos 3' terminales, incrementar la selectividad de la polimerasa frente a los extremos 3' ricos en AT, reducir la dispersión entre los replicados, suprimir la actividad de la polimerasa 5' exonucleasa, y/o inhibir la actividad de la polimerasa (tales reactivos pueden ser denominados reactivos Primesafe, o Primesafe I, o Primesafe II; Véanse, por ejemplo, Publicación de los EE.UU. N.º 2012/0088275; Publicación de los EE.UU. N.º 2009/0226973; Publicación de los EE.UU. N.º 2006/0177842;). En algunas realizaciones, el reactivo oligonucleotídico comprende un par de oligonucleótidos complementarios con una temperatura de fusión de hibridación de aproximadamente 70 °C, estando cada uno de dichos oligonucleótidos marcados en el extremo 3' y 5'. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos complementarios están marcados en el extremo con grupos dabcil. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos complementarios tienen más de 70 % de identidad (por ejemplo, >70 %, >75 %, >80 %, >85 %, >90 %, 95 %, >98 %, >99% con las SEQ ID NO: 56 y 57.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan kits y/o mezclas de reactivos para analizar secuencias diana de ácido nucleico de cadena sencilla. En algunas realizaciones, dichos kits y/o mezclas de reactivos encuentran uso en los métodos de identificación/detección/caracterización de secuencias diana descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, dichos kits y/o mezclas de reactivos comprenden cebadores, sondas, y/o secuencias control descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, los kits y/o mezclas de reactivos comprenden además tampones adecuados, sal, enzimas, etc.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos para analizar cuatro o más secuencias diana de ácido nucleico en una muestra, que comprenden: (a) poner en contacto una mezcla que comprende cuatro o más secuencias diana de ácido nucleico con reactivos de amplificación, en los que los reactivos de amplificación comprenden conjuntos de pares de cebadores específicos para cada una de las cuatro o más secuencias diana de ácido nucleico; (b) amplificar las secuencias diana de ácido nucleico bajo condiciones que producen un amplicón de cadena sencilla de cada una de las secuencias diana; (c) poner en contacto la muestra con reactivos de detección, comprendiendo dichos reactivos de detección conjuntos de pares de sondas para cada una de las secuencias diana, comprendiendo cada uno de dichos pares de sondas: (i) una sonda amortiguadora marcada con un amortiguador no fluorescente, y (ii) una sonda de señalización marcada con un colorante fluorescente, en los que la señal ruido es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora no se une a la secuencia diana, en los que la señal ruido anterior es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora se une a la secuencia diana pero la sonda amortiguadora no se une a la secuencia diana, en los que la señal de la sonda señalizadora se amortigua por el amortiguador no fluorescente cuando tanto la sonda señalizadora como la sonda amortiguadora se unen a la secuencia diana, en los que las sondas señalizadoras de cada uno de los conjuntos de sondas están marcadas con los mismos colorantes fluorescentes; y (d) analizar la señal de las sondas de señalización en función de la temperatura. En algunas realizaciones la sonda señalizadora es una sonda de autoamortiguación que tiene un fluoróforo y un amortiguador no fluorescente.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan kits que comprenden: (a) un ácido nucleico de control interno, (b) reactivos de detección, comprendiendo dichos reactivos de detección: (i) conjuntos de sondas específicos para cada una de las secuencias diana y el ácido nucleico de control interno, comprendiendo cada uno de dichos conjuntos de sondas: (A) una sonda amortiguadora marcada con un amortiguador no fluorescente, y (B) una sonda señalizadora marcada con un colorante fluorescente; en los que la señal ruido es emitida desde las sondas señalizadoras cuando la sonda señalizadora no se une a la secuencia diana, en los que la señal ruido anterior es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora se une a la secuencia diana pero la sonda amortiguadora no se une a la secuencia diana, en los que la señal de la sonda señalizadora se amortigua por el amortiguador no fluorescente cuando tanto la sonda señalizadora como la sonda amortiguadora se unen a la secuencia diana, en los que las sondas señalizadoras de cada uno de los conjuntos de sondas para las secuencias diana se marcan con los mismos colorantes fluorescentes, y en los que la sonda amortiguadora y la sonda señalizadora específica al ácido nucleico de control interno tienen temperaturas de fusión de menos de 35 °C con una parte de cadena sencilla del ácido nucleico de control interno; y (c) reactivos de amplificación, comprendiendo dichos reactivos de amplificación: pares de cebadores específicos a cada una de las secuencias diana y el ácido nucleico de control interno, comprendiendo dichos pares de cebadores un cebador en exceso y un cebador limitante, y en los que los cebadores específicos a diana tienen temperaturas de fusión con las secuencias diana por encima de las temperaturas de fusión de la sonda señalizadora y la sonda de amortiguación para la respectiva secuencia diana o ácido nucleico de control interno. En algunas realizaciones la sonda señalizadora es una sonda de autoamortiguación que tiene un fluoróforo y un amortiguador no fluorescente.

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para analizar dos o más secuencias diana de ácido nucleico en una muestra, que comprenden: (a) poner en contacto la muestra con el anterior ácido nucleico de control interno, los reactivos de detección y los reactivos de amplificación; (b) amplificar una parte del ácido nucleico de control interno y las partes de cada una de las dos o más secuencias diana de ácido nucleico con los reactivos de amplificación para producir amplicones de cadena sencilla; y (c) detectar la señal de las sondas señalizadoras en un intervalo de temperaturas.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan kits o mezclas de reactivos para la detección y/o caracterización de micobacterias en una muestra que comprenden: (a) pares de cebadores específicos a las secuencias diana dentro de los genes promotor *inhA*, *katG*, y *rpoB*, comprendiendo dichos pares de cebadores un cebador en exceso y un cebador limitante; y (b) conjunto de sondas para las secuencias diana dentro de los genes promotor *inhA*, *katG*, y *rpoB*, comprendiendo cada uno de dichos conjuntos de sondas: (i) una sonda amortiguadora marcada con un amortiguador no fluorescente, y (ii) una sonda señalizadora de autoamortiguación que tiene un fluoróforo más un amortiguador no fluorescente, en los que la señal ruido es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora no se une a la secuencia diana, en los que la señal ruido anterior es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora se une a la secuencia diana pero la sonda amortiguadora no se une a la secuencia diana, en los que la señal de la sonda señalizadora se amortigua por el amortiguador no fluorescente cuando tanto la sonda señalizadora como la sonda amortiguadora se unen a la secuencia diana, en los que las sondas señalizadoras de cada uno de los conjuntos de sondas están marcadas con los mismos colorantes fluorescentes, y en los que los pares de cebadores tienen temperaturas de fusión con las secuencias diana por encima de las temperaturas de fusión de la sonda señalizadora y la sonda de amortiguación para la respectiva secuencia diana. En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos para la detección y/o caracterización de micobacterias en una muestra que comprende: (a) poner en contacto la muestra con el kit o la mezcla de reactivos anterior; (b) amplificar las secuencias diana con los pares de cebadores para producir amplicones de cadena sencilla; y (c) detectar la señal de las sondas señalizadoras en un intervalo de temperaturas.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan kits o mezclas de reacción que comprenden: (a) un primer control interno, que comprende: (i) una primera secuencia control, (ii) pares de cebadores que comprenden cebadores en exceso y limitantes para la amplificación de una cadena sencilla de toda o una parte de la primera secuencia control para producir un primer amplicón control, (iii) una sonda amortiguadora marcada con un amortiguador no fluorescente y complementaria a una primera parte del primer amplicón control, y (iv) una sonda señalizadora marcada con un fluoróforo y complementaria a una segunda parte del primer amplicón control; y (b) un segundo control interno, que comprende: (i) una segunda secuencia control, (ii) una sonda amortiguadora marcada con un amortiguador no fluorescente y complementaria a una primera parte de la segunda secuencia control, y (iii) una sonda señalizadora de autoamortiguación que tiene un fluoróforo más un amortiguador no fluorescente y complementaria a una segunda parte de la segunda secuencia control; en los que la señal ruido es emitida desde las sondas señalizadoras cuando las sondas señalizadoras no se unen a la secuencia control, en los que la anterior señal ruido es emitida desde las sondas señalizadoras cuando las sondas señalizadoras se unen a la secuencia control pero las sondas amortiguadoras no se unen a la secuencia control, y en los que la señal de las sondas señalizadoras se amortigua por el amortiguador no fluorescente de la sonda amortiguadora cuando la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora se unen a la secuencia control. En algunas realizaciones, la sonda señalizadora del primer control interno y la sonda señalizadora del segundo control interno se marcan con el mismo colorante fluorescente. En algunas realizaciones, la T_m de las sondas señalizadora y amortiguadora del primer control interno y la T_m de las sondas señalizadora y amortiguadora del segundo control interno difieren en más de 30 °C. En algunas realizaciones, el segundo control interno es un control no amplificable y no requiere de cebadores de amplificación. En algunas realizaciones, la T_m de las sondas señalizadora y amortiguadora del primer control interno son al menos 30 °C (por ejemplo, >35 °C, >40 °C, >45 °C, >50 °C, >55 °C, >60 °C) menor que la T_m de las sondas señalizadora y amortiguadora del segundo control interno. En algunas realizaciones, la T_m de las sondas señalizadora y amortiguadora del segundo control interno son al menos 30 °C (por ejemplo, >35 °C, >40 °C, >45 °C, >50 °C, >55 °C, >60 °C) menor que la T_m de las sondas señalizadora y amortiguadora del primer control interno. En algunas realizaciones, un kit o una mezcla de reacción además comprenden: (c) un tercer control interno, que comprende: (i) una tercera secuencia control, (ii) una sonda amortiguadora marcada con un amortiguador no fluorescente y complementaria a una primera parte de la tercera secuencia control, y (iii) una sonda señalizadora marcada con un fluoróforo y complementaria a una segunda parte de la tercera secuencia control. En algunas realizaciones, un kit o una mezcla de reacción además comprenden: (iv) pares de cebadores que comprenden cebadores en exceso y limitantes para la amplificación de una cadena sencilla de toda o una parte de la tercera secuencia control para producir un tercer amplicón control. En algunas realizaciones la sonda señalizadora es una sonda de autoamortiguación que tiene un fluoróforo y un amortiguador no fluorescente.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos de calibración o control de un instrumento o reacción que comprenden: (a) proporcionar uno de los kits o mezclas de reacción precedentes en un recipiente único de reacción; (b) exponer el recipiente de reacción a las condiciones suficientes para permitir la amplificación de cadena sencilla; (c) analizar la señal de las sondas señalizadoras en función de la temperatura. En algunas realizaciones, las etapas (a)-(c) son simultáneas o en serie en múltiples recipientes de reacción.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan mezclas de reacción que comprenden: (a) un ácido nucleico diana; y (b) un conjunto de sondas de hibridación comprendido de tres o más conjuntos coloreados de pares de sondas comprendiendo cada par de sondas: (i) una sonda señalizadora marcada con un resto fluorescente y complementaria a una secuencia particular dentro de dicho ácido nucleico diana, y (ii) una sonda de amortiguación marcada con un resto amortiguador no fluorescente y complementaria a una secuencia de hibridación particular dentro de dicho ácido nucleico diana; en las que cada sonda señalizadora y su sonda de amortiguación adyacente comprende un par de sondas cuyas temperaturas de fusión son distintas de la temperatura de fusión de otros pares de sondas; y

en las que todos los pares de sondas cuyas sondas señalizadoras emiten fluorescencia en el mismo color de señalización, comprenden un conjunto coloreado de pares de sondas, y en las que: todos los pares de sondas dentro de un conjunto coloreado hibridan con secuencias dentro de dicho ácido nucleico diana, y en las que: todos los pares de sondas dentro de un conjunto coloreado no hibridan con una secuencia contigua dentro de dicho ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, cada sonda señalizadora tiene una temperatura de fusión para la secuencia diana que es distinta de las otras sondas señalizadoras de los tres o más conjuntos de sondas; en las que cada sonda de amortiguación tiene una temperatura de fusión para la secuencia diana que es distinta de las otras sondas de amortiguación de los tres o más conjuntos de sondas. En algunas realizaciones, las secuencias de hibridación para las sondas señalizadoras no están dispuestas linealmente dentro de dicho ácido nucleico diana de acuerdo con la magnitud ascendente o descendente de las temperaturas de fusión, y/o las secuencias de hibridación para las sondas de amortiguación no están dispuestas linealmente dentro de dicho ácido nucleico diana de acuerdo con la magnitud ascendente o descendente de las temperaturas de fusión.

En algunas realizaciones, una o más sondas señalizadoras del conjunto coloreado de sondas, emiten una señal ruido cuando no se unen a la secuencia diana, en las que la anterior señal ruido es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora de un par de sondas se une a la secuencia diana pero la sonda amortiguadora de un par de sondas no se une a la secuencia diana, en las que la señal de la sonda de señalización de un par de sondas se amortigua por el amortiguador no fluorescente de un par de sondas cuando tanto la sonda señalizadora como la sonda amortiguadora se unen a la secuencia diana. En algunas realizaciones, las sondas señalizadoras y las sondas de amortiguación son suficientemente complementarias a sus secuencias de ácido nucleico diana para hibridar bajo condiciones de ensayo como alguna temperatura.

En algunas realizaciones, para cada conjunto coloreado, la temperatura de fusión de la sonda señalizadora en cada par de sondas al ácido nucleico diana es mayor que la temperatura de fusión de la sonda de amortiguación en el mismo par de sondas a su secuencia diana.

En algunas realizaciones, las sondas señalizadoras son sondas de autoamortiguación que comprenden un amortiguador no fluorescente para reducir la señal del fluoróforo cuando la sonda señalizadora no se hibrida con una diana. En algunas realizaciones, las sondas señalizadoras son sondas de baliza molecular. En algunas realizaciones, las sondas señalizadoras comprenden una región de unión a diana y una región de no unión entre el amortiguador no fluorescente y el fluoróforo fluorescente.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es de cadena sencilla. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana comprende una secuencia de ácido nucleico de *Mycobacterium tuberculosis*. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana comprende una parte del gen *pncA*.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos de ensayo homogéneo para analizar al menos una secuencia diana de ácido nucleico de cadena sencilla en una muestra, que comprenden: (a) formar una mezcla de reacción de acuerdo con el párrafo precedente, en los que, para las sondas de cada conjunto de sondas, se emite una señal ruido desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora no se une a la secuencia diana, en los que la anterior señal ruido es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora se une a la secuencia diana pero la sonda amortiguadora del mismo par de sondas no se une a la secuencia diana, en los que la señal de la sonda señalizadora se amortigua por el amortiguador no fluorescente cuando tanto la sonda señalizadora como la sonda amortiguadora de un par de sondas se unen a la secuencia diana; (b) detectar una señal fluorescente de dicho resto fluorescente de dichas sondas señalizadoras a un intervalo de temperaturas; y (c) analizar la hibridación de dichos conjuntos de sondas con dicha al menos una secuencia diana en función de la temperatura.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan kits o mezclas de reacción que comprenden: (a) cebadores para la amplificación de un ácido nucleico diana desde un ácido nucleico muestra; y (b) un conjunto de sondas de hibridación comprendido de tres o más conjuntos coloreados de pares de sondas, comprendiendo cada par de sondas: (i) una sonda señalizadora marcada con un resto fluorescente y complementaria a una secuencia de hibridación particular dentro de dicho ácido nucleico diana, y (ii) una sonda de amortiguación marcada con un resto amortiguador no fluorescente y complementaria a una secuencia de hibridación particular dentro de dicho ácido nucleico diana; en los que cada sonda señalizadora tiene una temperatura de fusión para la secuencia diana que es distinta de las otras sondas señalizadoras del mismo conjunto coloreado; en los que cada sonda de amortiguación tiene una temperatura de fusión para la secuencia diana que es distinta de las otras sondas de amortiguación del mismo conjunto coloreado; y en los que: (A) todos los pares de sondas cuyas sondas señalizadoras emiten fluorescencia en el mismo color de señalización, comprenden un conjunto coloreado de pares de sondas, y en los que: todos los pares de sondas dentro de un conjunto coloreado hibridan con secuencias dentro de dicho ácido nucleico diana, y en los que: (B) todos los pares de sondas dentro de un conjunto coloreado no hibridan con una secuencia contigua dentro de dicho ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, las secuencias de hibridación para las sondas señalizadoras no están dispuestas linealmente dentro de dicho ácido nucleico diana de acuerdo con la magnitud ascendente o descendente de las temperaturas de fusión, y/o las secuencias de hibridación para las sondas de amortiguación no están dispuestas linealmente dentro de dicho ácido nucleico diana de acuerdo con la magnitud ascendente o descendente de las temperaturas de fusión.

En algunas realizaciones, se emite una señal ruido desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora no se une a la secuencia diana, en las que la anterior señal ruido es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora se une a la secuencia diana pero la sonda amortiguadora del mismo par de sondas no se une a la secuencia diana, en las que la señal de la sonda señalizadora se amortigua por el amortiguador no fluorescente cuando tanto la sonda señalizadora como la sonda amortiguadora del mismo par de sondas se unen a la secuencia diana. En algunas realizaciones, las sondas señalizadoras y las sondas de amortiguación son suficientemente complementarias a sus particulares secuencias diana de ácido nucleico para permitir la hibridación bajo condiciones de ensayo. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es de cadena sencilla.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana comprende una secuencia de ácido nucleico de *Mycobacterium tuberculosis*. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana comprende una parte del gen *pncA*. En algunas realizaciones, para cada par de sondas, la temperatura de fusión de la sonda señalizadora al ácido nucleico diana es mayor que la temperatura de fusión de la sonda de amortiguación a la secuencia diana. En algunas realizaciones, las sondas señalizadoras son sondas de autoamortiguación que comprenden un amortiguador no fluorescente para reducir la señal del fluoróforo cuando la sonda señalizadora no se hibrida con una diana. En algunas realizaciones, las sondas señalizadoras son sondas de baliza molecular. En algunas realizaciones, las sondas señalizadoras comprenden una región de unión diana y una región de no unión entre el amortiguador no fluorescente y el fluoróforo.

En algunas realizaciones, los cebadores comprenden un cebador limitante y cebador en exceso que tienen las propiedades requeridas para la amplificación por PCR asimétrica. En algunas realizaciones, los cebadores comprenden un cebador limitante y cebador en exceso que tienen las propiedades requeridas para la amplificación por LATE-PCR. En algunas realizaciones, los cebadores comprenden un cebador limitante y cebador en exceso que tienen las propiedades requeridas para la amplificación por LEL-PCR (Lineal-Expo-Lineal). En algunas realizaciones, el kit o la mezcla de reacción comprende además un ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, los cebadores son complementarios a regiones conservadas de dicho ácido nucleico diana y flanquean una región variable de dicho ácido nucleico diana.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos de ensayo homogéneo para analizar un ácido nucleico diana muestra, que comprenden: (a) formar una mezcla de reacción de acuerdo con los párrafos precedentes, en los que, para las sondas señalizadoras de cada par de sondas, se emite una señal ruido desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora no se une a la secuencia diana, en los que la anterior señal ruido es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora se une a la secuencia diana pero la sonda amortiguadora del mismo par de sondas no se une a la secuencia diana, en los que la señal de la sonda señalizadora se amortigua por el amortiguador no fluorescente del mismo par de sondas cuando tanto la sonda de señalización como la sonda amortiguadora se unen a la secuencia diana; (b) amplificar dicho ácido nucleico muestra con dichos cebadores para producir un ácido nucleico diana; (c) detectar una señal fluorescente desde dicho resto fluorescente de dichas sondas de señalización a un intervalo de temperaturas; y (d) analizar la hibridación de dichos conjuntos de sondas con dicha al menos una secuencia diana en función de la temperatura. En algunas realizaciones, se genera un patrón de fluorescencia dependiente de la secuencia de ácido nucleico diana.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es de cadena sencilla. En algunas realizaciones, los cebadores comprenden un cebador en exceso y un cebador limitante, y dicha amplificación es por LATE-PCR.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporciona una mezcla de reacción que comprende: (a) un ácido nucleico diana; y (b) tres o más pares de sondas, comprendiendo cada par de sondas: (i) una sonda señalizadora marcada con un resto fluorescente y complementaria a una secuencia de hibridación particular dentro de dicho ácido nucleico diana, y (ii) una sonda de amortiguación marcada con un resto amortiguador no fluorescente y complementaria a una secuencia de hibridación particular dentro de dicho ácido nucleico diana; en la que las secuencias de hibridación de la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora de un par de sondas son adyacentes (por ejemplo, sin un hueco intermedio, contiguo, etc.) sobre dicho ácido nucleico diana; en la que al menos dos sondas señalizadoras dentro de dichos tres o más pares de sondas se marcan con un primer resto fluorescente, y al menos una sonda señalizadora dentro de dichos tres o más pares de sondas se marca con un segundo resto fluorescente; y en la que la secuencia de hibridación para el al menos un par de sondas que comprende la sonda señalizadora marcada con un segundo resto fluorescente es contigua sobre el ácido nucleico diana con las secuencias de hibridación de dos de los pares de sondas que comprenden las sondas señalizadoras marcadas con el primer resto fluorescente. En algunas realizaciones, cada sonda señalizadora tiene una temperatura de fusión para la secuencia diana que es distinta de todas las otras sondas señalizadoras en la mezcla de reacción que se marcan con el mismo resto fluorescente.

En algunas realizaciones, para las sondas de cada par de sondas, se emite una señal ruido desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora no se une a la secuencia diana, en las que la señal ruido anterior es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora se une a la secuencia diana pero la sonda amortiguadora no se une a la secuencia diana, en las que la señal de la sonda señalizadora se amortigua por el amortiguador no fluorescente cuando tanto la sonda señalizadora como la sonda amortiguadora se unen a la secuencia diana. En algunas realizaciones, las sondas señalizadoras y las sondas de amortiguación son suficientemente complementarias a sus particulares secuencias de hibridación para permitir la hibridación bajo condiciones de ensayo. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es de cadena sencilla.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana comprende una secuencia de ácido nucleico de *Mycobacterium tuberculosis*. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana comprende una parte del gen *pncA*. En algunas realizaciones, para cada conjunto de sondas, la temperatura de fusión de la sonda señalizadora al ácido nucleico diana es mayor que la temperatura de fusión de la sonda de amortiguación a la secuencia diana. En algunas realizaciones, las sondas señalizadoras son sondas de autoamortiguación que comprenden un amortiguador no fluorescente para reducir la señal del fluoróforo cuando la sonda señalizadora no se hibrida con una diana. En algunas realizaciones, las sondas señalizadoras son sondas de baliza molecular. En algunas realizaciones, las sondas señalizadoras comprenden una región de unión a diana y una región de no unión entre el amortiguador no fluorescente y el colorante fluorescente.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporciona un método de ensayo homogéneo para analizar al menos una secuencia diana de ácido nucleico de cadena sencilla en una muestra, que comprende (a) formar una mezcla de reacción del párrafo precedente, en el que, para las sondas de cada par de sondas, se emite una señal ruido desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora no se une a la secuencia diana, en el que la señal ruido anterior es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora se une a la secuencia diana pero la sonda amortiguadora no se une a la secuencia diana, en el que la señal de la sonda señalizadora se amortigua por el amortiguador no fluorescente cuando tanto la sonda señalizadora como la sonda amortiguadora se unen a la secuencia diana; (b) detectar una señal fluorescente de dicho resto fluorescente de dichas sondas señalizadoras a un intervalo de temperaturas; y (c) analizar la hibridación de dichos conjuntos de sondas con dicha al menos una secuencia diana en función de la temperatura.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan kits o mezclas de reacción que comprenden: (a) cebadores para la amplificación de un ácido nucleico diana desde un ácido nucleico muestra; y (b) tres o más pares de sondas, comprendiendo cada par de sondas: (i) una sonda señalizadora marcada con un resto fluorescente y complementaria a una única secuencia de hibridación dentro de dicho ácido nucleico diana, y (ii) una sonda de amortiguación marcada con un resto amortiguador no fluorescente y complementaria a una única secuencia de hibridación dentro de dicho ácido nucleico diana; en los que las secuencias de hibridación de la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora de un par de sondas son contiguas sobre dicho ácido nucleico diana (por ejemplo, hueco no nucleótido); en los que al menos dos sondas señalizadoras dentro de dichos tres o más pares de sondas se marcan con un primer resto fluorescente, y al menos una sonda señalizadora dentro de dichos tres o más pares de sondas se marca con un segundo resto fluorescente; y en los que la secuencia de hibridación para el al menos un par de sondas que comprende la sonda señalizadora marcada con un segundo resto fluorescente se interpone y es contigua sobre el ácido nucleico diana de las secuencias de hibridación para dos de los pares de sondas que comprenden las sondas señalizadoras marcadas con el primer resto fluorescente. En algunas realizaciones, cada sonda señalizadora tiene una temperatura de fusión para la secuencia diana que es distinta de todas las otras sondas señalizadoras en la mezcla de reacción que se marcan con el mismo resto fluorescente (por ejemplo, en el mismo conjunto coloreado).

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos de ensayo homogéneo para analizar al menos un ácido nucleico diana muestra, que comprenden: (a) formar una mezcla de reacción de acuerdo con el párrafo precedente, en los que, para las sondas de cada par de sondas, se emite una señal ruido desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora no se une a la secuencia diana, en los que la señal ruido anterior es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora se une a la secuencia diana pero la sonda amortiguadora no se une a la secuencia diana, en los que la señal de la sonda señalizadora se amortigua por el amortiguador no fluorescente cuando tanto la sonda señalizadora como la sonda amortiguadora se unen a la secuencia diana; (b) amplificar dicho ácido nucleico muestra con dichos cebadores para producir un ácido nucleico diana; (c) detectar una señal fluorescente desde dicho resto fluorescente de dichas sondas de señalización a un intervalo de temperaturas; y (d) analizar la hibridación de dichos pares de sondas con dicha al menos una secuencia diana en función de la temperatura.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan mezclas de reacción que comprenden: (a) un ácido nucleico diana; (b) un primer conjunto coloreado que comprende una pluralidad de pares de sondas, comprendiendo cada par de sondas del primer conjunto coloreado: (i) una sonda señalizadora que comprende un primer resto fluorescente y complementaria a una secuencia de hibridación particular dentro de dicho ácido nucleico diana, y (ii) una sonda de amortiguación que comprende un resto amortiguador y complementaria a una secuencia de hibridación particular dentro de dicho ácido nucleico diana; en las que las secuencias de hibridación de la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora de un par de sondas son adyacentes sobre dicho ácido nucleico diana; y (c) un segundo conjunto coloreado que comprende una pluralidad de pares de sondas, comprendiendo cada par de sondas del segundo conjunto de color: (i) una sonda señalizadora que comprende un segundo resto fluorescente con espectros de excitación/emisión de dicho primer resto fluorescente, y complementaria a una única secuencia de hibridación dentro de dicho ácido nucleico diana, y (ii) una sonda de amortiguación que comprende un resto amortiguador y complementaria a una única secuencia de hibridación dentro de dicho ácido nucleico diana; en las que las secuencias de hibridación de la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora de cada conjunto de sondas en la primera pluralidad de conjuntos de sondas son adyacentes sobre dicho ácido nucleico diana; en las que las secuencias de hibridación de la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora de cada par de sondas son adyacentes sobre dicho ácido nucleico diana; en las que las secuencias de hibridación de un primer par de sondas de dicho primer conjunto

coloreado y las secuencias de hibridación de un segundo par de sondas de dicho primer conjunto coloreado están interpuestas por y son contiguas a la secuencia de hibridación de al menos un par de sondas del segundo conjunto coloreado. En algunas realizaciones, para las sondas de cada par de sondas, se emite una señal ruido desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora no se une a la secuencia diana, en las que la señal ruido anterior es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora se une a la secuencia diana pero la sonda amortiguadora no se une a la secuencia diana, en las que la señal de la sonda señalizadora se amortigua por el amortiguador no fluorescente cuando tanto la sonda señalizadora como la sonda amortiguadora se unen a la secuencia diana. En algunas realizaciones, las sondas señalizadoras y las sondas de amortiguación son suficientemente complementarias a sus particulares secuencias de hibridación para permitir la hibridación bajo condiciones de ensayo.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es de cadena sencilla. En algunas realizaciones, para cada par de sondas, la temperatura de fusión de la sonda señalizadora al ácido nucleico diana es mayor que la temperatura de fusión de la sonda de amortiguación a la secuencia diana. En algunas realizaciones, las sondas señalizadoras son sondas de autoamortiguación que comprenden un amortiguador no fluorescente para reducir la señal del fluoróforo cuando la sonda señalizadora no se hibrida con una diana. En algunas realizaciones, las sondas señalizadoras son sondas de baliza molecular. En algunas realizaciones, las sondas señalizadoras comprenden una región de unión a diana y una región de no unión entre el amortiguador no fluorescente y el colorante fluorescente. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana comprende una secuencia de ácido nucleico de *Mycobacterium tuberculosis*. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana comprende una parte del gen *pncA*. En algunas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico de las sondas se seleccionan de las secuencias de ácido nucleico que tienen al menos 70 % (por ejemplo, <70 %, <75 %, <80 %, <85 %, <90 %, <95 %) de identidad de secuencia con los ácidos nucleicos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 65-102. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende además: (d) un tercer conjunto coloreado que comprende una pluralidad de pares de sondas, comprendiendo cada par de sondas del tercer conjunto coloreado: (i) una sonda señalizadora que comprende un tercer resto fluorescente con distintos espectros de excitación/emisión desde dicho primer resto fluorescente y dicho segundo resto fluorescente, y complementaria a una particular secuencia de hibridación dentro de dicho ácido nucleico diana, y (ii) una sonda de amortiguación que comprende un resto amortiguador y complementaria a una secuencia de hibridación particular dentro de dicho ácido nucleico diana; en la que las secuencias de hibridación de la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora de cada par de sondas del tercer conjunto coloreado son contiguas sobre dicho ácido nucleico diana; en la que las secuencias de hibridación de un primer par de sondas de dicho tercer conjunto coloreado y las secuencias de hibridación de un segundo par de sondas de dicho tercer conjunto coloreado están interpuestas por y son contiguas con al menos un par de sondas del primero o segundo conjunto coloreado. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana comprende una secuencia de ácido nucleico de *Mycobacterium tuberculosis*. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana comprende una parte del gen *pncA*. En algunas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico de las sondas comprenden al menos 70 % (por ejemplo, <70 %, <75 %, <80 %, <85 %, <90 %, <95 %) de identidad de secuencia con las secuencias de ácido nucleico seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 65-102. En algunas realizaciones, las sondas se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 65-102.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos de ensayo homogéneo para analizar al menos un ácido nucleico diana muestra, que comprenden: (a) formar una mezcla de reacción descrita el párrafo precedente, en los que, para las sondas de cada par de sondas, se emite una señal ruido desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora no se une a la secuencia diana, en los que la señal ruido anterior es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora se une a la secuencia diana pero la sonda amortiguadora no se une a la secuencia diana, en los que la señal de la sonda señalizadora se amortigua por el amortiguador no fluorescente cuando tanto la sonda señalizadora como la sonda amortiguadora se unen a la secuencia diana; (b) detectar una señal fluorescente de dicho resto fluorescente de dichas sondas señalizadoras a un intervalo de temperaturas; y (c) analizar la hibridación de dichos pares de sondas de dicha al menos una secuencia diana en función de la temperatura.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan mezclas de reacción que comprenden: (a) una primera secuencia de ácido nucleico diana; (b) una segunda secuencia de ácido nucleico diana; (b) un primer conjunto coloreado que comprende una pluralidad de pares de sondas, comprendiendo cada par de sondas: (i) una sonda señalizadora que comprende un primer resto fluorescente y complementaria a una secuencia de hibridación particular dentro de dicha primera secuencia de ácido nucleico diana o dicha segunda secuencia de ácido nucleico diana, y (ii) una sonda de amortiguación que comprende un resto amortiguador y complementaria a una secuencia de hibridación particular contigua con la secuencia de hibridación particular de la sonda de señalización del conjunto de sondas; y (c) un segundo conjunto coloreado que comprende una pluralidad de pares de sondas, comprendiendo cada par de sondas: (i) una sonda señalizadora que comprende un segundo resto fluorescente con espectros de excitación/emisión desde dicho primer resto fluorescente, y complementaria a una secuencia de hibridación particular dentro de dicha primera secuencia de ácido nucleico diana o dicha segunda secuencia de ácido nucleico diana, y (ii) una sonda de amortiguación que comprende un resto amortiguador y complementaria a una secuencia de hibridación particular contigua con la única secuencia de hibridación de la sonda señalizadora del par de sondas; en las que las secuencias de hibridación para al menos un par de sondas de cada uno de dicho primer conjunto coloreado y dicho segundo conjunto coloreado están dentro de dicha primera secuencia de ácidos nucleicos diana, y en las que las secuencias de hibridación de al menos un par de sondas de cada uno de dicho primer conjunto coloreado y dicho segundo conjunto coloreado están dentro de dicha segunda secuencia de ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, cada uno de dichos conjuntos coloreados comprende tres o más conjuntos de sondas.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan mezclas de reacción que comprenden: (a) un ácido nucleico diana; (b) un primer conjunto coloreado de sondas de ácido nucleico, cuyas sondas son complementarias a las secuencias de hibridación dentro del ácido nucleico diana; en las que el primer conjunto coloreado comprende tres o más pares de sondas, en las que cada par de sondas comprende una sonda señalizadora marcada con un primer fluoróforo y una sonda amortiguadora marcada con un resto amortiguador; y en las que las sondas de señalización y amortiguación de cada par de sondas son contiguas sobre el ácido nucleico diana; y (c) un segundo conjunto coloreado de sondas de ácido nucleico, cuyas sondas son complementarias a las secuencias de hibridación dentro del ácido nucleico diana; en las que el segundo conjunto coloreado comprende tres o más pares de sondas, en las que cada par de sondas comprende una sonda señalizadora marcada con un segundo fluoróforo y una sonda de amortiguación marcada con un resto amortiguador; y en las que las sondas de señalización y amortiguación de cada par de sondas son contiguas sobre el ácido nucleico diana; en las que las secuencias de hibridación de al menos un par de sondas del primer conjunto coloreado se interponen y son contiguas con las secuencias de hibridación particulares de dos pares de sondas del segundo conjunto coloreado. En algunas realizaciones, las mezclas de reacción comprenden además: (d) un tercer conjunto coloreado de sondas de ácido nucleico, cuyas sondas son complementarias a las secuencias de hibridación dentro del ácido nucleico diana; en las que el tercer conjunto coloreado comprende tres o más pares de sondas, en las que cada par de sondas comprende una sonda señalizadora marcada con un tercer fluoróforo y una sonda de amortiguación marcada con un resto amortiguador; y en las que las sondas de señalización y amortiguación de cada par de sondas son contiguas sobre el ácido nucleico diana; en las que las secuencias de hibridación de al menos un par de sondas del tercer conjunto coloreado se interponen y son contiguas con las secuencias de hibridación particulares de dos pares de sondas de o bien el segundo conjunto coloreado o el primer conjunto coloreado. En algunas realizaciones, las mezclas de reacción comprenden además un cuarto conjunto coloreado, un quinto conjunto coloreado, un sexto conjunto coloreado, etc.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un diseño de ensayo ilustrativo para la detección por LATE-PCR en tubo único, de un solo color de tuberculosis resistente a múltiples/amplios fármacos (M/XDR-TB).

