

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 816 748**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6844 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2008** E 12195331 (9)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020** EP 2657350

54 Título: **Reacción de amplificación de extensión y mellado para la amplificación exponencial de los ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

14.07.2007 US 778018

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

05.04.2021

73 Titular/es:

**IONIAN TECHNOLOGIES, LLC (100.0%)
9995 Summers Ridge Road
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**MAPLES, BRIAN K.;
HOLMBERG, REBECCA C.;
MILLER, ANDREW P.;
PROVINS, JARROD;
ROTH, RICHARD y
MANDELL, JEFFREY**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 816 748 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

Reacción de amplificación de extensión y mellado para la amplificación exponencial de los ácidos nucleicos

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere, en general, a la amplificación exponencial rápida de cortas secuencias de ADN o ARN a temperatura constante.

10 **Antecedentes**

El campo del diagnóstico *in vitro* está desarrollándose rápidamente, pues están aumentando exponencialmente los sistemas necesarios que puedan detectar rápidamente la presencia de especies peligrosas, o que determinen la secuencia genética de una región de interés. La atención diagnóstica molecular habitual se centra en la detección de marcadores biológicos e incluye la detección de pequeñas moléculas, ensayos inmunológicos, y pruebas de ácidos nucleicos. La especificidad construida entre dos cadenas ácido nucleicas sustancialmente complementarias, permite un reconocimiento específico y rápido utilizando secuencias únicas de ADN o ARN, cuya simplicidad convierte al ensayo del ácido nucleico en una perspectiva atractiva. La identificación de agentes víricos amenazantes, de productos alimenticios genéticamente modificados, y de polimorfismos de nucleótidos únicos para la gestión de enfermedades, constituyen sólo algunos ámbitos en los que el avance de estas herramientas diagnósticas moleculares se convierte en extremadamente ventajoso. Para hacer frente a estas crecientes necesidades, se han desarrollado tecnologías de amplificación de ácido nucleico, que se han adecuado a estas necesidades de especificidad y sensibilidad.

25 Históricamente, la técnica de amplificación más habitual es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que, en muchos casos se ha convertido en la "regla de oro" para los procedimientos de detección, debido a su especificidad y fiabilidad. Esta técnica necesita un ciclo térmico con objeto de proceder a través de las etapas de desnaturalización del dsADN, hibridación de cortos cebadores oligonucleótidos, y extensión del cebador a lo largo de la matriz mediante una polimerasa termoestable. Aunque muchos nuevos avances en ingeniería genética han acortado con éxito estos tiempos de reacción a 20-30 minutos, es todavía necesaria una capacidad de planteamiento para cumplir con las necesidades de estas unidades termocicladoras.

30 Para soslayar la necesidad de la ciclación térmica, se han desarrollado varias técnicas de amplificación isotérmica. Debido a esta circunstancia, han emergido tecnologías de amplificación isotérmica tanto para el ADN como para el ARN.

35 La amplificación mediada por la transcripción (TMA) utiliza una transcriptasa inversa con actividad RNásica, una RNA polimerasa, y cebadores con una secuencia promotora en el extremo 5'. La transcriptasa inversa sintetiza cADN a partir del cebador, degrada el ARN diana, y sintetiza la segunda hebra después de que el cebador inverso se una. Entonces, la ARN polimerasa se une a la región promotora del dsADN y transcribe nuevos transcritos ARN que pueden servir como matrices para una transcripción inversa ulterior. La reacción puede producir una amplificación de un billón de veces en 20-30 minutos. Este sistema no es tan robusto como otras técnicas de amplificación del ADN y no constituye, por tanto, un ensayo de ámbito implantable debido a la presencia de las ARNasas externas de un laboratorio estéril. Esta técnica de amplificación es muy similar a la Replicación Secuencial Auto-Sostenida (3SR) y la Amplificación Basada en la Secuencia Ácido Nucleica (NASBA), pero varía en los enzimas utilizados.

40 La Amplificación Isotérmica de Cebador Único (SPIA) también implica polimerasas múltiples y RNasaH. En primer lugar, una transcriptasa inversa extiende un cebador quimérico a lo largo de un ARN diana. La RNasaH degrada el ARN diana y permite que una ADN polimerasa sintetice la segunda hebra del cADN. Entonces, RNasaH degrada una parte del cebador quimérico, para liberar una matriz para la Q-Beta replicasa, dando lugar a una amplificación exponencial de modo que existe replicasa en exceso para la matriz. Debido a que el proceso de replicación de Q-Beta es tan sensible, y puede llevar a cabo la amplificación tanto si la diana está presente o no, son necesarias múltiples etapas de lavado para purgar la muestra de plásmidos de replicación no unidos específicamente. La amplificación exponencial tarda aproximadamente 30 minutos, sin embargo, el tiempo total que incluye todas las etapas de lavado, es aproximadamente de 4 horas.

50 El sistema Q-Beta replicasa constituye un procedimiento de amplificación de una sonda. Una región de una sonda, complementaria o sustancialmente complementaria a la diana de elección, se inserta en MDV-1 RNA, una matriz que se presenta de modo natural para la Q-beta replicasa. Q-Beta replica el plásmido MDV-1, de forma que el producto sintetizado es en sí mismo una matriz para la Q-Beta replicasa, dando lugar a una amplificación exponencial de modo que existe replicasa en exceso para la matriz. Debido a que el proceso de replicación de Q-Beta es tan sensible, y puede llevar a cabo la amplificación tanto si la diana está presente o no, son necesarias múltiples etapas de lavado para purgar la muestra de plásmidos de replicación no unidos específicamente. La amplificación exponencial tarda aproximadamente 30 minutos, sin embargo, el tiempo total que incluye todas las etapas de lavado, es aproximadamente de 4 horas.

65 También se han desarrollado numerosas tecnologías de amplificación isotérmica del ADN. La amplificación en círculos rodantes (RCA) se desarrolló basándose en la replicación natural de plásmidos y virus. Un cebador se

propaga a lo largo de una matriz circular, dando lugar a la síntesis de una repetición monocatenaria en tandem. Las etapas de captura, lavado y unión son necesarias para circularizar preferentemente la matriz en presencia de la diana y reducir la amplificación anterior. La amplificación de ramificación (RAM) añade cebadores en cascada para una amplificación geométrica adicional. Esta técnica implica la amplificación de hebras de tamaños no específicos, que son mono o bicatenarias.

La amplificación dependiente de helicasa (HDA) se beneficia de una helicasa termoestable Tte-UvrD para que un dsADN no enrollado pueda crear hebras monocatenarias que están entonces disponibles para la hibridación y la extensión de los cebadores mediante la polimerasa. El procedimiento HDA termoestable no necesita las proteínas accesorias que el HDA no termoestable requiere. La reacción puede llevarse a cabo a una única temperatura, aunque una desnaturalización térmica inicial para unir los cebadores, genera más producto. Se informa de que los tiempos de reacción son superiores a una hora para amplificar productos con una longitud de 70-120 pares de bases.

La amplificación mediada por circuito cerrado (LAMP) constituye un procedimiento de amplificación isotérmico específico y sensible que utiliza una polimerasa termoestable con posibilidades de desplazamiento de la hebra y cuatro o más cebadores. Los cebadores se diseñan para hibridar consecutivamente a lo largo de la diana en sentido anterógrado e inverso. La extensión de los cebadores externos desplaza a los cebadores internos para liberar las hebras únicas. Cada cebador se diseña para que tenga extremos de tipo horquilla, que, una vez desplazados, encajen en una horquilla para facilitar el autocebado y la ulterior extensión de la polimerasa. Los cebadores adicionales en circuito cerrado pueden disminuir el tiempo de amplificación, pero complica la mezcla reactiva. En general, LAMP constituye un procedimiento dificultoso para ser multiplexado, es decir, amplificar más de una secuencia diana en un momento dado, aunque se informa de que es extremadamente específico, debido a los cebadores múltiples que deben hibridar a la diana para el proceso ulterior de amplificación. Aunque la reacción tiene lugar bajo condiciones isotérmicas, es necesaria una etapa térmica inicial de desnaturalización para las dianas bicatenarias. La amplificación tiene lugar en 20 a 50 minutos y produce un patrón de productos de diversas longitudes.

La amplificación de desplazamiento de la hebra (SDA) se desarrolló por Walker et al. en 1992. El procedimiento de amplificación utiliza dos conjuntos de cebadores, una polimerasa que desplaza una hebra, y una endonucleasa de restricción. Los cebadores tipo "tope" sirven para desplazar los cebadores inicialmente propagados para crear una única hebra para el cebador que esté próximo a unirse. Un sitio de restricción se encuentra en la región 5' del cebador. Los nucleótidos tiol-modificados se incorporan a los productos sintetizados para inhibir la descomposición de la hebra sintetizada. Esta modificación crea un sitio mellado en el lado cebador de la hebra, que la polimerasa puede extender. Este enfoque necesita una etapa inicial de desnaturalización térmica para dianas bicatenarias. La reacción se procesa entonces a una temperatura inferior a la de fusión de la región diana bicatenaria. Utilizando este procedimiento, en 30-45 minutos se amplifican habitualmente productos de 60-100 bases de longitud.

Estos y otros procedimientos de amplificación se consideran en, por ejemplo VanNess, J, et al., PNAS 2003, vol 100, nº 8, p 4504-4509; Tan E., et al., Anal. Chem. 2005, 77, 7984-7992; Lizard P., et al., Nature Biotech. 1998, 6, 1197-1202; Notomi, T., et al., NAR 2000, 28, 12, e63; y Kurn, N., et al., Clin. Chem. 2005, 51-10, 1973-1981. Otras referencias para estas técnicas generales de amplificación, incluyen, por ejemplo, las patentes US nºs de serie 7112423; 5455166; 5712124; 5744311; 5916779; 5556751; 5733733; 5834202; 5354668; 5591609; 5614389; 5942391; y las patentes US con nºs de publicación US20030082590; US20030138800; US20040058378 y US20060154286. Nuovo Diagn. Mol. Pathol (2000) volumen 9, páginas 195-202 describe "*In situ strand displacement amplification: an improved technique for the detection of low copy nucleic acids*". El documento US 6191267 B1 (Kong Huimin [US] et al) (2001) describe la aplicación del enzima de mellado N.BstNBI en una amplificación de desplazamiento de hebra no tio. Ehses et al (2005) J. Biochem. Biophys. Methods 63(3):170-186 describen la optimización y el diseño de la configuración de oligonucleótidos para la amplificación de desplazamiento de hebra.

Sumario

En la presente invención se proporcionan procedimientos para amplificar secuencias ácido nucleícas diana que dependen del mellado y de reacciones de extensión para amplificar secuencias más cortas en un marco temporal de lectura más rápido que las reacciones tradicionales de amplificación, tal como, por ejemplo, reacciones de amplificación de desplazamiento de hebras. Las formas de realización de la invención incluyen, por ejemplo, reacciones que utilizan sólo dos matrices para amplificar una secuencia diana, uno o dos enzimas de mellado, y una polimerasa, bajo condiciones isotérmicas. En las formas de realización ejemplificativas, la polimerasa y la enzima de mellado son termófilas, y la temperatura de reacción es significativamente inferior que la de fusión de la región diana hibridada. La enzima para el mellado mella sólo una hebra en un dúplex bicatenario de forma que la incorporación de nucleótidos modificados no es necesaria como en el caso de la amplificación convencional de desplazamiento de la hebra. Una etapa inicial de desnaturalización térmica no es necesaria para los procedimientos de la presente invención. Debido a la simplicidad de la reacción, en las formas de realización ejemplificativas, la reacción es muy fácil de llevar a cabo, no necesita un equipo especial, tal como un ciclor termico, y puede amplificar productos de 20-30 unidades metaméricas entre 10^8 y 10^{10} veces a partir del ADN

genómico en sólo entre 2,5 y 10 minutos aproximadamente. Además, en otras formas de realización ejemplificativas, el procedimiento puede amplificar el ARN sin una etapa de transcripción inversa separada. Basándose en la divulgación contenida en la presente memoria, la presente invención proporciona un procedimiento para la amplificación de secuencia de nucleótidos, que comprende:

combinar un ácido nucleico diana que presenta una secuencia de nucleótidos diana con

- (i) una polimerasa;
- (ii) un primer ácido nucleico de matriz que comprende (a) una primera región de reconocimiento de matriz en el extremo 3' que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana, (b) un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado aguas arriba de la región de reconocimiento y (c) una región estabilizante aguas arriba de dicho enzima de mellado;
- (iii) un segundo ácido nucleico de matriz que comprende (a) una segunda región de reconocimiento de matriz en el extremo 3' que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' del complemento de la primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana, (b) un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado aguas arriba de la región de reconocimiento y (c) una región estabilizante aguas arriba de dicho sitio de mellado; y
- (iv) uno o más enzimas de mellado que son aptos para mellar en el sitio de mellado de dichos primer y segundo ácidos nucleicos de matriz, en el que un enzima de mellado es apto para mellar ambas de dichas matrices, o cada matriz es apta para ser mellada mediante por lo menos uno de los enzimas de mellado, y en el que dichos uno o más enzimas de mellado no mellan dentro de dicha secuencia diana;

en una reacción de amplificación, bajo condiciones en las que la polimerasa extiende los ácidos nucleicos de matriz, generando así unos amplicones de ácido nucleico de matriz extendidos; en el que

el ácido nucleico diana no se ha sometido a una etapa de desnaturalización térmica inicial;

la secuencia de nucleótidos diana es de entre 20 y 40 nucleótidos de longitud;

la secuencia de nucleótidos diana comprende de 1 a 5 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de la primera región de reconocimiento de matriz y la segunda región de reconocimiento de matriz; y

las etapas anteriores se llevan a cabo bajo unas condiciones sustancialmente isotérmicas.