La Figura 2 muestra un esquema para el ensayo de detección de mutación del gen *pncA* en dos colores.

La Figura 3 muestra patrón fluorescente obtenido de una muestra de *M. bovis* a través de tres intervalos de diez veces de concentraciones sin control molde, usando las sondas 100 nM *pncA*_sonda_406_427 ON_Bovis (SEQ ID NO: 44) y 300 nM *pncA*_sonda_428_448_OFF (SEQ ID NO: 45).

La Figura 4 muestra un patrón fluorescente obtenido de una muestra de *M. tuberculosis* a través de tres intervalos de diez veces de concentraciones sin control molde, usando las sondas 100 nM *pncA*_sonda_406_427 ON_Bovis (SEQ ID NO: 44) y 300 nM *pncA*_sonda_428_448_OFF (SEQ ID NO: 45).

La Figura 5 muestra una comparación del patrón fluorescente de una *M. bovis*, *M. tuberculosis*, un control no molde, usando las sondas 200 nM *pncA*_sonda_406_427 ON_Bovis (SEQ ID NO: 44) y 500 nM *pncA*_sonda_428_448_OFF (SEQ ID NO: 45).

La Figura 6 muestra una comparación de los patrones fluorescentes con conjuntos de sondas para el promotor *inhA*, *katG*, *rpoB*, y o bien ambas sondas de 1.^{er} y 2.^o control interno o solamente el 2.^o control interno.

La Figura 7 muestra una comparación de patrones fluorescentes para cinco cepas (1, 2, 3, 4, y 5) que contienen diversas combinaciones de mutaciones en el promotor *inhA*, *katG*, y *rpoB*.

La Figura 8 muestra una comparación de patrones fluorescentes para cinco cepas (1, 6, 7, 8, y 9) que contienen diversas combinaciones de mutaciones en el promotor *inhA*, *katG*, y *rpoB*.

La Figura 9 muestra una comparación de patrones fluorescentes para cinco cepas (1, 10, 11, 12, y 13) que contienen diversas combinaciones de mutaciones en el promotor *inhA*, *katG*, y *rpoB*.

La Figura 10 muestra una comparación de patrones fluorescentes para seis cepas (1, 14, 15, 16, 17 y 18) que contienen diversas combinaciones de mutaciones en el promotor *inhA*, *katG*, y *rpoB*.

La Figura 11 muestra una comparación de patrones fluorescentes para cinco cepas (1, 19, 20, 21, y 22) que contienen diversas combinaciones de mutaciones en el promotor *inhA*, *katG*, y *rpoB*.

La Figura 12 muestra sondas ilustrativas alternativas unidas a secuencias diana de *rpoB* de referencia para con sonda señalizadora (ON) variante 4 y 4a, sonda señalizadora (ON) 5 y 5a, y sonda amortiguadora OFF 1 y 1a.

La Figura 13 muestra sondas ilustrativas unidas a secuencias diana de *pncA*. Las correspondientes sondas señalizadora (ON) y amortiguadora (OFF) se agrupan en filas.

La Figura 14 muestra una representación esquemática de fluorescencia frente a la curva de temperatura y la sonda señalizadora (1) y las sondas amortiguadoras hibridadas, (2) la sonda señalizadora hibridada/sonda amortiguadora en solución, y (3) la sonda señalizadora y las sondas amortiguadoras en estados en solución que producen la curva. El resto de señalización es un círculo en blanco y el resto de amortiguación es un círculo relleno.

La Figura 15 muestra las estructuras secundarias más estables previstas por Visual OMP del segmento amplificado de la diana control a 25 °C antes (izquierda) y después (derecha) de las modificaciones para reducir la estructura secundaria. Varios nucleótidos C se han sometido a delección o cambiado a nucleótidos A o T y nucleótidos G, A, y T se han añadido a la secuencia modificada. Solamente se han hecho cambios menores al cebador o partes complemento del cebador en cada extremo de la secuencia mostrada. La T_m de la estructura a la izquierda, que incluye una horquilla en los nucleótidos dirigidos por la sonda es de 37 °C. La T_m más alta prevista para una horquilla en la región sondeada de la secuencia modificada a la derecha es de 23 °C.

La Figura 16 muestra una gráfica de derivada negativa de la fluorescencia en muestras con unas 1.000 dianas

control amplificadas estimadas (líneas sólidas) o 100 dianas control amplificadas (líneas discontinuas). El valle a 27 °C es debido a la fusión de una sonda de amortiguación. El pico alrededor de los 30 grados es debido a la fusión de una sonda señalizadora.

La Figura 17 muestra un ensayo ilustrativo de LATE-PCR, en tubo único, multicolor para la detección/identificación/caracterización del complejo de tuberculosis, incluyendo TB resistente a multifármacos y amplios fármacos. Cada línea de las dianas representa un ensayo de un solo color, como se describe en el presente documento, cada uno de los cuales se realiza en un tubo único.

La Figura 18 muestra un ensayo ilustrativo de LATE-PCR, en tubo único, multicolor para la detección/identificación/caracterización del complejo de tuberculosis, incluyendo TB resistente a multifármacos y amplios fármacos. Cada línea de las dianas representa un ensayo de un solo color, como se describe en el presente documento, cada uno de los cuales se realiza en un tubo único.

La Figura 19 muestra los datos de fluorescencia dependiente de temperatura ilustrativos de un ensayo de tubo único, de dos colores que distingue *M. tuberculosis* de *M. bovis* basándose en las diferencias de secuencia en el gen *pncA*.

La Figura 20 muestra una gráfica de las T_m de la sonda frente a la secuencia de *pncA* para un ensayo en tubo único, de dos colores (ensayo diseño I) ilustrativo para distinguir *M. tuberculosis* de *M. bovis*. Los recuadros grises representan sondas Off, amortiguadores Black Hole (Biosearch Technologies, Petaluma, California, EE.UU.); los recuadros en blanco son sondas On con el fluoróforo Cal Orange 560 (Biosearch Technologies, Petaluma, California, EE.UU.); y los recuadros rellenos en negro son fluoróforo Quasar 670 (Biosearch Technologies, Petaluma, California, EE.UU.). Debajo de cada recuadro está la T_m prevista por Visual OMP de la sonda con *M. tuberculosis*, cepa H37Rv.

La Figura 21 muestra una gráfica de las T_m de la sonda frente a la secuencia de *pncA* para un ensayo en tubo único ilustrativo (ensayo diseño II) sin colores fluorescentes asignados para distinguir *M. tuberculosis* de *M. bovis*. Los recuadros grises representan sondas Off y los recuadros en blanco son sondas On.

La Figura 22 muestra una gráfica de las T_m de la sonda para un ensayo en tubo único, de tres colores ilustrativo (ensayo diseño II) para distinguir *M. tuberculosis* de *M. bovis*, en el que los pares de sondas se han agrupado dentro de cada conjunto coloreado. Debajo de cada recuadro está la T_m prevista por Visual OMP de la sonda con *M. tuberculosis*, cepa H37Rv.

La Figura 23 muestra una gráfica de las T_m de la sonda para un ensayo en tubo único, de tres colores ilustrativo (ensayo diseño II) para distinguir *M. tuberculosis* de *M. bovis*, en el que las secuencias de las sondas individuales se han ajustado a diferencias de T_m maximizadas dentro de los pares de sondas y a través del intervalo de temperatura en cada color, habiéndose agrupado los pares de sondas resultantes dentro de cada conjunto coloreado. Debajo de cada recuadro está la T_m prevista por Visual OMP de la sonda con *M. tuberculosis*, cepa H37Rv.

La Figura 24 muestra los datos de fluorescencia dependiente de temperatura ilustrativos de un ensayo de LATE-PCR tetraplex, en tubo único, de un solo color único; Las líneas 190 son la cepa H37Rv sensible a fármaco para todos los tres genes y la línea 191 es la cepa resistente para solamente *katG* (S315T, una serina localizada en la posición de aminoácidos 315 cambiada a una tirosina).

La Figura 25 muestra los datos de fluorescencia dependiente de temperatura ilustrativos de un ensayo de LATE-PCR tetraplex, en tubo único, de un solo color; la cepa sensible es la línea 200 mientras la cepa solamente resistente al promotor *inhA*, la línea 201 contenía un cambio de nucleótido único (T/C) en la posición menos 8 en la región del promotor.

La Figura 26 muestra los datos de fluorescencia dependiente de temperatura ilustrativos de un ensayo de LATE-PCR tetraplex, en tubo único, de un solo color; la línea 210 es la cepa sensible mientras que la línea 211 contiene solamente una mutación de *rpoB* (D516V, un ácido aspártico a valina).

La Figura 27 muestra los datos de fluorescencia dependiente de temperatura ilustrativos de un ensayo de LATE-PCR tetraplex, en tubo único, de un solo color; la línea 220 es la cepa sensible, mientras que la línea 221 contiene solamente una mutación de *rpoB* doble (D516A, ácido aspártico a alanina y H526N, histidina a asparagina).

Las Figuras 28A-B muestran los datos de fluorescencia dependiente de temperatura ilustrativos de un ensayo en tubo único, de dos colores, de *pncA*: (A) Cal Red 610 y (b) Quasar 670.

Las Figuras 29A-B muestran los datos de fluorescencia dependiente de temperatura ilustrativos de un ensayo en tubo único, de dos colores, de *pncA*: (A) Cal Red 610 y (b) Quasar 670.

Las Figuras 30A-B muestran los datos de fluorescencia dependiente de temperatura ilustrativos de un ensayo en tubo único, dos colores (Cal Red 610 (A) y Quasar 670 (B)) de *pncA* Diseño I.

Las Figuras 31A-C muestran los datos de fluorescencia dependiente de temperatura ilustrativos de un ensayo en tubo único, tres colores (Cal Orange 560 (A), Quasar 670 (B), y Cal Red 610 (C)), de *pncA* Diseño II.

Las Figuras 32A-C muestran los datos de fluorescencia dependiente de temperatura ilustrativos de un ensayo en tubo único, tres colores (Cal Orange 560 (A), Quasar 670 (B), y Cal Red 610 (C)), de *pncA* Diseño II.

Las Figuras 33A-B muestran (A) un esquema de un conjunto de sondas de hibridación de Diseño II ilustrativo, y (B) alteración de las T_m de sonda de hibridación por cambios en la secuencia diana.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, el término "kit" se refiere a cualquier sistema de administración para la administración de materiales. En el contexto de los ensayos de reacción, dichos sistemas de administración incluyen sistemas que permiten el almacenamiento, transporte, o administración de los reactivos de reacción (por ejemplo,

oligonucleótidos, enzimas, etc. en los recipientes apropiados) y/o materiales de soporte (por ejemplo, tampones, instrucciones escritas para la realización del ensayo, etc.) de una localización a otra. Por ejemplo, los kits incluyen uno o más apartados (por ejemplo, cajas) que contienen los reactivos de reacción relevantes y/o los materiales de soporte. Como se usa en el presente documento, el término "kit fragmentado" se refiere a un sistema de administración que comprende dos o más recipientes separados que cada uno contiene una subparte de los componentes del kit total. El término "kit" incluye tanto kits fragmentados como combinados.

Como se usa en el presente documento, el término "mezcla de reacción" o "mixtura de reacción" se refiere a una combinación de reactivos (por ejemplo, ácidos nucleicos, enzimas, fluoróforos, tampones, sales, etc.) en solución en un único recipiente (por ejemplo, tubo de microcentrífuga, tubo de PCR, pocillo, microcanal, etc.).

El término "muestra" se usa en el presente documento en su sentido más amplio. Significa que incluye: un espécimen o cultivo (por ejemplo, cultivos microbiológicos), una solución preparada o mezcla, y tanto muestras biológicas como ambientales. Las muestras biológicas pueden ser animal, incluyendo ser humano, o microbiana. Las muestras biológicas pueden tener la forma de un fluido o sólido, y se pueden obtener de cualquier fuente biológica adecuada. Las muestras ambientales incluyen material ambiental tal como materia de superficie, suelo, plantas, y agua. Estos ejemplos no se construyen como limitantes de tipos de muestra aplicables a la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que comprende secuencias codificantes necesarias para la producción de un polipéptido o precursor (por ejemplo, *katG*, *rpoB*, promotor *inhA*, *pncA*, etc.). El término "gen" abarca tanto el ADNc como las formas genómicas de un gen.

Como se usa en el presente documento, la expresión "específico a diana", cuando se usa en referencia a un reactivo oligonucleotídico, como en, por ejemplo, "sonda específica a diana" o "cebador específico a diana", se refiere a reactivos diseñados y producidos para la hibridación con una secuencia diana específica (por ejemplo, para la detección, caracterización, o amplificación de la secuencia diana). Un reactivo específico a diana puede ser alelo discriminante o tolerante a emparejamiento incorrecto.

Como se usa en el presente documento, la expresión "control interno" o "CI" se refiere a una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, plásmido, oligonucleótido, etc.) la cual se amplifica conjuntamente y/o detecta conjuntamente en el mismo recipiente que una o más secuencias diana. El CI se puede mezclar en una mezcla de reacción para hacer un seguimiento del desarrollo de la amplificación y/o detección, evitar resultados falsos, y/o calibrar las reacciones. Un CI se puede amplificar con cebadores para una diana o con cebadores específicos a CI. Un CI generalmente se detecta con sondas específicas a CI.

Como se usa en el presente documento, el término "control interno amplificable" se refiere a una molécula de ácido nucleico no diana (por ejemplo, plásmido, oligonucleótido, etc.) que es amplificable por PCR u otros métodos de amplificación (por ejemplo, amplificación isotérmica (por ejemplo, círculo rodante). Normalmente, se proporcionan cebadores de amplificación y sondas de detección para tal control.

Como se usa en el presente documento, el término "control interno no amplificable" se refiere a una molécula de ácido nucleico no diana (por ejemplo, plásmido, oligonucleótido, etc.) para la cual se proporcionan sondas de detección pero no cebadores de amplificación.

Como se usa en el presente documento, la expresión "temperatura de fusión" o "T_m" se refiere a la temperatura a la que una población de moléculas de ácido nucleico hibridadas llegan a estar disociadas a la mitad en las cadenas sencillas. Las ecuaciones para calcular la T_m de los ácidos nucleicos es bien conocida en la técnica. Por ejemplo, una "temperatura de fusión ajustada a concentración" de una sonda o cebador a su diana se puede calcular usando, por ejemplo, un método Nearest Neighbor (Véase SantaLucia (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:1460-1465; Allawi, H. T. and SantaLucia (1997) *Biochem.* 36:10581-10594;). Los estimados más exactos de la T_m de oligonucleótidos en tampones de PCR se pueden hacer usando programas informáticos (por ejemplo, Visual OMP, versión 7.5.0.0, DNA Software Inc., Ann Arbor, MI) o programas en línea (por ejemplo, "The DINAMelt Web Server") que usa una modificación de la fórmula de Nearest Neighbor que calcula el efecto de la concentración de magnesio sobre la T_m. Preferentemente, la T_m se mide empíricamente (publicación de patente de los Estados Unidos N.º 2004/0053254;).

Como se usa en el presente documento, el término "solapamiento" se aplica a intervalos de temperatura, cuando las señales producidas por las sondas señalizadoras que hibridan durante los respectivos intervalos de temperatura producen señal aditiva de manera detectable.

Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia diana" o "secuencia de ácido nucleico diana" se refiere a una región de ácido nucleico (por ejemplo, amplicón) a analizar por los métodos descritos en el presente documento. El término "secuencia de hibridación" se refiere a una parte de la secuencia diana que es suficientemente complementaria a una sonda ("secuencia de hibridación de la sonda") o cebador ("secuencia de hibridación del cebador") para permitir la hibridación de la sonda o el cebador bajo las condiciones de ensayo. Las secuencias de hibridación pueden incluir nucleótidos que no son complementarios con los correspondientes nucleótidos en el cebador

o la sonda, siempre que la hibridación sea capaz de darse bajo las condiciones de ensayo. Una única secuencia diana puede contener múltiples secuencias de hibridación, por ejemplo, alineadas de manera adyacente para cubrir cada nucleótido de la secuencia diana (aunque en algunas realizaciones una secuencia diana pueda comprender huecos entre las secuencias de hibridación). Un único amplicón u otro ácido nucleico puede contener una secuencia diana única o puede contener múltiples secuencias diana no adyacentes.

Como se usa en el presente documento, el término "resto fluorescente" se refiere a un compuesto u otro resto que se puede unir a un oligonucleótido, y se excita mediante radiación electromagnética y emite radiación electromagnética en respuesta en una cantidad suficiente para ser detectada en un ensayo. El experto en la técnica entenderá que un resto fluorescente absorbe y emite durante intervalos de longitudes de onda, denominados "espectro de absorbancia" y "espectro de emisión". Un resto fluorescente presentará una longitud de onda de emisión pico que es una longitud de onda mayor que su longitud de onda de absorbancia pico. El término "pico" se refiere al punto más alto en el espectro de absorbancia o emisión.

Como se usa en el presente documento, los términos "amortiguador" y "resto amortiguador" se refieren a un compuesto o resto que absorbe energía de un compuesto o resto donante excitado. Por ejemplo, el resto amortiguador puede funcionar absorbiendo los fotones fluorescentes emitidos por un fluoróforo donante, enmascarando de ese modo la fluorescencia del donante.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sonda señalizadora" se refiere a una sonda oligonucleotídica marcada con un resto fluorescente y que tiene suficiente complementariedad a una secuencia de hibridación sobre un ácido nucleico diana, para hibridar con las secuencias de hibridación con temperaturas de fusión separadas entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 80 °C. En las realizaciones descritas en el presente documento, un resto fluorescente normalmente se une al extremo 5' o 3' de la sonda señalizadora. Además del resto fluorescente, una sonda señalizadora además puede comprender un segundo resto fluorescente o un resto amortiguador (por ejemplo, en el extremo opuesto del primer resto fluorescente).

Como se usa en el presente documento, las expresiones "sonda de amortiguación" y "sonda amortiguadora" se refieren a una sonda oligonucleotídica marcada con un resto amortiguador y que tiene suficiente complementariedad a una secuencia de hibridación sobre un ácido nucleico diana, para hibridar con las secuencias de hibridación con temperaturas de fusión separadas entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 80 °C. Además del resto amortiguador, una sonda amortiguadora además puede comprender un segundo resto fluorescente o un resto amortiguador (por ejemplo, en el extremo opuesto del primer resto fluorescente).

Como se usa en el presente documento, las expresiones "conjunto de sondas" o "par de sondas" se refieren a un par de oligonucleótidos de ácido nucleico marcados que tienen suficiente complementariedad a secuencias de hibridación adyacentes sobre un ácido nucleico diana para hibridar con las secuencias de hibridación con temperaturas de fusión separadas entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 80 °C. Un par de sondas comprende una sonda señalizadora y una sonda de amortiguación; aunque una o ambas sondas en un par de sondas pueden ser sondas compartidas (a continuación). Normalmente, la sonda señalizadora de un par de sondas emite por encima de la fluorescencia ruido cuando se hibrida con su secuencia de hibridación y no la sonda de amortiguación. Cuando ambas sondas de un par de sondas se unen a sus secuencias de hibridación, el amortiguador de la sonda de amortiguación amortigua la fluorescencia del fluoróforo de la sonda señalizadora.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sonda compartida" se refiere a una sonda que es parte de dos pares de sondas adyacentes. Cuando hibrida con una secuencia de hibridación, el marcador (por ejemplo, resto fluorescente o resto amortiguador) en el extremo 5' de la sonda interactúa con el marcador de una sonda de un primer par de sondas y el marcador (por ejemplo, resto fluorescente o resto amortiguador) en el extremo 3' de la sonda interactúa con el marcador de una sonda de un segundo par de sondas. La sonda compartida normalmente comprende dos restos amortiguadores (que interactúan con los fluoróforos de las sondas señalizadoras adyacentes), o un resto fluorescente (que interactúa con un resto amortiguador de una sonda amortiguadora adyacente) y un resto amortiguador (que interactúa con un resto fluorescente de una sonda señalizadora adyacente). Se dice que la sonda compartida es parte de ambos pares de sondas. Una sonda compartida puede ser una sonda señalizadora en un primer par de sondas y una sonda de amortiguación en un segundo par de sondas, o una sonda de amortiguación en dos pares de sondas diferentes.

Como se usa en el presente documento, el "conjunto coloreado" se refiere a tres o más pares de sondas que tienen secuencias de hibridación dentro del mismo ácido nucleico diana o conjunto de ácidos nucleicos diana, estando las sondas señalizadoras de cada uno de los pares de sondas del conjunto coloreado marcadas con los mismos restos fluorescentes y/o restos amortiguadores.

Como se usa en el presente documento, la expresión "conjunto de sondas de hibridación" se refiere a dos o más conjuntos coloreados diferentes (por ejemplo, cada conjunto coloreado tiene un resto fluorescente distinto), las secuencias de hibridación de los conjuntos de sondas de los cuales están dentro del mismo ácido nucleico diana o conjunto de ácidos nucleicos diana.

Como se usa en el presente documento en referencia a las secuencias de ácido nucleico y/o sitios de unión a sonda, los términos "contiguos" y "adyacentes" se refieren a dos o más secuencias o segmentos de ácido nucleico sin nucleótidos intermedios (por ejemplo, huecos) entre ellos (es decir, el nucleótido 3' de una primera secuencia de hibridación está ligado por un enlace fosfodiéster con el nucleótido 5' de una segunda secuencia de hibridación). Por ejemplo, si la "secuencia X" y la "secuencia Y" son contiguas, entonces no hay nucleótidos que separen esas secuencias. Asimismo, si las secuencias de hibridación para la "sonda 1" y la "sonda 2" son contiguas, entonces no hay nucleótidos que se interponen entre esas secuencias de hibridación.

Como se usa en el presente documento en referencia a las secuencias de ácido nucleico y/o sitios de unión a sonda, el término "intermedio" y otras formas del mismo (por ejemplo, "interpuesto por") se refiere a una secuencia o segmento de ácido nucleico localizado entre otros dos segmentos de ácido nucleico. Por ejemplo, si la "secuencia A" y la "secuencia C" están interpuestas por la "secuencia B", entonces la secuencia B está entre las secuencias A y C. Una secuencia intermedia puede ser, pero no necesariamente, contigua con las secuencias entre las que está.

Descripción detallada

En el presente documento se proporcionan reactivos y kits para el análisis de secuencias diana de ácido nucleico en un ensayo multi sonda, en tubo único, y métodos de uso de los mismos. En realizaciones particulares, se proporcionan ensayos multiplex, por ejemplo, para la detección de secuencias diana del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (por ejemplo, *katG*, *rpoB*, promotor *inhA*, *pncA*, etc.). Se pueden analizar una o más secuencias diana usando múltiples sondas marcadas con un solo tipo de fluoróforo (por ejemplo, de un solo color), o en un ensayo multicolor. Las descripciones de la sonda (por ejemplo, longitudes, marcadores, temperaturas de fusión, etc.), los protocolos de ensayo, los controles y otros reactivos, los métodos, etc. descritos en el presente documento se aplican a ensayos de diana única y diana múltiple, de un solo color y multicolor, multiplex y monoplex, y/o Diseño I y Diseño II.

En ciertas realizaciones, en el presente documento se proporcionan reactivos y kits para la detección de secuencias diana en un ensayo en tubo único, de un solo color, y métodos de uso de los mismos. En realizaciones particulares, se proporcionan ensayos multiplex para la detección de secuencias diana del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (por ejemplo, *katG*, *rpoB*, promotor *inhA*, *pncA*, etc.). Por ejemplo, se proporciona un ensayo en tubo único, de un solo color, tetraplex para la detección de secuencias diana del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (por ejemplo, *katG*, *rpoB*, promotor *inhA*, etc.), por ejemplo, junto con una secuencia diana del 1.^{er} control interno (amplificable). Los cuatro productos de cadena sencilla de este tetraplex se detectaron usando conjuntos de sondas marcadas con un fluoróforo en un color. Estos componentes de reacción también pueden incluir un segundo control (no amplificable), también marcado en el mismo color (o marcado en un color diferente). En el presente documento también se proporciona el uso de tales reactivos y métodos con otros ensayos de detección y caracterización (por ejemplo, detección del gen *pncA* micobacteriano con un color adicional). En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan ensayos multiplex (por ejemplo, multicolor) para la detección y/o caracterización de, por ejemplo, el gen *pncA* micobacteriano.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan reactivos y kits para la detección de una o más secuencias diana en un ensayo en tubo único, multicolor, y métodos de uso de los mismos. En realizaciones particulares, se proporcionan ensayos monoplex y multiplex para la detección de secuencias diana del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (por ejemplo, *pncA*, etc.) u otras secuencias diana (por ejemplo, secuencias largas que requieren múltiples conjuntos de sondas). Por ejemplo, se proporciona un ensayo en tubo único, multicolor, monoplex para la detección de *pncA* de la secuencia diana del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Un amplicón diana de cadena sencilla se detecta usando conjuntos de sondas marcadas con múltiples fluoróforos (por ejemplo conjuntos de sondas agrupados (Diseño I) o mezclados (Diseño II)).

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan ensayos para detectar/identificar/caracterizar múltiples secuencias diana de ácido nucleico en un único recipiente de reacción. En algunas realizaciones, los conjuntos de sondas y los pares de cebadores se proporcionan para la amplificación y detección de 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más) dianas en un recipiente único y usando un solo color de fluoróforo. En algunas realizaciones, las secuencias diana se identifican en presencia de múltiples posibles secuencias diana (por ejemplo, secuencia no diana, secuencias cercanas a diana (por ejemplo, >90 % de identidad a diana, >95 % de identidad a diana, >98 % de identidad a diana, >99 % de identidad a diana), etc.) en un muestra. En algunas realizaciones, los métodos y los reactivos permiten la discriminación de diversas variantes de diana, en los que las secuencias diana variantes comprenden una secuencia variable flanqueada por secuencias conservadas o al menos relativamente conservadas. En realizaciones particulares, las versiones de cadena sencilla de las secuencias diana y/o variantes de la secuencia diana se generan mediante una amplificación que genera amplicones de cadena sencilla, por ejemplo, un método por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) no simétrica, tal como Lineal-Expo-Lineal(LEL)-PCR o más preferentemente Lineal Después de la Exponencial (LATE)-PCR. En algunas realizaciones, solamente unos pocos pares de cebadores, generalmente no más de tres pares, preferentemente no más de dos pares y más preferentemente solamente un solo par de cebadores se usan para cualquier diana (por ejemplo, incluso si pueden estar presentes un número de variantes de diana). Los cebadores específicos a diana (por ejemplo, en exceso y limitantes) hibridan con las secuencias que flanquean la región de interés (por ejemplo, región de identificación de especie, subespecie, y/o resistencia). En algunas realizaciones, se

proporciona un par de sondas (por ejemplo, sondas señalizadora y amortiguadora) que hibrida con la región amplificada. En realizaciones particulares, la señal generada por la hibridación dependiente de temperatura de las sondas señalizadoras y amortiguadora con la diana (por ejemplo, durante un intervalo de temperatura) identifica la secuencia diana como presente en la muestra y/o distingue entre las versiones variantes de la secuencia diana (por ejemplo, una mutación de resistencia). En realizaciones típicas, se proporcionan pares de cebadores y conjuntos de sondas (por ejemplo, en un kit único o volumen de reacción) que son cada uno específico a diferentes secuencias diana. Tales realizaciones permiten la detección y/o caracterización dependiente de temperatura de múltiples dianas dentro de una sola muestra, en un recipiente único y/o reacción. En algunas realizaciones, todos los conjuntos de sondas en una reacción o kit comprenden el mismo marcador detectable (por ejemplo, fluoróforo), y los métodos descritos en el presente documento permiten la detección/caracterización por un solo color de múltiples dianas en un recipiente único y/o reacción.

En algunas realizaciones, los ensayos de un solo color descritos en el presente documento se combinan con otros ensayos (por ejemplo, utilizando otros métodos de detección o utilizando uno o dos fluoróforos de color adicionales) para la detección de TB y/o patógenos adicionales. En algunas realizaciones, múltiples ensayos de un solo color (multidiana) diferentes se combinan en un recipiente único (Véase, por ejemplo, las Figuras 17 y 18). En algunas realizaciones, se proporcionan ensayos multicolor (por ejemplo, ensayos Diseño I y Diseño II).

En realizaciones particulares, en el presente documento se proporcionan reactivos y métodos para la detección, diferenciación, y/o caracterización del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, incluyendo, pero sin limitación uno o más de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium mungi*, *Mycobacterium orygis*, *Mycobacterium pinnipedii*, y *Mycobacterium canettii*. Los métodos y los reactivos descritos en el presente documento permiten la identificación de la especie, la cepa y/o la subespecie, la caracterización de la resistencia/susceptibilidad a fármacos, y/o la determinación de la nación/región u origen. En realizaciones particulares, se proporcionan cebadores y sondas para la amplificación, detección, y caracterización de partes de los genes *katG*, *rpoB*, promotor *inhA*, *pncA*, *mabA*, *embB*, *rpsL*, *rss*, *gyrA*, *gyrB*, *eis*, *tlyA*, y/o ADN_r 16s. En realizaciones particulares, se proporcionan cebadores y sondas para la amplificación, detección, y caracterización de partes de los genes *katG*, *rpoB*, promotor *inhA* y/o *pncA* (por ejemplo, las partes definidas por los cebadores en el mismo). En algunas realizaciones, se identifican variantes de aquellos genes que confieren resistencia a diversos fármacos (por ejemplo, resistencia a isoniazid (promotor *katG*/*inhA*), resistencia a rifampicina (*rpoB*), resistencia a etionamida (promotor *inhA*), resistencia a pirazinamida (*pncA*), etc.). En algunas realizaciones, se proporcionan cebadores y sondas que son capaces de distinguir todas las variantes alélicas (por ejemplo, todas las variantes conocidas, variantes conocidas y desconocidas) de una diana (por ejemplo, todas las variantes de los codones de *rpoB* 516, 526, 531 y 533).

En algunas realizaciones, los pares de sondas (por ejemplo, sondas señalizadora y amortiguadora) se configuran para hibridar con una secuencia diana (por ejemplo, una secuencia variable localizada entre las secuencias de unión a cebador conservadas) y para diferenciar entre múltiples secuencias diana (por ejemplo, en una muestra o mezcla única) (Véase, por ejemplo, la Figura 14). En algunas realizaciones, las sondas señalizadora y amortiguadora hibridan con diferente T_m con partes cercanas o adyacentes de la secuencia diana. La señal desde la sonda señalizadora incrementa cuando hibrida con la diana, entonces, la señal se amortigua cuando la sonda amortiguadora hibrida con su diana adyacente. Como alternativa, la señal del nivel ruido de una sonda señalizadora disminuye cuando hibrida con la diana adyacente a una sonda amortiguadora ya unida. En algunas realizaciones, se diseñan múltiples conjuntos de sondas con diferentes intervalos de temperatura de hibridación (Véase, por ejemplo, la Figura 1) de manera que la hibridación con múltiples dianas se puede discriminar en un tubo único con un solo color. En algunas realizaciones, una o ambas sondas de un conjunto de sondas (por ejemplo, sondas señalizadora y/o amortiguadora) comprenden diferentes grados de complementariedad con las regiones variables de las diferentes secuencias diana. En algunas realizaciones, una sonda señalizadora y/o sonda amortiguadora se configura para hibridar con la secuencia variable (por ejemplo, solapando la diferencia de secuencia exacta) de múltiples secuencias diana (por ejemplo, con diferente T_m para las diferentes secuencias diana). En algunas realizaciones, la sonda señalizadora se configura para hibridar con la secuencia variable de múltiples secuencias diana (por ejemplo, con diferente T_m para las diferentes secuencias diana). En algunas realizaciones, una sonda amortiguadora se configura para hibridar con la secuencia variable de múltiples secuencias diana (por ejemplo, con diferente T_m para las diferentes secuencias diana).

En ciertas realizaciones, en el presente documento se proporcionan reactivos y kits para la detección de una o más secuencias diana en un ensayo en tubo único, multicolor (por ejemplo, dos colores, tres colores, cuatro colores, o más), y métodos de uso de los mismos. En algunas realizaciones, se utilizan múltiples colores debido a la longitud de una diana o dianas, y/o la dificultad de abarcar las diana(s) con conjuntos de sondas diferenciados por la temperatura de fusión sola (por ejemplo, como un ensayo de un solo color). Para superar el problema de resolver el número de conjuntos de sondas necesarios para cubrir una diana o dianas, se emplean dos o más grupos de conjuntos de sondas, teniendo cada grupo una sonda señalizadora distintamente marcada (por ejemplo, cada grupo de los conjuntos de sondas definidos por su propio "color") y teniendo sondas que abarcan el espacio de temperatura de fusión disponible. Al utilizar dos, tres o más colores, el mismo espacio de temperatura (por ejemplo, temperaturas de fusión de sonda para la diana de entre aproximadamente 10 °C y aproximadamente 80 °C) se puede utilizar dos, tres o más veces en el mismo ensayo en dispositivos de PCR con las capacidades de calentamiento y enfriamiento apropiadas. En realizaciones particulares, se proporcionan ensayos (por ejemplo, multiplex, monoplex, etc) para la detección de

secuencias diana del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (por ejemplo, *pncA*, etc.).

En algunas realizaciones, los conjuntos de sondas de un primer color se asignan a una diana o una parte de una diana (por ejemplo, una primera parte contigua de una diana), los conjuntos de sondas de un segundo color se asignan a una segunda diana o segunda parte de una diana, etc. (por ejemplo, para un tercer color de conjuntos de sondas, cuarto color de conjuntos de sondas, etc.). En tales realizaciones, el espectro de fluorescencia del primer color se correlaciona con la secuencia de la primera diana o parte de una diana; los cambios en el primer espectro se pueden asignar a cambios en esa secuencia. Asimismo, el espectro de fluorescencia del segundo color se correlaciona con la secuencia de la segunda diana o parte de una diana, y los cambios en el segundo espectro se pueden asignar a cambios en esa secuencia; y etc. para los terceros colores, cuartos colores, etc. En algunas realizaciones, además de del agrupamiento de los conjuntos de sondas por color, el grupo se dispone a lo largo de la diana o parte de la diana en orden descendente o ascendente de temperatura de fusión. Por lo tanto, cuando el espectro de fluorescencia para un color se mueve de bajo a alto, corresponde a movimiento a través de la correspondiente secuencia diana o parte de la secuencia diana de un extremo al otro (por ejemplo, 5' a 3' o 3' a 5'). En algunas realizaciones, las sondas o conjuntos de sondas agrupados sobre una secuencia diana de acuerdo con el color marcador y/o alineados dentro de un grupo de color de acuerdo con la magnitud de la temperatura de fusión se diseñan de acuerdo con un proceso de diseño "Diseño I" (Véase a continuación).

En algunas realizaciones los pares de sondas, comprendidos de una sonda señalizadora que tiene un primer color, segundo color, tercer color, etc. más una sonda de amortiguación para cada sonda señalizadora, se unen en pares por toda una diana o dianas (por ejemplo, los colores están intercalados). En tales realizaciones, el espectro de fluorescencia del primer color se correlaciona con cambios de secuencia en diversas localizaciones por toda la diana o dianas. Asimismo, el espectro de fluorescencia del segundo color se correlaciona con cambios de secuencia en diversas localizaciones por toda la diana o dianas y etc. para los colores adicionales. Pero las secuencias diana sonda particulares dentro de un color no se agrupan a lo largo de la(s) secuencia(s) diana. No obstante, las secuencias diana sonda se disponen de acuerdo con las temperaturas de fusión de sonda/diana ascendentes o descendentes en un color. Por lo tanto, cuando las temperaturas de fusión de los pares de sondas en un color se mueven de bajo a alto, las correspondientes secuencias diana particulares se encuentran en localizaciones no contiguas a lo largo de la secuencia o secuencias diana. En algunas realizaciones, la correlación de los cambios en un espectro de fluorescencia con los cambios de secuencia requiere comparación con una clave o un espectro o espectros control (por ejemplo, debido al color del espectro y/o temperatura a lo largo del espectro no se correlaciona con una región específica de la diana). En algunas realizaciones, las sondas y pares de sondas que no se agrupan sobre una secuencia diana de acuerdo con el color marcador, y/o se alinean alineadas dentro de un grupo de color de acuerdo con la magnitud de la temperatura de fusión, se diseñan de acuerdo con un proceso de diseño "Diseño II" (véase a continuación).

En algunas realizaciones, los métodos de sondeo y análisis proporcionados en el presente documento se aplican a muestras que contienen diana(s) de ácido nucleico de cadena sencilla. Los métodos incluyen análisis de una única secuencia, análisis de dos o más secuencias en la misma cadena, análisis de secuencias en diferentes cadenas, y combinaciones de las anteriores. Una secuencia diana de ácido nucleico de cadena sencilla puede ser una secuencia control añadida a una muestra. Una secuencia diana de ácido nucleico puede ser ADN, ARN, o una mezcla de ADN y ARN. Puede venir de cualquier fuente. Por ejemplo, puede tener origen natural, o la secuencia diana se puede dar en forma de doble cadena, en el caso de que la secuencia diana de cadena sencilla se obtenga mediante separación y purificación de cadena, o un método de amplificación de cadena sencilla (por ejemplo LEL-PCR o LATE-PCR). Si la secuencia diana de ácido nucleico de cadena sencilla es una secuencia de ADNc, se obtiene de una fuente de ARN por transcripción inversa.

En muchos casos una fuente natural no contendrá una secuencia diana en suficiente número de copias para el sondeo y el análisis. En tales casos la secuencia diana de cadena sencilla se obtiene por amplificación, generalmente un método de amplificación que incluye amplificación exponencial. Los métodos de amplificación útiles incluyen métodos de amplificación isotérmica y métodos de amplificación por ciclación térmica. La reacción de amplificación puede generar la secuencia diana de ácidos nucleicos de cadena sencilla directamente, o puede generar la secuencia diana en forma de doble cadena, en dicho suceso la secuencia diana de cadena sencilla se obtiene mediante separación de cadena y purificación, como se ha indicado anteriormente. Los métodos de amplificación útiles que se pueden emplear incluyen, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), incluyendo PCR simétrica, PCR asimétrica, LEL-PCR y LATE-PCR, cualquiera de las cuales se puede combinar con transcripción inversa para la amplificación de secuencias de ARN, NASBA, SDA, TMA, y amplificación en círculo rodante. Si la secuencia diana de ácidos nucleicos de cadena sencilla es una secuencia de ADNc, el método de amplificación incluirá transcripción inversa, por ejemplo, RT-PCR. En algunas realizaciones, cuando se utiliza amplificación no simétrica, se incluyen conjuntos de sondas en la mezcla de reacción de amplificación antes de la amplificación para evitar la contaminación.

Los conjuntos de sondas útiles en los métodos proporcionados en el presente documento incluyen una sonda señalizadora y una sonda amortiguadora asociada. La sonda señalizadora es una sonda de hibridación que emite una señal detectable, preferentemente una señal fluorescente, cuando hibrida con una secuencia diana de ácido nucleico de cadena sencilla en una muestra, en la que la señal es amortiguable mediante la hibridación cercana (por ejemplo, adyacente) de la sonda amortiguadora asociada. La sonda amortiguadora no emite energía en luz visible. Generalmente, una sonda señalizadora tiene un resto fluorescente covalentemente unido. Las sondas señalizadoras

incluyen sondas marcadas con fluoróforos u otros restos fluorescentes. En algunas realizaciones, las sondas señalizadoras preferidas son sondas doblemente marcadas; es decir, sondas que emiten poca o ninguna señal cuando están en solución y no unidas a diana, incluso si se estimulan, pero emiten una señal cuando hibridan con una secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla (por ejemplo, en ausencia de un amortiguador adyacentemente unido).

Por ejemplo, cuando la sonda está en solución, asume una conformación (por ejemplo, bucle aleatorio, etc.) en la que el amortiguador interactúa aleatoriamente con el fluoróforo, y la sonda emite un nivel bajo de fluorescencia (por ejemplo, completamente oscuro (por ejemplo, >90 % amortiguada, >95 % amortiguada, >98 % amortiguada, >99 % amortiguada o más), o parcialmente oscurecida (por ejemplo, <80 % de señal, <70 % de señal, <60 % de señal, <50 % de señal, <40 % de señal, <30 % de señal, <20 % de señal, <10 % de señal, o menos)). Cuando la sonda hibrida con su diana, sin embargo, se fuerza dentro en una conformación (por ejemplo, conformación abierta, conformación estable, etc.) en la que el fluoróforo está físicamente separado del amortiguador, y las señales de la sonda.

En las sondas señalizadoras amortiguadas (por ejemplo, sondas de autoamortiguación), la amortiguación se puede lograr por cualquier mecanismo, generalmente por FRET (Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia) entre un fluoróforo y un resto de amortiguación no fluorescente o por amortiguación por contacto. En algunas realizaciones, las sondas señalizadoras preferidas son negras o están muy cerca del negro en solución (por ejemplo, no hibridadas) para minimizar la fluorescencia ruido. En otras realizaciones, el resto de amortiguación amortigua solamente parcialmente el fluoróforo cuando está en solución (por ejemplo <95 %, <90 %, <80 %, <70 %, <60 %, <50 %, <40 %, <30 %, >10 %, >20 %, >30 %, >40 %, >50 %, >60 %, >70 %, >80 %, etc.). En algunas realizaciones, la amortiguación se logra mediante amortiguación por contacto o amortiguación por FRET. En algunas realizaciones, la distancia entre un resto de amortiguación y el resto de señalización se extiende mediante inclusión de una región no unión dentro de la sonda (por ejemplo, una parte de la sonda que no es complementaria a la diana, por ejemplo, un tracto poliA). Al extender la secuencia entre el resto de amortiguación y el resto de señalización, las secuencias adicionales disminuyen la cantidad de amortiguación de la señal en solución.

La sonda amortiguadora de un conjunto de sondas es o incluye una cadena de ácido nucleico que incluye un amortiguador no fluorescente. El amortiguador puede ser, por ejemplo, un cromóforo no fluorescente tal como dabcil o un amortiguador Black Hole (Black Hole Quenchers, disponibles en Biosearch Technologies, son una serie de amortiguadores, de los cuales uno u otro es recomendado por el fabricante para su uso con un fluoróforo particular). En algunas realizaciones, las sondas de amortiguación preferidas incluyen un cromóforo no fluorescente. En algunas realizaciones, los amortiguadores son amortiguadores Black Hole (por ejemplo, BHQ2). La sonda amortiguadora de un conjunto hibrida con la secuencia diana de ácido nucleico de cadena sencilla adyacente a o cerca de la sonda señalizadora de manera que cuando ambas se hibridan, la sonda amortiguadora amortigua, o vuelve negra, la sonda señalizadora (por ejemplo, >80 % amortiguada, >85 % amortiguada, >90 % amortiguada, >95 % amortiguada, >98 % amortiguada, >99 % amortiguada). La amortiguación puede ser por transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET o FET) o por contacto (por ejemplo, "amortiguación colisional" o "amortiguación por contacto").

En algunas realizaciones, se proporcionan diversos controles (por ejemplo, sondas control, cebadores control, plásmidos control, etc.). En algunas realizaciones, se proporcionan controles internos (por ejemplo, amplificados conjuntamente y/o detectados conjuntamente con la(s) diana(s) en un recipiente único). En algunas realizaciones, los controles internos son secuencias no diana (por ejemplo, secuencias altamente conservadas) dentro del ácido nucleico muestra (por ejemplo, genoma de *M. tuberculosis*, parte no diana de un gen diana, etc.) que se amplifican con cebadores específicos a control, y detectados con sondas específicas a control. En algunas realizaciones, los controles internos son moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, oligonucleótidos, plásmidos, etc.) que se proporcionan como un reactivo junto con cebadores y sondas para su amplificación y detección. En algunas realizaciones, los controles internos son secuencias no diana (por ejemplo, secuencias altamente conservadas) dentro del ácido nucleico muestra (por ejemplo, genoma de *M. tuberculosis*, parte no diana de un gen diana, etc.) que no se amplifican (por ejemplo, se proporcionan cebadores no apropiados), pero se detectan con sondas específicas a control. En algunas realizaciones, los controles internos son moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, oligonucleótidos, plásmidos, etc.) que no se amplifican (por ejemplo, se proporcionan cebadores no apropiados), pero se detectan con sondas específicas a control (por ejemplo, concentración conocida). En algunas realizaciones, las sondas control comprenden el mismo fluoróforo que las sondas diana. En otras realizaciones, las sondas control comprenden diferentes fluoróforos de las sondas diana. En algunas realizaciones, un control comprende un par de oligonucleótidos, de los cuales uno o ambos están marcados en el extremo con un fluoróforo y o amortiguador (Véase, por ejemplo, solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 61/755). En tales realizaciones, una señal fluorescente de los oligonucleótidos controles se altera (por ejemplo, amortigua o no amortigua) cuando los oligonucleótidos se separan. La señal de tal control es útil cuando la T_m se conoce con precisión y normaliza las curvas de fusión, por ejemplo, si hay una variación debido a la variación de instrumentación o muestra (por ejemplo, introduciendo altas concentraciones de sal con la muestra). En algunas realizaciones, el reactivo de doble cadena también interactúa con la polimerasa durante la PCR y mejora la especificidad de amplificación.

En algunas realizaciones, los controles se proporcionan con temperaturas de hibridación de sonda que difieren (por ejemplo, un control de alta temperatura y un control de baja temperatura). En ciertas realizaciones, las temperaturas de hibridación de sonda son más extremas que algunas temperaturas de hibridación diana. En ciertas realizaciones los dos controles pueden emitir señal en el mismo color o en colores diferentes. Tales controles permiten la calibración de la escala de temperatura y algunos patrones fluorescentes dentro de ese tramo de temperatura. Una secuencia

control puede ser un oligonucleótido de cadena sencilla, par de oligonucleótidos de doble cadena, un plásmido, etc.

En algunas realizaciones, las concentraciones de la sonda control son relativamente bajas (por ejemplo, 50 nM para la sonda ON, 150 nM para la sonda OFF) en comparación con las sondas diana. En tales realizaciones, la baja concentración de sonda control reduce la fluorescencia ruido de los reactivos control en el intervalo de temperatura de detección de diana. En otras realizaciones, las concentraciones de sonda control son iguales a o mayores que las concentraciones diana. En tales realizaciones, la magnitud del pico control proporciona una medida de la eficacia general con la que la secuencia diana se recuperó y amplificó en cada muestra. En algunas realizaciones, tanto la amplitud de un pico control como la profundidad del valle control se usan como constantes para la comparación con las amplitudes de los picos diana y los valles del resto del patrón (por ejemplo, proporciona una media de la cuantificación de la cantidad de la señal desconocida). En algunas realizaciones, las sondas control están en concentraciones que superan la concentración del amplicón final (por ejemplo, por encima de 500 nM) para cuantificar el amplicón, por ejemplo, para ensayar la eficacia con la que las moléculas diana se recuperaron durante la preparación de la muestra y posteriormente se amplificaron. En algunas realizaciones, las sondas control son concentraciones limitantes (por ejemplo, 50 nM o 100 nM) para proporcionar una señal uniforme en todas las muestras a pesar de las variaciones en la eficacia de la recuperación de la diana durante la preparación de la muestra y la posterior amplificación.

En algunas realizaciones, un control es un control de hibridación de baja temperatura. En algunas realizaciones, un ácido nucleico sintético (por ejemplo, plásmido control, oligo control, etc.) se diseña para permitir la detección de la hibridación de sonda (por ejemplo, señalización y amortiguación) a baja temperatura (<35 °C, <30 °C, <25 °C, <20 °C, <15 °C, >5 °C, >10 °C, >15 °C, >20 °C, intervalos entre las mismas). En algunas realizaciones, el intervalo de hibridación de temperatura baja para el control permite la medición (por ejemplo, cuantitativa) del control sin interferir con la detección de la diana que se da a temperaturas mayores. La T_m baja del control proporciona una señal a una temperatura baja predeterminada. En ciertas realizaciones, no se puede asumir que cada posición en el ciclador térmico funciona exactamente igual, ni que la calibración a una alta temperatura es también precisa para baja temperatura. Por tanto, en algunas realizaciones, un control de baja T_m junto con un control de alta T_m permite calibración de doble temperatura en cada reacción. La calibración de doble temperatura en ausencia de dianas genómicas también se puede llevar a cabo antes o después del análisis de las muestras. Esto es útil para el mantenimiento rutinario de la máquina y los datos resultantes incluso se pueden analizar a una distancia (es decir, en cualquier lugar en el mundo mediante una conexión a la "nube"). La calibración refleja el funcionamiento de tanto el ciclador térmico como el sistema óptico del dispositivo. Los fluoróforos que emiten a diferentes longitudes de onda pueden estar afectados de manera diferente por variaciones experimentales y de equipo, haciendo útiles los múltiples controles. Además, ciertas impurezas que pueden estar presentes en una muestra o instrumento absorben luz de diferentes longitudes de onda de manera diferente. Por tanto, si los controles internos de baja T_m y alta T_m están diseñados para emitir fluorescencia a diferentes longitudes de onda, se puede analizar la relación de sus intensidades de señal (así como sus temperaturas exactas). Si el sistema óptico está sucio la señal del fluoróforo que es sensible a la impureza estará más afectada que el fluoróforo que es insensible (menos sensible) a la impureza y la relación de los valores cambiarán.

En algunas realizaciones, los reactivos y los métodos descritos en el presente documento encuentran uso en la calibración de instrumentos (por ejemplo, termociclador, lector de placa, fluorímetro, plataforma robótica de alto rendimiento, etc.), la calibración de las reacciones de reacción, o como controles para su uso con otros ensayos no descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, se proporcionan kits de calibración o control, por ejemplo, que comprenden secuencias control (por ejemplo, plásmidos, oligonucleótidos, etc.), cebadores, sondas, y cualquier otro reactivo útil (por ejemplo, enzimas, tampones, etc.). En realizaciones particulares, se proporcionan un control de alta T_m (por ejemplo, un control con una T_m de hibridación de sonda con secuencia control de más de 60 °C (por ejemplo, >65 °C, >70 °C, >75 °C)) y un control de baja T_m (por ejemplo, un control con una T_m de hibridación de sonda con secuencia control de menos de 40 °C (por ejemplo, <35 °C, <30 °C, <25 °C, <20 °C, <15 °C)). En algunas realizaciones, uno o ambos de los controles internos son no amplificables (por ejemplo, sondas proporcionadas pero no cebadores). En algunas realizaciones, uno o ambos de los controles internos son amplificables (por ejemplo, sondas y cebadores proporcionados). En algunas realizaciones, se proporcionan uno o más controles de T_m intermedios adicionales (por ejemplo, amplificables o no amplificables). Los kits y métodos de calibración dentro del alcance de la invención no se limitan a las combinaciones de los controles descritos en el presente documento. Cualquier combinación adecuada (por ejemplo, 2 controles internos, 3 controles internos, 4 controles internos o más) de los controles descritos en el presente documento (por ejemplo, alta T_m, baja T_m, amplificable, no amplificable, etc.). En algunas realizaciones, la amplificación y detección de tales controles permite a un usuario, incluyendo un usuario a una distancia sustancial hacer un seguimiento y calibrar el instrumento y/o realizar el control de calidad con el paso del tiempo.

La variación en las concentraciones de sal, (por ejemplo, debido al remanente de la preparación de muestra) así como otras variaciones en los reactivos o el equipo pueden cambiar la T_m empírica de las sondas de hibridación, pero pueden afectar a las sondas de manera diferente. Por ejemplo, una sonda larga, rica en GC, o completamente complementaria puede mostrar un mayor o menor cambio en la T_m en comparación con una sonda que es corta, rica en AT o parcialmente complementaria. Es útil, por lo tanto, tener controles en tanto los intervalos superiores como los inferiores del espacio de temperatura que se usa para la detección. El cambio relativo en la máxima fluorescencia (o

mínima) de los controles relativos a las condiciones patrón se puede medir y expresar como un factor de temperatura. Entonces, los ajustes a fluorescencia a temperaturas intermedias se pueden hacer usando factores de normalización que varían con la temperatura, como resultaría evidente para un experto en la técnica.

5 El diseño de sondas de baja T_m de calidad (consideradas en el presente documento que tienen T_m empírica no mayor que 40 °C y versiones preferidas de no mayor que 30 °C) incluye criterios que generalmente no son requeridos (o al menos no considerados) para sondas de alta T_m. La diana de cadena sencilla con la que hibrida la sonda debería tener estructura secundaria limitada (por ejemplo, formación de horquilla a la temperatura de detección). Cuando se
10 baja la temperatura, el potencial para la formación de horquilla incrementa. Si hay horquillas que tienen T_m varios grados por encima de la del híbrido sonda/diana, que la región de nucleótidos tiene disponibilidad reducida para la hibridación de la sonda, bajará la tasa de hibridación y las señales de la sonda pueden estar limitadas. En algunas realizaciones las regiones diana se seleccionan de secuencias endógenas que se prevé que están libres de horquillas que tienen T_m por encima de la del híbrido sonda/diana. En algunas realizaciones preferidas, la T_m de horquilla prevista no es mayor que 5 grados por debajo de la T_m prevista del híbrido. Tales predicciones se pueden realizar usando programas informáticos tales como Visual OMP, versión 7.5.0.0 (DNA Software, Ann Arbor, Michigan, EE.UU.). Las secuencias se pueden alterar hasta un grado limitado durante la amplificación mediante el uso de cebadores con emparejamientos incorrectos a las dianas, como es bien conocido por los expertos en la técnica. Se puede reducir algo del potencial para la formación de horquilla específica usando tales cebadores emparejados incorrectamente para generar una secuencia modificada.

20 En el caso de dianas sintéticas, tales como las usadas para controles, incluyendo controles amplificados internos, la secuencia se puede diseñar específicamente o alterar desde una secuencia de origen natural para reducir o eliminar la formación de horquilla en la(s) región(es) dirigida(s) a la sonda por encima de una temperatura dada. La Figura 15 muestra una parte de una secuencia generada aleatoriamente y su secuencia posteriormente modificada con estructura secundaria reducida. Algunos de los nucleótidos en la secuencia original encontrados en las partes híbridas de las horquillas se modificaron (normalmente a A o T) o se sometieron a delección de la secuencia. El programa informático Visual OMP de nuevo se usó para predecir la formación de horquilla y nucleótidos en esas horquillas se sustituyeron o se sometieron a delección. Este proceso se repitió hasta que la T_m de la horquilla en la región dirigida a sonda no era mayor que la T_m del híbrido sonda/diana. Los cambios adicionales se realizaron posteriormente para lograr la realización preferida que una horquilla prevista que implica los nucleótidos dirigidos a sonda tengan una T_m no mayor que 5 grados por debajo de la T_m prevista del híbrido.

30 En algunas realizaciones, las regiones dirigidas a sonda de baja T_m y las regiones adyacentes de las dianas sintéticas consisten en 80 %, 90 % o 100 % de 2 nucleótidos no complementarios (por ejemplo, A y G) para limitar o prevenir horquillas con T_m por encima de una T_m particular. En realizaciones preferidas, al menos 20, o al menos 30, o al menos 40, o al menos 50 nucleótidos sobre cualquier lado de los nucleótidos dirigidos a sonda consisten exclusivamente en 2 nucleótidos no complementarios y los nucleótidos dirigidos a sonda consisten en al menos el 80 % de esos mismos nucleótidos.

40 Las regiones dirigidas a sonda descritas anteriormente pueden ser dianas de una sonda única, o de un par de sondas tales como una sonda señalizadora y una sonda de amortiguación. La hibridación eficaz de una de un par de sondas puede limitar la formación de horquilla en la región. Por lo tanto, en algunas realizaciones las dianas se seleccionan o diseñan de manera que la T_m prevista de las horquillas no es mayor que la T_m más alta de los dos híbridos sonda/diana, preferentemente no mayor que 5 grados por debajo de la T_m más alta de los dos híbridos sonda/diana.

45 En algunas realizaciones, la interacción entre los fluor y los amortiguadores de pares de sondas yuxtapuestos, hibridados puede estabilizar ambas sondas a los nucleótidos diana e incrementar la T_m de cada uno, particularmente el de inferior T_m prevista. En tales casos, la T_m prevista de cualquier horquilla que implica nucleótidos dirigidos debería ser no mayor que la T_m empírica de al menos un híbrido sonda/diana, preferentemente la T_m de ambos híbridos sonda/diana, y lo más preferentemente al menos 5 grados por debajo de la T_m empírica de ambos híbridos sonda/diana.

50 Las siguientes patentes y publicaciones describen reactivos y métodos que encuentran uso con diversas realizaciones descritas en el presente documento: Patente de los Estados Unidos N.º 8.367.325; Patente de los Estados Unidos N.º 7.972.786; Patente de los Estados Unidos N.º 7.915.014; Patente de los Estados Unidos N.º 7.632.642; Patente de los Estados Unidos N.º 7.517.977; Patente de los Estados Unidos N.º 7.465.562; Patente de los Estados Unidos N.º 7.198.897; Publicación de los EE.UU. N.º 2013/0210656; Publicación de los EE.UU. N.º 2013/0203626; Publicación de los EE.UU. N.º 2013/0095479; Publicación de los EE.UU. N.º 2012/0282611; Publicación de los EE.UU. N.º 2012/0208191; Publicación de los EE.UU. N.º 2012/0202203; Publicación de los EE.UU. N.º 2012/0198576; Publicación de los EE.UU. N.º 2012/0088275; Publicación de los EE.UU. N.º 2012/0040352; Publicación de los EE.UU. N.º 2011/0311971; Publicación de los EE.UU. N.º 2009/0226973; Publicación de los EE.UU. N.º 2009/0111170; Publicación de los EE.UU. N.º 2009/0081648; Publicación de los EE.UU. N.º 2008/0280292; Publicación de los EE.UU. N.º 2008/0193934; Publicación de los EE.UU. N.º 2006/0275773; Publicación de los EE.UU. N.º 2006/0177842; Publicación de los EE.UU. N.º 2006/0177841; y Publicación de los EE.UU. N.º 2004/0053254;

65 Las realizaciones descritas en el presente documento cuando utilizan un solo tipo o color de fluoróforo pueden hacer

uso de los fluoróforos ilustrados en el presente documento, o pueden hacer uso de los fluoróforos adicionales conocidos por los expertos en los campos relevantes. Como se usa en el presente documento, "fluoróforo", "colorante fluorescente", "marcador fluorescente", "agente fluorescente", etc. se usan como sinónimos. Los fluoróforos adecuados que pueden encontrar uso en las realizaciones incluyen, pero sin limitación, complejos de lantanida fluorescente, incluyendo aquellos de Europio y Terbio, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, verde malaquita, estilbeno, amarillo Lucifer, Cascade Blue, Texas Red, y otros descritos en la 6ª Edición del "Molecular Probes Handbook" de Richard P. Haugland, Colorantes fluorescentes comercialmente disponibles para su uso con ciertas realizaciones incluyen, pero sin limitación: Cy3, Cy5, (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J., EE.UU.), fluoresceína, tetrametilrodamina-, TEXAS RED, CASCADE BLUE, BODIPY FL-14, BODIPY R, BODIPY TR-14, VERDE RODAMINA, OREGON GREEN 488, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665-, ALEXA FLUOR 488, ALEXA FLUOR 532, ALEXA FLUOR 568, ALEXA FLUOR 594, ALEXA FLUOR 546 (Molecular Probes, Inc. Eugene, Oreg., EE.UU.), Quasar 570, Quasar 670, Cal Red 610 (BioSearch Technologies, Novato, Ca), ALEXA FLUOR 350, ALEXA FLUOR 532, ALEXA FLUOR 546, ALEXA FLUOR 568, ALEXA FLUOR 594, ALEXA FLUOR 647, BODIPY 493/503, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY 530/550, BODIPY TMR, BODIPY 558/568, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, CASCADE BLUE, CASCADE YELLOW, Dansil, lisamina rodamina B, MARINA BLUE, OREGON GREEN 488, OREGON GREEN 514, PACIFIC BLUE, RODAMINA 6G, VERDE RODAMINA, ROJO RODAMINA, tetrametilrodamina, TEXAS RED (disponible de Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg., EE.UU.), y Cy2, Cy3.5, Cy5.5, y Cy7 (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J. EE.UU. y otros).

Aunque muchas realizaciones descritas en el presente documento son útiles para ensayos de un solo color y/o en tubo único, está dentro del alcance de la presente invención combinar tales ensayos, o realizaciones de los mismos, con fluoróforos adicionales (por ejemplo, para la detección de otras dianas) o ensayos adicionales realizados en otros recipientes de reacción (por ejemplo, detección de espectro de masas de *M. tuberculosis*).

En algunas realizaciones, se proporcionan reactivos y métodos para el análisis de ácido nucleico mediante un ensayo multicolor, en tubo único (un ensayo Diseño I o Diseño II).

Un ejemplo de ensayo multicolor, en tubo único (ensayo Diseño I) para el análisis del gen *pncA* se representa, por ejemplo, en las Figuras 1-2 y 19-20. Tal ensayo se denomina en el presente documento ensayo Diseño I. La diana del gen *pncA* es de 561 pares de bases de longitud que se divide para la distribución de las sondas en dos secciones de longitud aproximadamente igual de la secuencia del gen. La identificación correcta de las secuencias de *Mycobacterium bovis* de *Mycobacterium tuberculosis* que difieren en un solo par de bases era la primera etapa en el diseño de sonda para dar a cada especie su propio patrón fluorescente. El diseño del conjunto de sondas On/Off emparejadas contenía una sonda On de alta Tm (75 °C) que era complementaria a la secuencia de *M. bovis* y un emparejamiento incorrecto único a la secuencia de *M. tuberculosis*. La sonda Off era complementaria a ambas secuencias. El diseño aseguró que *M. bovis* generaría una señal de fluorescencia a una temperatura mayor y ambas secuencias se desactivarían mediante la unión de la sonda Off a la misma temperatura. Creando así un patrón distinto que identificaría claramente *M. bovis* de *M. tuberculosis* (Figure 24). Con este par de sondas diseñadas para distinguir *M. bovis*, los posteriores pares de sondas se diseñaron en relación con la localización exacta dentro del propio gen. La formulación básica para el diseño de sonda emparejada era de una longitud de 25 pares de bases para la sonda On y 17 pares de bases para la sonda Off. Se hicieron modificaciones posteriores a las sondas basándose en: (1) formación de estructura secundaria potencial que reduciría las capacidades de las sondas para unirse a la diana, e (2) hibridación cruzada intermolecular de la misma unión de sonda a sí misma. Estos tipos de interacciones se previeron usando el programa informático Visual OMP versión 7.5.1.0 (DNA Software Inc., Ann Arbor, Michigan, EE.UU.) y las sondas se modificaron cambiando la secuencia de la sonda para reducir o eliminar estas interacciones. Sustituir un nucleótido de citosina (C) por una timina (T) causará una alteración mínima del emparejamiento de bases entre la sonda y su diana complementaria; por lo tanto, esta sustitución era la primera elección cuando se enfrenta con la formación de la estructura secundaria potencial o la hibridación cruzada intermolecular. La Figura 25 muestra el diseño final del esquema de dos colores (Diseño I). Los primeros dos pares de sondas On/Off mostraron Tm de sonda Off mayor que la de la sonda On emparejada. Mientras que en la mayoría de los emparejamientos On/Off la sonda Off desactiva la sonda On de una manera dependiente de la temperatura, no todos los emparejamientos se diseñaron de esta manera. Por ejemplo, en la región de Quasar 670 hay un par de sondas On adyacentes una a otra (Tm=58,7, Tm=61,1) en las que el amortiguador de la sonda On en dirección 5' se usa para desactivar el fluorescente de la otra sonda On.

Otro ejemplo de ensayo multicolor, en tubo único ilustrativo, en este caso también para el análisis del gen *pncA* se denomina en el presente documento ensayo Diseño II. En tal diseño, las sondas no se disponen continuamente a lo largo de la secuencia diana de acuerdo con la temperatura y/o el color. En cambio, en algunas realizaciones, secuencias particulares se seleccionan a lo largo de la secuencia diana basándose en su longitud (número de nucleótidos), las Tm para las sondas para aquellas secuencias particulares se determinan, y entonces los colores se asignan al par de sondas adyacente con la perspectiva de convertirlos en pares de sondas On/Off en un orden específico dentro de un color que maximiza los espacios de Tm entre las sondas de cada color. El resultado de tal diseño es que los pares de sondas adyacentes (pares On/Off) no pueden estar relacionados uno con otro en ni color (por ejemplo, marcador diferente) ni temperatura (por ejemplo, no dispuestos secuencialmente de acuerdo con la magnitud de Tm). El Diseño II de sonda usa el amplio espacio de temperatura que es permitido cuando tanto la sonda

como la diana son ADN de cadena sencilla, particularmente al final de una reacción de LATE-PCR, una LEL-PCR o una reacción de PCR asimétrica. En lugar de estar contruidos por donde una sonda se alinearía con su secuencia de hibridación complementaria, la disposición de los pares de sondas On/Off se basa en sus respectivas T_m. Por tanto primero se diseñan los pares On/Off y se asignan valores de T_m de acuerdo con sus secuencias. A continuación, a los pares de sondas se les asigna colores basándose en sus valores de T_m, en lugar de su localización a lo largo de la longitud de la secuencia diana, finalmente las secuencias de las sondas dentro de un color se ajustan para maximizar su espaciado de temperatura a través del intervalo de temperatura entero para la hibridación de diana sonda. El resultado es que los pares de sondas llegan a ser contiguos durante la temperatura pero no necesariamente contiguos a lo largo de la secuencia diana.

El proceso Diseño II comienza por la selección de la longitud de las sondas On (señalización) y Off (amortiguación). En el ensayo Diseño II de *pncA* ilustrativo, las secuencias de hibridación de 20 pares de bases para las sondas On y las secuencias de hibridación de 15 pares de bases adyacentes para las sondas Off se alinearon a través de la secuencia diana. Una segunda etapa opcional incluye sustituciones de nucleótidos, como se ha descrito anteriormente para el Diseño I, para corregir para cualquier formación de estructura secundaria potencial o hibridación cruzada intermolecular. Las T_m de la sonda producidas tras estas modificaciones se muestran en la Figura 26. En una tercera etapa a cada sonda señalizadora dentro de un par de sondas se le asigna un color basándose en su T_m en lugar de la posición, para maximizar el espacio de temperatura sin reparar en la localización a lo largo de la secuencia diana. La Figura 27 muestra los resultados de esta reorganización basada en la temperatura. El refinado adicional de las diferencias de T_m entre las sondas se hace para maximizar el uso del espacio de temperatura. Un método para ajustar la T_m de una sonda a su secuencia de hibridación es introducir un cambio de C a G en la sonda que da como resultado un emparejamiento incorrecto de G a T entre la sonda y la diana, reduciendo así la T_m total de la sonda. Cualquier introducción de un emparejamiento incorrecto bajará la T_m de la hibridación de sonda/diana a su complemento perfecto. Para incrementar las diferencias totales en algunas de las sondas con la diana complementaria (*M. tuberculosis*, cepa H37Rv) se introdujeron emparejamientos incorrectos a las secuencias sonda. En la figura 28 se muestran el refinado resultante. Cada uno de los pares de sondas para el ensayo ilustrativo del gen *pncA* (resistencia a PZA) se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Diseño II ilustrativo, sondas de *pncA*

Secuencia 5' a 3'	T _m	Modificación 5'	Modificación 3'	Posición nucleótido
<u>AACGCCGCGCTGGAGGAGATGCTT</u>	74,5	QSR670	BHQ2	196_215
GGCCGATACCACCGT	60,6		BHQ2	216_230
<u>ACCATCGGAGCGTACAGCGGCTGT</u>	68,7	QSR670	BHQ2	406_425
CTACAAGGGTGCCTA	53,8		BHQ2	426_440
<u>ACAGTTGGTTTGACGCTCCTGAGT</u>	64,7	QSR670	BHQ2	161_180
GCACTGCCGGCGCTCG	55,2		BHQ2	181_195
<u>AAGACCCGGGTGATCACTTCTCTT</u>	63,4	QSR670	BHQ2	546_565
AAGGACTTCCACATC	51,3		BHQ2	566_580
<u>AACGCTATCAGTGACTACCTGGTT</u>	58,1	QSR670	BHQ2	616_635
CGCTGCGTTGGCTCG	51,1		BHQ2	636_650
<u>AATCGGCAATTGAGTCGGTGTTTT</u>	54,5	QSR670	BHQ2	441_460
CAGTCTGGACCG	47,3			461_475
<u>TAGCGGTACGCAATGGCTTGGCCTA</u>	73,4	CO560	BHQ1	266_285
AGACGGCCGAGGAC	60,1		BHQ1	286_300
<u>ACACCATCACGTCGTGGCAACCGT</u>	68,6	CO560	BHQ1	581_600
CCGGAGCGGCGGGCT	56,8		BHQ1	601_615
<u>ACCTCTCGGCGTGGACTTCTATCCGT</u>	60,3	CO560	BHQ1	476_495
ATTGCGTTAGCGGTA	48,3		BHQ1	496_510

(continuación)

Secuencia 5' a 3'	Tm	Modificación 5'	Modificación 3'	Posición nucleótido
<u>TTTCGTTGACGTGCAGAA</u> <u>TGACAA</u>	57,4	CO560	BHQ1	685_705
TGCGGGTGTGGTCA	46,7		BHQ1	706_720
<u>AAAGAATGGTACGTCACTGCTGTT</u>	53,2	CO560	BHQ1	371_390
TCGGAGGAGTTGACG	42		BHQ1	391_405
<u>ACTTCCTCGTCGTGGCCATCGCGT</u>	69	CR610	BHQ2	511_530
CGGCACACTGGACTA	53,4		BHQ2	531_345
<u>AGCGCGGCGTCGATGAGGTTGACT</u>	68,6	CR610	BHQ2	336_355
AATTGGCTGCGGTAA	52,5		BHQ2	356_370
<u>AATCGCTGGCGGTAAC</u> <u>TGGTGGTT</u>	67,8	CR610	BHQ2	651_670
TTCTGCGAGGGTGGC	60,4		BHQ2	671_685
<u>AACATCGATCATTGTGTGCGCCTT</u>	64,4	CR610	BHQ2	301_320
TGTGGTCGGTATTGC	54,2		BHQ2	321_335
<u>AAGACTTGACAGCGGGTGTGTCTT</u>	62,9	CR610	BHQ2	231_250
ACTGGGTGCTGGTG	52,1		BHQ2	251_265
<u>TTCCGAACGTATGGTGGATTAAA</u>	55,1	CR610	BHQ2	721_740
TGCTTGGGCAGTTGC	45		BHQ2	741_755

Los nucleótidos subrayados no son complementarios a la secuencia de hibridación. Las modificaciones 5' son QSR670 es quasar 670, CO560 es cal orange 560 y CR610 es cal red 610. Mientras que las modificaciones 3' BHQ1 y BHQ2 son amortiguadores Black Hole.