La presente invención y las formas de realización de la misma se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

Se describe en la presente memoria un procedimiento para amplificar una secuencia ácido nucleica bicatenaria diana, que comprende poner en contacto una molécula diana de ADN, que incluye una secuencia bicatenaria diana que posee una hebra codificante y una no codificante, con una matriz anterógrada y una inversa, en la que dicha matriz anterógrada comprende una secuencia ácido nucleica que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' y que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la hebra no codificante de la secuencia diana; un sitio mellado enzimático de unión, y un sitio mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento, y una región de estabilización aguas arriba de dicho sitio mellado enzimático de unión y de dicho sitio mellado; incluyendo dicha matriz inversa una secuencia de nucleótidos que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la hebra codificante de la secuencia diana, un sitio mellado enzimático de unión y un sitio mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento, y una región estabilizante aguas arriba de dicho sitio de mellado enzimático de unión y dicho sitio de mellado; proporcionando un primer enzima de mellado que puede disponer mellas en el sitio de mellado de dicha matriz anterógrada; no dando lugar a mellas en el interior de dicha secuencia diana; proporcionando un segundo enzima de mellado que puede producir mellas en el sitio de mellado de dicha matriz inversa y que no da lugar a mellas en el interior de dicha secuencia diana; y proporcionando una ADN polimerasa; bajo condiciones en las que la amplificación se lleva a cabo mediante ciclos múltiples de dicha polimerasa, propagando dichas matrices anterógradas e inversas a lo largo de dicha secuencia diana, produciendo un sitio de mellado bicatenario, dando lugar a mellas dichos enzimas mellantes en dichos sitios de mellado, produciendo un producto de amplificación.

En ciertas formas de realización de la invención, la ADN polimerasa es una polimerasa termófila. En otros ejemplos de la invención, la polimerasa y dichos enzimas de mellado son estables a temperatura de hasta 37°C, 42°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C u 85°C. En ciertas formas de realización, la polimerasa es estable hasta 60°C. La polimerasa puede, por ejemplo, seleccionarse a partir del grupo formado por Bst (fragmento grande), 9°N, Vent_R® (exo-)DNA polimerasa, Therminator, y Therminator II.

5 El enzima de mellado puede, por ejemplo, producir mellas por encima del sitio de unión del enzima de mellado, o, en formas de realización ejemplificativas, el enzima de mellado puede producir mellas aguas abajo del sitio de unión enzimática para mellado. En ciertas formas de realización, las matrices anterógradas e inversa comprenden sitios de mellado reconocidos por el mismo enzima de mellado, siendo los mismos dicho primero y segundo enzimas de mellado.

El enzima de mellado puede, por ejemplo, seleccionarse a partir del grupo formado por Nt.BspQI, Nb.BbvCI, Nb.Bsml, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, Nt.AlwI, Nt.BbvCI, Nt.BstNBI, Nt.CviPII, Nb.Bpu10I, y Nt.Bpu10I.

10 La secuencia diana comprende de 1 a 5 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de dicha región de reconocimiento de la matriz anterógrada y de dicha región de reconocimiento de la matriz inversa.

15 La molécula de ADN puede ser, por ejemplo, ADN genómico. La molécula de ADN puede seleccionarse, por ejemplo, a partir del grupo formado por ADN plasmídico, mitocondrial y vírico. En ciertas formas de realización, la matriz anterógrada se proporciona a la misma concentración que la matriz inversa. En otros ejemplos, la matriz anterógrada se proporciona en una proporción con respecto a la matriz inversa del orden de 1:100 a 100:1.

20 En otros ejemplos de la invención, el procedimiento comprende además la utilización de una segunda polimerasa. La amplificación puede llevarse a cabo, por ejemplo a temperatura constante. Esta temperatura, puede estar, por ejemplo, entre 54°C y 60°C. En cuanto al tiempo para que la reacción se produzca, en ciertos ejemplos, la reacción de amplificación se mantiene a una temperatura constante entre 1 y 10 minutos.

25 La presente invención comprende además la detección del producto de amplificación, por ejemplo, mediante el grupo de técnicas formado por electroforesis en gel, espectrometría de masas, fluorescencia SYBR I, fluorescencia SYBR II, oro SYBR, Pico Green, TOTO-3, intercalando la detección de colorantes, FRET, detección de una baliza molecular, captura superficial, electroforesis capilar, incorporación de nucleótidos marcados para permitir la detección mediante captura, polarización de fluorescencia, y captura lateral de flujo. Los productos de amplificación pueden detectarse, por ejemplo, detectarse utilizando un procedimiento sólido de superficie, por ejemplo, donde por lo menos, se inmoviliza una sonda de captura en la superficie sólida que se une a la secuencia amplificada.

30 La presente invención puede utilizarse para la amplificación multiplex. Así, por ejemplo, en ciertas formas de realización de la presente invención, al menos dos secuencias diana pueden amplificarse. Por "pueden amplificarse" hace referencia a que la reacción de amplificación comprende las matrices y las enzimas apropiadas para amplificar, por lo menos, dos secuencias diana. Así por ejemplo, la reacción de amplificación puede prepararse para detectar por lo menos dos secuencias diana, pero estando presente sólo en la muestra sometida a investigación, actualmente, una de las secuencias diana, de forma que ambas secuencias puedan amplificarse, incluso aunque sólo una secuencia pueda actualmente amplificarse. O, si están presentes dos secuencias dianas, la reacción amplificadora puede llevar a la amplificación de dos de las secuencias diana. La reacción de amplificación multiplex puede dar lugar a la amplificación de una, alguna o todas, las secuencias diana, para la cual incluye las matrices y enzimas apropiados.

35 Por lo menos, una de las matrices, por ejemplo, puede incluir un espaciador, un grupo de bloqueo, o un nucleótido modificado.

45 También se describe en la presente memoria un procedimiento para amplificar una secuencia diana ácido nucleica monocatenaria, que comprende poner en contacto un ácido nucleico diana que incluye una secuencia diana monocatenaria con una matriz inversa, donde dicha matriz inversa comprende una secuencia de nucleótidos que incluye una región de reconocimientos en el extremo 3' y que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la secuencia diana, un sitio mellado enzimático de unión y un sitio mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento, y una región de estabilización aguas arriba de dicho sitio mellado enzimático de unión y dicho sitio mellado; proporcionando un primer enzima de mellado, que puede mellar en el sitio de mellado de dicha matriz inversa, y que no produce mellas en el interior de dicha secuencia diana; proporcionando una ADN polimerasa bajo condiciones en las que dicha polimerasa propaga dicha matriz inversa a lo largo de dicha secuencia diana; poniendo en contacto dicha matriz inversa que se propaga con una matriz anterógrada, donde dicha matriz anterógrada comprende un sitio de reconocimiento en el extremo 3' y que es idéntico al extremo 5' de la secuencia diana, un sitio mellado enzimático de unión y un sitio mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento, y una región de estabilización aguas arriba de dicho sitio mellado enzimático de unión y dicho sitio mellado; proporcionando un segundo enzima de mellado que puede provocar mellas en el sitio de mellado de dicha matriz anterógrada, no provocando mellas en el interior de dicha secuencia diana; bajo condiciones en las que la amplificación se lleva a cabo mediante ciclos múltiples de dicha polimerasa, propagando dichas matrices anterógradas e inversas a lo largo de dicha secuencia diana, produciendo un sitio de mellado bicatenario, produciendo dichas enzimas mellantes, en dichos sitios de mellado, un producto de amplificación.

65 Los expertos en la materia apreciarán que los ejemplos que se presentan en la presente memoria con respecto a la amplificación de una secuencia diana ácido nucleica bicatenaria, y la detección del producto amplificado, se aplican también a la amplificación de una secuencia diana ácido nucleica monocatenaria y a la detección del

producto amplificado. Además, en los ejemplos de la presente invención, la secuencia diana puede ser, por ejemplo, ARN, a título de ejemplo no limitativo ARN mensajero (ARNm), ARN ribosómico (ARNr), ARN vírico, micro ARN, un micro precursor, o siARN. En las formas de realización ejemplificativas de la presente invención, por ejemplo, si la secuencia diana es ARN, la polimerasa posee actividad de transcripción inversa. En otros ejemplos de la presente invención, aún, la secuencia diana es ADN, tal como por ejemplo, el ADN genómico, o por ejemplo, la secuencia diana, se selecciona a partir del grupo formado por ADN plasmídico, mitocondrial y vírico, o incluso, un producto PCR.

Si el procedimiento, según la presente invención, implica la utilización de más de una polimerasa, en las formas de realización ejemplificativas, una, por lo menos, de las polimerasas, puede tener actividad transcriptásica.

La presente divulgación proporciona un conjunto de matrices oligonucleótidas, que comprende una primera matriz para la amplificación ácidos nucleica, que incluye una región de reconocimiento del extremo 3', que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de una hebra no codificante de una secuencia diana; un sitio enzimático de unión para mellado; y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento; y una región de estabilización aguas arriba de dicho sitio enzimático de unión para mellado y dicho sitio de mellado; y una segunda matriz para amplificación del ácido nucleico, que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' que es idéntica al extremo 5' de dicha hebra no codificante de la secuencia diana; de unión del enzima de mellado y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento; y una región estabilizante aguas arriba de dicho sitio de unión enzimático para mellado y dicho sitio de mellado; en el que dicha secuencia diana comprende entre 1 y 5 bases espaciadoras entre dicho extremo 3' de la hebra no codificante y el extremo 5' de dicha hebra antisentido que no se une a ninguna matriz.

La presente divulgación proporciona un kit para seguir los procedimientos de la presente divulgación para la amplificación de ácido nucleico, que comprende una ADN polimerasa, una primera matriz para la amplificación de ácido nucleico, que incluye una región de reconocimiento en el extremo 3' y que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de una hebra no codificante de una secuencia diana; un sitio de unión de enzima de mellado, y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento; y una región estabilizante aguas arriba de dicho sitio de unión de enzima de mellado y dicho sitio de mellado; una segunda matriz para la amplificación de ácido nucleico, que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de una hebra codificante de una secuencia diana; un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento; y una región de estabilización aguas arriba de dicho sitio de unión enzimático de reconocimiento y dicho sitio de mellado; uno o dos enzimas termoestables para mellado, en los que un enzima puede mellar en el sitio de mellado de dicha primera y segunda matrices, o un primer enzima puede mellar en el sitio de mellado de dicho primer cebador, y un segundo enzima puede mellar en el sitio enzimático de dicho segundo cebador.

El kit puede, por ejemplo, proporcionar dicha polimerasa, enzimas de mellado, y matrices en un recipiente. En ciertos ejemplos, el kit puede proporcionar dicha polimerasa los enzimas de mellado y las matrices en dos recipientes. En ciertos ejemplos, la polimerasa y los enzimas de mellado están liofilizados. El kit puede, por ejemplo, comprender instrucciones ulteriores para seguir los procedimientos de amplificación de la presente divulgación. El kit puede, por ejemplo, incluir además, una pequeña cuba. El kit puede, por ejemplo, comprender además un dispositivo de flujo lateral o de tiras reactivas. El dispositivo de flujo lateral o de tiras reactivas puede comprender además una sonda de captura, donde sonda de captura se une al producto amplificado. El kit puede, por ejemplo, incluir además, un componente detector, por ejemplo, uno seleccionado a partir del grupo formado por un colorante fluorescente, partículas de oro coloidal, partículas de látex, baliza molecular, perlas de poliestireno, y similares. En otros ejemplos, una, por lo menos, de las matrices del kit, puede incluir un espaciador, grupo de bloqueo o un nucleótido modificado.

Los deoxinucleótido trifosfatos (dNTP) se incluyen en la reacción de amplificación. Uno o varios de los dNTP pueden modificarse o marcarse, tal como se considera en la presente memoria, pero, sin embargo, la utilización de los dNTP no es necesaria en este procedimiento. Los nucleótidos se designan de la siguiente forma. A un ribonucleósido trifosfato se le hace referencia como NTP o rNTP; donde N puede ser A, G, C, U o m5U, para designar ribonucleótidos específicos. Los sustratos desoxinucleósidos trifosfato se indican como dNTP, donde N puede ser A, G, C, T o U. En el texto, las unidades monoméricas nucleótidas pueden denominarse como A, G, C, O T sin hacer una referencia particular a ADN o ARN.

Se proporciona un procedimiento para la amplificación de ácido nucleico que comprende la formación de una mezcla de un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana bicatenaria que posee una hebra codificante y una no codificante; una matriz anterógrada que incluye una secuencia ácido nucleica que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' y que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la hebra no codificante de la secuencia diana; un sitio de unión del enzima de mellado y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento, y una región de estabilización aguas arriba de dicho sitio de unión de enzima de mellado y dicho sitio de mellado; una matriz inversa que comprende una secuencia de nucleótidos que incluye una región de reconocimiento en el extremo 3' que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la hebra codificante de la secuencia diana, un sitio de unión de enzima de mellado

y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento y una región de estabilización aguas arriba de dicho sitio de unión de enzima de mellado y dicho sitio de mellado; un primer enzima de mellado que puede provocar mellas en el sitio de mellado de dicha matriz anterógrada, y que no produce mellas dentro de dicha secuencia diana; un segundo enzima de mellado que puede producir una mella en dicho sitio de mellado de dicha matriz inversa, y no produce una mella dentro de dicha secuencia diana; y una polimerasa termófila bajo condiciones en las que la amplificación se lleva a cabo mediante ciclos múltiples de dicha polimerasa, propagando dichas matrices inversas y anterógradas a lo largo de dicha secuencia diana, dando lugar a un sitio de mellado bicatenario, produciendo mellas dichos enzimas de mellado en dichos sitios de mellado, dando lugar a un producto de amplificación. En determinadas formas de realización, los sitios de unión enzimáticos para la formación de mellas en las matrices inversas y anterógradas, son reconocidos por el mismo enzima de mellado, utilizándose para la reacción un solo enzima de mellado.