5 Los métodos Diseño I y Diseño II para diseñar conjuntos de sondas para analizar una secuencia diana no se limitan a los ejemplos de *pncA* anteriormente descritos. En particular, el método Diseño II es ventajoso por al menos las siguientes razones: (a) se puede aplicar a cualquier secuencia diana larga; (b) la asignación de las longitudes de la sonda On y sonda Off es rápida debido a que no tienen que ajustarse para lograr las Tm específicas; (c) el ordenamiento de los pares de sondas por Tm durante del espacio de temperatura deseado es rápido; (d) la asignación de los colores es rápida; y (e) el ajuste de las Tm introduciendo los tipos específicos de emparejamientos incorrectos se hace en el contexto de conjuntos completos de sondas y se consigue rápidamente.

10 En algunas realizaciones, el método Diseño II se usa para diseñar conjuntos de sondas para ensayos de un solo color, de dos colores, de tres colores, cuatro colores, o ademas multicolor. En algunas realizaciones, el método Diseño II se usa para diseñar conjuntos de sondas para ensayos de diana única o multidiana.

20 Los ensayos descritos en el presente documento incluyen tres o más pares de sondas (por ejemplo, comprendiendo cada par de sondas una sonda On (señalización) y Off (amortiguación)). Cuando se diseña usando el método Diseño II la disposición de los colores y/o las Tm de las secuencias de hibridación para los pares de sondas no está relacionada con su orden lineal a lo largo de la diana. Para un ensayo de un solo color, el método Diseño II puede dar como resultado orden lineal no ascendente o descendente a las Tm de las secuencias de hibridación a lo largo de la secuencia diana. Además, debido a que particulares secuencias diana sonda inicialmente se disponen a lo largo de la secuencia diana, independientemente de la identidad de la secuencia diana, las secuencias particulares resultantes y las sondas tienen Tm que no están dispuestas en ningún orden particular (por ejemplo, ascendente o descendente), pero en su lugar se dictan por su composición de bases particular a lo largo de la secuencia diana.

Parte experimental

30 Ejemplo 1

Diseño de una diana de control interno sintética con estructura secundaria reducida, amplificación con cebadores de LATE-PCR, y detección usando sondas de señalización y amortiguación

Se generó una secuencia aleatoria de 60 % de nucleótidos G y C y 40 % de nucleótidos A y T.

5'CTTCACGTAATACAAGAACCAGCGGGGGTTCGGGGCACACTCACCACGCGGGGCCGGTGTGGCCCTA
AGCCGAGTCGAGACTTGTCCGGTAGTGCGCCTGGTTCTGAGCGGTGTGGAGTGGGTGCGCCCTACGTGG
GGGAGGCTTCACGAGCTTCCGAGTTGCATCTGTGAGTGGGAGCTTAACGAGCGAGCTGCTCCAGTATGT
GGCATGGACACGGTCCGCGCCCTCAGAATGCGACGGCAAAATGCTCGCGAGCTGCGGTCCGCGGTACCG
ATGGTACCAGATAAGAGACCTGTTAGGCAACCTGTTCAACGGGGCATGCTCTCAAGTGGATAGACTCCA
CCAGTGTCTGGAGGACTCGGCATGTCTCGGAGGTGAGGCGATGGCAGATGCTCCCTATTGCGACTTCC
GGGCTCGAAGGAACCGATGCCAAAAGCAACAGCCAGAGACACTTTGTGCGCCGACTGCCTAGGTCTGGT
CAGCAATTCCCAATACAGC-3' (SEQ ID NO: 58)

Los cebadores de LATE-PCR se seleccionaron que amplificaran un segmento de 82 nucleótidos de la diana control (Figura 15, izquierda). Para asegurar que las sondas con muy baja T_m (intervalo 20 a 40 °C) hibridaría eficazmente, se modificó la parte de la diana entre el cebador y las secuencias complementarias al cebador para prevenir alguna formación de horquilla prevista. Algunos nucleótidos, principalmente nucleótidos C, en los tallos de horquilla previstos se sometieron a delección o se alteraron. Los nucleótidos G y A adicionales, así como algunos nucleótidos T se añadieron a esa región para permitir la posible hibridación de una segunda sonda y para separar además los segmentos dirigidos a sonda de las regiones cebador (Figura 15, derecha). Las horquillas con T_m alta se eliminaron de manera similar de otras partes de la diana para posible futuro diseño de cebador y sonda. La secuencia de la diana de control interno era

5'CTTCACGTAATACAAGAAGCAGCGGGTTCGGGAGTGTACAGTGGGTGCGGTGTGTAAGAGTCGAG
ACTTGTGCGGGTAGTCTGGTTGTGTGGTCAACCGCAATTAGCTTGGGTCAACGAGCTTCCGAGTTGCATC
TGTGAGTTTAAACGAGAGCCAGTATGTAGCGTCAGAATGCAGAATCAGCAGGCACGTGTCCGCCGTAGAT
GGTACCAGATAAGAGACCTGTTAGGCAACCTGTTCAAAATACTACTCTGGAGGACTGAGATGGCAGAT
GCTCCACATTGCGACTTCTGCCCTTGATAGTTATATTGAAAGTAAATAGTAGATAGTAGATGATGATA
TAAACAACAGCCAGAGACACTTTGTGCGCCGACTGCCTATCAAATTCCTCAATACAGC-3' (SEQ ID
NO: 59)

Se sintetizó un ADN sintético con la secuencia modificada de 400 pares de bases, se insertó en el plásmido pIDTSMARKAN, se clonó y se purificó por Tecnologías de ADN integradas (Coralville, Iowa, EE.UU.). Unas estimadas 100 o 1.000 copias del plásmido se añadieron a una mezcla de reacción que contenía concentraciones finales de 50 nM de cebador limitante (SEQ ID NO: 9), 1.000 nM de cebador en exceso (SEQ ID NO: 10), 100 nM de sonda señalizadora (SEQ ID NO: 52), 300 nM de sonda de amortiguación (SEQ ID NO: 53), 0,3 mM de dNTP, 3 mM de magnesio, tampón de PCR IX Platinum Taq y 1,5 unidades de ADN polimerasa Platinum Taq (Life Technologies) en un volumen final de 25 microlitros. Se usó un ciclador térmico Stratagene Mx3005P para llevar a cabo un programa de 95 °C durante 3 minutos, luego 50 ciclos de 95 °C durante 10 segundos y 75 °C durante 40 segundos, seguido de 10 minutos a 25 °C y una fusión de 25 °C a 95 °C en etapas de 1 °C cada 30 segundos con detección de fluorescencia de Quasar 670 en cada etapa.

La Figura 16 muestra la derivada negativa de los valores de fluorescencia. El valle a 27 °C indica la T_m aproximada de la sonda amortiguadora cuando se funde de la diana amplificada y permite que la sonda de señalización hibridada emita mayores niveles de fluorescencia. El pico a 30 °C indica que la T_m de la sonda señalizadora con la diana amplificada. Las líneas sólidas representan muestras replicadas con unas 1.000 dianas iniciales estimadas y las líneas discontinuas representan muestras replicadas con unas 100 dianas estimadas. Las gráficas de solapamiento indican que la diana amplificada ha alcanzado los niveles de saturación con la sonda señalizadora (la diana está en exceso en todos los casos); un resultado deseable para la consistencia de la señal control.

Ejemplo 2

Detección multiplex de resistencia a fármacos en tres genes diferentes para cepas de *M. tuberculosis*.

Se usó un ensayo de LATE-PCR tetraplex para detectar la resistencia a fármacos en los tres genes promotor *inhA* (región promotora), *katG*, y *rpoB*, más un 1.º control interno amplificable y un 2.º control interno no amplificable. La localización de cada diana (Véase la Tabla 1) se basó en la secuencia Genbank NC_000962.3.

Tabla 1. Secuencias diana

	Secuencia 5' a 3'	
secuencia <i>rpoB</i>	ACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTTCGCCGCGAT CAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGT CGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTGCGCGCTGGGGCCCCGGGCTGTGTACGTGA GCGTGCCGGGCTGGAG	SEQ ID NO: 61

(continuación)

	Secuencia 5' a 3'	
secuencia katG	GCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAGCGG CATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGGACAACAGTTTCTCGAGATCC TGTACGGCTACGAGTGGGAGCT	SEQ ID NO: 62
secuencia promotor inhA	TCGCAGCCACGTTACGCTCGTGGACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGACGATA GGTTGTCGGGTGACTGCCACAGCCACTGAAGGGGCCAAACCCCATTCGTATCCCGTT CAGTCCTGGTTACCGGAGGAA	SEQ ID NO: 63
secuencia control interno	GGCACGATGCTCCACATTGCGACTTCTGCCCTTGATAGTTATATTGAAAGTAAATAGTA GATAGTAGATGATGATATAACAACAGCCAGAGACACTTTGTGCGCCGAA	SEQ ID NO: 64

La secuencia diana de *rpoB* es de 191 pares de bases de longitud y se localiza en los nucleótidos 761011 a 761201. Las seis sondas usadas para esta diana cubren 101 pares de bases dentro de la diana entre los nucleótidos 761078 a 761178. Esto cubre la región de 81 pares de bases conocida como la RRDR responsable de la resistencia a rifampin en *M. tuberculosis*. La secuencia diana de *katG* es de 139 pares de bases de longitud y se localiza en los nucleótidos 2155084 a 2155222. Las dos sondas usadas para esta diana cubren 31 pares de bases dentro de la diana entre los nucleótidos 2155160 a 2155190 que incluyen los condones 309 a 317, en particular el codon 315. La secuencia diana del promotor *inhA* es de 139 pares de bases de longitud y se localiza en los nucleótidos 1673371 a 1673509. Las dos sondas usadas para esta diana cubren 31 pares de bases dentro de la diana entre los nucleótidos 1673419 a 1673449. Las sondas cubren 21 nucleótidos de la región promotora en particular los sitios de mutación -15 y -8 y los tres primeros condones del gen del promotor *inhA*.

Los resultados se muestran en las Figuras 6-11.

Para la región promotora del promotor *inhA* todas las cepas eran sensibles a fármaco mientras que las cepas 16 y 22 que contenían un cambio de nucleótido único (C/T) en la posición menos 15, y la cepa 21 que tenía un cambio en la posición menos 8 (T/C) eran resistentes a fármacos. Para el gen *katG* las cepas 1, 5, 11, 14, 21 y 22 eran sensibles a fármacos mientras que todas las otras cepas (S315T, una serina localizada en la posición de aminoácido 315 cambiada a una tirosina) eran resistentes. Para el gen *rpoB*, las cepas 1, 19, y 22 eran sensibles a fármacos mientras que todas las otras cepas que contenían diversas mutaciones eran resistentes. Los componentes y las condiciones de reacción eran las siguientes:

Para el gen promotor *inhA* (región promotora)

Cebador limitante: 5' TTCCGGTAACCAGGACTGAACGGGATACGAATGGGGGTTTGG (SEQ ID No.5)
Cebador en exceso: 5' TCGCAGCCACGTTACGCTCGTGGACATAC (SEQ ID No.6)

Sondas usadas para el promotor *inhA*
promotor *inhA_ON*

5' BHQ2-AAAAAAAAAAAAAAAAAGGCAGTCATCCCGTT-QSR670 (SEQ ID No.19) promotor *inhA_OFF*
5' BHQ2-TTACAGCCTATCGCCTCGC-C3 Espaciador (SEQ ID No.20)

Para el gen *katG*

Cebador limitante: 5' AGCGCCCACTCGTAGCCGTACAGGATCTCGAGGAAAC (SEQ ID No.3)
Cebador en exceso: 5' TCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCAC (SEQ ID No.4)

Para el 1er control interno

Cebador limitante de control interno
TTCGGCGCACAAAGTGTCTCTGGCTGTTGT (SEQ ID NO: 9)

Cebador en exceso de control interno
GGCACGATGCTCCACATTGCGACTTC (SEQ ID NO: 10)

Sondas usadas para el gen *katG* *katG_ON*

5' QSR670-ACTCGCGTCCTTACCCAAAAAAAAAAAAAAAA-BHQ2 (SEQ ID No. 17)
katG_OFF 5' ATGTCGGTGGTGA-BHQ2 (SEQ ID No. 18)

Para el gen *rpoB*

Cebador limitante: 5' CTCCAGCCAGGCACGCTCACGTGACAGACCG (SEQ ID No.1)

Cebador en exceso: 5' ACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTT (SEQ ID No.2)

5

Sondas usadas para el gen *rpoB*

rpoB Sonda 1 OFF

BHQ2-CTGGTTGGTGCAGAAG-C3 Espaciador (SEQ ID NO: 11)

10

rpoB Sonda2 ON

BHQ2-TCAGGTCCATGAATTGGCTCAGA-QSR670 (SEQ ID NO: 12)

rpoB Sonda3 OFF

BHQ2-CAGCGGGTGTGTT-C3 Espaciador (SEQ ID NO: 13)

15

rpoB Sonda4 ON

BHQ2-ATGCGCTTGTGGATCAACCCCGAT-QSR670 (SEQ ID NO: 14)

20

rpoB Sonda5 ON

QSR670-AAGCCCCAGCGCCGACAGTCGTT-BHQ2 (SEQ ID NO: 15)

rpoB Sonda6 OFF

ACAGACCGCCGG-BHQ2 (SEQ ID NO: 16)

25

1.º control interno ON

QSR670-ATTCTATTATTTATTTTCAT-BHQ2 (SEQ ID NO: 52)

Control interno OFF

ATCATTATTTACTA-BHQ2 (SEQ ID NO: 53)

30

2.º control interno

Cadena fluor de control interno

QSR670-CAGCTGCACTGGGAAGGGTGCAGTCTGACC-C3 (SEQ ID NO: 54)

35

Cadena amortiguadora de control interno

GGTCAGACTGCACCCCTCCAGTGCAGCTG-BHQ2 (SEQ ID NO: 55)

PrimeSafe

PrimeSafe Sentido

40

Dabcil-GGATCAGATTAGCACTGATGTA-Dabcil (SEQ ID NO: 56)

PrimeSafe Antisentido

Dabcil-TACATCAGTGCTAATCTGATCC-Dabcil (SEQ ID NO: 57)

45

Las amplificaciones por LATE-PCR se llevaron a cabo en un volumen de 25 µl que consistía en tampón de IX PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), 3 mM de MgCl₂, 300 nM de dNTP, 50 nM de cebador limitante y 1000 nM de cebador en exceso para cada conjunto de cebador, 2,0 unidades de ADN Polimerasa Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA), 100 nM de sonda On y 300 nM de sonda Off para todas las sondas excepto para la sonda del 1er control interno que era 50 nM de sonda On con 150 nM de sonda Off. Cada cadena de PrimeSafe II se añadió a 600 nM mientras que la cadena fluor para el 2.º control interno era 50 nM y la cadena amortiguadora era 150 nM. Para cada cepa ensayada se usaron aproximadamente 1.000 genomas equivalentes y las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado.

50

El perfil térmico para la reacción de amplificación era el siguiente: 98 °C/3 min para 1 ciclo, seguido de 98 °C/10 s-75 °C/40 s para 60 ciclos, seguido de 10 min a 75 °C. Esto le sigue una fusión que comienza a 25 °C con incrementos de 1 °C en intervalos de 30 s a 98 °C

55

Al final de los 60 ciclos las hibridaciones de la diana sonda se analizaron por análisis de la curva de fusión usando la primera derivada para cada fluor por separado para las temperaturas entre 25 °C a 95 °C. Los resultados se presentan en las Figuras 6-11 como la primera derivada para las señales de fluorescencia de todas las sondas para los genes promotor *inhA*, *katG*, *rpoB*, más el 1.º control interno y el 2.º control interno todos en el mismo fluoróforo coloreado, Quasar 670, en función de la temperatura. La Figura 6 muestra las señales de los controles internos 1.º y 2.º en ausencia de ADN de *M. tuberculosis* añadido. Las reacciones de las Figuras 7-11 se iniciaron con aproximadamente 1.000 copias de ADN genómico de diferentes cepas de *M. tuberculosis*.

60

65 Ejemplo 3

Detección multiplex de resistencia a fármacos en tres genes diferentes para cepas de *M. tuberculosis*.

Se usó un ensayo de LATE-PCR tetraplex para detectar la resistencia a fármacos en los tres genes promotor *inhA* (región promotora), *katG*, y *rpoB*, más un 1.^{er} control interno amplificable y un 2.^o control interno no amplificable. Los resultados se muestran en las Figuras 24-27. En la Figura 24, las líneas 190 son la cepa H37Rv sensible a fármacos para todos los tres genes mientras que la línea 191 es la cepa resistente para solamente *katG* (S315T, una serina localizada en la posición de aminoácidos 315 cambiada a una tirosina). Para la Figura 25, la cepa sensible es la línea 200 mientras la cepa solamente resistente al promotor *inhA*, la línea 201 contenía un cambio de nucleótido único (T/C) en la posición menos 8 en la región del promotor. Para la Figura 26, la línea 210 es la cepa sensible mientras que la línea 211 contiene solamente una mutación de *rpoB* (D516V, un ácido aspártico a valina). Para la Figura 27, la línea 220 es la cepa sensible, mientras que la línea 221 contiene solamente una mutación de *rpoB* doble (D516A, ácido aspártico a alanina y H526N, histidina a asparagina).

las amplificaciones por LATE-PCR se llevaron a cabo en un volumen de 25 µl en una mezcla de reacción que contenía tampón de IX PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), 3 mM de MgCl₂, 300 nM de dNTP, 600 nM del PrimeSafe 1, 50 nM de cebador limitante y 1.000 nM de cebador en exceso para cada conjunto de cebador, 2,0 unidades de ADN Polimerasa Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA), 50 nM de sonda On y 150 nM de sonda Off para todas las sondas excepto para la *rpoB* Sonda 5_On (25 nM), *rpoB* Sonda 5_On_G (75 nM). Para cada cepa ensayada se usaron aproximadamente 1.000 genomas equivalentes y las reacciones de amplificación se realizaron por duplicado. El perfil térmico para la reacción de amplificación era el siguiente: 97 °C/5 s-75 °C/45 s para 60 ciclos, seguido de 10 min a 75 °C. Esto le sigue una fusión que comienza a 25 °C con incrementos de 1 °C en intervalos de 20 s a 98 °C. Al final de los 60 ciclos las hibridaciones de diana sonda se analizaron por análisis de la curva de fusión usando la primera derivada para cada fluoróforo por separado para las temperaturas entre 25 °C a 95 °C. Los resultados se presentan en las Figuras 24-27 como la primera derivada para las señales de fluorescencia de todas las sondas para los genes promotor *inhA*, *katG*, *rpoB*, más el 1er control interno y el 2.^o control interno todos en el mismo fluoróforo coloreado, Quasar 670, en función de la temperatura.

Ejemplo 3

Ensayo de detección de mutación usando 2 colores en cepas diferentes de *M. tuberculosis* para el gen de pirazinamida

Se usó un ensayo de LATE-PCR monoplex (Diseño I) para detectar las diferencias mutacionales de la cepa sensible en el gen de pirazinamida. El amplicón de 561 pares de bases incluye la secuencia codificante entera del gen *pncA*. Se recubre con 31 sondas On de luz y sondas Off de luz en dos colores fluorescentes (Cal Red 610 y Quasar 670). Los pares de sondas en un solo color se colocan linealmente sobre aproximadamente la mitad de la secuencia diana, dando como resultado el análisis de la secuencia diana en dos segmentos fluorescentes separados. Las señales fluorescentes características (primeras derivadas) de una diana tipo silvestre normal (sensible a PZA) y unas pocas de las muchas posibles secuencias no tipo silvestre (resistente a PZA) se muestran en las Figuras 28-29.

Las Figuras 28A y 28B muestran los resultados en fluorescencia de Cal Red 610 y Quasar 670 respectivamente, en las que las líneas 230 y 232 son cepa sensible H37Rv mientras que las líneas 231 y 233 son la cepa mutacional que contiene un cambio de base único de guanina (G) en la posición tres a una citosina (C) para el gen de pirazinamida. En la Figura 28A ambos patrones son el mismo indicando no mutación dentro de esta parte del gen. Mientras que los patrones en la Figura 28B son claramente diferentes mostrando la presencia de una mutación. Las Figuras 29A y 29B muestran los resultados de una comparación de la misma cepa sensible pero con una cepa mutacional diferente que contenía una inserción de una timidina (T) entre la posición del nucleótido 321 y 322. La Figura 29A, muestra los resultados en Cal Red 610 mientras que la línea 240 es la cepa sensible H37Rv mientras que la línea 241 es la cepa mutacional que es plenamente diferente del patrón fluorescente de la cepa sensible mostrando la presencia de una mutación. Los resultados de Quasar 670 se muestran en la Figura 29B, la línea 242 es la cepa sensible y la línea 243 es la cepa mutacional y no hay diferencia entre los patrones fluorescentes en esta parte del gen.

Las amplificaciones por LATE-PCR se llevaron a cabo en un volumen de 25 µl que consistía en tampón de IX PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), 3 mM de MgCl₂, 300 nM de dNTP, 600 nM del PrimeSafe 1, 50 nM de cebador limitante y 1.000 nM de cebador en exceso, 1,5 unidades de ADN Polimerasa Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA), 50 nM de cada sonda On y 150 nM de cada sonda Off. Para cada cepa ensayada se usaron aproximadamente 1.000 genomas equivalentes y se realizaron las reacciones de amplificación. El perfil térmico para la reacción de amplificación era el siguiente: 97 °C/10 s-75 °C/45 s para 60 ciclos, seguido de 10 min a 75 °C, seguido de 10 min a 25 °C. Esto le sigue una fusión que comienza a 25 °C con incrementos de 1 °C en intervalos de 20 s a 98 °C. Al final de los 60 ciclos las hibridaciones de diana sonda se analizaron por análisis de la curva de fusión usando la primera derivada para cada fluor por separado para las temperaturas entre 25 °C a 95 °C. Los resultados se presentan en las Figuras 28-29 como la primera derivada para las señales de fluorescencia de todas las sondas en función de la temperatura.

Ejemplo 4

Ensayo de detección de mutación usando 3 colores en cepas diferentes de *M. tuberculosis* para el gen de

pirazinamida

Se usó un ensayo de LATE-PCR monoplex para detectar las diferencias mutacionales de la cepa sensible en el gen *pncA* y una parte de la región promotora 5' en dirección 5'. En este caso la longitud total de la diana era de 685 nucleótidos. El amplicón se recubrió con 35 sondas On de luz y sondas Off de luz en tres colores fluorescentes (Cal Orange 560, Cal Red 610 y Quasar 670). Los resultados se muestran en las Figuras 30-32 en comparación con los obtenidos con el ensayo de dos colores. Las Figuras 30A y 30B muestran los resultados del ensayo de dos colores (véase el ejemplo 3) en el que una cepa mutacional (un solo cambio de base en la posición 307 de nucleótido, una timidina (T) a una cisteína (C)) no mostró una diferencia en los patrones fluorescentes de la cepa sensible en cualquier color. Las Figuras 30A y 30B muestran los resultados del ensayo de 2 colores en Cal Red 610 y Quasar 670 respectivamente, para la cepa sensible (líneas 250 y 252) y la cepa mutacional (líneas 251 y 253). Debido al fracaso del ensayo de dos colores para resolver esta diferencia mutacional, el ensayo de 3 colores se usó sobre estas mismas cepas con los resultados mostrados en las Figuras 31A-C. Los resultados para dos de los colores (Cal Orange 560, figura 26A y Quasar 670, figura 31B) muestran patrones fluorescentes idénticos mientras que el tercer color (Cal Red 610, figura 31C) tiene dos señales diferentes, mostrando así la presencia de la mutación. En la figura 31A, la cual muestra los resultados de Cal Orange 560 la línea 260 es la cepa sensible mientras que la línea 261 es la cepa mutacional. Los resultados en Quasar 670 están en la figura 31B con la línea 262 (cepa sensible), la línea 263 (cepa mutacional). La diferencia clara en los patrones se muestra en la figura 31C, Cal Red 610 donde la línea 264 es la cepa sensible y la línea 265 la cepa mutacional por tanto el ensayo de 3 colores era capaz de distinguir esta cepa mutacional mientras que el ensayo de 2 colores no. Los resultados adicionales de este ensayo de 3 colores se muestran en las Figuras 32A-C. Las Figuras 32A-C compara los resultados de una cepa mutacional que contenía una sola delección de par de bases de un nucleótido de guanina (G) en la posición veintidós con la cadena sensible. La figura 32A, el Cal Orange 560 donde la línea 271 es la cepa mutacional mostró una fuerte alteración del patrón fluorescente en comparación con la cepa sensible (línea 270) indicando la presencia de una mutación. Los resultados de los otros fluor Cal Red 610 (figura 32B) y Quasar 670 (figura 32C) mostraron patrones fluorescentes casi idénticos para ambas cepas (cepa sensible, líneas 272 y 274 y cepas mutacionales, líneas 273 y 275).

Las amplificaciones por LATE-PCR se llevaron a cabo en un volumen de 25 µl que consistía en tampón de IX PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), 3 mM de MgCl₂, 300 nM de dNTP, 600 nM del PrimeSafe 1, 50 nM de cebador limitante y 1.000 nM de cebador en exceso, 1,5 unidades de ADN Polimerasa Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA), 50 nM de cada sonda On y 150 nM de cada sonda Off y 25 nM de la cadena On de control interno con 75 nM de la cadena Off interna. Para cada cepa ensayada se usaron aproximadamente 1.000 genomas equivalentes y se realizaron las reacciones de amplificación. El perfil térmico para la reacción de amplificación era el siguiente: 97 °C/7 s-75 °C/45 s para 60 ciclos, seguido de 10 min a 75 °C, seguido de 10 min a 25 °C. Esto le sigue una fusión que comienza a 25 °C con incrementos de 1 °C en intervalos de 20 s a 98 °C. Al final de los 60 ciclos las hibridaciones de diana sonda se analizaron por análisis de la curva de fusión usando la primera derivada para cada fluor por separado para las temperaturas entre 25 °C a 95 °C. Los resultados se presentan en las Figuras 30-32 como la primera derivada para las señales de fluorescencia de todas las sondas más los controles internos en función de la temperatura.

Secuencias**Cebadores**cebador limitante de *rpoB*

CTCCAGCCAGGCACGCTCACGTGACAGACCG (SEQ ID NO: 1)

cebador en exceso de *rpoB*

ACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTT (SEQ ID NO: 2)

cebador limitante de *katG*

AGCGCCCACTCGTAGCCGTACAGGATCTCGAGGAAAC (SEQ ID NO: 3)

cebador en exceso de *katG*

TCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCAC (SEQ ID NO: 4)

cebador limitante del promotor *inhA*

TTCCGGTAACAGGACTGAACGGGATACGAATGGGGTTTGG (SEQ ID NO: 5)

cebador en exceso del promotor *inhA*

TCGCAGCCACGTTACGCTCGTGGACATAC (SEQ ID NO: 6)

cebador limitante de *pncA*

AACTGCCCCGCCAGTCGCCCGAACGTATGGTGGACGT (SEQ ID NO: 7)

cebador en exceso de *pncA*

GTTTCATCCCGGTTCCGGCGGTGCCA (SEQ ID NO: 8)

Cebador limitante de control interno

TTCGGCGCACAAAGTGTCTCTGGCTGTTGT (SEQ ID NO: 9)

5 Cebador en exceso de control interno

GGCACGATGCTCCACATTGCGACTTC (SEQ ID NO: 10)

Sondas

10 rpoB_Sonda1_OFF

BHQ2-CTGGTTGGTGCAGAAG-C3 Espaciador (SEQ ID NO: 11)

rpoB_Sonda 1a_OFF

BHQ2-CTGGTTGGTGTGAAG-C3 Espaciador (SEQ ID NO:100)

15

rpoB_Sonda2_ON

BHQ2-TCAGGTCCATGAATTGGCTCAGA-QSR670 (SEQ ID NO: 12)

rpoB_Sonda3_OFF

20 BHQ2-CAGCGGGTTGTT-C3 Espaciador (SEQ ID NO: 13)

rpoB_Sonda4_ON

BHQ2-ATGCGCTTGTGGATCAACCCCGAT-QSR670 (SEQ ID NO: 14)

25 rpoB_Sonda4a_ON

BHQ2-ATGCGCTTGTGGTCAACCCCGAT-QSR670 (SEQ ID NO:101)

rpoB_Sonda5_ON

30 QSR670-AAGCCCCAGCGCCGACAGTCGTT-BHQ2 (SEQ ID NO: 15)

rpoB_Sonda5a_ON

QSR670-AAGCCCCAGCGCCGTCAGTCGTT-BHQ2 (SEQ ID NO: 102)

35 rpoB_Sonda6_OFF

ACAGACCGCCGG-BHQ2 (SEQ ID NO: 16)

katG_ON

40 QSR670-ACTCGCGTCCTTACCCAAAAAAAAAAAAAAAAA-BHQ2 (SEQ ID NO: 17)

katG_OFF

ATGTCGGTGGTGA-BHQ2 (SEQ ID NO: 18)

promotor inhA_ON

45 BHQ2-AAAAAAAAAAAAAAAGGCAGTCATCCCGTT-QSR670 (SEQ ID NO: 19)

promotor inhA_OFF

BHQ2-TTACAGCCTATCGCCTCGC-C3 (SEQ ID NO: 20)

50 pncA_sonda_025_040_ON

CR610-TCGGTTTGCAGCTCCTGAGA-BHQ2 (SEQ ID NO: 21)

pncA_sonda_041_054_OFF

GCCAGCGTCGAGTT-BHQ2 (SEQ ID NO: 22)

55

pncA_sonda_055_074_ON

CR610-CGCTGGAGGAGATGTGCACCAAAAAAAAAAAAAAAAAA-BHQ2 (SEQ ID NO: 23)

pncA_sonda_075_100_OFF

60 TGTGTTGGTCGATACTACCGTCGCCG-BHQ2 (SEQ ID NO: 24)

pncA_sonda_101_118_ON

CR610-AGGGTGGACTTGACAGCGGGCT-BHQ2 (SEQ ID NO: 25)

65 pncA_sonda_119_132_OFF

GCCACTAGGGTGCT-BHQ2 (SEQ ID NO: 26)

pncA sonda 133 146 ON
CR610-AATACGCAATGGCTTGTT-BHQ2 (SEQ ID NO: 27)

5 pncA sonda 147 156 OFF
GAGGACGCGG-BHQ2 (SEQ ID NO: 28)

pncA sonda 157 175 ON
CR610-GTTTGTGTGCGCTAGATGGCCAC-BHQ2 (SEQ ID NO: 29)

10 pncA sonda 176 188 OFF
TTGCCACCGATCA-BHQ2 (SEQ ID NO: 30)

pncA sonda 189 204 ON
CR610-TCGTGATGTGGTTGGTAGA-BHQ2 (SEQ ID NO: 31)

15 pncA sonda 205 215 OFF
GCGTCGATGAG-BHQ2 (SEQ ID NO: 32)

pncA sonda 216 229 ON
CR610-ATGCTGTGGCAATGCGAT-BHQ2 (SEQ ID NO: 33)

20 pncA sonda 230 241 OFF
ACTGCTGAATTG-BHQ2 (SEQ ID NO: 34)

25 pncA sonda 242 262 ON
CR610-TAAGTCGATGAGAACGGTACGCCTA-BHQ2 (SEQ ID NO: 35)

pncA sonda 263 276 OFF
AGCGGCTTCGAAGG-BHQ2 (SEQ ID NO: 36)

30 pncA sonda 277 293 ON
QSR670-AACCTACACCGGAGCGTACTT-BHQ2 (SEQ ID NO: 37)

pncA sonda 294 307 OFF
GTTCTACAAGGGTG-BHQ2 (SEQ ID NO: 38)

35 pncA sonda 308 331 ON
QSR670-TAGGACACGTTGGCAGTTGAGGCGGTAAAAAAAAA-BHQ2 (SEQ ID NO: 39)

40 pncA sonda 332 353 OFF
GCGCGGACTTCTATCCCAGTCT-BHQ2 (SEQ ID NO: 40)

pncA sonda 354 372 ON
QSR670-TGTGCGTCAGTGGTACTTCCGCAAAAAAAAAAAAAA-BHQ2 (SEQ ID NO: 41)

45 pncA sonda 373 388 ON
QSR670-GTGTGCTGGCTACCGCATAC-BHQ2 (SEQ ID NO: 42)

pncA sonda 389 405 OFF
ACACCGGACTATTCTTCG-BHQ2 (SEQ ID NO: 43)

50 pncA sonda 406 427 ON Bovis
QSR670-CCCGGGTGACGACTTCTCCGGC-BHQ2 (SEQ ID NO: 44)

55 pncA sonda 428 448 OFF
AACCAAGGACTTCCACATCGA-BHQ2 (SEQ ID NO: 45)

pncA sonda 449 478 ON
QSR670-AACGAAGCGGTGGACTATCGTTACGTTGTGGCTT-BHQ2 (SEQ ID NO: 46)

60 pncA sonda 479 501 OFF 2
CGCGCTATCAGTGACTACCTGGC-BHQ2 (SEQ ID NO: 47)

pncA sonda 502 521 ON
QSR670-CCGGTGGTGTGTGCTGGCAAAAAAAAAAAAAA-BHQ2 (SEQ ID NO: 48)

65

pncA sonda 522 546 OFF

TGTGAGGGTGGTTCGTTGGCGGTAA-BHQ2 (SEQ ID NO: 49)

5 pncA sonda 547 569 ON

QSR670-TTTCGTTGACGTGCAGAACGACTTCAA-BHQ2 (SEQ ID NO: 50)

pncA sonda 570 585 OFF

ATGCGGGCGTTGATCA-BHQ2 (SEQ ID NO: 51)

10

1.º control interno ON

QSR670-ATTCTATTATTTATTTTCAT-BHQ2 (SEQ ID NO: 52)

1.º control interno OFF

15 ATCATTATTTACTA-BHQ2 (SEQ ID NO: 53)

marcadores internos

2.º control interno ON

20 QSR670-CAGCTGCACTGGGAAGGGTGCAGTCTGACC-C3 (SEQ ID NO: 54)

2.º Control interno OFF

GGTCAGACTGCACCCTTCCCAGTGCAGCTG-BHQ2 (SEQ ID NO: 55)

25 **PrimeSafe II**

PrimeSafe Sentido

Dabcil-GGATCAGATTAGCACTGATGTA-Dabcil (SEQ ID NO: 56)

30 PrimeSafe Antisentido

Dabcil-TACATCAGTGCTAATCTGATCC-Dabcil (SEQ ID NO: 57)