También se describe en la presente invención un procedimiento para la amplificación de ácido nucleico que incluye la formación de una mezcla de un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana monocatenaria; una matriz inversa, en la que ésta comprende una secuencia de nucleótidos que incluye una región de reconocimiento en el extremo 3', que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la secuencia diana, un sitio de unión de enzima de mellado, y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento, y una región estabilizante aguas arriba de dicho sitio de unión enzimática para mellado y dicho sitio de mellado; un primer enzima de mellado que puede producir mellas en el sitio de mellado de dicha matriz inversa, y que no produce una mella dentro de dicha secuencia diana; una polimerasa termófila bajo condiciones en las cuales dicha polimerasa se propaga en dicha matriz inversa a lo largo de dicha secuencia diana, una matriz anterógrada, en la que dicha matriz anterógrada comprende una secuencia ácido nucleica que comprende una región de reconocimientos en el extremo 3' que es idéntica o sustancialmente idéntica al extremo 5' de la secuencia diana; y un segundo enzima de mellado que puede producir mellas en el sitio de mellado de dicha matriz anterógrada y que no produce mellas dentro de dicha secuencia diana; bajo condiciones en las que la amplificación se lleva a cabo mediante ciclos múltiples de dicha polimerasa que propaga dichas matrices inversas y anterógradas a lo largo de dichas secuencias diana, dando lugar a un sitio de mellado bicatenario, produciendo dichos enzimas de mellado, que actúan en dichos sitios de mellado, un producto de amplificación. En determinadas formas de realización, los sitios de unión de enzima de mellado en las matrices anterógradas e inversas son reconocidos por el mismo enzima de mellado, utilizándose para la reacción un solo enzima de mellado.

Se han descrito en la presente invención procedimientos para la separación de ácidos nucleicos amplificados obtenidos mediante procedimientos de amplificación de la invención. En otras formas de realización de la invención, todavía, se proporcionan procedimientos para detectar y/o analizar los ácidos nucleicos amplificados obtenidos mediante los procedimientos de amplificación de la invención que incluyen, por ejemplo, procedimientos que utilizan SYBR I, II, SYBR Gold, Pico Green, TOTO-3 y muchos colorantes de intercalación, balizas moleculares, FRET, captura superficial utilizando sondas inmovilizadas mediante detección de fluorescencia, electroquímica o colorimétrica, espectrometría de masas, electroforesis capilar, la incorporación de nucleótidos marcados para permitir la detección mediante captura o polarización de fluorescencia, flujo lateral, y otros procedimientos que implican sondas de captura.

Los procedimientos que utilizan sondas de captura para detección incluyen, por ejemplo, la utilización de una molécula ácido nucleica (sonda de captura) que incluye una secuencia que es complementaria, o sustancialmente complementaria a una hebra del producto de amplificación, de forma que la sonda de captura se une al ácido nucleico amplificado. La sonda puede unirse a un marcador detectable en ciertas formas de realización, y el producto de amplificación puede detectarse basándose en el marcador detectable de la sonda, que se hibridiza específicamente al producto de amplificación. La reacción puede, por ejemplo, comprender además un anticuerpo dirigido contra una molécula incorporada a, o unida, a la sonda de captura. O, por ejemplo, la sonda de captura o una molécula que se une a la sonda de captura, puede incorporar, por ejemplo, un marcador enzimático, por ejemplo, peroxidasa, fosfatasa alcalina, o beta-galactosidasa, un marcador fluorescente, tal como, por ejemplo, fluorescencia o rodamina, o, por ejemplo, otras moléculas que presentan actividad quimioluminiscente o bioluminiscente. En algunas formas de realización, la sonda se une a un soporte sólido, y las hebras del producto de amplificación pueden inmovilizarse específicamente a la sonda de captura unida al soporte sólido bajo condiciones conocidas y seleccionadas por el experto en la materia. En las formas de realización más actuales, el producto de amplificación inmovilizado al soporte, puede someterse a etapas de procesamiento, tales como lavado, intercambio iónico, liberación a partir del soporte sólido, u otras etapas de procesamiento. Un producto de amplificación puede detectarse cuando está inmovilizado en un soporte sólido, en algunas formas de realización. Las formas de realización de la presente invención comprenden también combinaciones de estos procedimientos de detección y análisis.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A-D son gráficos que muestran mecanismos de las reacciones de la presente invención. La figura 1D es una leyenda para la figura 1.

Figura 2. Gel de poliacrilamida al 20% de los productos de reacción de un ensayo ADN NEAR™.

Se procesó durante 2,5 minutos y a 56°C, una reacción según estos procedimientos, desnaturalizándola entonces mediante calor a 94°C durante 4 minutos. Se procesaron seis microlitos de la reacción sobre un gel de poliacrilamida al 20%, durante 2,5 horas y 160V. El gel se sometió a tinción con gel SYBR II. Carril 1: control sin diana para un ensayo de 25 unidades metaméricas. Carril 2: control sin diana para un ensayo de 27 unidades metaméricas. Carril 3: ensayo para 25 unidades metaméricas con 3,5E + 5 copias de ADN genómico de *Bacillus subtilis*. Carril 4: ensayo para 27 unidades metaméricas con 1,1E + 6 copias del ADN genómico de *Bacillus subtilis*.

Figura 3. Gel de poliacrilamida al 20% de los productos de reacción de un ensayo de ARN utilizando estos procedimientos.

La reacción se procesó durante 12 minutos a 56°C, desnaturalizándose entonces mediante calor a 94°C durante 4 minutos. Seis microlitros de la reacción se procesaron sobre un gel de poliacrilamida al 20% a 160V durante aproximadamente 2,5 horas. El gel se sometió a tinción con gel SYBR II. Carril 1 y 2: reacción para un ensayo de 25 unidades metaméricas con 1E + 6 copias del ARN blindado del Ébola (Ambion). Carriles 3 y 4: reacción de control sin diana para un ensayo de 25 unidades metaméricas. Los productos de la reacción de 25 unidades metaméricas se ponen de manifiesto en una caja blanca.

Figura 4. Espectro de masas de los productos del ensayo del ADN *Bacillus anthracis*.

A) 0 copias de la diana o B) 5E + 5 copias del ADN genómico añadido a la reacción. Éstas se procesó durante 10 minutos, y se desnaturalizó entonces con calor a 94°C durante 4 minutos. En el LC/ESI-MS se inyectaron 10 microlitros de la muestra. El estado de carga (-4) del producto de 26 unidades metaméricas y su secuencia complementaria, se ponen de manifiesto en una caja negra. Los picos adyacentes más pequeños son los aductos de sodio del producto principal.

Figura 5. Espectro de masas de los productos del ensayo del ARN genómico MS2.

A) 0 copias de la diana, B) 1E + 6 copias del ARN genómico MS2, o C) 1E + 6 copias del ADN diana sintético añadido a la reacción. La reacción se procesó durante 10 minutos, desnaturalizándose entonces mediante calor a 94°C durante 4 minutos. En el LC/ESI-MS se inyectaron 10 microlitros de la muestra. El estado de carga (-4) del producto de 27 unidades metaméricas y su secuencia complementaria se ponen de manifiesto en una caja negra. Los picos adyacentes más pequeños son los aductos de sodio del producto principal.

Figura 6. Detección en tiempo real de la amplificación utilizando colorantes fluorescentes de intercalación.

Amplificación en tiempo real del ADN genómico de *Yersinia pestis* en 500 copias cuadrados, comparada con el control sin diana (NTC, triángulos abiertos). La reacción se procesó durante 10 minutos a 58°C y se monitorizó mediante fluorescencia en tiempo real con SYBR II (n = 5).

Figura 7. Detección en tiempo real de la amplificación, utilizando transferencia energética resonante de fluorescencia (FRET).

Amplificación en tiempo real del ADN sintético de *Yersinia pestis* con 10.000 copias cuadrados, comparada con el control sin diana (NTC, triángulos abiertos). La reacción se procesó durante 10 minutos a 57°C, n = 3.

Figura 8. Amplificación del ADN de *Francisella tularensis* detectado en tiempo real utilizando balizas moleculares.

Se añadieron 0 copias (triángulos abiertos) o 1E + 5 copias (cuadrados) a la mezcla reaccionante y se procesaron durante 10 minutos a 57,5°C.

Figura 9. Resultados del ensayo del porcentaje de falsos positivos, comparando valores promedio de AUC.

Las barras de error denotan una desviación estándar. Los ensayos de *Bacillus subtilis* se procesaron durante 10 minutos a 55°C en presencia y ausencia del ADN genómico de *Bacillus subtilis*. Los enzimas se desnaturalizaron mediante calor a 94°C durante 4 minutos. En LC/ESI-MS se inyectó una muestra de 10 µl, analizándose el área bajo la curva (AUC) de los picos del producto. Los positivos verdaderos contenían 10.000 copias de ADN de *Bacillus subtilis*, junto con 990.000 copias del ADN vecino cercano (*Bacillus thuringiensis*). Los negativos verdaderos contenían 10.000 copias del ADN de *E. coli* con 990.000 copias del ADN vecino cercano y los negativos acuosos no contenían ADN como control.

Figura 10. Estudio replicativo utilizando la detección de balizas moleculares con distintos operadores que llevan a cabo los experimentos en dos días distintos.

La reacción se procesó durante 10 minutos a 57,5°C (en presencia o ausencia de 500 copias del ADN genómico de *Francisella tularensis*, con una muerte por calor durante 4 minutos a 94°C. Se añadieron 300 nM de baliza molecular, monitorizándose a 45, 50 y 57°C (n = 24).

5 Figura 11. Sensibilidad de la reacción que utiliza la detección de balizas moleculares.

10 El ensayo se procesó durante 10 minutos a 57,5°C. La reacción se detuvo con una etapa de inactivación térmica durante 4 minutos a 94°C. Se añadieron 300 nM de balizas moleculares, monitorizándose la fluorescencia a 57,5°C (n = 3). La fluorescencia se monitorizó por la apertura de balizas en presencia de reacciones amplificadas con 1E+6, 5E+5, 5E+4, 5E+2, 50 y 0 (NTC) copias de entrada del ADN genómico de *Francisella tularensis*, y se comparó con la fluorescencia anterior de sólo la baliza (MB).

Figura 12. Concentración final de los productos amplificados en la reacción NEAR.

15 La reacción NEAR™ se procesó durante 10 minutos a 55°C con distintas copias del ADN genómico de *Bacillus subtilis*. La reacción se paró con una etapa de inactivación térmica a 94°C durante 4 minutos. En el LC/ESI-MS se inyectó una muestra de 10 microlitros, y la AUC del pico del producto a 1944 Daltons, se analizó y comparó con una curva estándar.

20 Figura 13. Correlación de la entrada del número de copias de la diana ARN con la concentración de productos amplificados con la concentración final de los productos amplificados.

25 El ensayo Ébola NEAR™ se procesó durante 12 minutos a 55°C con copias variadas del ARN sintético correspondiente al ADN genómico del Ébola. La reacción se detuvo mediante una etapa de inactivación térmica a 94°C durante 4 minutos. En el LC/ESI-MS se inyectó una muestra de 10 microlitros, analizándose la AUC del pico del producto a 1936 Daltons, y se comparó con la curva estándar de los valores AUC (n=3).

30 Figura 14. Análisis del producto mediante espectrografía de masas demostrando la especificidad de la reacción NEAR.

La reacción NEAR™ de *Bacillus anthracis* se procesó en presencia de una dilución de copias de *Bacillus thuringiensis* durante 10 minutos a 56°C (n=3), desnaturalizándose térmicamente entonces a 94°C durante 4 minutos. En el LC/ESI-MS se inyectó una muestra de 10 µl, y se analizaron los valores AUC de los picos del producto.

35 Figura 15. Efecto de un conjunto de sustancias interferentes sobre la amplificación.

40 Se procesaron reacciones del ADN de *Bacillus subtilis* durante 10 minutos a 55°C y se calentaron a 94°C durante 4 minutos para detener la reacción. Las reacciones se procesaron por triplicado en presencia de 1E+5 copias del ADN genómico de *Bacillus subtilis* ("_1E+5"), o con la presencia de ADN sin diana ("_0"). La muestra x es el ensayo de control sin añadir la sustancia interferente. Los interferentes desde A a F se añadieron a un volumen de reacción del 50% e el ensayo de *Bacillus subtilis*. La AUC de los picos para espectrografía del producto se analizó utilizando un ensayo de Bonferroni y de ANOVA de dos vías (Significados: A = ninguno; B = polvo casero, leche desnatada; C = polvo del ensayo AZ, ácido húmico; D = Diésel hollín; E = leche desnatada; F = esporas fúngicas.

Figura 16. Resultados de la electroforesis en gel para la reacción dúplex *Bacillus subtilis* / *Bacillus anthracis* ADN.

50 La reacción NEAR™ incluyendo matrices específicas para el ADN tanto de *Bacillus subtilis* (Bs) como de *Bacillus anthracis* (Ba), se procesó en ausencia del ADN diana (negativo), en presencia de sólo *Bacillus subtilis* (positivo para el producto de 27 unidades metaméricas), y en presencia de tanto *Bacillus subtilis* como de *Bacillus anthracis* (positivo, respectivamente, para el producto de 27 unidades metaméricas y de 25 unidades metaméricas). El número de copias diana que se utilizó en este ensayo fue de 500.000 copias. El ensayo se procesó durante 10 minutos a 57°C. Las matrices variaron en concentración entre los ensayos para controlar la amplificación (100nM para *Bacillus anthracis* y 50 nM para *Bacillus subtilis*. Las muestras se procesaron sobre un gel de poliacril amida al 20%, a 160 V durante 2 horas aproximadamente. El gel se sometió a tinción con el colorante fluorescente SYBR II, obteniéndose imágenes. Las bandas fluorescentes se cuantificaron y analizaron como densidad óptica integrada (IOD) (n = 8).

60 Figura 17. Resultados específicos para la reacción del *Bacillus subtilis* / *Bacillus anthracis* ADN dúplex mostrados por la electroforesis en gel.

65 La reacción NEAR™ que incluye matrices tanto para ADN de *Bacillus subtilis* (Bs) como de *Bacillus anthracis* (Ba), se procesó en ausencia de ADN diana (negativo), en presencia sólo de ADN de *Bacillus subtilis* (producto de 27 unidades metaméricas), y en presencia de ADN, tanto de *Bacillus subtilis* como de *Bacillus anthracis*,

(27 productos de 25 unidades metaméricas, respectivamente). El número de copias diana para cada genoma presente en este ensayo fue de 500.000 copias. Todas las reacciones contenían 500.000 copias de *Bacillus thuringiensis* como ácidos nucleicos exógenos. Las matrices variaron en concentración entre los ensayos para controlar la amplificación. El ensayo se procesó durante 10 minutos a 57°C, desnaturalizándose térmicamente a 94°C durante 4 minutos, cargándose 6 microlitros en un gel al 20%. A 160 V durante 2 horas aproximadamente. El gel se sometió a tinción con colorante fluorescente SYBR II, obteniéndose imágenes. Las bandas fluorescentes se cuantificaron y analizaron como densidad óptica integrada (IOD).

Figura 18. Resultados de la electroforesis en gel para la reacción del ARN dúplex del Ébola/MS2.

La reacción NEAR™ que incluye matrices para un ensayo Ébola y de MS2 se procesó en ausencia del ARN diana (negativo, carriles 2-5), en presencia de sólo MS2 (producto de 27 unidades metaméricas, carriles 6 y 7) y en presencia tanto del ARN Ébola como del MS2 (producto de 27 unidades metaméricas y 25 unidades metaméricas, respectivamente, carriles 8 y 9). El número de copias diana utilizado en este ensayo fue de 1E+6 copias. El ensayo se procesó durante 10 minutos a 57°C. Las matrices variaron en concentración entre los ensayos para controlar la amplificación. Las muestras se procesaron sobre un gel de poliacrilamida al 20% a 160 V durante 2,5 horas. El gel se sometió a tinción con colorante fluorescente SYBR II, formándose imagen. Las bandas fluorescentes se cuantificaron y analizaron como densidad óptica integrada (IOD).

Figura 19. Análisis espectrográfico de masas de amplificación del ADN a partir de esporas lisadas.

Los valores promedio de AUC a partir de masas de producto amplificado, comparados con respecto a muestras lisadas y no lisadas. Unas muestras de esporas lisadas se añadieron entonces a las mezclas madre y se procesaron durante 10 minutos a 55°C, desnaturalizándose entonces térmicamente durante 4 minutos a 94°C, y se procesaron espectrográficamente para análisis. Los valores AUC de los picos del producto se promediaron y compararon (n = 3).

Figura 20. Demostración de la captura y enfoque de la extensión para la detección superficial. Se compararon:

A) Unión promedio (producto de reacción positiva sin polimerasa añadida), B) 500.000 dianas (producto de reacción positiva con polimerasa añadida) y C) sin diana (reacción negativa con polimerasa añadida). Se procesó el ensayo NEAR™ durante 10 minutos a 55°C, desnaturalizándose térmicamente a 94°C durante 4 minutos, y añadiéndolo entonces a la placa con la sonda de captura unida a la superficie en el extremo 5'. Se añadió la polimerasa a un pocillo de la reacción positiva. Se incubó la placa a 55°C durante 30 minutos, se lavó, se añadió SYBR II, se lavó 3 veces, y se procedió a la lectura en una placa lectora Tecam (excitación a 495 nm/emisión a 530 nm).

Figura 21. Detección en tiempo pseudoreal mediante fluorescencia del ensayo NEAR™, con una matriz única inmovilizada sobre una superficie, en presencia cuadrados y ausencia (triángulos abiertos) de 1E + 6 copias de ADN genómico.

Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos de fondo plano cubiertas con neutravidina. Una solución de 1 micromolar de una matriz inversa marcada con FRET se incubó mezclando con cuidado durante 1 hora, a 37°C. Los pocillos se lavaron 3 veces con una solución PBS-Tween para liberar la matriz no unida. La mezcla reactiva NEAR™ de este procedimiento se añadió a los pocillos (una por cada tiempo marcado), inculcándose a 58°C en un bloque térmico en un incubador de agitación, a 135 RPM. Los tiempos se marcaron añadiendo 1 microlitro de EDTA al pocillo para detener la reacción. La fluorescencia se leyó a partir del fondo, utilizando un lector de placa Tecan 100.

Figura 22. Límite del Ensayo de Detección para *Chlamydia trachomatis*. Se llevaron a cabo una serie de ensayos utilizando diluciones dobles de una diana de *Chlamydia*. A) Gráfico de barras de la detección de fluorescencia que muestra el límite de detección promedio de 3 ensayos. B) Gráfico de barras que muestra los resultados de ensayos individuales.

Figura 23. Discriminación de *Listeria monocytogenes* a partir de *L. innocua*. Gráfico de barras que muestra los resultados de una serie de ensayos que se llevaron a cabo para determinar su capacidad para discriminar entre dos bacterias diferentes.

Figura 24. Ensayo con ARN vírico. Gráfica de barras que muestra los resultados de una serie de ensayos de estos procedimientos con varias diluciones de una diana de ARN vírico.

Figura 25. Gráfica de barras que muestra los resultados de un ensayo para la elección de la secuencia diana del gen *bar*.

Figura 26. Gráfica de barras que muestra los resultados de un ensayo de estos procedimientos para la detección de una secuencia diana miRNA.

Figura 27. Ensayo Gc: LOD. A) Gráfico de barras que muestra el promedio de una serie de ensayos para la detección de una secuencia genómica diana. B) Resultados de los ensayos individuales, incluyendo cada uno 50 copias genómicas.

Figura 28. Ensayo *B. Subtilis* de NEAR™. A) Curva estándar para determinar la correlación entre la cantidad de oligonucleótidos de referencia añadidos a una muestra y el área bajo la curva (AUC). B) Gráfico de barras que muestra los resultados de los ensayos de estos procedimientos para determinar la cantidad de producto específico generado. C) Tabla que muestra los resultados del ensayo.

Figura 29. Estudio de la longitud del espaciador. A) Gráfico de barras que muestra los resultados de un ensayo de estos procedimientos para determinar el efecto de varias longitudes de espaciador. B) Secuencias matriciales utilizadas para obtener distintas longitudes de espaciadores.

Figura 30. Diseños de matrices utilizados para el ensayo que se muestra en la figura 29.

Figura 31. Efecto de la región estabilizante. A) Gráfico de los resultados de los ensayos de estos procedimientos utilizando oligo matrices que incluyen, o no, regiones estabilizantes. B) Ampliación de parte del gráfico de A).

Figura 32. Titulación de la concentración de Mg²⁺. A) Gráfico de barras que muestra los resultados de un conjunto de ensayos NEAR que utilizan cantidades variables de Mg²⁺. B) Diagrama que describe componentes de los ensayos.

Figura 33. Gráficos que muestran los mecanismos de las reacciones de estos procedimientos.

Figura 34. Listado de ejemplos de secuencias diana y oligomatrixiales.

Descripción detallada

En la presente invención se proporcionan procedimientos para la amplificación exponencial de secuencias cortas de ADN o ARN.

Los ácidos nucleicos diana de la presente invención incluyen moléculas de ácido nucleico bicatenarias y monocatenarias. El ácido nucleico puede ser, por ejemplo, ADN o ARN. Si el ácido nucleico diana es una molécula de ARN, ésta puede ser, por ejemplo, di- o bicatenaria o la molécula de ARN puede incluir una secuencia diana que es monocatenaria. Los ácidos nucleicos diana incluyen, por ejemplo, ácidos nucleicos genómicos, plasmídicos, mitocondriales, celulares y víricos. El ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, ADN genómico cromosómico, plasmídico, un gen, cualquier tipo de ARN celular, o un oligonucleótido sintético. Por "ácido nucleico genómico" se hace referencia a cualquier ácido nucleico de cualquier genoma, incluyendo por ejemplo, genomas animales, vegetales, de insectos y bacterianos que incluyen, por ejemplo, genomas que se encuentran en esporas. Los ácidos nucleicos diana de ADN bicatenario, incluyen, por ejemplo, ADN genómico, ADN mitocondrial, ADN vírico y ADN sintético, u otros tipos de ADN que se describen en la presente memoria o que se conocen en la técnica. Los ácidos nucleicos diana monocatenarios de ADN incluyen, por ejemplo, ADN vírico, cADN y ADN sintético monocatenario, u otras de ADN que se dan a conocer en la presente memoria o que son conocidos en la técnica. Los ácidos nucleicos diana ARN incluyen, por ejemplo, ARN mensajero, ARN vírico, ARN ribosómico, ARN de transferencia, micro ARN y precursores del micro ARN, y siARN u otros ARN que se describen en la presente memoria o que se conocen en la técnica.

Los micro ARN, miARN, o pequeños ARN (stARN), son secuencias monocatenarias cortas, de alrededor de 21-23 nucleótidos de largo que están implicadas en la regulación génica. Se piensa que los micro ARN interfieren con la traducción del ARN mensajero, pues son parcialmente complementarios con los ARN (véase, por ejemplo, Ruvkun, GI, Science 294:797-99 (2001); Lagos-Quintana, M., et al., Science 294:854-58 (2001); Lau, N.C., et al., Science 294:858-62 (2001); Lee, R.C., and Ambros, V., Science 294:862-64 (2001); Baulcombe, D., et al., Science 297:2002-03 (2002); Llave, C., Science 297:2053-56 (2002); Hutvagner, G., and Zamore, P.D., Science 297:2056-60 (2002)). Los micro ARN pueden también tener un papel en el sistema inmunitario, basándose en estudios de los que recientemente se ha informado en ratones con genes inactivados (véase por ejemplo, Wade, N., "Studies Reveal and Immune System Regulator" New York Times, April 27, 2007). Los precursores de microARN que pueden también detectarse utilizando los procedimientos de la presente invención incluyen, por ejemplo, el transcrito primario (primiARN) y el ARN pre-miARN estructurado en "bucle", que se procesa posteriormente a miRNA.

Los ARN interferentes cortos, o los siARN son, por lo menos, parcialmente bicatenarios con moléculas ARN de una longitud de 20-25 nucleótidos, que se encuentran implicados en la interferencia del ARN, por ejemplo, en la regulación por disminución de la replicación vírica o en la expresión génica (véase, por ejemplo, Zamore et al., 2000, Cell, 101, 25-33; Bass, 2001, Nature, 411, 428-429; Elbashir et al., 2001, Nature, 411, 494-498; and Kreutzer et al., International PCT Publication No. WO 00/44895; Zernicka-Goetz et al., International PCT Publication No.

WO 01/36646; Fire, International PCT Publication No. WO 99/32619; Plaetinck et al., International PCT Publication No. WO 00/01846; Mello and Fire, International PCT Publication No. WO 01/29058; Deschamps-Depaillette, International PCT Publication No. WO 99/07409; and Li et al., International PCT Publication No. WO 00/44914; Allshire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, Science, 297, 2215-2218; and Hall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237; Hutvagner and Zamore, 2002, Science, 297, 2056-60; McManus et al., 2002, RNA, 8, 842-850; Reinhart et al., 2002, Gene & Dev., 16, 1616-1626; and Reinhart & Bartel, 2002, Science, 297, 1831).

La utilización del término “secuencia diana” puede referirse a la hebra con sentido o antisentido de la secuencia, o bien, a las secuencias tal como se encuentran en los ácidos nucleicos diana, copias amplificadas, o productos de amplificación, de la secuencia diana original. El producto de amplificación puede consistir en una molécula más grande que comprende la secuencia diana, así como por lo menos, otra secuencia u otros nucleótidos. La longitud de la secuencia diana, y la concentración (por ciento) de la guanosina citosina (GC), depende de la temperatura a la que la reacción es procesada; esta temperatura depende de la estabilidad de las polimerasas y de las enzimas de mellado que se utilizan en la reacción. Los expertos en la materia pueden procesar ensayos para determinar la longitud apropiada y la concentración de GC para las condiciones de la reacción. Por ejemplo, si las polimerasas y el enzima de mellado son estables hasta 60°C, entonces la secuencia diana puede ser, por ejemplo, de entre 19 a 50 nucleótidos de largo, o por ejemplo, de 20 a 45, 20 a 40, 22 a 35 ó 23 a 32 nucleótidos de longitud. La concentración de GC bajo estas condiciones puede ser, por ejemplo, inferior al 60%, menos que el 55%, inferior al 50% o inferior al 45%. La secuencia diana y los enzimas para el mellado se seleccionan de modo que la secuencia diana no contenga sitios de mellado para cada enzima de mellado que vaya a incluirse en la mezcla reactiva.

Las secuencias diana pueden someterse a amplificación a partir de muchos tipos de muestras, que incluyen pero no se limitan a muestras que contienen esporas, virus, células, ácidos nucleicos de procariontes o eucariontes, o cualquier ácido nucleico libre. Por ejemplo, el ensayo puede detectar el ADN en el lado externo de las esporas sin necesidad de que éstas se lisen. La muestra puede aislarse a partir de cualquier material que sea sospechoso de contener la secuencia diana. Por ejemplo, para los animales, por ejemplo, mamíferos como por ejemplo el hombre, la muestra puede contener sangre, médula ósea, moco, linfa, tejidos duros como por ejemplo, hígado, bazo, riñón, pulmones u ovarios, biopsias, esputos, saliva, lágrimas, heces, u orina. O, la secuencia diana puede encontrarse en el aire, plantas, suelos, u otros materiales que presuntamente contengan organismos biológicos.