PrimeSafe PS1

35 Dabcil-GAATAATATAGCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCTATATTATTC-Dabcil (SEQ ID NO: 60)

sondas de Diseño II de pncA

pncA-diseñoII 196-215

40 QSR670-AACGCCGCGCTGGAGGAGATGCTT-BHQ2 (SEQ ID NO: 65)

pncA-diseñoII 216-230

GGCCGATACCACCGT-BHQ2 (SEQ ID NO: 66)

pncA-diseñoII 406-425

45 QSR670-ACCATCGGAGCGTACAGCGGCTGT-BHQ2 (SEQ ID NO: 67)

pncA-diseñoII 426-440

CTACAAGGGTGCCTA-BHQ2 (SEQ ID NO: 68)

pncA-diseñoII 161-180

50 QSR670-ACAGTTGGTTTGCAGCTCCTGAGT-BHQ2 (SEQ ID NO: 69)

pncA-diseñoII 181-195

55 GCACTGCCGGCGTCG-BHQ2 (SEQ ID NO: 70)

pncA-diseñoII 546-565

QSR670-AAGACCCGGGTGATCACTTCTCTT-BHQ2 (SEQ ID NO: 71)

pncA-diseñoII 566-580

60 AAGGACTTCCACATC-BHQ2 (SEQ ID NO: 72)

pncA-diseñoII 616-635

QSR670-AACGCTATCAGTGACTACCTGGTT-BHQ2 (SEQ ID NO: 73)

pncA-diseñoII 636-650

65 CGCTGCGTTGGCTCG-BHQ2 (SEQ ID NO: 74)

pncA-diseñoll 441-460
QSR670-AATCGGCAATTGAGTCGGTGT-TT-BHQ2 (SEQ ID NO: 75)

5 pncA-diseñoll 461-475
CAGTCTGGACGCG-BHQ2 (SEQ ID NO: 76)

pncA-diseñoll 266-285
10 CO560-TAGCGGTACGCAATGGCTTGGCCTA-BHQ1 (SEQ ID NO: 77)

pncA-diseñoll 286-300
AGACGGCCGAGGAC-BHQ1 (SEQ ID NO: 78)

pncA-diseñoll 581-600
15 CO560-ACACCATCACGTCTGGCAACCGT-BHQ1 (SEQ ID NO: 79)

pncA-diseñoll 601-615
CCGGAGCGGCGGGCT-BHQ1 (SEQ ID NO: 80)

20 pncA-diseñoll 476-495
CO560-ACCTCTCGGCGTGGACTTCTATCCGT-BHQ1 (SEQ ID NO: 81)

pncA-diseñoll 496-510
25 ATTGCGTTAGCGGTA-BHQ1 (SEQ ID NO: 82)

pncA-diseñoll 685-705
CO560-TTTCGTTGACGTGCAGAAATGACAA-BHQ1 (SEQ ID NO: 83)

pncA-diseñoll 706-720
30 TGCGGGTGTGGTCA-BHQ1 (SEQ ID NO: 84)

pncA-diseñoll 371-390
CO560-AAAGAATGGTACGTCACTGCTGTT-BHQ1 (SEQ ID NO: 85)

35 pncA-diseñoll 391-405
TCGGAGGAGTTGACG-BHQ1 (SEQ ID NO: 86)

pncA-diseñoll 511-530
40 CR610-ACTTCCTCGTCGTGGCCATCGCGT-BHQ2 (SEQ ID NO: 87)

pncA-diseñoll 531-345
CGGCACACTGGACTA-BHQ2 (SEQ ID NO: 88)

pncA-diseñoll 336-355
45 CR610-AGCGCGGCGTCGATGAGGTTGACT-BHQ2 (SEQ ID NO: 89)

pncA-diseñoll 356-370
AATTGGCTGCGGTAA-BHQ2 (SEQ ID NO: 90)

50 pncA-diseñoll 651-670
CR610-AATCGCTGGCGGTAAGTGGTGGTT-BHQ2 (SEQ ID NO: 91)

pncA-diseñoll 671-685
55 TTCTGCGAGGGTGGC-BHQ2 (SEQ ID NO: 92)

pncA-diseñoll 301-320
CR610-AACATCGATCATTGTGTGCGCCTT-BHQ2 (SEQ ID NO: 93)

pncA-diseñoll 321-335
60 TGTGGTCGGTATTGC-BHQ2 (SEQ ID NO: 94)

pncA-diseñoll 231-250
CR610-AAGACTTGACAGCGGGTGTGTCTT-BHQ2 (SEQ ID NO: 95)

65 pncA-diseñoll 251-265
ACTAGGGTGCTGGTG-BHQ2 (SEQ ID NO: 96)

pncA-diseñoll 721-740

CR610-TTCCGAACGTATGGTGGATGTAAA-BHQ2 (SEQ ID NO: 97)

5 pncA-diseñoll 741-755
TGCTTGGGCAGTTGC-BHQ2 (SEQ ID NO: 98)

pncA-diseñoll 356-370 B

AATTGGCTGTGGCGG-BHQ2 (SEQ ID NO: 99)

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BRANDEIS UNIVERSITY

15 <120> ENSAYO DE DETECCIÓN DE DIANA MULTIPLEX

<130> BRAND-33608/WO-1/ORD

20 <150> US 61/906.267

<151> 19-11-2013

<160> 103

25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Sintético

35 <400> 1
ctccagccag gcacgctcac gtgacagacc g

31

<210> 2

<211> 28

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

45 <400> 2
acgtggaggc gatcacaccg cagacgtt

28

<210> 3

<211> 37

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

55

<400> 3
agcgccact cgtagccgta caggatctcg aggaaac

37

<210> 4

<211> 28

<212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> Sintético

	<400> 4 tcttgggctg gaagagctcg tatggcac	28
5	<210> 5 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintético	
	<400> 5 ttccggtaac caggactgaa cgggatacga atgggggttt gg	42
15	<210> 6 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintético	
25	<400> 6 tcgcagccac gttacgctcg tggacatac	29
30	<210> 7 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
35	<400> 7 aactgcccgg ccagtcgccc gaacgtatgg tggacgt	37
40	<210> 8 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
45	<400> 8 gttcatcccg gttcggcggg gccca	24
50	<210> 9 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
55	<400> 9 ttcggcgac aaagtgtctc tggctgtgt	30
60	<210> 10 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Sintético	

	<400> 10 ggcacgatgc tcccacattg cgacttc	27
5	<210> 11 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintético	
	<400> 11 ctggttggtg cagaag	16
15	<210> 12 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintético	
25	<400> 12 tcaggtccat gaattggctc aga	23
30	<210> 13 <211> 12 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
35	<400> 13 cagcgggttg tt	12
40	<210> 14 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
45	<400> 14 atgcgcttgt g gatcaaccc cgat	24
50	<210> 15 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
55	<400> 15 aagccccagc gccgacagtc gtt	23
60	<210> 16 <211> 12 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Sintético	

	<400> 16 acagaccgcc gg	12
5	<210> 17 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintético	
	<400> 17 actcgcgtcc ttacccaaaa aaaaaaaaaa	30
15	<210> 18 <211> 13 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintético	
25	<400> 18 atgtcgtgg tga	13
30	<210> 19 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
35	<400> 19 aaaaaaaaa aaaaaggcag tcatcccggt	30
40	<210> 20 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
45	<400> 20 ttacagccta tcgcctcgc	19
50	<210> 21 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
55	<400> 21 tcggttgca gtcctgaga	20
60	<210> 22 <211> 14 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Sintético	

	<400> 22 gccagcgctcg agtt	14
5	<210> 23 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintético	
	<400> 23 cgctggagga gatgtgcacc aaaaaaaaaa aaaaa	35
15	<210> 24 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintético	
25	<400> 24 tgtgttggtc gatactaccg tcgccg	26
30	<210> 25 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
35	<400> 25 agggtggact tgacagcggg ct	22
40	<210> 26 <211> 14 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
45	<400> 26 gccactaggg tgct	14
50	<210> 27 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
55	<400> 27 aatacgcaat ggcttggt	18
60	<210> 28 <211> 10 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Sintético	

	<400> 28 gaggacgcgg	10
5	<210> 29 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintético	
	<400> 29 gtttgtgtgc gctagatggc cac	23
15	<210> 30 <211> 13 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintético	
25	<400> 30 ttgccaccga tca	13
30	<210> 31 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
35	<400> 31 tcgtcgatgt ggttggtaga	20
40	<210> 32 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
45	<400> 32 gcgtcgatga g	11
50	<210> 33 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
55	<400> 33 atgctgtggc aatgcgat	18
60	<210> 34 <211> 12 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Sintético	

	<400> 34 actgctgaat tg	12
5	<210> 35 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintético	
	<400> 35 taagtcgatg agaacggtac gccta	25
15	<210> 36 <211> 14 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintético	
25	<400> 36 agcggcttcg aagg	14
30	<210> 37 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
35	<400> 37 aacctacacc ggagcgtact t	21
40	<210> 38 <211> 14 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
45	<400> 38 gttctacaag ggtg	14
50	<210> 39 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
55	<400> 39 taggacacgt tggcagttga ggcggttaa aaaaa	35
60	<210> 40 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Sintético	

	<400> 40 gcgcggactt ctatcccagt ct	22
5	<210> 41 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintético	
	<400> 41 tgtgcgtcag tggacttcc gcaaaaaaaaa aaaaa	35
15	<210> 42 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintético	
25	<400> 42 gtgtcgtggc taccgcatac	20
30	<210> 43 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
35	<400> 43 acaccggact attcttcg	18
40	<210> 44 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
45	<400> 44 cccgggtgac gacttctccg gc	22
50	<210> 45 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
55	<400> 45 aaccaaggac ttccacatcg a	21
60	<210> 46 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Sintético	

	<400> 46 aacgaagcgg tggactatcg ttacgttg gctt	34
5	<210> 47 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintético	
	<400> 47 cgcgctatca gtgactacct ggc	23
15	<210> 48 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintético	
25	<400> 48 ccggtggtgt tgtgctggcc aaaaaaaaaa aaaaa	35
30	<210> 49 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
35	<400> 49 tgtgagggtg gttcgtggc ggtaa	25
40	<210> 50 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
45	<400> 50 ttcgttgac gtgcagaacg acttcaa	27
50	<210> 51 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
55	<400> 51 atgcgggcgt tgatca	16
60	<210> 52 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Sintético	

	<400> 52 attctattat ttatttcat	20
5	<210> 53 <211> 14 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintético	
	<400> 53 atcattattt acta	14
15	<210> 54 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintético	
25	<400> 54 cagctgcact gggaaggggtg cagtctgacc	30
30	<210> 55 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
35	<400> 55 ggtcagactg cacccttccc agtgcagctg	30
40	<210> 56 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
45	<400> 56 ggatcagatt agcactgatg ta	22
50	<210> 57 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
55	<400> 57 tacatcagtg ctaatctgat cc	22
60	<210> 58 <211> 500 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Sintético	

ES 2 813 899 T3

<400> 58

cttcacgtaa tacaagaacc agcggggggtt cggggcacac tcaccacgcg gggccggtgt	60
ggccctaagc gcagtcgaga cttgtcgggt agtgcgcctg gttctgagcg gtgtggagt	120
ggtgcgccct acgtggggga ggcttcacga gcttccgagt tgcattctgtg agtgcgagct	180
taacgagcga gctgctccag tatgtggcat ggacacggtc cgcgccctca gaatgcgacg	240
gcaaaatgct cgcgagctgc ggtccgccgt accgatggta ccagataaga gacctgttag	300
gcaacctgtt caacggggca tgctctcaag tggatagact ccaccagtgc tggaggactc	360
ggcatgtctc ggaggtcgag gcatggcagc atgctcccct attgcgactt ccgggctcga	420
aggaaccgat gccaaaagca acagccagag acactttgtg cgcgcgactgc ctaggtctgg	480
tcagcaattc ccaatacagc	500

5 <210> 59
 <211> 400
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético
 <400> 59

cttcacgtaa tacaagaagc agcggggttcg ggagtgtcac agtggggtgc cgtgtgtaag	60
agtcgagact tgctcgggtag tcctgggtgt gtggtcgaac gcattagctt ggggtcaacga	120
gcttccgagt tgcattctgtg agtttaacga gagccagtat gtagcgtcag aatgcagaat	180
cagcaggcac gtgtccgccg tagatggtag cagataagag acctgttagg caacctgttc	240
aaaatactac tctggaggac tgagatggca cgatgctccc acattgcgac ttctgccctt	300
gatagttata ttgaaagtaa atagtagata gtagatgatg atataaaca cagccagaga	360
cactttgtgc gccgactgcc tatcaaattc ccaatacagc	400

15 <210> 60
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

25 <400> 60
 gaataatata gcccccccc ccccccccc cccctatatt attc 44

30 <210> 61
 <211> 191
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sintético

<400> 61

ES 2 813 899 T3

	acgtggaggc gatcacaccg cagacgttga tcaacatccg gccggtggtc gccgcgatca	60
	aggagttctt cggcaccagc cagctgagcc aattcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg	120
	ggttgaccca caagcgccga ctgtcggcgc tggggcccgg cggctctgtca cgtgagcgtg	180
	ccgggctgga g	191
5	<210> 62 <211> 139 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintético <400> 62	
	gcttgggctg gaagagctcg tatggcaccg gaaccggtaa ggacgcgatc accagcggca	60
	tccgaggtcgt atggacgaac accccgacga aatgggacaa cagtttcctc gagatcctgt	120
	acggctacga gtgggagct	139
15	<210> 63 <211> 139 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintético <400> 63	
	tccgagccac gttacgctcg tggacatacc gatttcggcc cggccgcggc gagacgatag	60
	gttgtcgggg tgactgccac agccactgaa ggggccaaac ccccatcgt atcccgttca	120
25	gtcctgggta ccggaggaa	139
30	<210> 64 <211> 110 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
35	<400> 64	
	ggcagcatgc tcccacattg cgacttctgc ccttgatagt tatattgaaa gtaaatagta	60
	gatagtagat gatgatataa acaacagcca gagacacttt gtgcgccgaa	110
40	<210> 65 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sintético <400> 65	
	aacgccgcgc tggaggagat gctt	

5	<210> 66 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
10	<400> 66 ggccgatacc accgt	15
15	<210> 67 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
20	<400> 67 accatcggag cgtacagcgg ctgt	24
25	<210> 68 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
30	<400> 68 ctacaagggt gccta	15
35	<210> 69 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
40	<400> 69 acagttgggt tgcagctcct gagt	24
45	<210> 70 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
50	<400> 70 gcactgccgg cgtcg	15
55	<210> 71 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
60	<400> 71 aagaccggg tgatcacttc tctt	24

5	<210> 72 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
10	<400> 72 aaggacttcc acatc	15
15	<210> 73 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
20	<400> 73 aacgctatca gtgactacct gggt	24
25	<210> 74 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
30	<400> 74 cgctgcgttg gctcg	15
35	<210> 75 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
40	<400> 75 aatcggcaat tgagtcggtg tttt	24
45	<210> 76 <211> 13 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
50	<400> 76 cagtctggac gcg	13
55	<210> 77 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
60	<400> 77 tagcgggtacg caatggcctg gccta	25

5	<210> 78 <211> 14 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
10	<400> 78 agacggccga ggac	14
15	<210> 79 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
20	<400> 79 acaccatcac gtcgtggcaa ccgt	24
25	<210> 80 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
30	<400> 80 ccggagcggc gggct	15
35	<210> 81 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
40	<400> 81 acctctcggc gtggacttct atccgt	26
45	<210> 82 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
50	<400> 82 attgcgtag cggt	15
55	<210> 83 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
60	<400> 83 ttctgtgac gtgcagaatg acaa	24

5	<210> 84 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintético <400> 84 tgcgggtgtt ggtca	15
15	<210> 85 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintético <400> 85 aaagaatggt acgtcactgc tgtt	24
25	<210> 86 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintético <400> 86 tcggaggagt tgacg	15
35	<210> 87 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Sintético <400> 87 acttcctcgt cgtggccatc gcgt	24
45	<210> 88 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Sintético <400> 88 cggcacactg gacta	15
55	<210> 89 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Sintético <400> 89 agcgcggcgt cgatgaggtt gact	24
65		

5	<210> 90 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintético	
15	<400> 90 aattggctgc ggtaa	15
20	<210> 91 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Sintético	
30	<400> 91 aatcgctggc ggtaactggt gggt	24
35	<210> 92 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Sintético	
45	<400> 92 ttctgcgagg gtggc	15
50	<210> 93 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Sintético	
60	<400> 93 aacatcgatc attgtgtgcg cctt	24
65	<210> 94 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <223> Sintético	
75	<400> 94 tgtggtcggg attgc	15
80	<210> 95 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
85	<220> <223> Sintético	
90	<400> 95 aagacttgac agcgggtgtg tctt	24

5	<210> 96 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
10	<400> 96 actagggtgc tggcg	15
15	<210> 97 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
20	<400> 97 ttccgaacgt atggtggatg taaa	24
25	<210> 98 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
30	<400> 98 tgctgggca gttgc	15
35	<210> 99 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
40	<400> 99 aattggctgt ggcgg	15
45	<210> 100 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
50	<400> 100 ctggttggtg ctgaag	16
55	<210> 101 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
60	<400> 101 atgcgctgt tggtaaccc cgat	24
65		

ES 2 813 899 T3

5	<210> 102 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
10	<400> 102 aagccccagc gccgtcagtc gtt	23
15	<210> 103 <211> 82 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintético <400> 103 ggcacgatgc tcccacattg cgacttccgg gctcgaagga accgatgcca aaacaacagc	60
	cagagacact ttgtgcgccg aa	82

REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar secuencias diana de ácido nucleico de cadena sencilla en una muestra, que comprende:

5 (a) poner en contacto una muestra que comprende una primera secuencia diana de ácido nucleico de cadena sencilla y al menos una segunda secuencia diana de ácido nucleico de cadena sencilla, con reactivos de detección en un tubo único, comprendiendo dichos reactivos de detección conjuntos de pares de sondas para cada una de las secuencias diana, comprendiendo cada uno de dichos pares de sondas:

10 (i) al menos una sonda amortiguadora marcada con un amortiguador no fluorescente, y
(ii) al menos una sonda señalizadora marcada con un colorante fluorescente,

15 en donde la sonda señalizadora es una sonda de autoamortiguación que comprende un amortiguador no fluorescente para reducir la señal del fluoróforo cuando la sonda señalizadora no se hibrida con una diana y en donde la señal ruido es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora no se une a la secuencia diana,

en donde la señal ruido anterior es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora se une a la secuencia diana pero la sonda amortiguadora no se une a la secuencia diana,

20 en donde la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora hibridan de manera adyacente sobre la secuencia diana de manera que la señal de la sonda señalizadora es amortiguada por el amortiguador no fluorescente cuando tanto la sonda señalizadora como la sonda amortiguadora se unen a la secuencia diana;

en donde las sondas señalizadoras de cada uno de los conjuntos de sondas están marcados con colorantes fluorescentes del mismo color;

25 en donde el intervalo de temperaturas en el que el conjunto de sondas para dicha primera diana se unen a la primera secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla se solapa con el intervalo de temperaturas en el que el conjunto de sondas para dicha segunda diana se unen a la segunda secuencia diana de ácido nucleico de cadena sencilla.

30 (b) analizar la señal de las sondas señalizadoras en función de la temperatura, en donde la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora de un primer conjunto de sondas tienen temperaturas de fusión para la hibridación con una primera secuencia diana en el intervalo de 10-75 °C, por lo que la primera secuencia diana es una parte del gen promotor *inhA* de *M. tuberculosis* y, en donde un primer conjunto de los pares de sondas comprende una sonda señalizadora que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 19 y una sonda amortiguadora que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 20.

35 2. El método de la reivindicación 1, en el que dichas sondas de señalización son sondas de autoamortiguación que comprenden un amortiguador no fluorescente para reducir la señal del fluoróforo cuando la sonda señalizadora no se hibrida con una diana, en donde dichas sondas señalizadoras son sondas de baliza molecular.

40 3. El método de la reivindicación 1, en el que la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora de un segundo conjunto de sondas tienen temperaturas de fusión para la hibridación con una segunda secuencia diana en el intervalo de 10-75 °C, por lo que la segunda secuencia diana es una parte del gen *katG* de *M. tuberculosis* y en donde la sonda señalizadora del segundo conjunto de sondas tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 17 y la sonda amortiguadora del segundo conjunto de sondas tiene al menos un 70 % de identidad (por ejemplo, >70 %, >75 %, >80 %, >85 %, >90 %, 95 %, >98 %, >99%) con la SEQ ID NO: 18.

45 4. Un kit o una mezcla de reactivo para analizar secuencias diana de ácido nucleico de cadena sencilla en un tubo único, que comprenden:

50 (a) reactivos de amplificación que comprenden pares de cebadores específicos para cada una de las secuencias diana, comprendiendo dichos pares de cebadores un cebador en exceso y un cebador limitante; y

(b) reactivos de detección que comprenden conjuntos de pares de sondas para cada una de las secuencias diana, comprendiendo cada uno de dichos pares de sondas:

55 (i) una sonda amortiguadora marcada con un amortiguador no fluorescente, y
(ii) una sonda señalizadora marcada con un colorante fluorescente,

en donde la sonda señalizadora es una sonda de autoamortiguación que comprende un amortiguador no fluorescente para reducir la señal del fluoróforo cuando la sonda señalizadora no se hibrida con una diana y en donde la señal ruido es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora no se une a la secuencia diana,

60 en donde la señal ruido anterior es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora se une a la secuencia diana pero la sonda amortiguadora no se une a la secuencia diana,

en donde la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora se hibridan de manera adyacente sobre la secuencia diana de manera que la señal de la sonda señalizadora es amortiguada por el amortiguador no fluorescente cuando tanto la sonda señalizadora como la sonda amortiguadora se unen a la secuencia diana,

65 en donde las sondas señalizadoras de cada uno de los conjuntos de sondas están marcadas con colorantes fluorescentes del mismo color,

en donde los cebadores específicos para la diana tienen temperaturas de fusión con las secuencias diana por encima de las temperaturas de fusión de la sonda señalizadora y de la sonda de amortiguación para la respectiva secuencia diana,

en donde el intervalo de temperaturas en el que el conjunto de sondas que se unen a la primera secuencia diana de ácido nucleico de cadena sencilla se solapa con el intervalo de temperaturas en el que el conjunto de sondas se une a una segunda secuencia diana de ácido nucleico de cadena sencilla, y

en donde la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora de un primer conjunto de sondas tienen temperaturas de fusión para la hibridación con una primera secuencia diana en el intervalo de 10-75 °C, por lo que la primera secuencia diana es una parte del gen del promotor *inhA* de *M. tuberculosis* y en donde un primer conjunto de sondas comprende una sonda señalizadora con una secuencia de la SEQ ID NO: 19 y una sonda amortiguadora con una secuencia de la SEQ ID NO: 20.

5. Un método para analizar cuatro o más secuencias diana de ácido nucleico en una muestra, que comprende:

(a) poner en contacto una mezcla que comprende cuatro o más secuencias diana de ácido nucleico con reactivos de amplificación, en donde los reactivos de amplificación comprenden conjuntos de pares de cebadores específicos para cada uno de las cuatro o más secuencias diana de ácido nucleico;

(b) amplificar las secuencias diana de ácido nucleico bajo condiciones que producen un amplicón de cadena sencilla de cada una de las secuencias diana;

(c) poner en contacto la muestra con reactivos de detección en un tubo único, comprendiendo dichos reactivos de detección conjuntos de pares de sondas para cada una de las secuencias diana, comprendiendo cada uno de dichos pares de sondas:

(i) una sonda amortiguadora marcada con un amortiguador no fluorescente, y

(ii) una sonda señalizadora marcada con un colorante fluorescente,

en donde la sonda señalizadora es una sonda de autoamortiguación que comprende un amortiguador no fluorescente para reducir la señal del fluoróforo cuando la sonda señalizadora no se hibrida con una diana y en donde la señal ruido es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora no se une a la secuencia diana,

en donde la señal ruido anterior es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora se une a la secuencia diana pero la sonda amortiguadora no se une a la secuencia diana,

en donde la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora se hibridan de manera adyacente sobre la secuencia diana de manera que la señal de la sonda señalizadora es amortiguada por el amortiguador no fluorescente cuando tanto la sonda señalizadora como la sonda amortiguadora se unen a la secuencia diana;

en donde las sondas señalizadoras de cada uno de los conjuntos de sondas están marcadas con colorantes fluorescentes del mismo color,

en donde el intervalo de temperaturas en el que el conjunto de sondas se unen a una de las cuatro o más secuencias diana de ácido nucleico se solapa parcialmente con el intervalo de temperaturas en el que el conjunto de sondas se unen a una cualquiera de las otras secuencias diana de ácido nucleico,

(d) analizar la señal de las sondas señalizadoras en función de la temperatura, y

en donde la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora de un primer conjunto de sondas tienen temperaturas de fusión para la hibridación con una primera secuencia diana en el intervalo de 10-75 °C, por lo que la primera secuencia diana es una parte del gen del promotor *inhA* de *M. tuberculosis* y en donde un primer conjunto de pares de sondas comprende una sonda señalizadora que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 19 y una sonda amortiguadora que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 20.

6. Un kit o una mezcla de reactivos para la detección y/o caracterización de micobacterias en una muestra que comprenden:

(a) pares de cebadores específicos para las secuencias diana dentro de los genes promotor *inhA*, *katG* y *rpoB*, comprendiendo dichos pares de cebadores un cebador en exceso y un cebador limitante; y

(b) conjunto de sondas para las secuencias diana dentro de los genes promotor *inhA*, *katG*, y *rpoB*, comprendiendo cada uno de dichos conjuntos de sondas:

(i) una sonda amortiguadora marcada con un amortiguador no fluorescente, y

(ii) una sonda señalizadora marcada con un colorante fluorescente,

en los que la sonda señalizadora es una sonda de autoamortiguación que comprende un amortiguador no fluorescente para reducir la señal del fluoróforo cuando la sonda señalizadora no se hibrida con una diana y

en los que la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora se hibridan de manera adyacente sobre la secuencia diana de manera que la señal ruido es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora no se une a la secuencia diana,

en los que la señal ruido anterior es emitida desde la sonda señalizadora cuando la sonda señalizadora se une a la secuencia diana pero la sonda amortiguadora no se une a la secuencia diana,

en los que la señal de la sonda señalizadora se amortigua por el amortiguador no fluorescente cuando tanto la sonda señalizadora como la sonda amortiguadora se unen a la secuencia diana,

en los que las sondas señalizadoras de cada uno de los conjuntos de sondas están marcadas con colorantes fluorescentes del mismo color; y

- 5 en los que los pares de cebadores tienen temperaturas de fusión con las secuencias diana por encima de las temperaturas de fusión de la sonda señalizadora y la sonda de amortiguación para la respectiva secuencia diana, en los que el intervalo de temperaturas durante el cual el conjunto de sondas para una primera unión de diana a una primera secuencia diana de ácidos nucleicos solapa con el intervalo de temperaturas durante el cual el conjunto de sondas para una segunda diana se une a una segunda secuencia diana de ácido nucleico. y

- 10 en los que la sonda señalizadora y la sonda amortiguadora de un primer conjunto de sondas tienen temperaturas de fusión para la hibridación con una primera secuencia diana en el intervalo de 10-75 °C, de ese modo la primera secuencia diana es una parte del gen promotor *inhA* de *M. tuberculosis* y en el que un primer conjunto de sondas comprende una sonda señalizadora con una secuencia de la SEQ ID NO: 19 y una sonda amortiguadora con una secuencia de la SEQ ID NO: 20.

15

FIG. 1

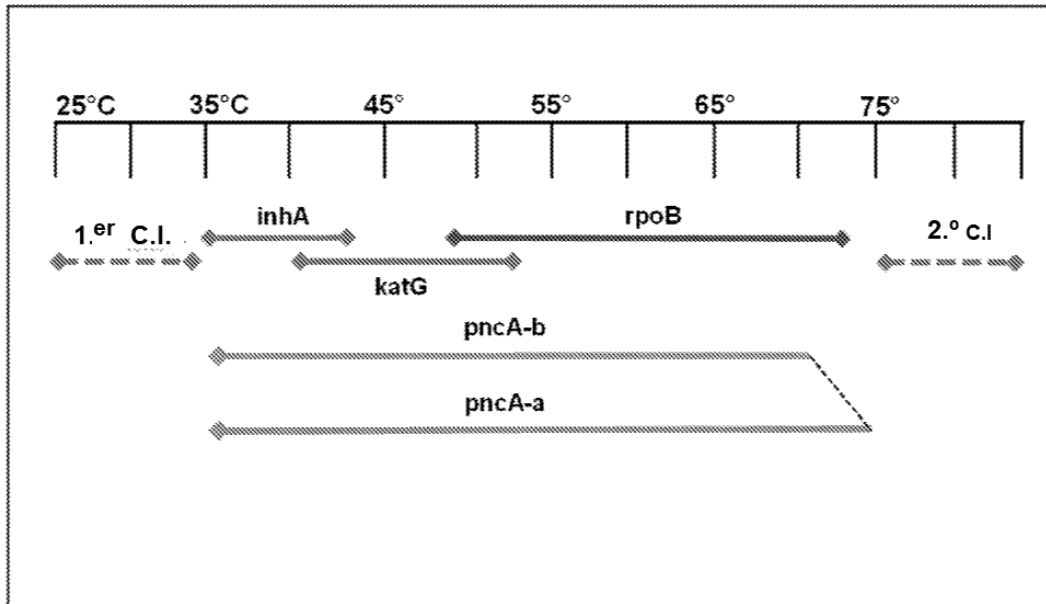


FIG. 2

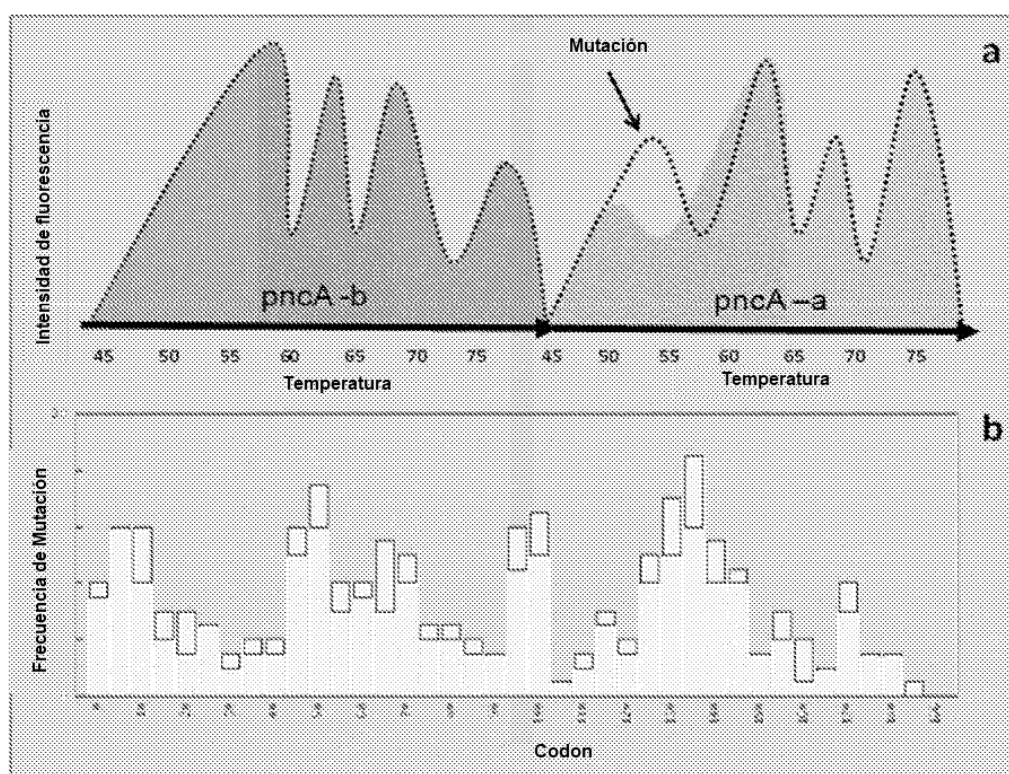


FIG. 3

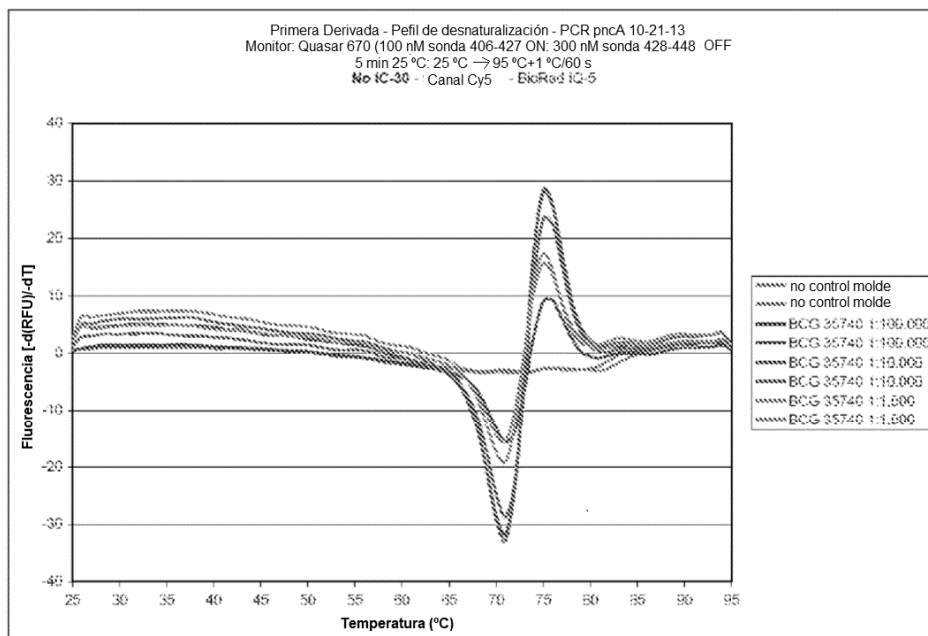


FIG. 4

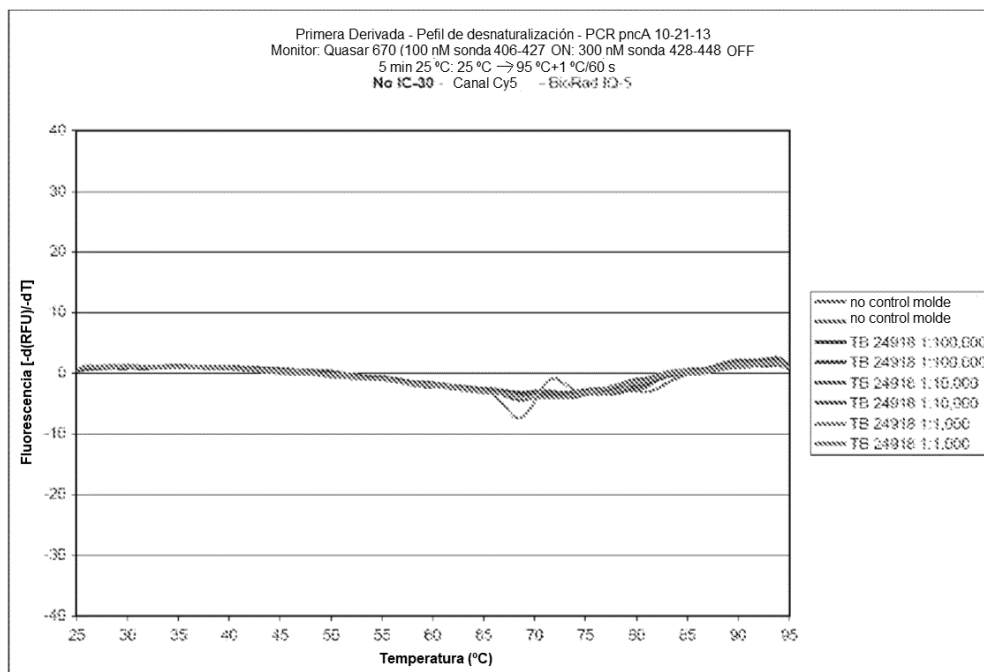


FIG. 5

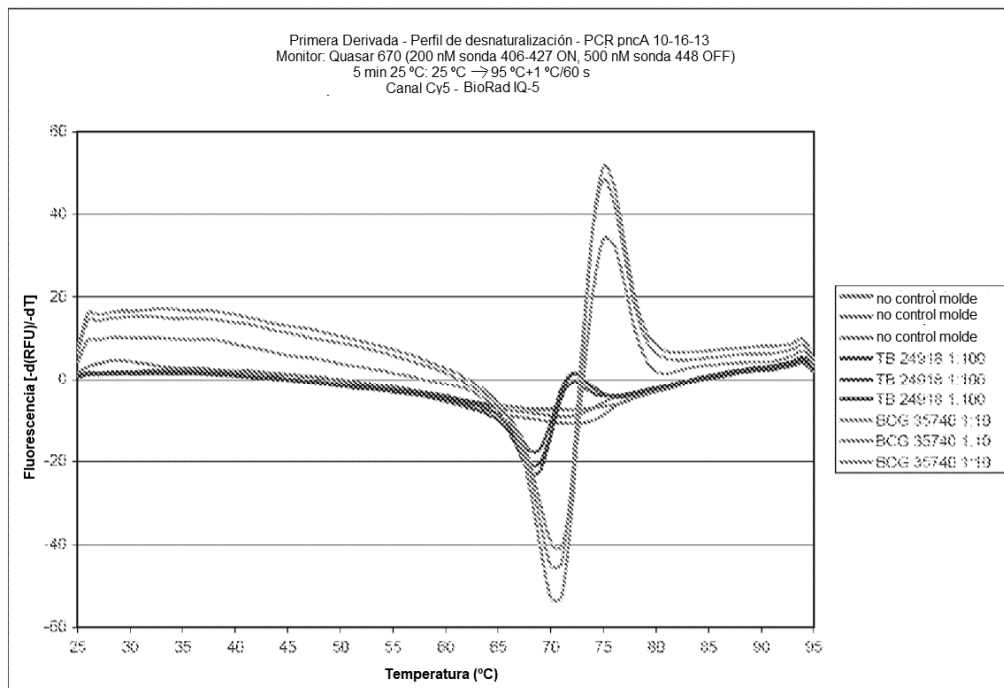


FIG. 6

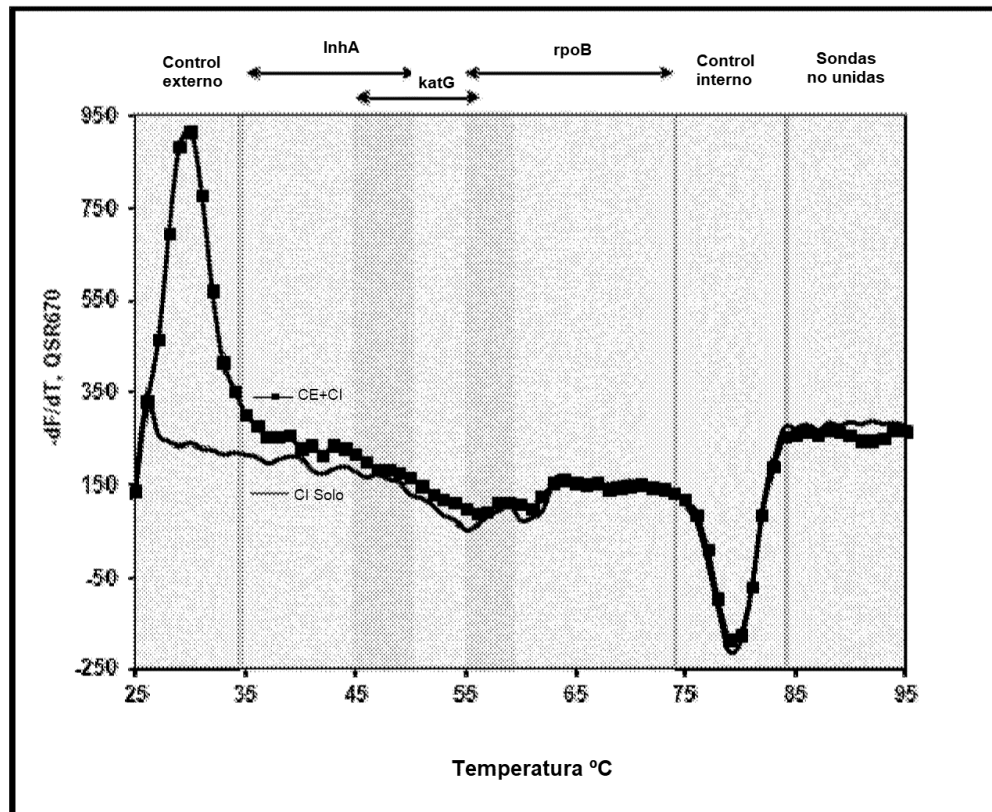


FIG. 7

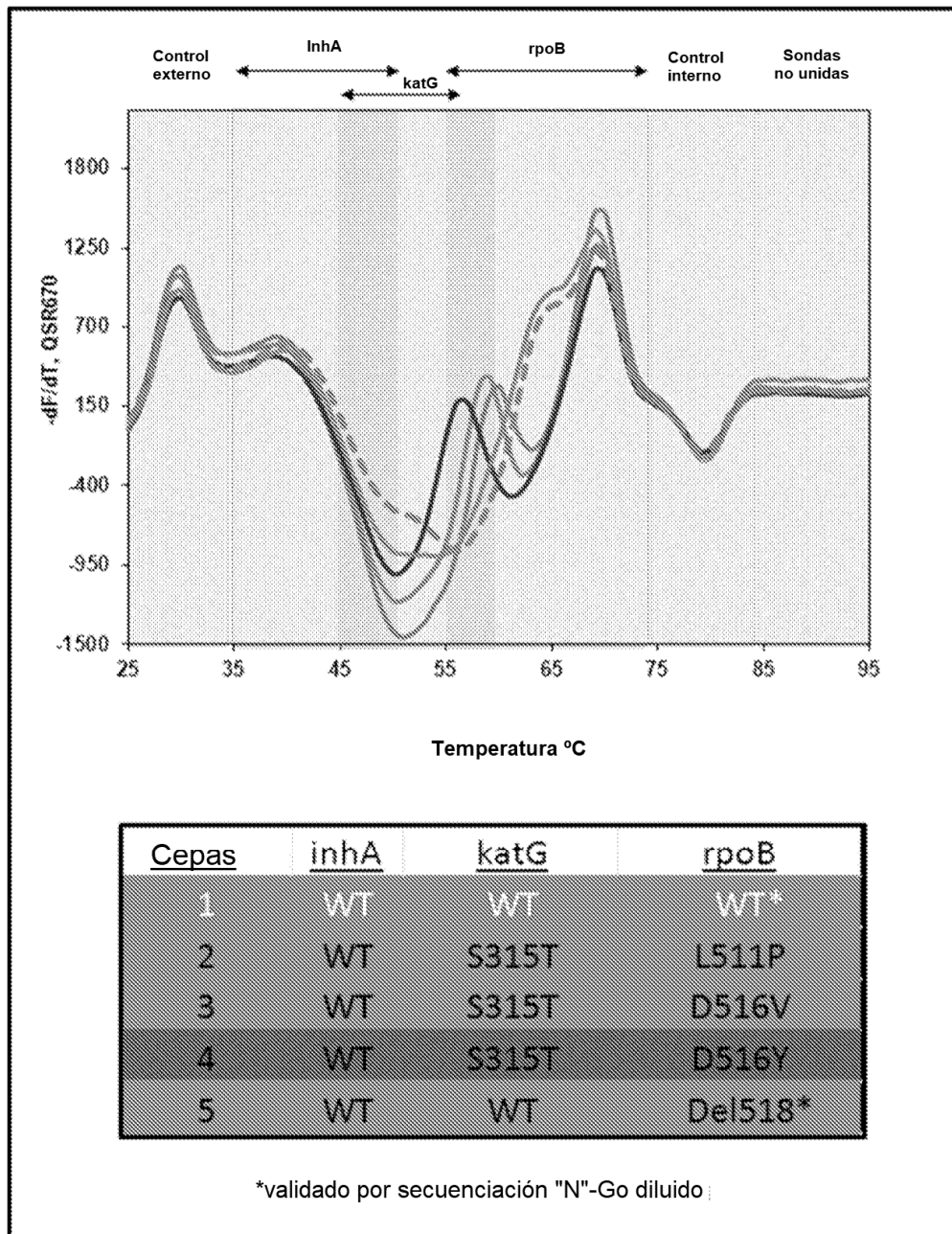


FIG. 8

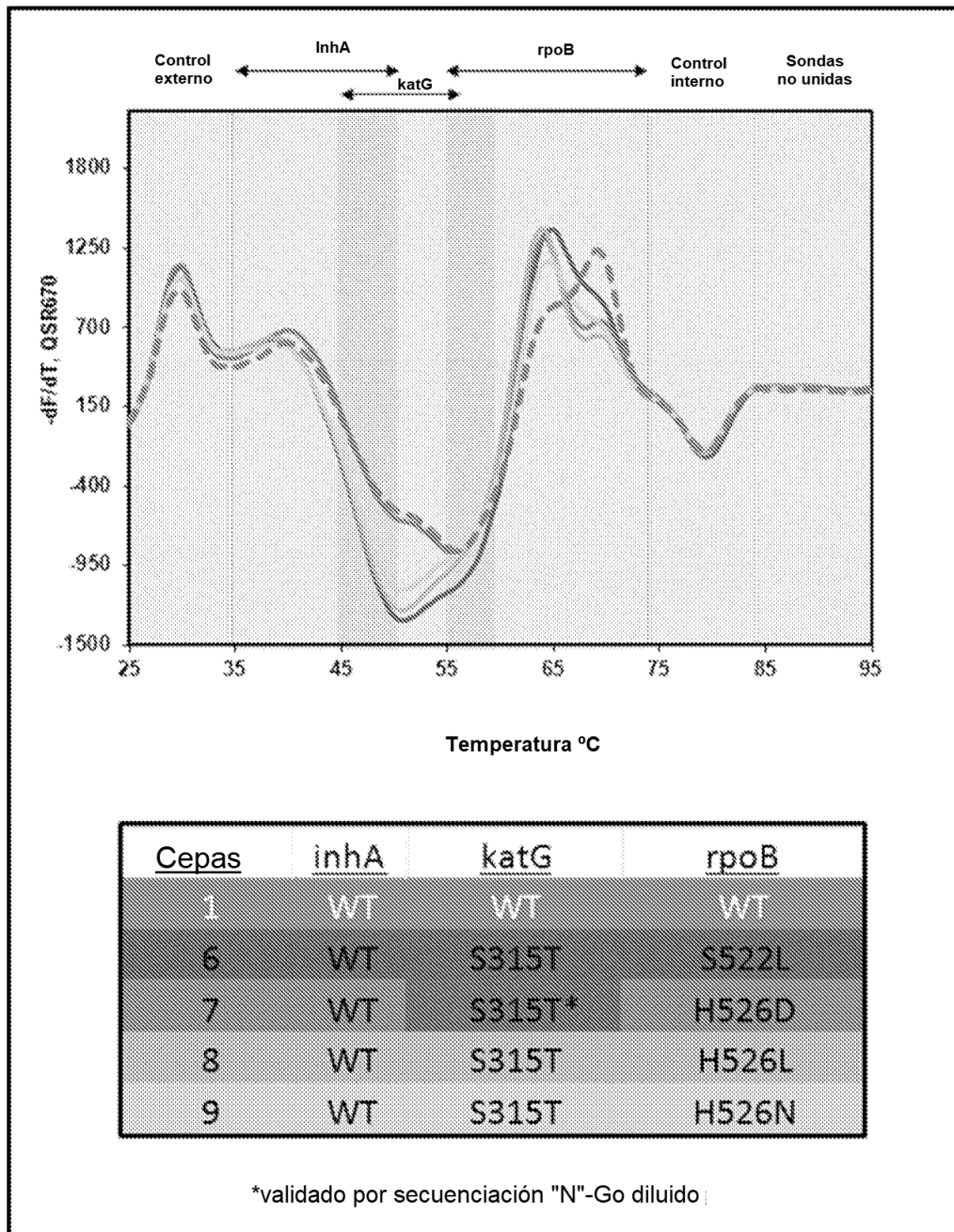


FIG. 9

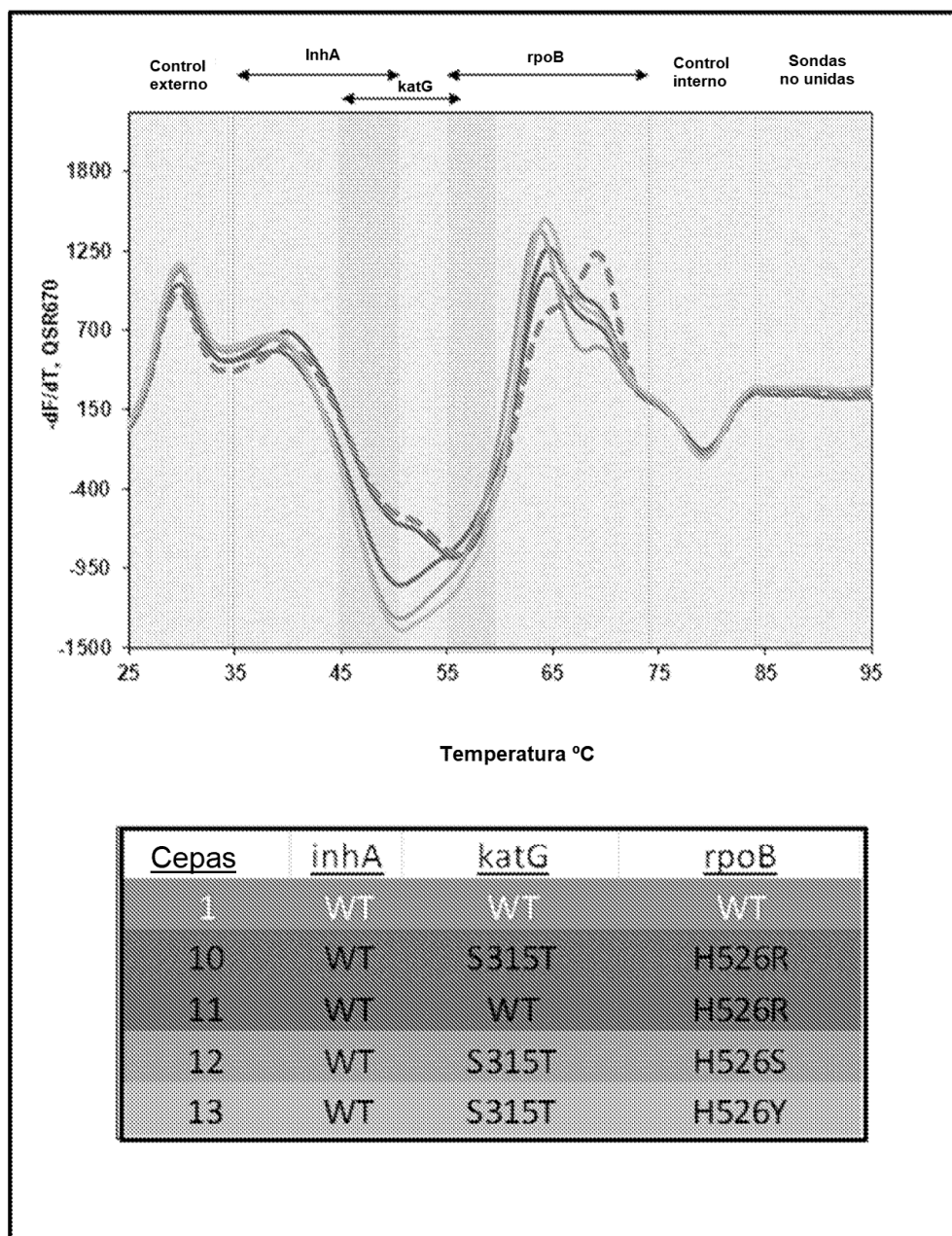


FIG. 10

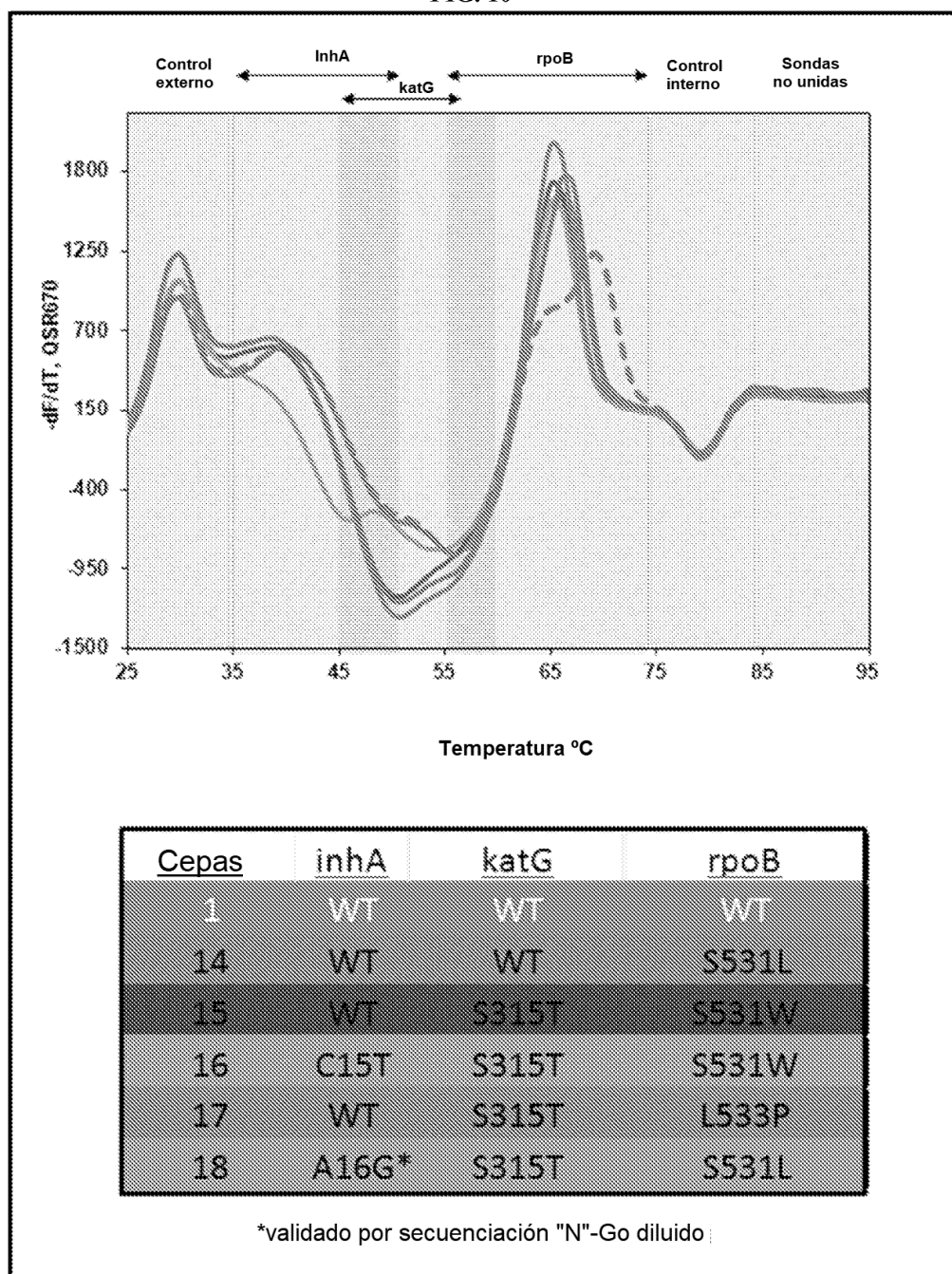


FIG. 11

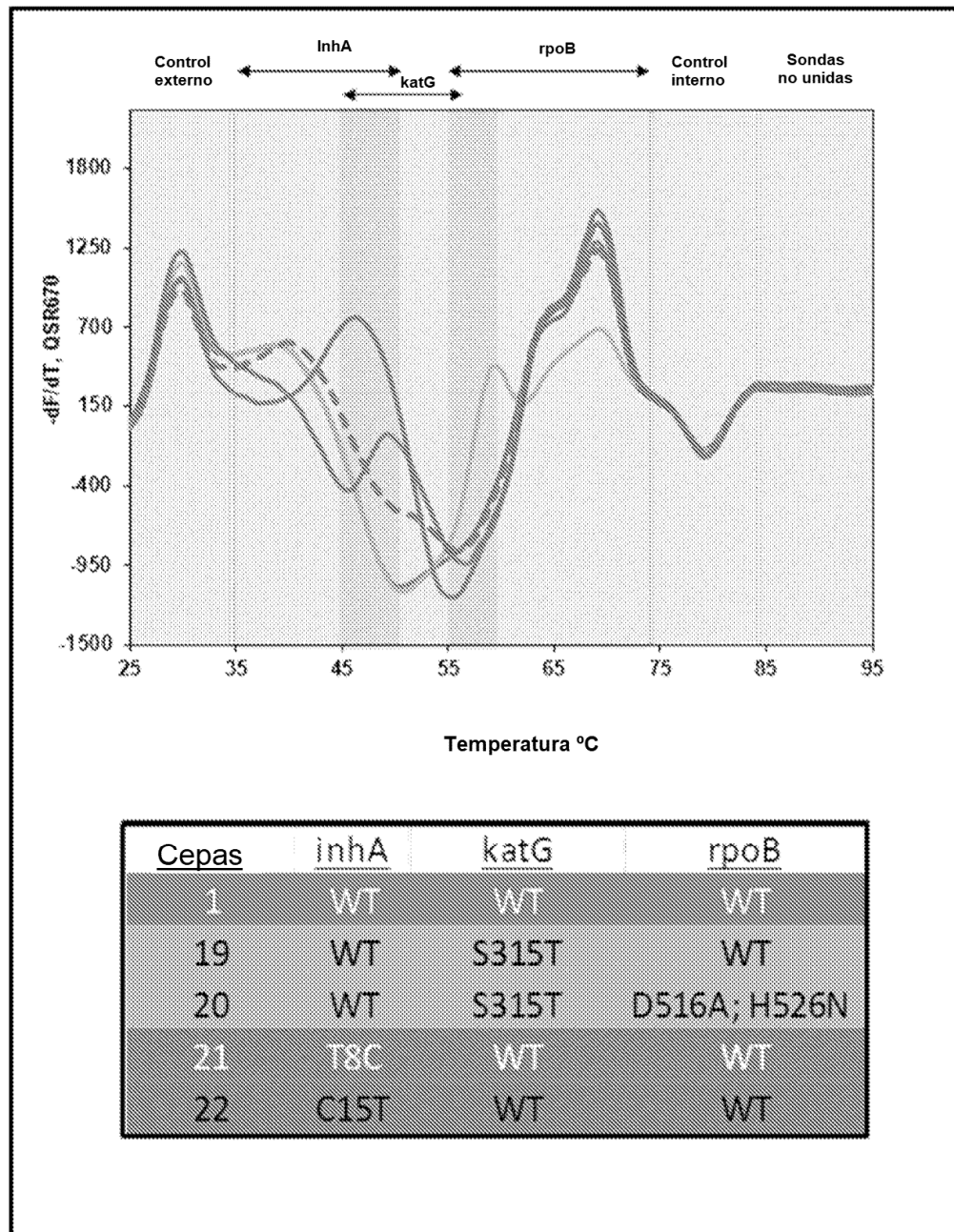
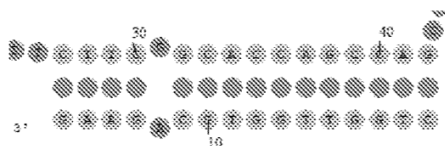


FIG. 12

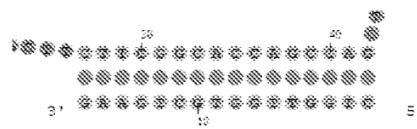
rpoB Sonda 1 OFF (SEQ ID NO: 11)



referencia rpoB con rpoB Sonda1 OFF

ΔG° (55 °C) = -15,17 kcal/mol
 ΔH° = -272,63 kcal/mol
 ΔS° = -784,58 cal/mol K
 T_m = 46,56 °C
 $[monovalente] = 0,0500 \text{ mol/l}$
 $[Mg^{2+}] = 0,0030 \text{ mol/l}$

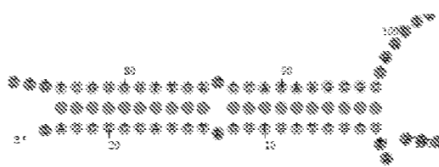
rpoB Sonda 1a OFF (SEQ ID NO: 100)



referencia rpoB con rpoB Sonda 1a OFF

ΔG° (55 °C) = -16,03 kcal/mol
 ΔH° = -274,33 kcal/mol
 ΔS° = -788,67 cal/mol K
 T_m = 49,31 °C
 $[monovalente] = 0,0500 \text{ mol/l}$
 $[Mg^{2+}] = 0,0030 \text{ mol/l}$

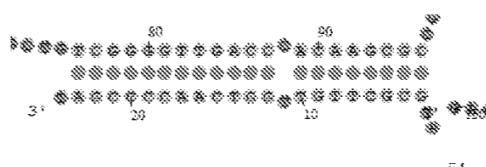
rpoB Sonda 4 ON (SEQ ID NO: 14)



referencia rpoB con rpoB Sonda4 ON

ΔG° (55 °C) = -38,80 kcal/mol
 ΔH° = -270,00 kcal/mol
 ΔS° = -765,49 cal/mol K
 T_m = 56,87 °C
 $[monovalente] = 0,0500 \text{ mol/l}$
 $[Mg^{2+}] = 0,0030 \text{ mol/l}$

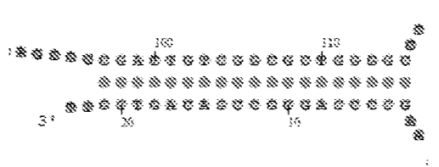
rpoB Sonda 4a ON (SEQ ID NO: 101)



referencia rpoB con rpoB Sonda 4a ON

ΔG° (55 °C) = -18,32 kcal/mol
 ΔH° = -282,35 kcal/mol
 ΔS° = -804,60 cal/mol K
 T_m = 64,86 °C
 $[monovalente] = 0,0500 \text{ mol/l}$
 $[Mg^{2+}] = 0,0030 \text{ mol/l}$

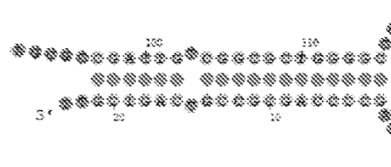
rpoB Sonda 5 ON (SEQ ID NO: 15)



referencia rpoB con rpoB Sonda5 ON

ΔG° (55 °C) = 22,52 kcal/mol
 ΔH° = -282,09 kcal/mol
 ΔS° = -791,00 cal/mol K
 T_m = 74,68 °C
 $[monovalente] = 0,0500 \text{ mol/l}$
 $[Mg^{2+}] = 0,0030 \text{ mol/l}$

rpoB Sonda 5a ON (SEQ ID NO: 102)

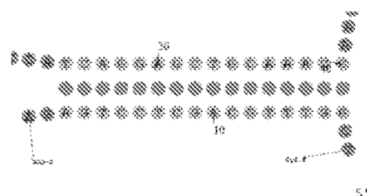


referencia rpoB con rpoB Sonda5a ON

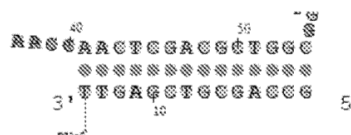
ΔG° (55 °C) = -19,39 kcal/mol
 ΔH° = -269,66 kcal/mol
 ΔS° = -762,66 cal/mol K
 T_m = 68,68 °C
 $[monovalente] = 0,0500 \text{ mol/l}$
 $[Mg^{2+}] = 0,0030 \text{ mol/l}$

FIG. 13

Sonda 025_040 ON CO560 (SEQ ID NO: 21)
22)

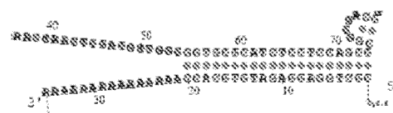


Sonda 041_054 OFF (SEQ ID NO:



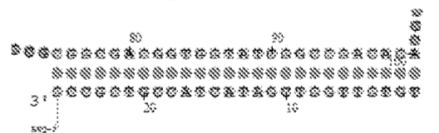
sonda 041 054 OFF
 ΔG° (50 °C) = -50,54 kcal/mol
 ΔH° = -1027,17 kcal/mol
 ΔS° = -3022,22 cal/mol K
 T_m = 61,63 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

Sonda 055_074 ON CO560 (SEQ ID NO: 23)
24)



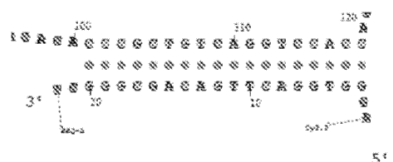
sonda 055 074 ON
 ΔG° (50 °C) = -49,98 kcal/mol
 ΔH° = -973,12 kcal/mol
 ΔS° = -2356,69 cal/mol K
 T_m = 66,09 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

Sonda 075_100 OFF (SEQ ID NO:



sonda 075 100 OFF
 ΔG° (70 °C) = 13,02 kcal/mol
 ΔH° = -439,23 kcal/mol
 ΔS° = -1242,03 cal/mol K
 T_m = 68,68 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

Sonda 101_118 ON CO560 (SEQ ID NO: 25)
26)



sonda 101 118 ON
 ΔG° (50 °C) = -47,88 kcal/mol
 ΔH° = -947,89 kcal/mol
 ΔS° = -2735,09 cal/mol K
 T_m = 62,43 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

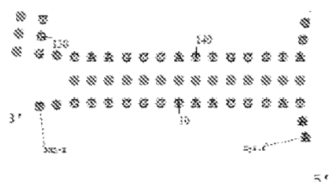
Sonda 119_132 OFF (SEQ ID NO:



sonda 119 132 OFF
 ΔG° (50 °C) = -43,83 kcal/mol
 ΔH° = -895,33 kcal/mol
 ΔS° = -2635,01 cal/mol K
 T_m = 54,59 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

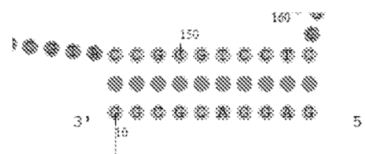
FIG. 13 (Continuación)

Sonda 133_146 ON CO560 (SEQ ID NO: 27)
28)



Sonda 133_146 ON
 ΔG° (50 °C) = -46,16 kcal/mol
 ΔH° = -929,24 kcal/mol
 ΔS° = -2732,72 cal/mol K
 T_m = 62,08
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

Sonda 147_156 OFF (SEQ ID NO: 28)



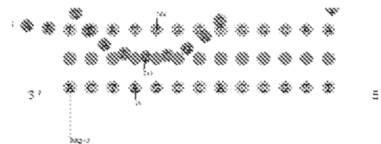
Sonda 147_156 OFF
 ΔG° (50 °C) = -44,44 kcal/mol
 ΔH° = -897,07 kcal/mol
 ΔS° = -2638,53 cal/mol K
 T_m = 45,70 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

Sonda 157_175 ON CO560 (SEQ ID NO: 29)
30)



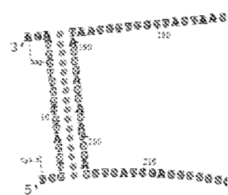
Sonda 157_175 ON
 ΔG° (50 °C) = -45,44 kcal/mol
 ΔH° = -956,25 kcal/mol
 ΔS° = -2513,53 cal/mol K
 T_m = 53,24 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

Sonda 176_188 OFF (SEQ ID NO: 30)



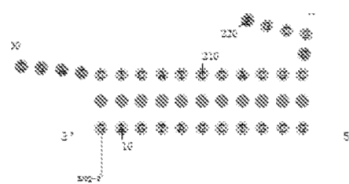
Sonda 176_188 OFF
 ΔG° (50 °C) = -45,44 kcal/mol
 ΔH° = -956,25 kcal/mol
 ΔS° = -2513,53 cal/mol K
 T_m = 53,24 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

Sonda 189_204 ON (SEQ ID NO: 31)
32)



Sonda 189_204 ON
 ΔG° (70 °C) = 7,29 cal/mol
 ΔH° = -413,36 kcal/mol
 ΔS° = -1183,35 cal/mol K
 T_m = 50,05 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

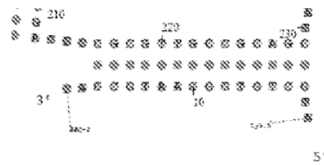
Sonda 205_215 OFF (SEQ ID NO: 32)



Sonda 205_215 OFF
 ΔG° (50 °C) = -43,44 kcal/mol
 ΔH° = -914,79 kcal/mol
 ΔS° = -2696,43 cal/mol K
 T_m = 43,64 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

FIG. 13 (Continuación)

Sonda 216_229 ON C0560 (SEQ ID NO: 33)
34)



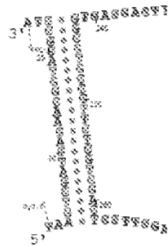
Sonda 216 228 QN
 ΔG° (50 °C) = -44,31 kcal/mol
 ΔH° = -921,80 kcal/mol
 ΔS° = -2715,41 cal/mol K
 T_m = 48,71 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

Sonda 230_241 OFF (SEQ ID NO:



Sonda 236 243 OFF
 ΔG° (50 °C) = -42,83 kcal/mol
 ΔH° = -985,54 kcal/mol
 ΔS° = -2917,25 cal/mol K
 T_m = 40,43 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

Sonda 242_262 ON CO560 (SEQ ID NO: 35)
36)



Sonda 242 262 ON⁻
 ΔG° (50 °C) = -50,16 kcal/mol
 ΔH° = -1027,54 kcal/mol
 ΔS° = -3024,53 cal/mol K
 T_m = 61,19 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

Sonda 263_276 OFF (SEQ ID NO:



Sonda 265 276 OFF
 ΔG° (50 °C) = 48,90 kcal/mol
 ΔH° = -1011,07 kcal/mol
 ΔS° = -2977,49 cal/mol K
 T_m = 58,95 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