Las secuencias diana pueden encontrarse en muestras que pueden contener también sustancias ambientales o contaminantes tales como polvo, polen y hollín (por ejemplo, procedente del escape del diésel, o de matrices clínicamente importantes como orina, moco o saliva. Las secuencias diana pueden también encontrarse en aguas de desecho, agua potable, aire, leche u otros alimentos. Dependiendo de la concentración de estos contaminantes, los procedimientos de purificación de muestras conocidos por los expertos en la materia, pueden requerirse para eliminar inhibidores, para que la amplificación tenga éxito. La purificación, puede, por ejemplo, implicar la utilización de lisados detergentes, ultrasonidos, agitaciones vorticiales con perlas cristalinas, o una prensa francesa. Esta purificación podría también llevar a la concentración de la muestra diana. Las muestras pueden también purificarse ulteriormente, por ejemplo, mediante filtración, extracción fenólica, cromatografía, intercambio iónico, electroforesis en gel, o centrifugación dependiente de la densidad. En formas de realización particulares, la muestra puede añadirse directamente a la mezcla reactiva sin una purificación previa del ácido nucleico diana.

Un oligonucleótido es una molécula que comprende dos o más desoxiribonucleótidos o ribonucleótidos, por ejemplo, más de tres. La longitud de un oligonucleótido dependerá de cómo ha de utilizarse. El oligonucleótido puede derivarse sintéticamente o mediante clonación.

El término “complementario” tal como se refiere a dos secuencias ácido nucleicas, hace referencia generalmente a la capacidad de dos secuencias para formar suficientes uniones de hidrógeno entre los dos ácidos nucleicos, para estabilizar una secuencia de nucleótidos bicatenaria formada por la hibridación de dos ácidos nucleicos. En las dos secuencias, todos los nucleótidos en una secuencia pueden ser complementarios de los nucleótidos de su parte opuesta en la otra secuencia. En algunas formas de realización, pueden existir algunas faltas de correspondencia entre nucleótidos de la parte opuesta en las dos secuencias (es decir, nucleótidos no complementarios), tal como 1 falta de correspondencia en 10 nucleótidos, una en 20 nucleótidos, o una en 30 nucleótidos, por ejemplo, haciéndose referencia a dichas secuencias como “sustancialmente complementarias” en la presente memoria. Tal como se muestra en las figuras 1A-1D cada ácido nucleico matriz incluye a menudo una región de reconocimiento complementaria a, o sustancialmente complementarias a una hebra ácido nucleica diana (o su complemento), a la cual se hibridiza el ácido nucleico matriz. También se muestra en las figuras 1A-1D, cada ácido nucleico matriz incluye a menudo una región 5' estabilizante de la región de reconocimiento y de la región de reconocimiento del agente para mellado que no es complementaria o sustancialmente complementaria a la secuencia ácido nucleica diana o su complemento.

Tal como se utiliza en la presente memoria, “hibridación” y “unión” se utilizan de forma intercambiable y se refieren a la unión no covalente o “emparejamiento de bases” de secuencias ácido nucleicas complementarias entre ellas. La permanencia de una sonda particular con sus bases apareadas a una secuencia polinucleótida, depende del

grado de complementariedad, longitud de la sonda, y rigurosidad de las condiciones de unión. Cuanto más elevada sea la rigurosidad más elevado debe ser el grado de complementariedad, y/o más larga la sonda para unirse o emparejar las bases para permanecer estable.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, "rigurosidad" se refiere a la combinación de condiciones a las cuales se someten los ácidos nucleicos, para dar lugar a que el ácido nucleico bicatenario se disocie en hebras únicas componentes, tales como pH extremos, temperatura alta, y concentración salina. La expresión "alta estringencia" se refiere a condiciones de hibridación que son suficientemente estringentes o restrictivas, de modo que sólo se producirán emparejamientos específicos de las bases. La especificidad será suficiente para permitir la detección de secuencias únicas utilizando una sonda oligonucleótida o una secuencia estrechamente relacionada según los protocolos estándar de la hibridación Southern (tal como se describe en J. Mol. Biol. 98:503 (1975)).

10 La matrices se definen como oligonucleótidos que se unen a una región de reconocimiento de una secuencia diana, y que también contienen una región de unión a un enzima de mellado por encima de la región de reconocimiento y una región de estabilización por encima de la región de unión del enzima de mellado.

15 "Región de reconocimiento" hace referencia a una secuencia ácido nucleica en la matriz que es complementaria o sustancialmente complementaria a una secuencia ácido nucleica en la secuencia diana. "Región de reconocimiento en la secuencia diana" se refiere a la secuencia de nucleótidos en la secuencia diana que es complementaria o sustancialmente complementaria a, y se une a, la matriz.

20 "Región estabilizante" se refiere a una secuencia ácido nucleica que muestra, por ejemplo, un contenido de GC del 50% aproximadamente, diseñado para estabilizar la molécula para, por ejemplo, las reacciones para mellado y/o de extensión.

25 En la descripción del posicionamiento de ciertas secuencias sobre las moléculas ácido nucleicas, tal como, por ejemplo, en la secuencia diana, a la matriz, los expertos en la materia apreciarán que los términos "3'" y "5'" se refieren a una localización de una secuencia o región particular con relación a otra. De este modo, cuando una secuencia o región es 3' para, o 3' de otra secuencia o región, la localización se encuentra entre la secuencia o región y el hidroxilo 3' de la hebra del ácido nucleico. Cuando una localización en un ácido nucleico, es 5' para o 5' de otra secuencia o región, esto significa que la localización está entre esa secuencia o región y el fosfato del extremo 5' de aquella hebra del ácido nucleico.

30 La polimerasa es una proteína que puede catalizar la incorporación específica de nucleótidos para extender un extremo hidroxilo 3' de una molécula cebadora, tal como, por ejemplo, el oligonucleótido matriz, contra una secuencia diana ácido nucleica. La polimerasa puede ser, por ejemplo, termófila, de forma que es activa a una temperatura elevada de reacción. Puede también, por ejemplo, ser capaz de desplazar las cadenas. No es necesario, sin embargo, que sea muy procesadora (son suficientes 30-40 nucleótidos para una única síntesis). A menudo, la polimerasa que se utiliza, no posee actividad exonucleósica 5'-3'. Si la polimerasa también posee actividad transcriptasa inversa (tal como Bst (fragmento grande), 9°N, Therminator, Therminator II, etc.), la reacción puede también amplificar dianas ARN en una etapa única sin utilizar una transcriptasa inversa separada. Puede incluirse en la reacción más de una polimerasa; en un ejemplo, una de las polimerasas puede mostrar actividad transcriptasa inversa y a la otra polimerasa, le puede faltar dicha actividad. En las formas de realización ejemplificativas, la polimerasa es BST (fragmento grande). La polimerasa puede seleccionarse a partir, por ejemplo del grupo formado por una o varias de las polimerasas presentadas en la Tabla 1.

Tabla 1

| Polimerasa |
|---|
| Bst ADN polimerasa |
| Bst ADN polimerasa (fragmento grande) |
| 9° Nm ADN polimerasa |
| Fi 29 ADN polimerasa |
| ADN polimerasa I (<i>E. coli</i>) |
| ADN polimerasa I fragmento grande (Klenow) |
| Fragmento Klenow (3'-5'-exo) |
| T4 ADN polimerasa |
| T7 ADN polimerasa |
| Deep Vent _R TM (exo) ADN polimerasa |
| Deep Vent _R TM ADN polimerasa |
| DyNAzyme TM EXT ADN |
| AND polimerasa DyNAzyme TM II de comienzo caliente |
| ADN polimerasa de alta fidelidad de fusión TM |
| Therminator TM ADN polimerasa |
| Therminator TM II ADN polimerasa |

| Polimerasa |
|--|
| Vent _R TM ADN polimerasa |
| Vent _N TM (EXO-) ADN polimerasa |
| RepliPHI TM Phi29 ADN polimerasa |
| RBst ADN polimerasa |
| RBst ADN polimerasa, fragmento grande (ADN polimerasa IsoTherm TM) |
| MasterAmb TM AmpliTherm TM ADN polimerasa |
| Taq ADN polimerasa |
| Tth ADN polimerasa |
| Tfi ADN polimerasa |
| Tgo ADN polimerasa |
| SP6 ADN polimerasa |
| Tbr ADN polimerasa |
| ADN polimerasa Beta |
| ThermoPhi ADN polimerasa |
| Pyrophage 3173 (Lucigen) |

Los ejemplos siguientes no limitativos de transcriptasas inversas (RT) pueden utilizarse en las reacciones de este procedimiento para mejorar la actuación cuando se detecta una secuencia ARN: OmniScript (Roche), HIV RT (Ambion), SuperScriptIII (Invitrogen), ThermoScript (Invitrogen), Thermo-X (Invitrogen), ImProm II (Promega).

5 Estas distintas RT actúan a distintos niveles en el tampón estándar de reacción, y su calificación de actuación se presenta a continuación. Un “+” indica que la reacción de amplificación da lugar a un producto específico. Más “+” indican que la reacción trabaja mejor, indicando resultados excelentes “+++++”. Un “-” indica que la reacción no dio lugar a un producto específico, o que no se produjo un producto específico con respecto al antecedente.

10

Tabla 2

| | |
|------------------------------|-------|
| OmniScript** (Qiagen) | +++++ |
| SensiScript (Qiagen) | +++ |
| MonsterScript (Epicentre) | +++ |
| Transcriptor | ++ |
| HIV RT+ (Ambion) | + |
| SuperScript III (Invitrogen) | - |
| ThermoScript (Invitrogen) | - |
| Thermo-X (Invitrogen) | - |
| ImProm II (Promega) | - |

15

“Mellado” hace referencia a la fragmentación de sólo una hebra de la parte bicatenaria de un ácido nucleico completa o parcialmente bicatenaria. A la posición en la que el ácido nucleico es mellado se hace referencia como el sitio mellado. A la secuencia de reconocimiento que el enzima de mellado reconoce, se hace referencia como el sitio de unión del enzima de mellado. “Capaz de mellado” hace referencia a una capacidad enzimática de un enzima de mellado.

20

El enzima de mellado es una proteína que se une al ADN bicatenario y fragmenta una hebra de un dúplex bicatenario. El enzima de mellado puede fragmentar bien por encima o aguas abajo del sitio de unión, o del sitio de reconocimiento del enzima de mellado. En formas de realización ejemplificativas, la reacción incluye el uso de enzimas de mellado que fragmentan o producen la mella aguas abajo del sitio de unión (enzimas que mellan la hebra por encima), de modo que la secuencia del producto no contiene el sitio de mellado. La utilización de un enzima que fragmenta aguas abajo del sitio de unión, permite que la polimerasa se extienda más fácilmente sin tener que desplazar el enzima de mellado. Éste debe ser funcional en las mismas condiciones reactivas que la polimerasa, siendo, por tanto, necesaria su optimización entre las dos condiciones ideales para ambos. Los enzimas de mellado están disponibles en, por ejemplo, New England Biolabs (NBE) y Fermentas. El enzima de mellado puede, por ejemplo, seleccionarse a partir del grupo formado por uno o más de los enzimas de mellado que se presentan en la Tabla 3.

30

Tabla 3

| Enzima de mellado | Nombre alternativo |
|-------------------|--------------------|
| Nb.BbvCI | |
| Nb.BpuI 01 | |
| Nb. Bsal | |
| Nb. BsmI | |

| Enzima de mellado | Nombre alternativo |
|-------------------|--------------------|
| Nb.BsrDI | |
| Nb.BstBIP | |
| Nb.BstSEIP | |
| Nb.BtsI | |
| Nb.SapI | |
| Nt.AlwI | |
| Nt.BbvCI | |
| Nt.BhallIP | |
| Nt.Bpul 01 | |
| Nt.Bpul 01B | |
| Nt.Bsal | |
| Nt.BsmAI | |
| Nt.BsmBI | |
| Nt.BspD6I | |
| Nt.BspQI | |
| Nt.Bst91 | |
| Nt.BstNBI | N.BstNBI |
| Nt.BstSEI | |
| Nt.CviARORFMP | |
| Nt.CviFRORFAP | |
| Nt.CviPII | Nt.Cvi.PIIm |
| Nt.CviQII | |
| Nt.CviQXI | |
| Nt.EsaSS11198P | |
| Nt.MlyI | |
| Nt.SapI | |

5 Los enzimas de mellado pueden, por ejemplo, seleccionarse a partir del grupo formado por NtBspQI(NEB), Nb.BbvCI(NEB), Nb.Bsm(NEB), Nb.BsrDI(NEB), Nb.BtsI (NEB), Nt.Alw(NEB), Nt.bbvCI (NEB), Nt.BstNBI (NEB), Nt.CviPII (NEB), NbBpu 101 (Fermentas, y Nt.Bpu 101 (Fermentas). En ciertas formas de realización el enzima de mellado se selecciona a partir del grupo formado por Nt.Bst.NBI, Nb.Bsml, y Nb.BsrDI. Los expertos en la materia apreciarán que varios enzimas de mellado distintos a los que se han mencionado específicamente en la presente memoria pueden utilizarse en estos procedimientos.

10 Los enzimas de mellado y las polimerasas de estos procedimientos pueden ser, por ejemplo, estables a temperatura ambiente, y los enzimas pueden también, por ejemplo, ser estables a temperaturas hasta de 37°C, 42°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, o 85°C. En ciertas formas de realización, los enzimas son estables hasta 60°C.

15 Un enzima es "termófilo" cuando es estable a temperaturas de hasta 37°C, 42°C, 50-60°C, 54-60°C, 56-58°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C o 85°C.

20 Producto o producto amplificado se define como el resultado final de la propagación de la matriz a lo largo de la diana, que se somete a mellado y se libera. Este producto puede entonces retroalimentarse en el ciclo de amplificación, o puede hibridarse a su complemento o a una baliza molecular.

"Nucleótido original" se refiere a los ácidos adenílico, guanílico, citidílico, timidílico o uridílico. Un nucleótido derivado es un nucleótido distinto a un nucleótido original.

25 La reacción puede llevarse a cabo en presencia de nucleótidos originales, tales como, por ejemplo, didesoxiribonucleósidos trifosfato (dNTP). La reacción puede también realizarse en presencia de dNTP marcados, como por ejemplo, marcadores radiactivos, como, por ejemplo, ³²P, ³³P, ¹²⁵I, o ³⁵S, marcadores enzimáticos tales como fosfatasa alcalina, marcadores fluorescentes tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC), biotina, avidina, digoxigenina, antígenos, haptens o fluorocromos. Estos nucleótidos derivados, pueden, opcionalmente, encontrarse en las matrices.

30 Por "temperatura constante", "condiciones isotérmicas", "esencialmente isotérmico", o "isotérmicamente", se hace referencia a un conjunto de condiciones reactivas en las que la temperatura de la reacción se mantiene esencial o sustancialmente constante en el curso de la reacción de amplificación. Una ventaja del procedimiento de amplificación de estos procedimientos es que la temperatura no necesita ciclarse entre una temperatura alta y una baja. El mellado y la reacción de extensión trabajarán a la misma temperatura o dentro del mismo estrecho intervalo térmico. Sin embargo, no es necesario que la temperatura se mantenga de forma precisa, en una determinada forma. Si el equipo que se utiliza para mantener una temperatura elevada, permite que la temperatura de la mezcla

35

reactiva varíe en unos pocos grados, o en algunas décimas de grado, como por ejemplo, en menos de un grado, 0,8 grados, 0,6 grados, 0,4 grados o 0,2 grados, esto no es perjudicial para la reacción de amplificación, y puede considerarse todavía como una reacción isotérmica.

5 El término "amplificación multiplex" se refiere a la amplificación de más de un ácido nucleico de interés. Por ejemplo, puede referirse a la amplificación de secuencias múltiples a partir de la misma muestra, o a la amplificación de una de varias secuencias en una muestra, tal como se considera, por ejemplo, en las patentes US n^{os} 5.422.252; y 5.470.723, que proporcionan ejemplos de amplificación múltiple de desplazamiento de hebras. El término también hace referencia a la amplificación de una o más secuencias presentes en muestras múltiples, de forma simultánea o en un procedimiento por etapas.

Diseño de matrices

15 Las matrices inversas y anterógradas y las primarias y secundarias, se diseñan de forma que exista una región estabilizante en el extremo 5', un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado por debajo de la región de estabilización, y una región de reconocimiento aguas abajo del sitio de unión de enzima de mellado y del sitio de mellado en el extremo 3' del oligonucleótido. La longitud total oligo puede ser del orden de 19 a 40, por ejemplo de 19-40, 23-40, 20-30, 20-24, 23-24, 23-32, 25-40, 27-40 o 27-35 nucleótidos, dependiendo de la longitud de cada región individual, la temperatura, la longitud de la secuencia diana, y la concentración de GC. El experto en la materia sabrá cómo equilibrar estas características de las matrices. Las matrices pueden diseñarse de modo que puedan, juntas, unirse a menos que o al 100% de la secuencia diana, una uniéndose a la hebra con sentido, y una a la sin sentido. La longitud de cada matriz no es necesario que sea la misma que la de la otra matriz. Por ejemplo, si la matriz anterógrada se une al 60% aproximadamente de la hebra diana no codificante, la matriz inversa puede, por ejemplo, unirse a aproximadamente 40% de la hebra diana codificante. Las matrices pueden diseñarse para permitir bases más espaciadas en la secuencia diana, que no se unen a ninguna matriz. Las matrices pueden, por tanto, diseñarse para unirse al 30%, 40%, 50% o 60% aproximadamente, de la secuencia diana.

30 La región de reconocimiento de la matriz anterógrada se diseña para ser sustancialmente idéntica a la región 5' de la hebra diana codificante y complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la hebra no codificante del sitio diana. La región de reconocimiento de la matriz anterógrada es de cualquier longitud apropiada, por ejemplo, de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o de 16 bases de longitud, y a veces de 8-16, 9-16, 10-16, 8-12, 8-15, 9-15, 10-15 u 11-14 nucleótidos de largo. En las formas de realización ejemplificativas, la longitud es 11-13, 11-12, 12 o 12-13 nucleótidos de largo. La región de reconocimiento de la matriz inversa se diseña para ser sustancialmente complementaria o complementaria al extremo 3' de la hebra codificante del sitio diana. La región de reconocimiento de la matriz inversa es de cualquier longitud apropiada, por ejemplo, de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o de 16 bases de longitud aproximadamente, y a veces de 8-16, 9-16, 10-16, 8-12, 8-15, 9-15, 10-15 u 11-14 nucleótidos de largo. En las formas de realización ejemplificativas, la longitud es de 11-13, 11-12 o 12-13 nucleótidos de largo. La longitud de la región de reconocimiento de la primera matriz puede ser, o la misma que la longitud de la región de reconocimiento de la segunda matriz, o puede ser diferente.

40 Una secuencia de reconocimiento de una matriz es a menudo complementaria o sustancialmente complementaria a una secuencia única, o sustancialmente única secuencia de un organismo. El término "secuencia única" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia de nucleótidos en un organismo, que no se encuentra en otro organismo conocido. Una "secuencia sustancialmente única" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia de nucleótidos presente en una familia de organismos específica, o en hasta sólo alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 otros organismos. En algunas formas de realización, una secuencia única o secuencia sustancialmente única, se encuentra en el ARN ribosómico o en la hebra no codificante o codificante del ADN que codifica el ARN ribosómico.

50 Los expertos en la materia pueden determinar la longitud de la región de reconocimiento apropiado para una amplificación óptima y eficiente. En ciertas formas de realización, para proporcionar una especificidad apropiada, una región de reconocimiento de la matriz de 8 bases de longitud, es un límite inferior. La especificidad analítica de la reacción está relacionada con la suma de las regiones de reconocimiento de las 2 matrices, la matriz anterógrada y la inversa. Si cada matriz posee una región de reconocimiento de 8 nucleótidos, por ejemplo, que da lugar a un ensayo que puede detectar una combinación única de $8 + 8 = 16$ nucleótidos, al que se hace referencia como "tamaño de diana". Para una hebra dada de ADN, un tamaño de diana de 16 nucleótidos tiene $4,29 \times 10^9$ combinaciones posibles. El genoma humano tiene $3,3 \times 10^9$ nucleótidos de largo. Por tanto, estadísticamente, una secuencia específica de 16 nucleótidos se espera que se presente aproximadamente una vez en el genoma humano. Como el tamaño de la diana disminuye, por ejemplo a 15 nucleótidos se esperaría que estuviera presente promedialmente, 3 veces en el genoma humano ($1,07 \times 10^9$ posibilidades ocurriendo $3,3 \times 10^9$ veces), y por tanto no sería tan específico como un tamaño de la diana de 16 nucleótidos. Para un ensayo con una región de reconocimiento de 7 nucleótidos, que confiere un ensayo del tamaño de la diana de 14 bases, se esperaría que estuviera presente en el genoma humano 12 veces ($2,68 \times 10^8$ posibilidades ocurriendo $3,3 \times 10^9$). Esto generaría un ensayo con una especificidad reducida que tendría menos valor en un posicionamiento diagnóstico. Por tanto, una región de reconocimiento de 8 bases para cada matriz se considera a menudo como el límite más bajo para ciertos ensayos.

Tabla 4

| Tamaño de la diana del ensayo | posibilidades únicas |
|-------------------------------|----------------------|
| N | 4 ^N |
| 14 | 2,68E + 08 |
| 15 | 1,07E + 09 |
| 16 | 4,29E + 09 |
| 17 | 1,72E + 10 |
| 18 | 6,87E + 10 |
| 19 | 2,75E + 11 |
| 20 | 1,10E + 12 |
| 21 | 4,40E + 12 |
| 22 | 1,76E+ 13 |
| 23 | 7,04E + 13 |
| 24 | 2,81E + 14 |
| 25 | 1,13E + 15 |
| 26 | 4,50E + 15 |

5 Los ensayos de amplificación según la presente invención se llevaron a cabo para determinar la longitud óptima de la región de reconocimiento. En ensayos de 10 minutos, utilizando 0 ó 100.000 copias del ADN diana, un conjunto de matrices con una región de reconocimiento de 20 unidades metaméricas no dio lugar a un producto específico detectable, mientras que se detectó un producto específico utilizando un conjunto de matrices con una región de reconocimiento de 12 unidades metaméricas. La utilización de un conjunto de matrices con una región de reconocimiento de 16 unidades metaméricas dio lugar a un producto detectable específico pero se detectó un producto cuatro veces menos específico que en un ensayo que utilizó un conjunto de matrices con una región de reconocimiento de 12 unidades metaméricas. En ciertas formas de realización, la utilización de un conjunto de matrices con una región de reconocimiento de 15 unidades metaméricas, generó un producto más específico que un conjunto de matrices con una región de reconocimiento de 16 unidades metaméricas.

15 De este modo, en la presente memoria se describen procedimientos para amplificar una secuencia diana ácido nucleica bicatenaria, que comprendan la puesta en contacto de una molécula de ADN diana, que incluye una secuencia diana bicatenaria, que posee una hebra codificante y una no codificante, con una matriz anterógrada y una matriz inversa, donde la matriz anterógrada comprende una secuencia ácido nucleica que incluye una región de reconocimiento en el extremo 3' y que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la hebra no codificante de la secuencia diana, en la que la región de reconocimiento tiene de 8 a 15 nucleótidos de longitud; un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado por encima de la región de reconocimiento, y una región de estabilización por encima del sitio de unión de enzima de mellado; comprendiendo la matriz inversa una secuencia de nucleótidos que incluye una región de reconocimiento en el extremo 3' que es complementario o sustancialmente complementario al extremo 3' de la hebra con sentido de la secuencia diana, en la que la región de reconocimiento tiene de 8 a 15 nucleótidos de longitud, un sitio de unión de enzima de mellado, y un sitio de mellado por encima de la región de reconocimiento, y una región de estabilización por encima del sitio de unión de enzima de mellado y el sitio de mellado; proporcionando un primer enzima de mellado que puede producir mellas en el sitio de mellado de la matriz, y que no produce mellas en el interior de la secuencia diana; proporcionando un segundo enzima de mellado que puede producir mellas en el sitio de mellado de la matriz inversa y que no produce mellas en el interior de la secuencia diana; y proporcionando un ADN polimerasa; bajo condiciones en las que la amplificación se lleva a cabo mediante ciclos múltiples de la polimerasa que extiende las matrices anterógrada e inversa a lo largo de la secuencia diana, produciendo un sitio de mellado bicatenario y los enzimas de mellado produciendo mellas en los sitios de mellado, dando lugar a un producto de amplificación. Así, en ciertas formas de realización, la región de reconocimiento de la matriz anterógrada o inversa, o cada una de las matrices anterógradas e inversa tiene 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 nucleótidos de largo. En ciertas formas de realización, la secuencia diana comprende de 1 a 5 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de la región de reconocimiento de la matriz anterógrada y de la región de reconocimiento de la matriz inversa.

40 También se describen en la presente memoria procedimientos para amplificar una secuencia diana ácidonucleica monocatenaria, que comprende la puesta en contacto de un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana monocatenaria con una matriz inversa, donde la matriz inversa incluye una secuencia de nucleótidos que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' y que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la secuencia diana, en la que la región de reconocimiento tiene de 8 a 15 nucleótidos de longitud, un sitio de unión del enzima de mellado y un sitio de mellado por encima de la región de reconocimiento, y una región estabilizante por encima del sitio de unión para mellado; proporcionando un primer enzima de mellado que puede provocar mellas en el sitio de mellado de la matriz inversa, y que no produce mellas en el interior de la secuencia diana; proporcionando una ADN polimerasa bajo condiciones en las que la polimerasa extiende la matriz inversa a lo largo de la secuencia diana; poniendo en contacto la matriz inversa extendida con una matriz anterógrada, donde ésta comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' que es idéntica al extremo 5' de la secuencia diana, donde la región de reconocimiento tiene de 8 a 15 nucleótidos de longitud, un

sitio de unión de enzima de mellado, y un sitio de mellado por enzima de la región de reconocimiento, y una región estabilizante por encima del sitio de unión de enzima de mellado, y el sitio de mellado; proporcionando un segundo enzima de mellado que puede provocar mellas en el sitio de mellado de la matriz anterógrada y que no provoca mellas en el interior de la secuencia diana; bajo condiciones en las que la amplificación se lleva a cabo mediante ciclos múltiples de la polimerasa que extiende las matrices anterógrada e inversa a lo largo de la secuencia diana, produciendo un sitio de mellado bicatenaria; produciendo mellas los enzimas de mellado en los sitios de mellado, produciendo una amplificación. Así, en ciertas formas de realización, la región de reconocimiento de la matriz anterógrada o inversa, o cada una de las matrices anterógradas e inversa, tiene una longitud de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En ciertas formas de realización, la secuencia diana comprende entre 1 a 5 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de la región de reconocimiento de la matriz anterógrada y de la región de reconocimiento de la matriz inversa.