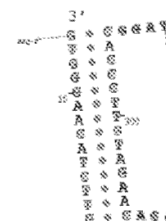
FIG. 13 (Continuación)

Sonda 277_293 ON QSR670 (SEQ ID NO: 37)
38)



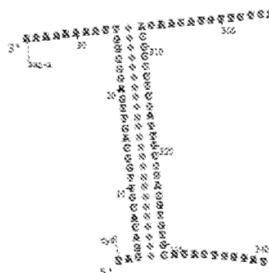
Sonda 277_293 ON
 ΔG° (50 °C) = -50,19 kcal/mol
 ΔH° = -1022,44 kcal/mol
 ΔS° = -3003,66 cal/mol K
 T_m = 62,33 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

Sonda 294_307 OFF (SEQ ID NO:



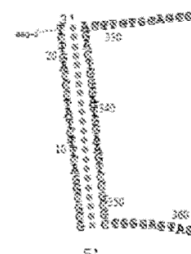
Sonda 294_307 OFF
 ΔG° (50 °C) = -44,39 kcal/mol
 ΔH° = -919,11 kcal/mol
 ΔS° = -2923,48 cal/mol K
 T_m = 48,25 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

Sonda 308_331 ON (TL) QSR670 (SEQ ID NO: 39)
40)



Sonda 308_331 ON
 ΔG° (70 °C) = -12,20 kcal/mol
 ΔH° = -456,34 kcal/mol
 ΔS° = -1294,30 cal/mol K
 T_m = 63,41 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

Sonda 332_353 OFF (SEQ ID NO:

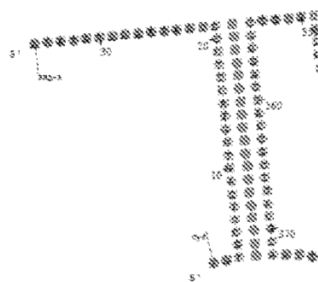


Sonda 332_353 OFF
 ΔG° (70 °C) = -14,50 kcal/mol
 ΔH° = -463,19 kcal/mol
 ΔS° = -1307,57 cal/mol K
 T_m = 68,23 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

FIG. 13 (Continuación)

Sonda 354_372 ON (TL) QSR670
OFF

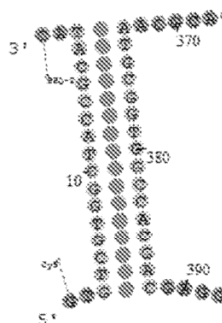
(SEQ ID NO: 41)



Sonda 354_372 ON
 ΔG° (50 °C) = -43,13 kcal/mol
 ΔH° = -976,54 kcal/mol
 ΔS° = -2876,12 cal/mol K
 T_m = 56,99 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

Sonda 373_388 ON QSR670

(SEQ ID NO: 42)



Sonda 373_388 ON
 ΔG° (50 °C) = -49,66 kcal/mol
 ΔH° = -997,24 kcal/mol
 ΔS° = -2935,42 cal/mol K
 T_m = 59,59 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

Sonda 389_405

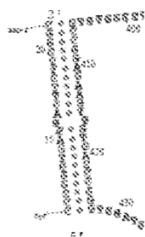
(SEQ ID NO: 43)



Sonda 389_405 OFF
 ΔG° (70 °C) = -9,60 kcal/mol
 ΔH° = -376,20 kcal/mol
 ΔS° = -1068,34 cal/mol K
 T_m = 56,68 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

Sonda 406_427 ON -(TB SEQ)

(SEQ ID NO: 44)



Sonda 406_427 ON TB SEQ
 ΔG° (70 °C) = -16,02 kcal/mol
 ΔH° = -407,01 kcal/mol
 ΔS° = -1139,43 cal/mol K
 T_m = 71,85 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

Sonda 406_427 ON (BOVIS SEQ)

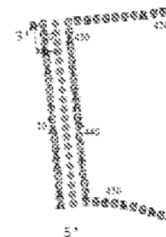
(SEQ ID NO: 44)



Sonda 406_427 ON Bovis
 ΔG° (70 °C) = -18,81 kcal/mol
 ΔH° = -420,11 kcal/mol
 ΔS° = -1169,47 cal/mol K
 T_m = 77,70 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

Sonda 428_448 OFF

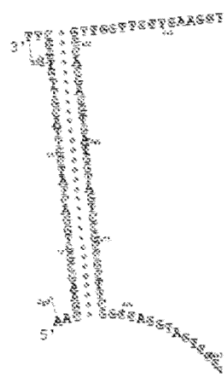
(SEQ ID NO: 45)



Sonda 428_448 OFF
 ΔG° (55 °C) = -39,90 kcal/mol
 ΔH° = -835,07 kcal/mol
 ΔS° = -2432,34 cal/mol K
 T_m = 64,50 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

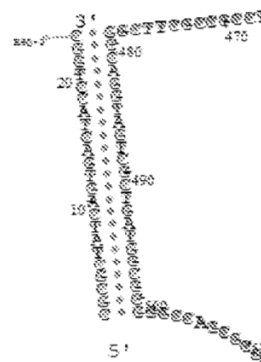
FIG. 13 (Continuación)

Sonda 449_478 ON QSR670 (SEQ ID NO: 46)
47)



Sonda 449 478 ON
 ΔG° (55 °C) = -39,73 kcal/mol
 ΔH° = -824,94 kcal/mol
 ΔS° = -2392,84 cal/mol K
 T_m = 63,92 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

Sonda 479_501 OFF (SEQ ID NO:



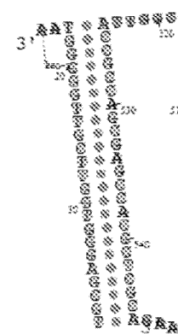
Sonda 479 501 OFF
pacA sonda 479 501 OFF
 ΔG° (55 °C) = -37,23 kcal/mol
 ΔH° = -761,96 kcal/mol
 ΔS° = -2208,51 cal/mol K
 T_m = 67,69 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

Sonda 502_521 (TL) ON QSR670 (SEQ ID NO: 48)
49)



Sonda 502 521 ON
 ΔG° (79 °C) = -11,33 kcal/mol
 ΔH° = -403,34 kcal/mol
 ΔS° = -1142,23 cal/mol K
 T_m = 62,89 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

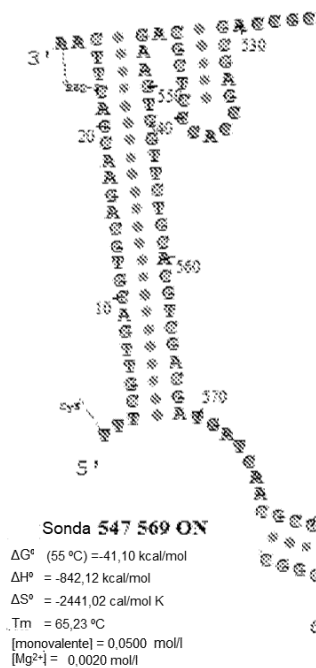
Sonda 522_546 OFF (SEQ ID NO:



Sonda 522 546 OFF
 ΔG° (55 °C) = -37,28 kcal/mol
 ΔH° = -784,82 kcal/mol
 ΔS° = -2278,05 cal/mol K
 T_m = 63,89 °C
[monovalente] = 0,0500 mol/l
[Mg²⁺] = 0,0020 mol/l

FIG. 13 (Continuación)

Sonda 547_569 ON QSR670 (SEQ ID NO: 50)



Sonda 570_585 OFF (SEQ ID NO: 51)