En ciertas formas de realización, la temperatura a la cual se lleva a cabo la reacción de amplificación, es inferior que la temperatura de fusión (T_m) de una matriz y diana. En ciertas formas de realización, la temperatura de reacción es, por ejemplo, desde $1^\circ\text{C} - 10^\circ\text{C}$, $1^\circ\text{C}-8^\circ\text{C}$, $1^\circ\text{C}-6^\circ\text{C}$, $1^\circ\text{C}-4^\circ\text{C}$, $1^\circ\text{C}-2^\circ\text{C}$, $2^\circ\text{C}-10^\circ\text{C}$, $2^\circ\text{C}-8^\circ\text{C}$, $2^\circ\text{C}-6^\circ\text{C}$, $2^\circ\text{C}-4^\circ\text{C}$, $2^\circ\text{C}-2^\circ\text{C}$, desde $2^\circ\text{C}-4^\circ\text{C}$ o desde 2°C , 3°C , 4°C , 5°C , 6°C , 7°C U 8°C menos que la T_m de una matriz y diana. La temperatura de reacción es también a menudo inferior a la T_m de los productos de reacción (por ejemplo, productos para mellado y extensión polimerásica del dúplex de amplificación que se muestra en la figura 1B y figura 1C después de la etapa 9A). La temperatura de reacción puede ser superior que la T_m de la matriz inicial/complejo de secuencia diana (figura por encima de la etapa (1) de la figura 1A). Un vez la matriz se extiende para formar un complejo estable, la T_m del complejo estable es superior a la temperatura de reacción.

Así, la T_m de una diana ácido nucleica matriz/diana es a menudo superior a la de la temperatura de reacción, y a veces, la T_m es 5°C más alta que la temperatura de reacción, o por ejemplo, 1°C , 2°C , 3°C , 4°C , 5°C , 6°C , 7°C o 8°C aproximadamente o más alta, que la temperatura de reacción. La T_m de cada porción de la hebra mellada después de la mella, es a menudo más alta que la temperatura de reacción, y a veces la T_m de cada porción mellada es 5°C o más alta que la temperatura de reacción, o por ejemplo, 1°C , 2°C , 3°C , 4°C , 5°C , 6°C , 7°C Ó 8°C o más alta, aproximadamente, que la temperatura de reacción. La T_m de la matriz y de la diana puede calcularse, por ejemplo, utilizando el programa proporcionado por el Analizador Oligo IDT (Integrated DNA Technologies) y World Wide, en la Web URL idtdna.com/analyzer/Applications/Oligo Analyzer, considerando la concentración de sal de las condiciones de la reacción. Tal como se considera en el sitio Web IDT, los cálculos de T_m utilizando el analizador se llevan a cabo de la siguiente forma:

La temperatura de fusión (T_m) es la temperatura a la cual un dúplex oligonucleótido está en forma monocatenaria al 50% y al 50% en forma dicatenaria. El analizador Oligo calcula la T_m a partir del modelo bi-estatal vecinal más cercano, que es aplicable a dúplex ADN cortos.

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = \frac{\Delta H^{\circ}}{\Delta S^{\circ} + R \ln[\text{oligo}]} - 273.15$$

donde ΔH° (entalpía) y ΔS° (entropía) son los parámetros de fusión calculados a partir de la secuencia, y de los parámetros termodinámicos vecinos más próximos publicados, R es la constante del gas ideal ($1.987 \text{ cal}\cdot\text{K}^{-1}\text{mole}^{-1}$), y [oligo] es la concentración molar de un oligonucleótido, convirtiendo la temperatura de grados Kelvin a grados Celsius la constante de $-273,15$. Los parámetros más precisos, vecinales más próximos se obtuvieron a partir de las publicaciones siguientes para los pares de bases ADN/ADN (Allawi, H., Santa Lucia, J., Jr., Biochemistry, 36, 10581), RNA/DNA pares de bases /Sugimoto, N. et al., Biochemistry, 34, 11211), RNA/RNA pares de bases (Xia, T. et al., Biochemistry, 37, 14719) y LNA/DNA pares de bases (McTigue, P.M. et al., Biochemistry, 43, 5388).

La T_m depende de la concentración de sales monovalentes ($[\text{Na}^+]$) del disolvente. La corrección lineal de T_m es un procedimiento conocido en la técnica. Tal como se considera en el sitio web IDT, los científicos en IDT llevaron a cabo un amplio conjunto de experimentos de fusiones mediante UV (~3000 mediciones aproximadamente) sobre alrededor de 100 dúplex de ADN cortos, en distintos tampones sódicos, y determinaron que esta función lineal es imprecisa. El Analizador Oligo utiliza la función correctora cuadrática mejorada de la T_m salina (Owczarzy, R. Et al., Biochemistry, 43, 3537),

$$\frac{1}{T_m(\text{Na}^+)} = \frac{1}{T_m(1\text{M Na}^+)} + (4.29f(\text{GC}) - 3.95) \times 10^{-5} \ln[\text{Na}^+] + 9.40 \times 10^{-6} \ln^2[\text{Na}^+]$$

donde $f(\text{GC})$ es la fracción de los pares de bases de GC

Las longitudes de las regiones de reconocimiento se ajustan, de forma que, por lo menos, existe un nucleótido en la secuencia diana que no está en la región de reconocimiento de la matriz anterógrada. Estas bases espaciadoras (que forman la "región espaciadora" son nucleótidos contenidos en el interior de la secuencia diana que se encuentra entre los extremos de las matrices inversas y anterógradas. Las bases espaciadoras se muestran, por

ejemplo, en la figura 30, en la que se indican como la sección de las secuencias diana antisentido y sentido entre los extremos 3' de las matrices anterógradas e inversas, también indicadas en el interior de la "región espaciadora". Por ejemplo, cuando las matrices T2 y T1 de la figura 30, se utilizan con la diana, la hebra diana con sentido posee 1 base espaciadora (o, un espacio de 1 nucleótido)-T, y la hebra diana antisentido posee una base espaciadora (o, un espacio de 1 nucleótido)-A. 5 bases espaciadoras o menús se encuentran en la secuencia diana. En formas de realización ejemplificativas, el número de bases espaciadoras es de 2 a 3. En ciertas formas de realización, el número de bases espaciadoras es de 1, 2 ó 3. En otras formas de realización, existe una base espaciadora. En otras formas de realización, existen 2 bases espaciadoras. En otras formas de realización, existen 3 bases espaciadoras. En otras formas de realización, el número de bases espaciadoras es 1, 2, 3, 4 ó 5.

Así, en los presentes procedimientos, la secuencia diana comprende desde 1 a 5 nucleótidos entre el nucleótido de la secuencia diana que se hibrida al extremo 3' de la primera matriz y el nucleótido correspondiente al nucleótido del complemento de la primera hebra que se hibridiza al extremo 3' de la segunda matriz. "Nucleótido correspondiente" hace referencia al nucleótido en una hebra de la secuencia de nucleótidos diana que se hibridiza a la hebra complementaria de la secuencia de nucleótidos diana cuando las dos hebras están alineadas. Estos 1 a 5 nucleótidos se denominan también bases espaciadoras.

Estas bases espaciadoras permiten la distinción del producto verdadero amplificado de cualquiera productos anteriores amplificados mediante extensión debida a matrices que se solapan de forma similar a los dímeros-cebadores. Esta consideración permite una mejor discriminación entre el ruido anterior y la amplificación de una secuencia diana. Sin embargo, estas bases espaciadoras no son necesarias para que lleve a cabo la amplificación.

Así, en determinadas formas de realización ejemplificativas, se proporcionan unos procedimientos para amplificar una secuencia diana ácido nucleica bicatenaria, que comprenden la puesta en contacto de una molécula de ADN diana que incluye una secuencia diana bicatenaria, que posee una hebra codificante y una no codificante, con una matriz anterógrada y una matriz inversa, donde la matriz anterógrada comprende una secuencia ácido nucleica que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' y que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la hebra antisentido de la secuencia diana; un sitio de unión de enzima de mellado, y un sitio de unión de enzima de mellado, y un sitio de mellado por encima de la región de reconocimiento, y una región estabilizante por encima del sitio de unión de enzima de mellado, y el sitio de mellado; la matriz inversa comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' y que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la matriz con sentido de la secuencia diana, un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado por encima de la región de reconocimiento; y una región de estabilización por encima del sitio de unión enzimático y el sitio de mellado; proporcionando un primer enzima de mellado que puede producir mellas en el sitio de mellado de la matriz anterógrada, y que no produce mella en el interior de la secuencia diana, que proporciona un segundo enzima de mellado que puede producir mellas en el sitio de mellado de la matriz inversa y que no produce mellas en el interior de la secuencia diana; y proporcionando una ADN polimerasa; bajo condiciones en las que la amplificación se lleva a cabo mediante ciclos múltiples, que extiende las matrices anterógradas e inversa a lo largo de la secuencia diana, dando lugar a un sitio de mellado bicatenario, produciendo mellas los enzimas de mellado en los sitios de mellado, produciendo un producto de amplificación, en el que la secuencia diana comprende de 1 a 5 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de la región de reconocimiento de la matriz anterógrada y de la región de reconocimiento de la matriz inversa. Así, la secuencia diana comprende 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de la región de reconocimiento de la matriz anterógrada y de la región de reconocimiento de la matriz inversa.

En otras formas de realización ejemplificativas, se proporcionan unos procedimientos para amplificar una secuencia diana ácido nucleica monocatenaria, que comprende el contacto de un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana monocatenaria con una matriz inversa, en el que la matriz inversa comprende una secuencia de nucleótidos que incluye una región de reconocimiento en el extremo 3' que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la secuencia diana, un sitio de unión de enzima de mellado, y un sitio de mellado por encima de la región de reconocimiento, y una región de estabilización por encima del sitio de unión de enzima de mellado, y el sitio de mellado; proporcionando un primer enzima de mellado que puede producir mellas en el sitio de mellado de la matriz inversa, y que no produce mellas en el interior de la secuencia diana; proporcionando una ADN polimerasa bajo condiciones en las que la polimerasa extiende la matriz inversa a lo largo de la secuencia diana; poniendo en contacto la matriz inversa extendida con una matriz anterógrada, en la que la matriz anterógrada comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' y que es idéntica al extremo 5' de la secuencia diana, un sitio de unión de enzima de mellado, y un sitio de mellado por encima de la región de reconocimiento, y una región estabilizante por encima del sitio de unión enzimática para mellado, y el sitio de mellado; proporcionando un segundo enzima de mellado que puede producir mellas en el sitio de mellado de la matriz anterógrada, no produciendo mellas en el interior de la secuencia diana, bajo condiciones en las que la amplificación se lleva a cabo mediante ciclos múltiples de la polimerasa que extiende las matrices anterógradas e inversas a lo largo de la secuencia diana, dando lugar a un sitio de mellado bicatenario, y que los enzimas de mellado, mellan en los sitios de mellado, produciendo un producto de amplificación, en el que la secuencia diana comprende de 1 a 5 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de la región de reconocimiento de la matriz anterógrada y de la región de reconocimiento de la matriz inversa. Así, la secuencia diana comprende 1, 2, 3, 4 o

5 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de la región de reconocimiento de la matriz anterógrada y de la región de reconocimiento de la matriz inversa.

La secuencia del sitio de unión de enzima de mellado de la matriz, depende de que el enzima de mellado se seleccione para cada matriz. Pueden utilizarse distintos enzimas de mellado en un ensayo único, pero una amplificación única puede, por ejemplo, utilizar un enzima único para mellado para utilizarlo con ambas matrices. Así, las formas de realización de estos procedimientos incluyen aquéllas en las que ambas matrices incluyen sitios de reconocimiento para el mismo enzima de mellado, utilizándose sólo un enzima de mellado en la reacción. En estas formas de realización, los dos primer y segundo enzimas, para mellado, son el mismo. Este procedimiento incluye también las formas de realización en las que cada matriz comprende un sitio de reconocimiento para un enzima diferente para mellado, utilizándose en la reacción dos enzima de mellado.

Por ejemplo en el caso de Nt.BstNBI, el sitio de unión enzimático es 5'-GAGTC-3', y el enzima mella la banda alta, cuatro nucleótidos aguas abajo del sitio (es decir, GAGTCNNNN[^]). La reacción de amplificación muestra poca dependencia en la secuencia de estos cuatro nucleótidos (N), aunque la secuencia óptima de esta región es 25% o menos contenido de GC, y con una tiamina al nucleótido 5' de la región de unión. La segunda estipulación permite la capacidad de cebado de los productos que presentan añadida una adenina o mediante la polimerasa. La secuencia de los cuatro nucleótidos puede optimizarse para crear o eliminar la presencia de horquillas, autodímeros, o hétérodímeros, dependiendo de la aplicación.

La región estabilizante en el extremo 5' del oligonucleótido matriz se diseña para ser de un GC del 50% aproximadamente. Así, el contenido de GC puede ser, por ejemplo, del 40-60% aproximadamente, del 42-58% aproximadamente, del 44-56% aproximadamente, del 46-54%, aproximadamente, del 48-52% aproximadamente o del 49-51° aproximadamente. Estos parámetros dan lugar a una longitud de la región estabilizante de 8-11 nucleótidos para el enzima Nt.BstNBI, aunque longitudes tan cortas como 6 y 15 nucleótidos se han probado y se mostró que funcionaban en el procedimiento de amplificación. Unas regiones estabilizantes más largas o un GC% superior al 50% podrían estabilizar posteriormente las reacciones de mellado y extensión a temperaturas reactivas más altas. La secuencia de las regiones estabilizantes del extremo 5' de las matrices anterógradas e inversas son idénticas habitualmente, pero pueden variarse si el objetivo es capturar cada hebra del producto de forma independiente. La secuencia de esta región no interferirá con el sitio de mellado o la región de reconocimiento, aunque las horquillas internas cortas en el interior de la secuencia matricial han mostrado tener resultados mejorados en tiempo real.