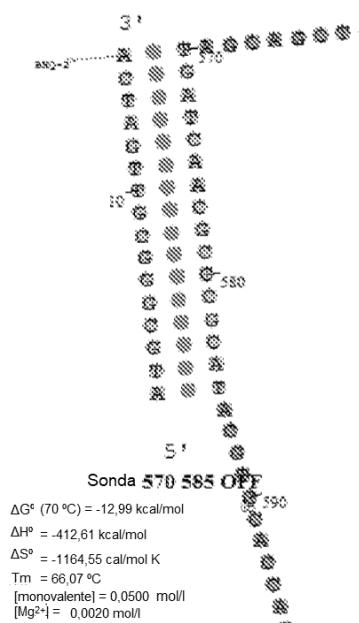


FIG. 14

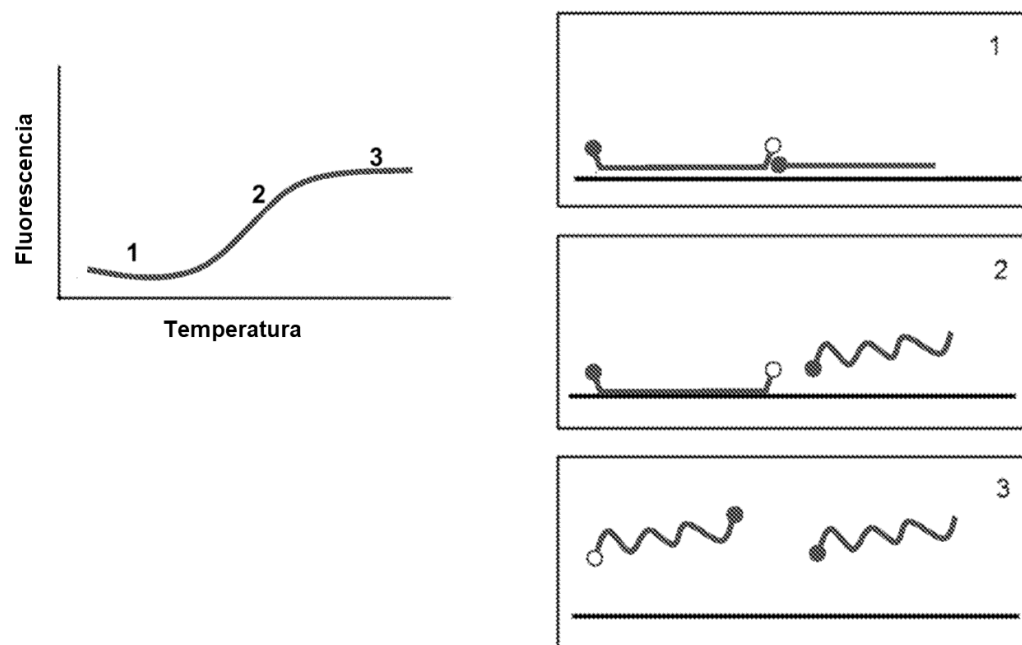


FIG. 15

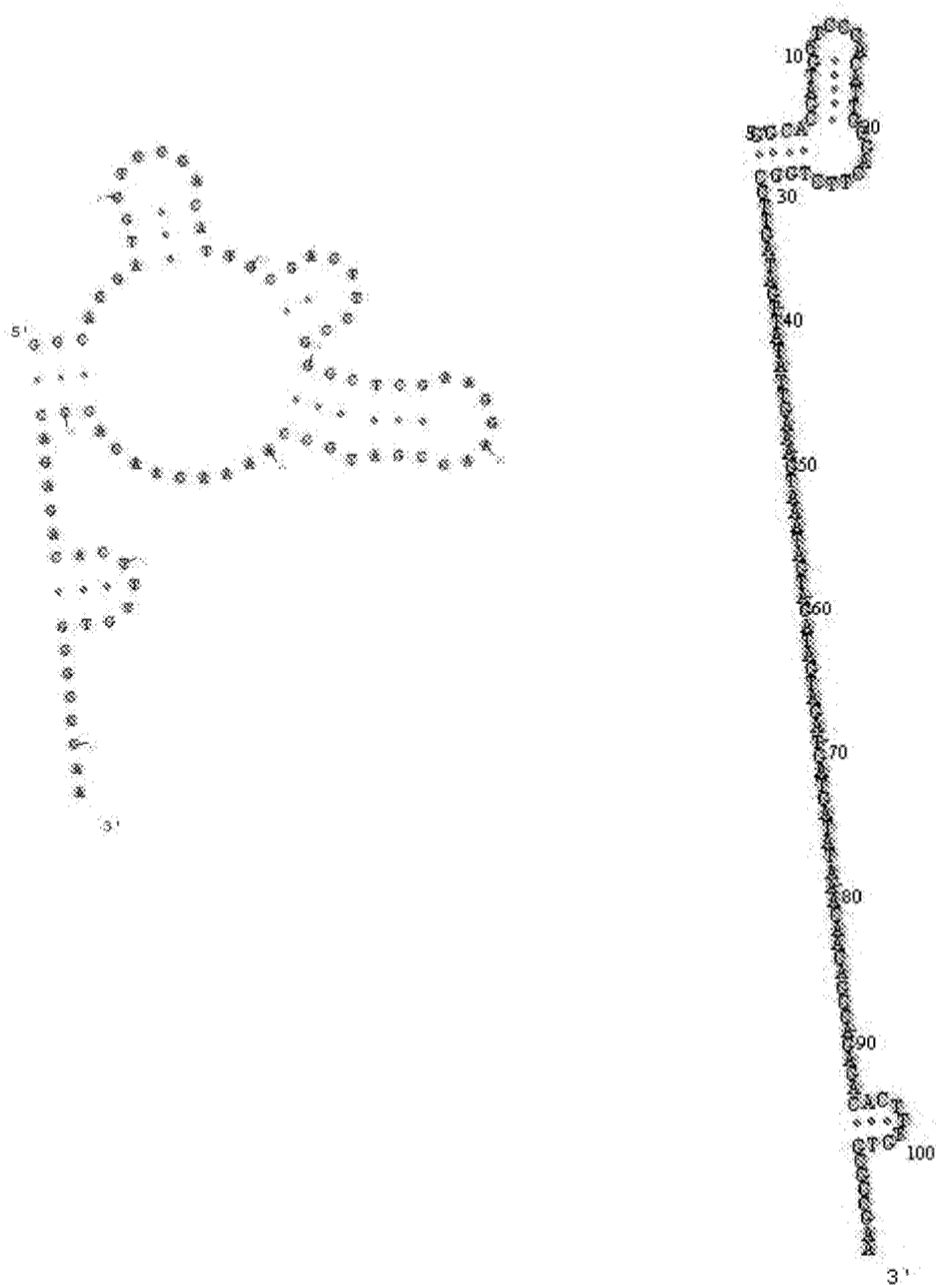


FIG. 16

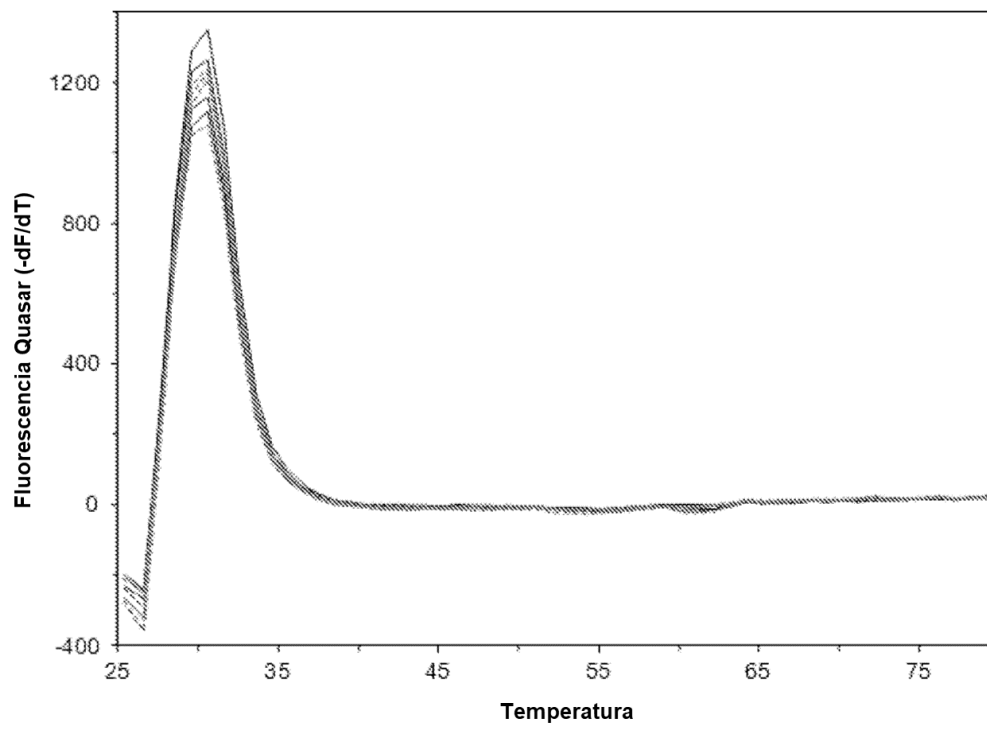


FIG. 17

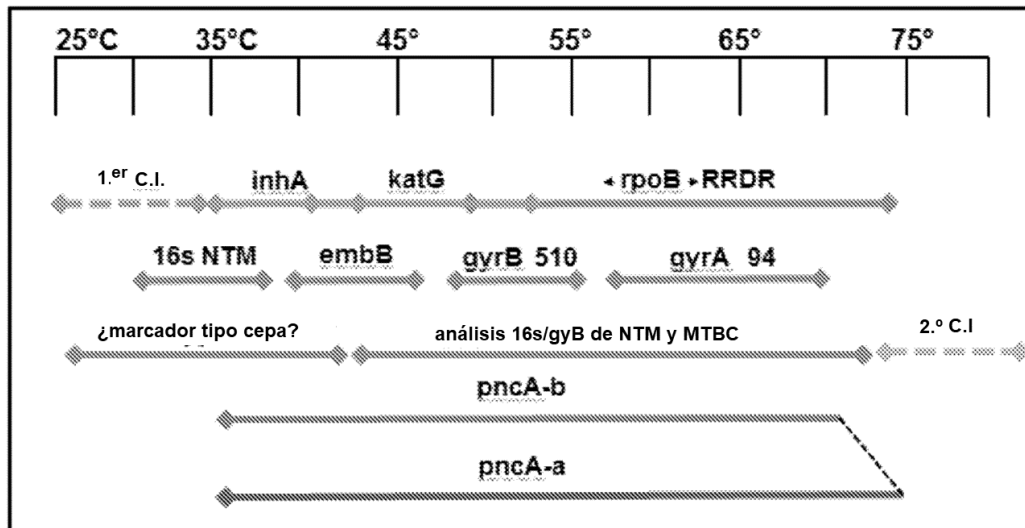


FIG. 18

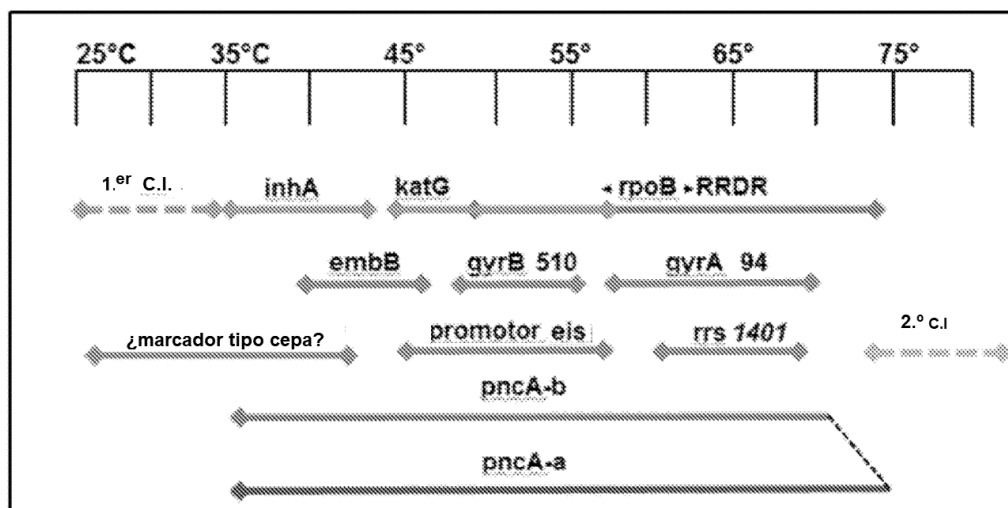


FIG. 19

Distinguir *M. tuberculosis* de *M. bovis*

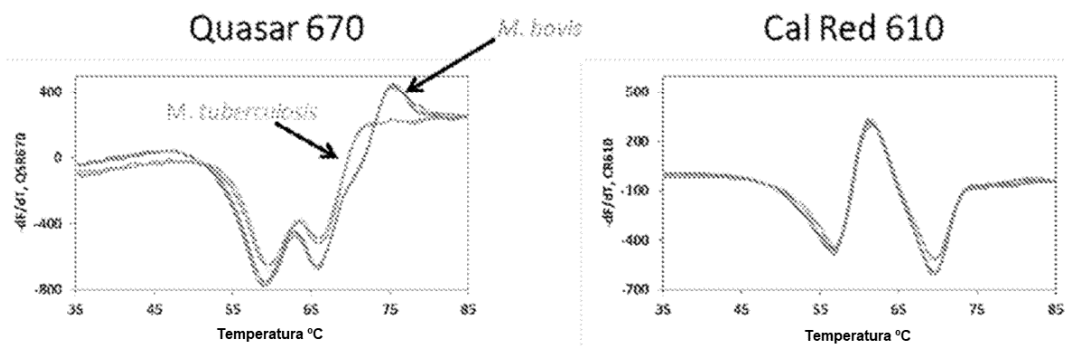


FIG. 20

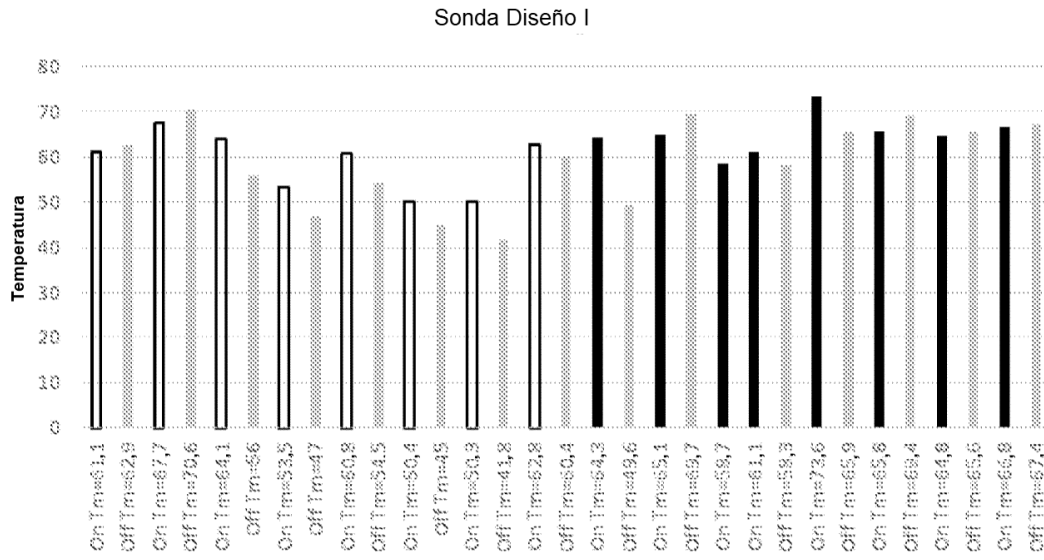


FIG. 21

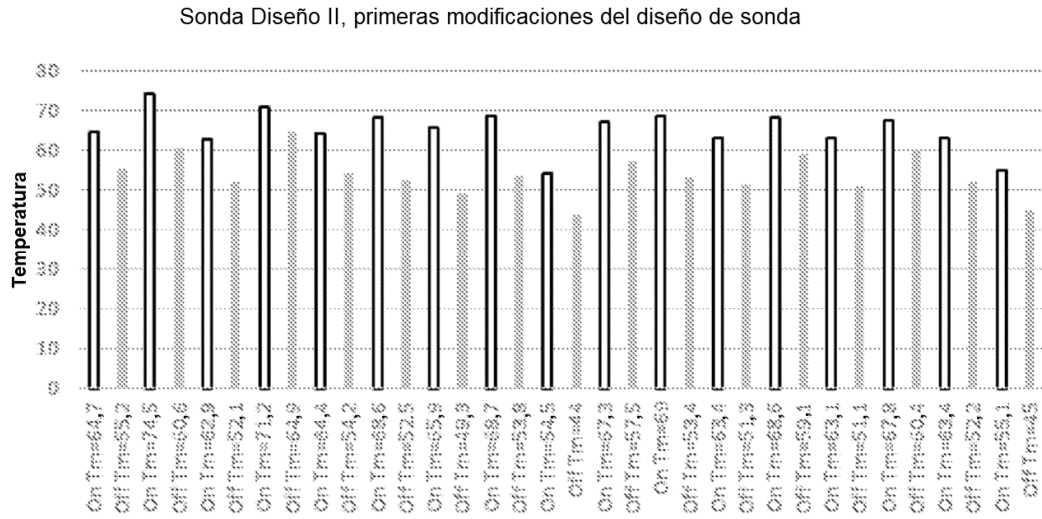


FIG. 22

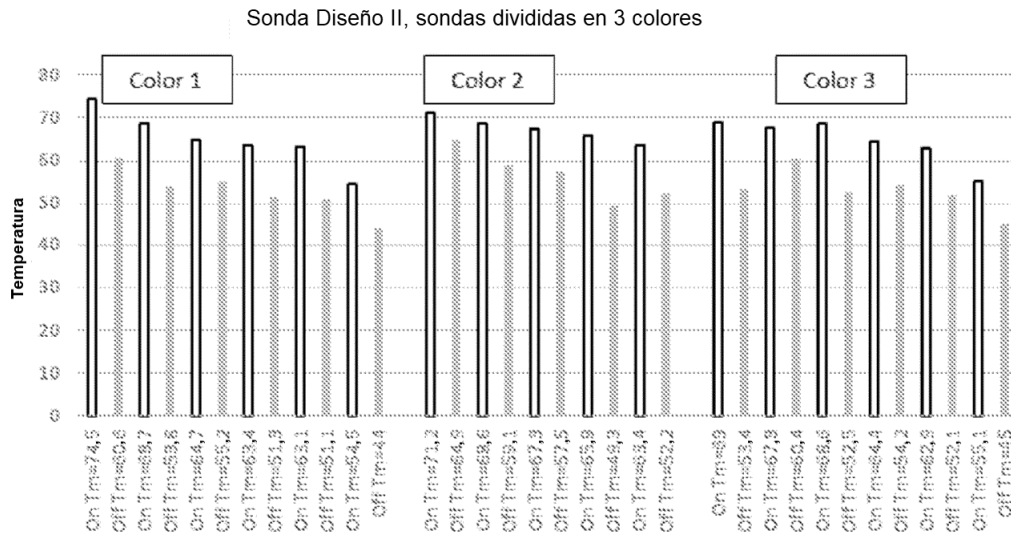


FIG. 23

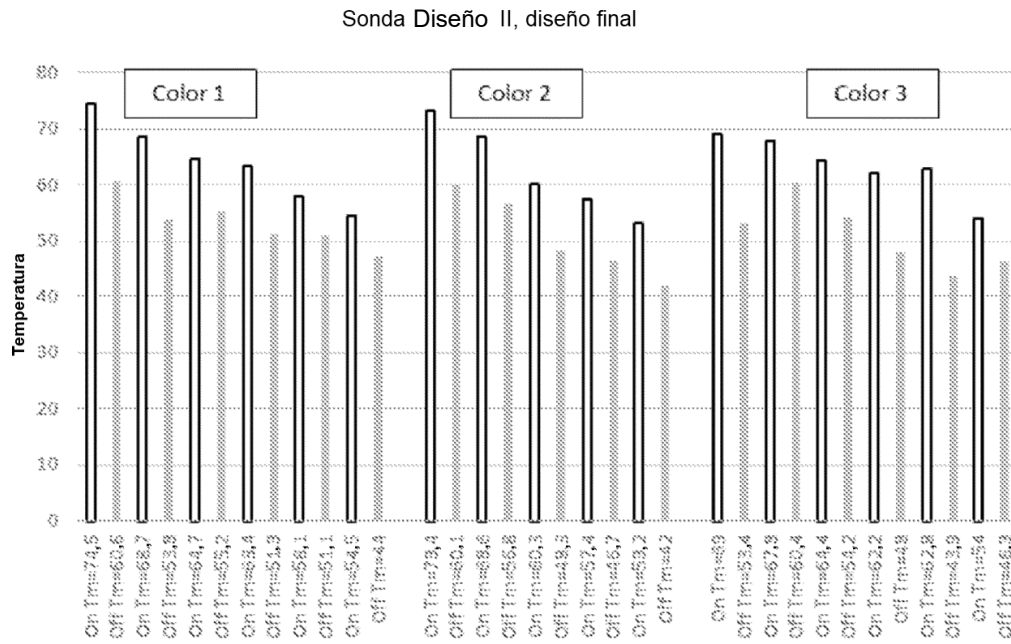


FIG. 24

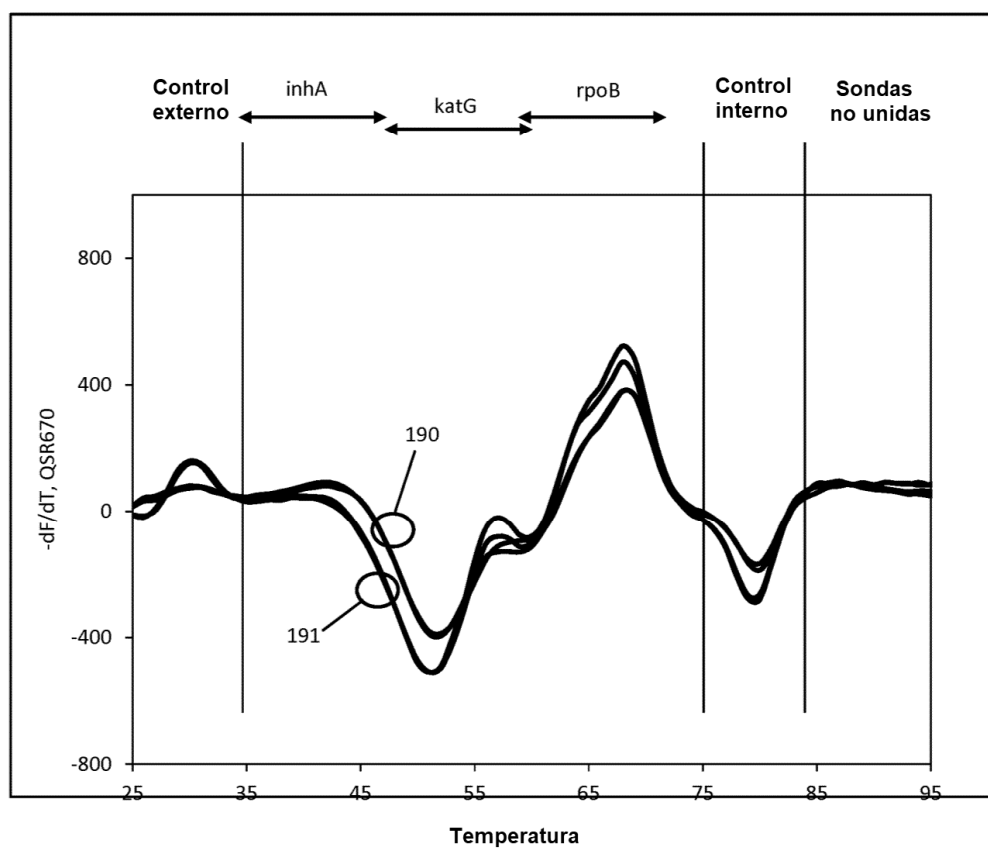


FIG. 25

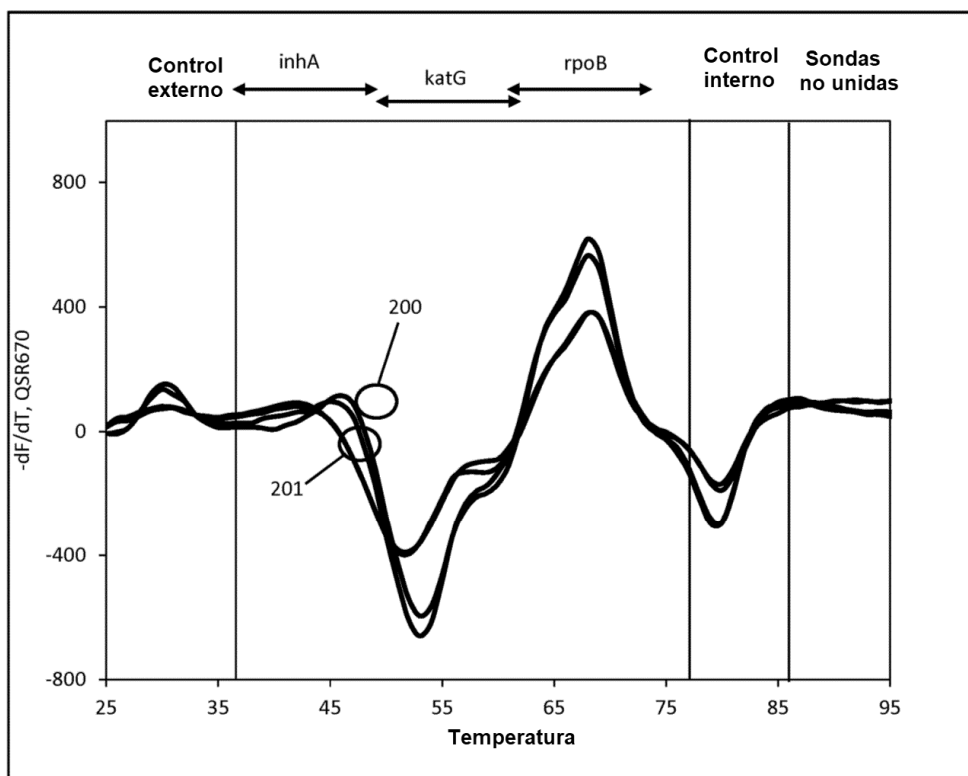


FIG. 26

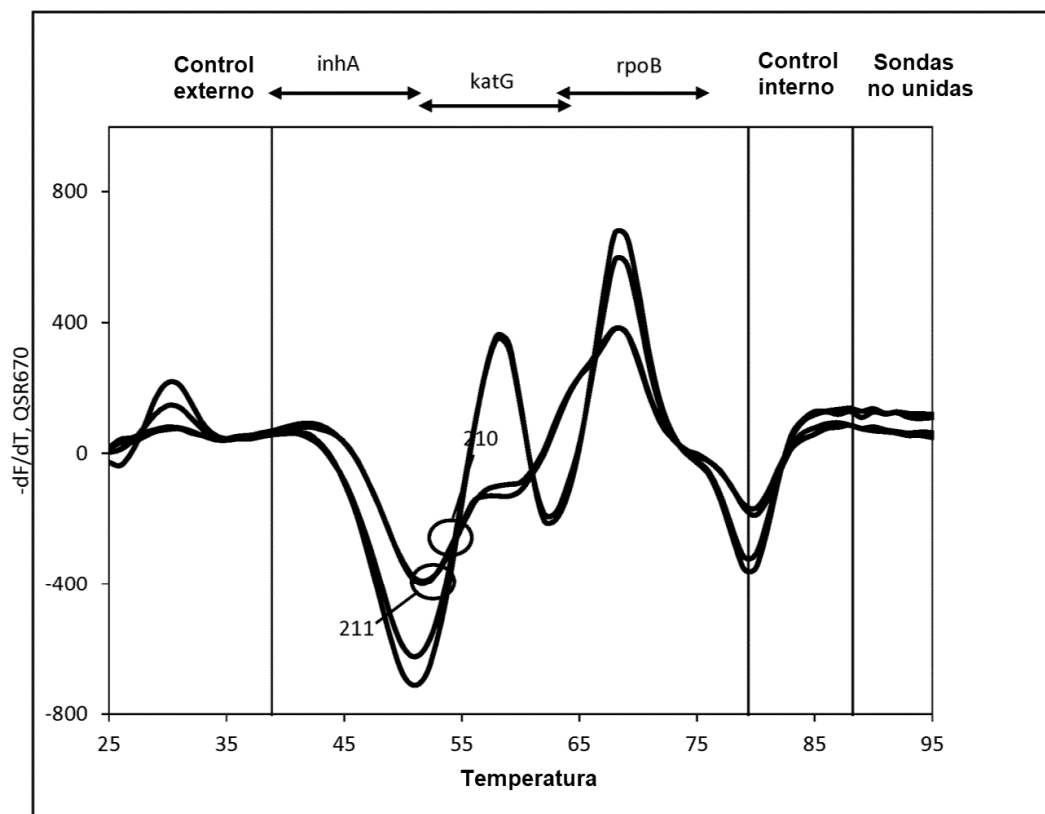


FIG. 27

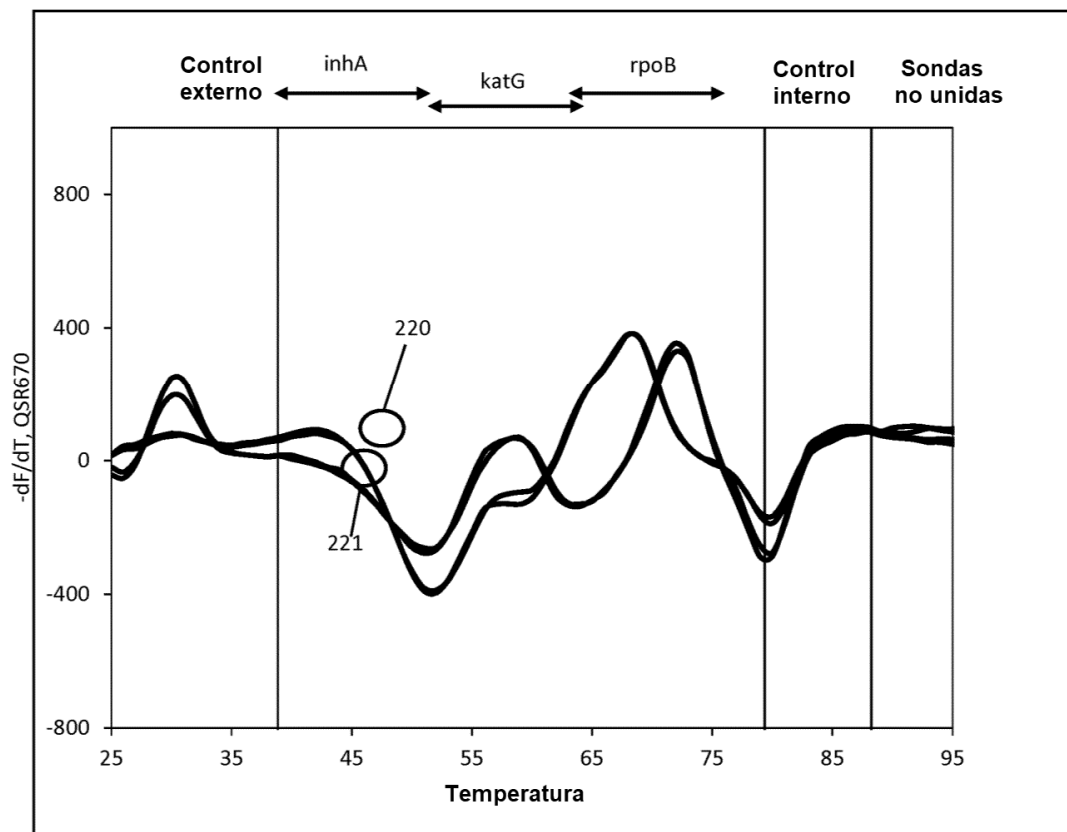


FIG. 28

A

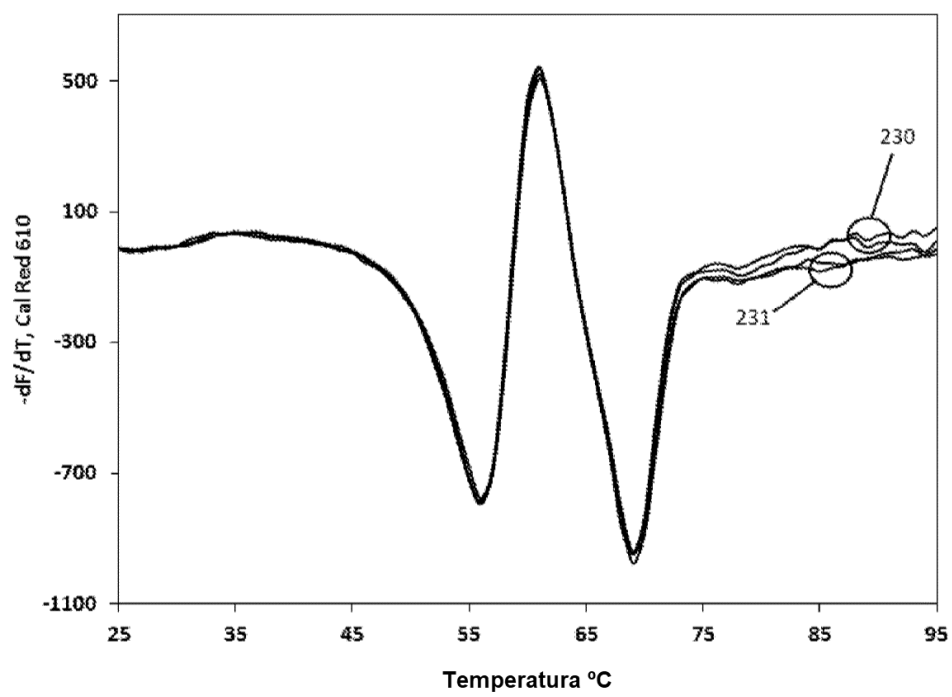


FIG. 28 (Continuación)

B

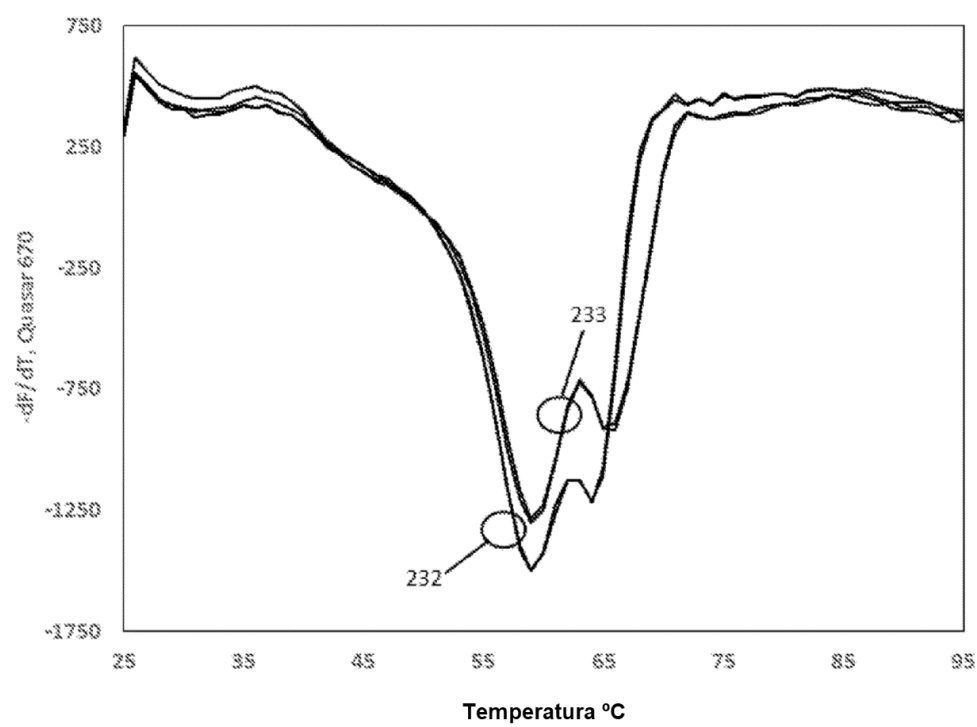


FIG. 29

A

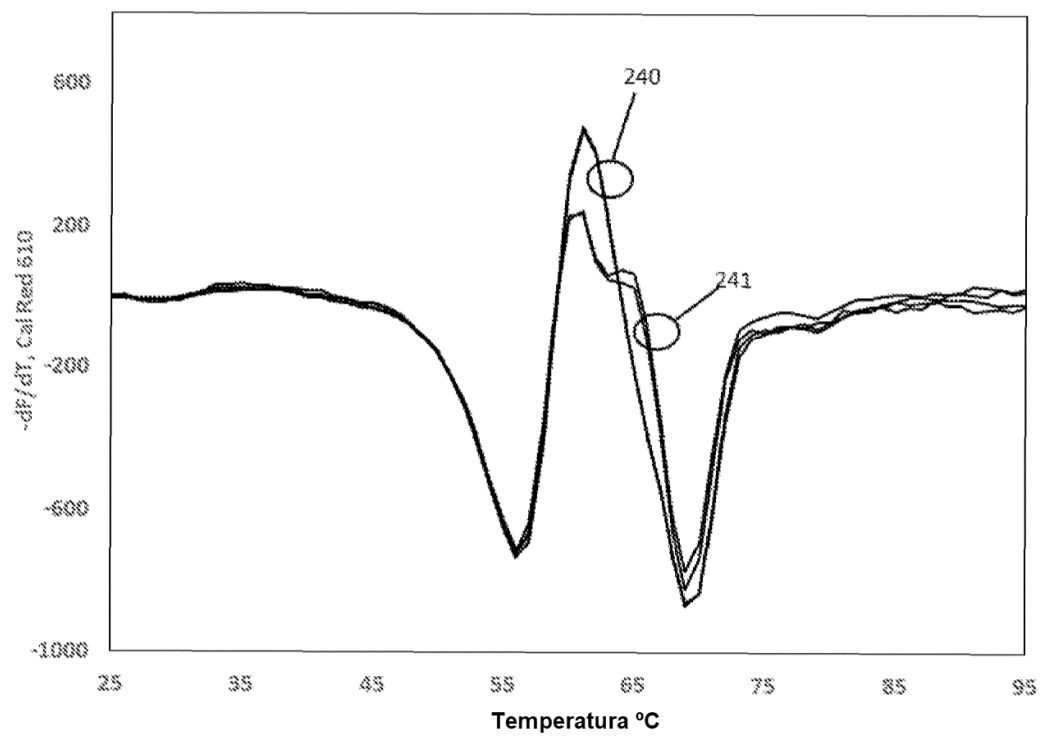


FIG. 29 (Continuación)

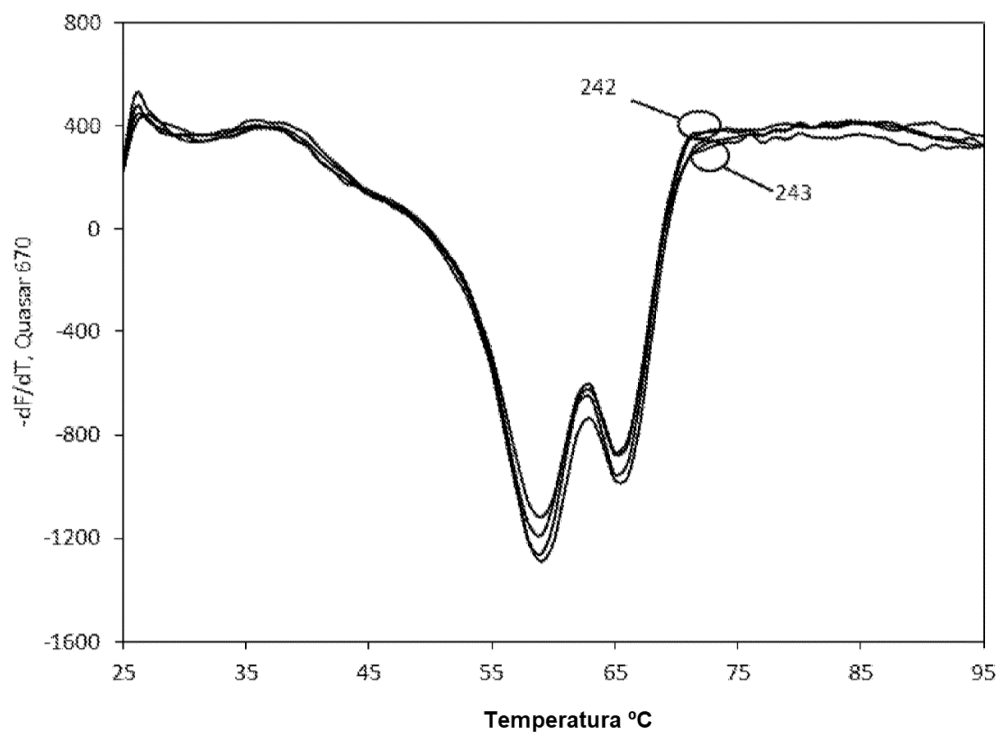
B

FIG. 30

A

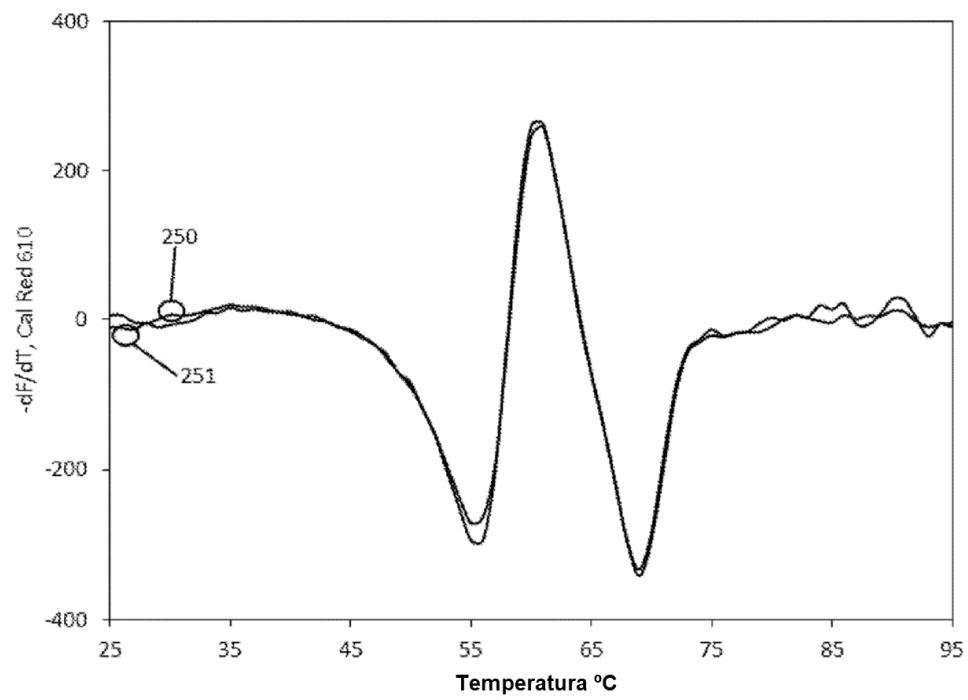


FIG. 30 (Continuación)

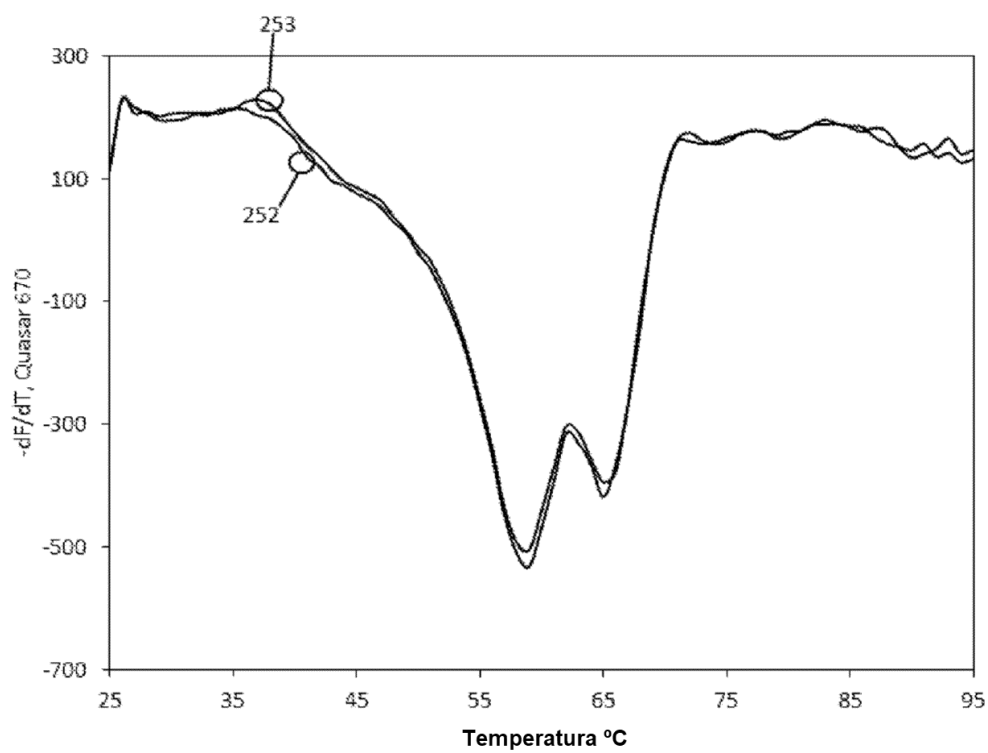
B

FIG. 31

A

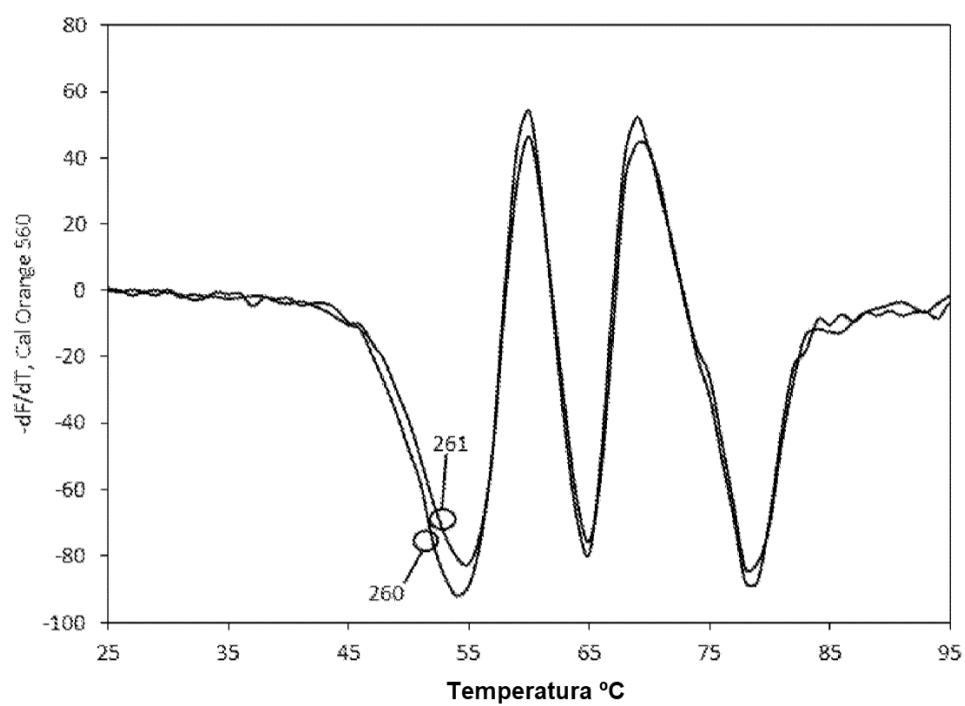


FIG. 31 (Continuación)

B

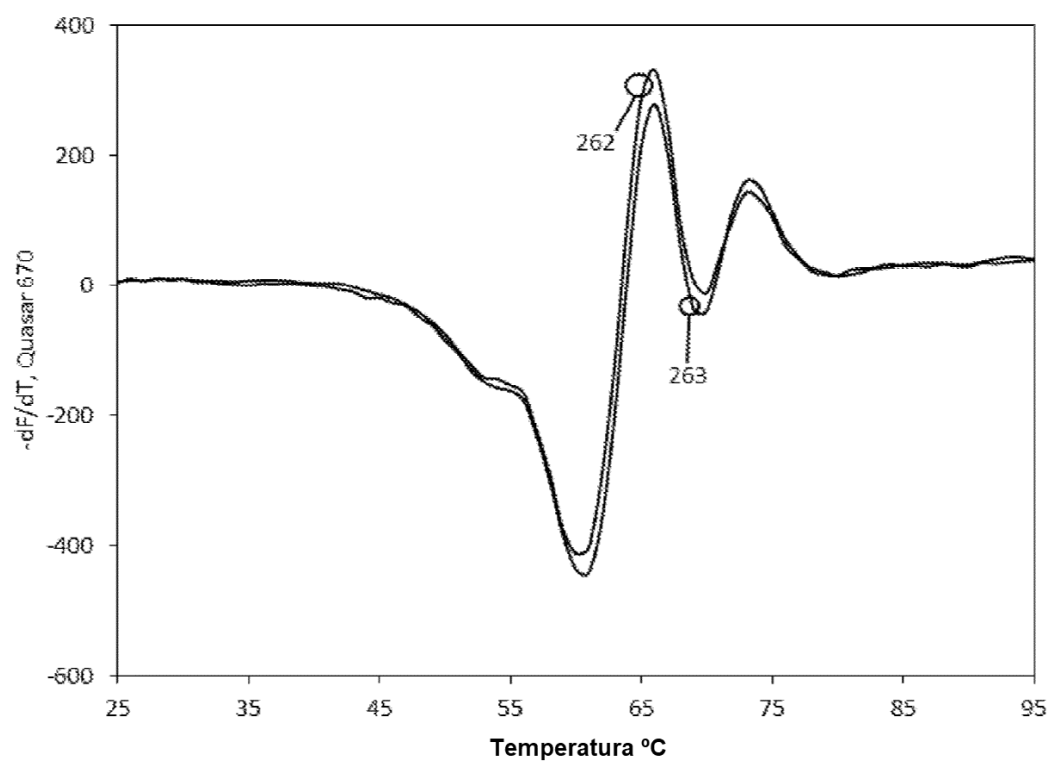


FIG. 31 (Continuación)

C

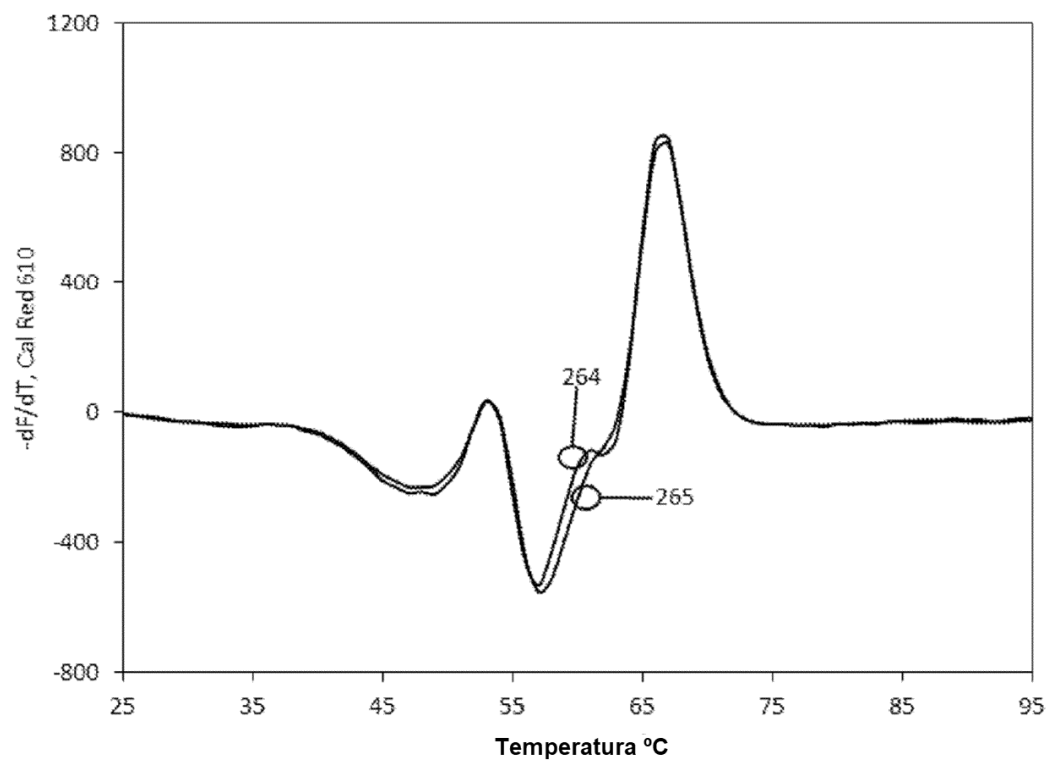


FIG. 32

A

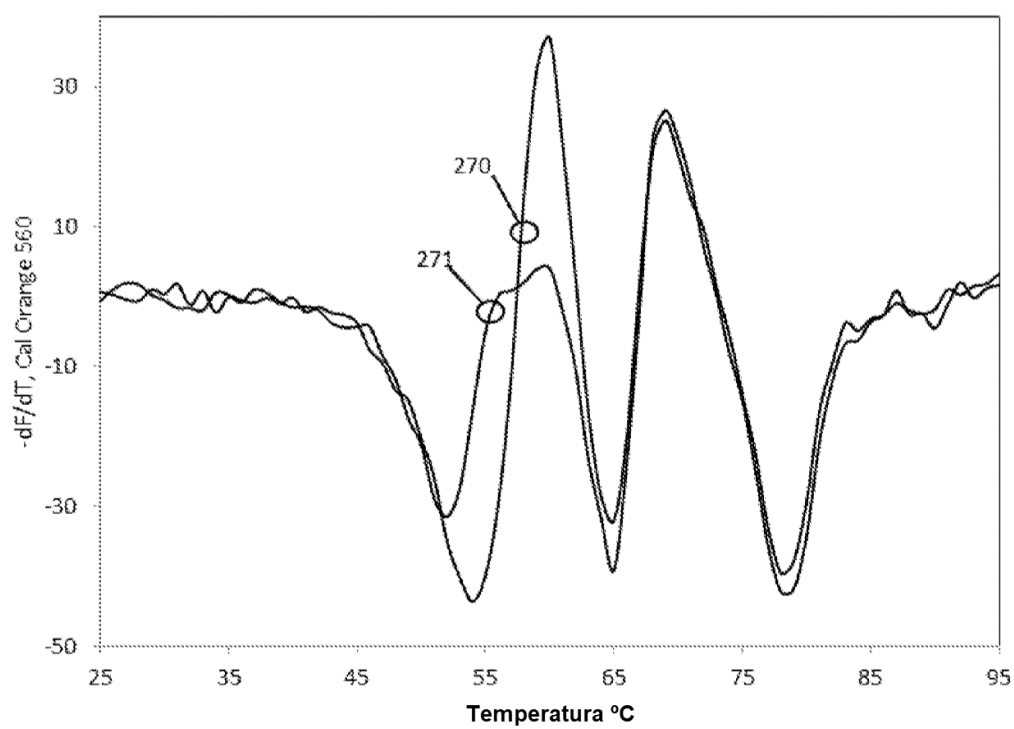


FIG. 32 (Continuación)

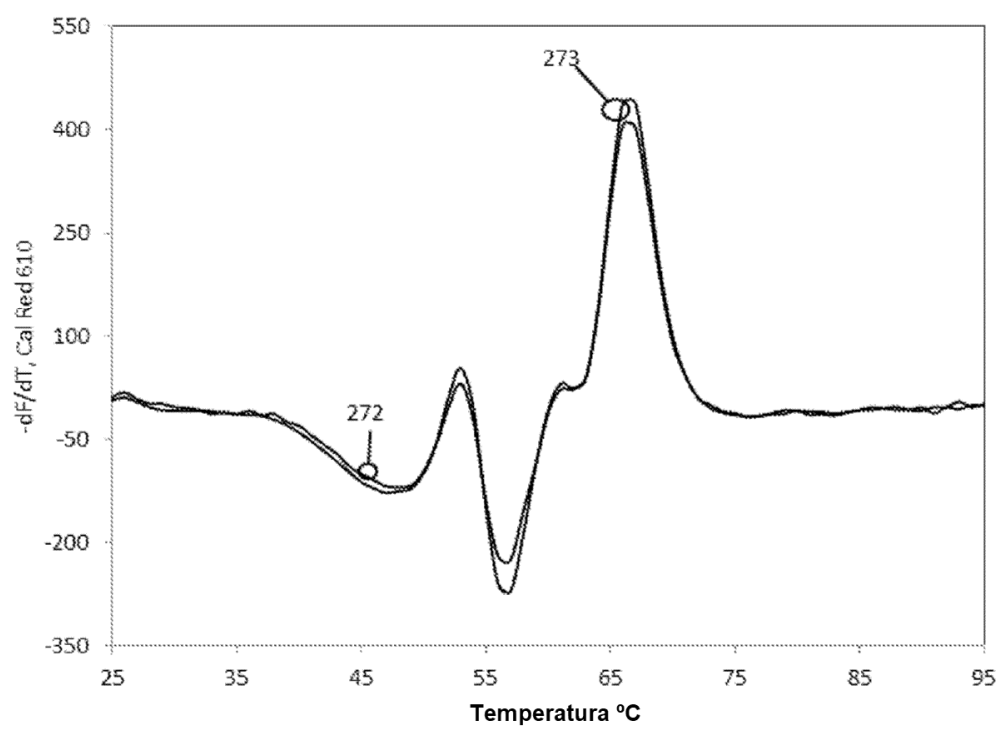
B

FIG. 32 (Continuación)

C

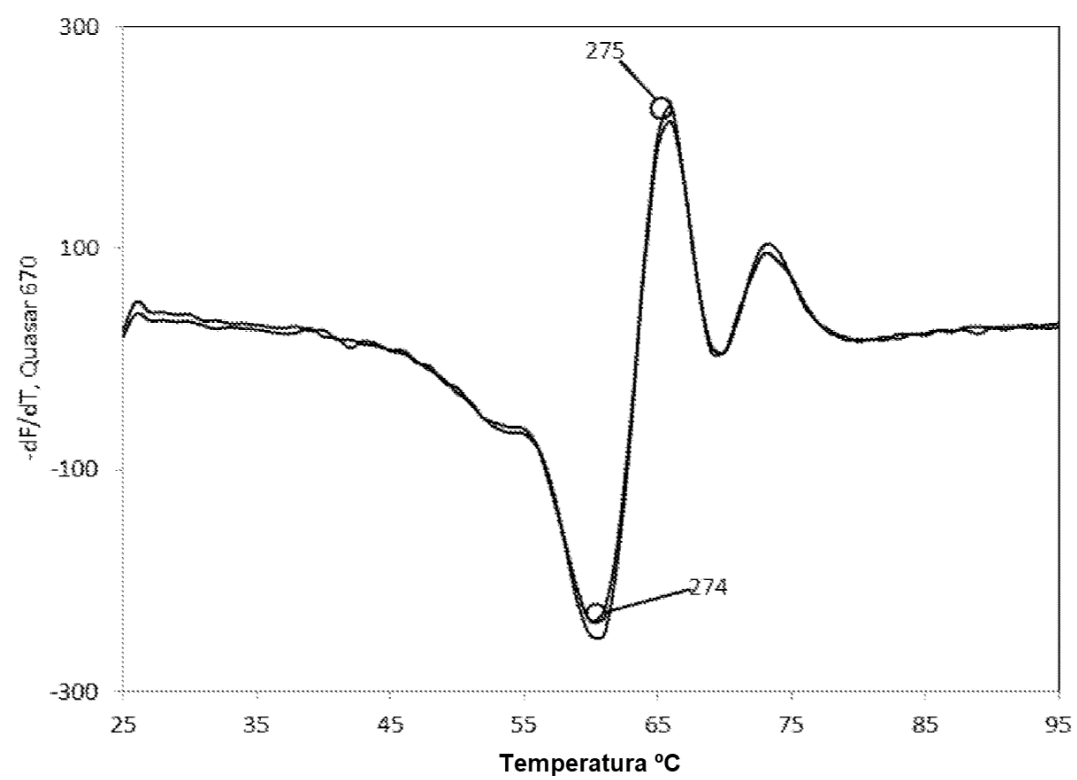


FIG. 33

A

Ilustración de opciones de Diseño II para un ácido nucleico diana y un conjunto de sondas de hibridación

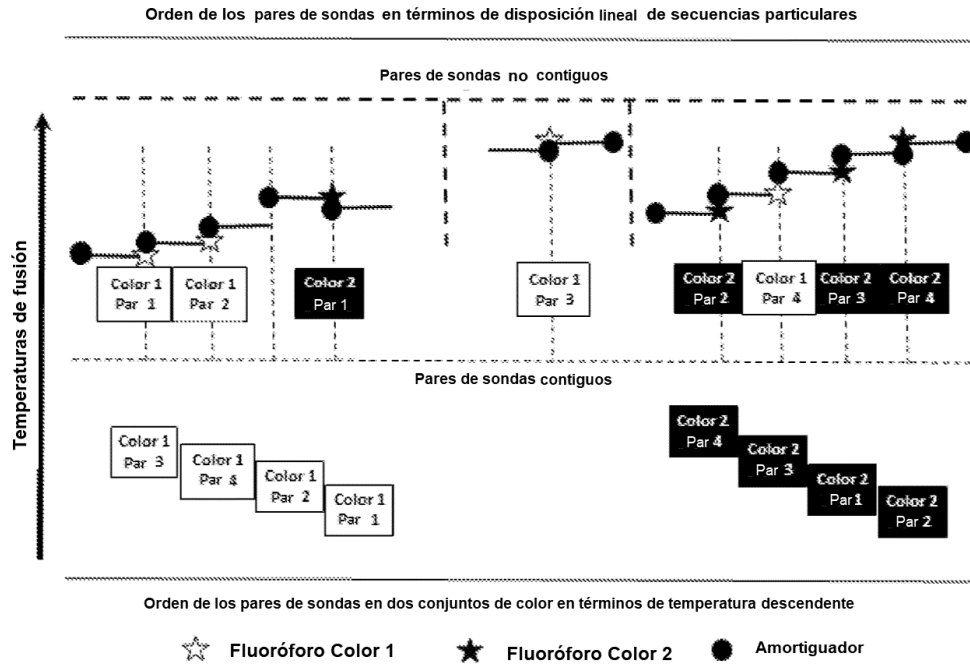


FIG. 33 (Continuación)

B

Cambios de secuencia de ácido nucleico diana después de las T_m de sonda y por tanto orden de las sondas en conjuntos coloreados.