En ciertas formas de realización uno o más agentes que desestabilizan la interacción ácido nucleica, (por ejemplo, interacciones inter o intrabandas), se incluyen en un procedimiento de amplificación, y en formas de realización alternativas, uno o varios de dichos agentes no se incluye en un procedimiento de amplificación. Los ejemplos de agentes que desestabilizan la interacción ácido nucleica en los que desestabilizan la estructura bicatenaria (por ejemplo, el ADN bicatenario), y/o estructuras en el interior de una hebra (por ejemplo, estructuras secundarias o terciarias en el ARN), e incluyen, sin limitación, betainas y otros compuestos tetraamónicos, formamida, glicerol, sorbitol, perclorato sódico, dimetilsulfóxido (DMSO), alcoholes alquilo inferiores (por ejemplo etanol; alcoholes 1-4 carbono), urea, sales trialquilamónicas, (por ejemplo, cloruro trietil amónico), proteínas de unión monocatenaria (ssb), tales como, por ejemplo, E. coli, ssb, helicasas, tales, por ejemplo, helicasas I, II o IV de ADN de E. coli, alcoholes alquilo inferiores (1-4C), y similares. Sin vincularse a ninguna teoría, dichos agentes disminuyen la temperatura de fusión T_m de las interacciones ácido nucleicas (por ejemplo, una T_m dúplex más baja). Los expertos en la materia pueden determinar el agente apropiado de desestabilización y su concentración apropiada para la reacción considerando, por ejemplo, el grado de desestabilización, así como la necesidad de mantener la actividad enzimática. Los ejemplos de concentraciones incluyen glicerol al 10%, perclorato sódico al 10%, DMSO al 10%, sorbitol al aproximadamente 10%, cloruro trietil amónico 2,4 molar aproximadamente, y una molaridad superior, aproximadamente a 1, 2, 3, 4 o 5 molar betaína, por ejemplo, alrededor de betaína 5-6 molar. La betaína, o la N,N,N-trimetilglicina, puede obtenerse, por ejemplo, de Sigma-Aldrich, por ejemplo, números de catálogo B2629 o B0300. Pueden utilizarse, por ejemplo, combinada con concentraciones bajas de DMSO, por ejemplo, de alrededor de 1-2, o alrededor de 1,3% de DMSO a alrededor de 1 M betaína.

Las matrices de estos procedimientos incluyen espaciadores y pueden incluir, por ejemplo, grupos de bloqueo y nucleótidos modificados. Éstos son nucleótidos o nucleótidos trifosfatos que difieren en composición y/o estructura de los nucleótidos naturales y de los nucleótidos trifosfatos. Los nucleótidos o los nucleótidos trifosfatos que se utilizan en la presente memoria pueden modificarse, por ejemplo, de tal forma que, cuando las modificaciones se encuentran en una hebra de un ácido nucleico bicatenario donde existe un sitio de reconocimiento de una endonucleasa de restricción los nucleótidos modificados o los nucleótidos trifosfatos protegen la hebra modificada contra la escisión mediante los enzimas de restricción. De este modo, la presencia de los nucleótidos modificados o de los nucleótidos trifosfatos favorece al mellado más que la escisión del ácido nucleico bicatenario. Los grupos de bloqueo son fragmentos de moléculas químicas que pueden añadirse a la matriz para inhibir la polimerización secuencia diana-ácido nucleica independiente por la polimerasa. Los grupos de bloqueo se encuentran localizados habitualmente en el extremo 3' de la matriz. Los ejemplos de grupos de bloqueo incluyen, por ejemplo grupos alquilo, engarces no nucleótidos, fósforo tioato, residuos alcan-diol, péptidos ácido nucleicos y derivados nucleótidos a los que les falta un 3'-OH, que incluyen, por ejemplo, cordicopina. Los ejemplos de espaciadores

incluyen, por ejemplo, espaciadores C3. Los espaciadores son utilizados, por ejemplo, en el interior de la matriz, y también pueden ser utilizados, por ejemplo, en el extremo 5', para unir otros grupos como por ejemplo, marcadores.

5 Los nucleótidos no modificados se proporcionan a menudo para la extensión de las matrices. Los nucleótidos no modificados y los derivados nucleótidos no se proporcionan a menudo para la incorporación en matrices extendidas. En ciertas formas de realización, sin embargo, uno o varios nucleótidos modificados o derivados de nucleótidos pueden proporcionarse e incorporarse a una matriz extendida.

10 La reacción de amplificación puede también incluir oligonucleótidos colaboradores. Éstos son oligonucleótidos que tienen una longitud de alrededor de 5-10, 5-15, 5-20 nucleótidos. La presencia de oligonucleótidos colaboradores puede aumentar la velocidad, cantidad o sensibilidad de la reacción de amplificación. Los oligonucleótidos colaboradores no se incorporan al producto final. Los expertos en la materia podrán determinar los oligonucleótidos colaboradores apropiados para añadir a una reacción, así como la cantidad que debe añadirse. Un ejemplo de una forma para determinar los oligonucleótidos colaboradores apropiados, es sintetizar oligonucleótidos que son complementarios a varias regiones del ácido nucleico diana o su complemento, y añadirlos al ensayo variando cantidades, comparando el ensayo con los oligonucleótidos colaboradores a uno sin oligonucleótidos colaboradores, como control. Pueden sintetizarse oligonucleótidos colaboradores que son complementarios a regiones aguas arriba o aguas abajo de la región de reconocimiento, o su complemento. Por ejemplo, se pueden sintetizar conjuntos de oligonucleótidos colaboradores de una longitud de 10 bases aproximadamente, que son complementarias a regiones espaciadas cada 5-10 bases aguas arriba o aguas abajo de la región de reconocimiento, ensayándose entonces en pares en cuanto a su capacidad para potenciar la reacción de amplificación.

25 **Mecanismo detallado de la amplificación**

25 Las reacciones de amplificación de estos procedimientos requieren la presencia de una diana ácido nucleica, por lo menos, de dos oligonucleótidos matrices, un enzima de mellado, por ejemplo, un enzima termófilo para mellado, una polimerasa termófila, y componentes tampón, mantenidos todos a la temperatura de reacción. La región de reconocimiento de las matrices interacciona con la secuencia diana complementaria o sustancialmente complementaria. Ya que la temperatura de fusión, de las regiones complementarias o sustancialmente complementarias de la diana y de la matriz, está bien por debajo de la temperatura de reacción, la interacción entre las dos hebras ácido nucleicas es transitoria, pero permite un tiempo suficiente para que una polimerasa termófila se extienda desde el extremo 3' de la matriz, a lo largo de la hebra diana. Los experimentos han mostrado que ciertas polimerasas se unen a oligonucleótidos monocatenarios. La preformación de este complejo puede facilitar la velocidad del proceso de amplificación.

30 Para una diana bicatenaria, ambas matrices pueden interactuar con las correspondientes hebras diana simultáneamente (matriz anterógrada con la hebra no codificante y la matriz inversa con la hebra codificante) durante la respiración normal del ADN bicatenario. La diana puede también generarse mediante sitios mellados dobles o únicos en el interior de la secuencia genómica. Para una diana monocatenaria (ADN o ARN), la matriz inversa se une y extiende primero (Figura 1, etapas 1 y 2). La secuencia extendida contiene el complemento para la matriz anterógrada. Ésta se desplaza entonces a una región de la diana y se une a la región sintetizada del extremo 3' complementaria o sustancialmente complementaria a la región de reconocimiento de la matriz anterógrada (Etapa 3). Alternativamente, otra matriz inversa puede también desplazar la matriz inversa extendida inicial en la región de reconocimiento, para crear una matriz inversa extendida monocatenaria para unir la matriz anterógrada. La unión inicial y la extensión de las matrices es facilitada mediante una polimerasa no procesadora que extiende hebras más cortas del ADN, de forma que la temperatura de fusión del producto sintetizado se encuentra por encima de la temperatura de reacción. El producto monocatenario está entonces disponible para unirse al próximo sitio de reconocimiento de la matriz, y extenderse con la polimerasa.

40 La matriz anterógrada se extiende al extremo 5' de la matriz inversa, creando un sitio de unión enzimático bicatenario para mellado para la matriz inversa (etapa 5). El enzima de mellado se une entonces al dúplex y produce una mella directamente por encima de la secuencia de reconocimiento de la hebra de la matriz inversa (en el caso de un enzima de mellado de banda alta) (Etapa 6). La secuencia ácido nucleica por debajo del mellado se libera, (si la temperatura de fusión es cercana a la de reacción) y/o es desplazada por la síntesis polimerásica a partir del sitio mellado 3'-OH. La polimerasa se extiende a lo largo de la matriz anterógrada al extremo 5' de la matriz anterógrada (Etapa 8). La hebra doble formada a partir de la extensión de ambas matrices crea un sitio de unión enzimática para mellado en cada extremo del dúplex. Esta hebra doble se denomina el dúplex NEAR™ de amplificación. Cuando el enzima de mellado se une y produce mellas o bien el producto diana que se localiza entre los dos sitios de mellado (con 5'-fosfato y 3'-OH) se libera, con una longitud del orden, habitualmente de (pero no se limita a) 23 a 29 bases (Etapas 9-11A), o el producto únicamente mellado que contiene el producto diana y el complemento inverso del sitio de mellado y la región de estabilidad de la matriz (habitualmente de 36 a 48 bases de longitud), se libera (Etapas 9-11B). Otra muestra de los mecanismos de la reacción se presenta en la figura 33.

65 La relación de los productos 1 a 2 puede ajustarse variando las concentraciones de las matrices. La relación matriz anterógrada inversa puede variar entre, por ejemplo, las proporciones molares de 100:1, 75:1, 50:1, 40:1, 30:1,

20:1, 10:1, 5:1, 2,5:1, 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:75 o 1:100. La proporción de productos (A a B) depende de la proporción del enzima de mellado a la polimerasa, es decir, una concentración más alta de polimerasa da lugar a más producto de longitud mayor (B), ya que existe un enzima de mellado comparativamente menor para mellar ambas hebras simultáneamente antes de que la polimerasa de extienda, ya que el producto desplazado/librado de la matriz inversa alimenta la matriz anterógrada y viceversa, se alcanza la amplificación exponencial. La proporción enzima de mellado polimerasa puede variar de, por ejemplo, proporciones unitarias enzimáticas de 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1,5:1, 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20. En ciertas formas de realización, la proporción del enzima de mellado a la polimerasa puede, por ejemplo, ser 1:3, 1:2, 1:1,5 o 1:0,8. Los expertos en la materia apreciarán que estas proporciones pueden representar valores redondeados. Este proceso de extensión polimerásica y mellado continua hasta que una de las fuentes (habitualmente dNTP o enzima) se acaba.

Tal como se demuestra en los Ejemplos, el tiempo en que la reacción se procesa puede variar entre, por ejemplo, de alrededor de 1 minuto, o de alrededor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 minutos. Los tiempos de reacción más largos pueden producir resultados aceptables cuando la velocidad no constituye un problema. En algunas formas de realización, la reacción dura entre 1-20 minutos, 1-15 minutos o 1-10, 1-8, 1-5, 1-2,5, 2,5-5, 2,5-8, 2,5-10 o 2,5-20 minutos en ciertas formas de realización. Los procesos de amplificación que se han descrito en la presente memoria, son eficientes, y en algunas formas de realización, tal como se muestra, por ejemplo, en los ejemplos, existe una amplificación de 1×10^6 veces aproximadamente o más, una amplificación de 1×10^7 veces o más aproximadamente, una amplificación de 1×10^8 veces o más aproximadamente, una amplificación de 1×10^9 veces o más, aproximadamente, o una amplificación de 1×10^{10} veces o más, en el ámbito temporal de la reacción, por ejemplo, en 5 o 10 minutos. La reacción es muy sensible y puede detectar, por ejemplo, un número de copias tan bajo como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 copias, o más, en una muestra, tantas como 200, 500, 1.000, 5.000 o 10.000 o más, en una muestra, o, por ejemplo, puede detectar una diana que se encuentre a una concentración de, por ejemplo, alrededor de $3,32E-13$ micromolar a alrededor de $3,32E-8$ micromolar, alrededor de $1,66E-12$ micromolar a alrededor de $3,32E-8$ micromolar, alrededor de $3,32E-13$ micromolar a alrededor de $3,32E-7$ micromolar, o alrededor de $3,32E-13$ micromolar a alrededor de $3,32E-6$ micromolar.

En determinadas formas de realización ejemplificativas, se proporcionan unos procedimientos para amplificar una secuencia diana ácido nucleica monocatenaria, que comprende poner en contacto un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana monocatenaria con una matriz inversa, donde la matriz inversa incluye una secuencia de nucleótidos que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la secuencia diana, un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado por encima de la región de reconocimiento, y una región estabilizante por encima del sitio de unión de enzima de mellado y el sitio de mellado, proporcionando un primer enzima de mellado que puede practicar mellas en el sitio de mellado de la matriz inversa, y que no produce mellas en el interior de la secuencia diana; proporcionando una ADN polimerasa bajo condiciones en las que la polimerasa extiende la matriz inversa a lo largo de la secuencia inversa extendida con una matriz anterógrada, donde la matriz anterógrada comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' que es idéntica al extremo 5' de la secuencia diana, un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado por encima de la región de reconocimiento y una región estabilizante por encima del sitio de unión del enzima de mellado y el sitio de mellado, proporcionando un segundo enzima de mellado, que puede practicar mellas en el sitio de mellado de la matriz anterógrada y que no produce mellas en el interior de la secuencia diana; bajo condiciones en las que la amplificación se lleva a cabo mediante ciclos múltiples de la polimerasa que extiende las matrices anterógradas e inversa a lo largo de la secuencia diana, dando lugar a un sitio de mellado bicatenario, y los enzimas de mellado, en los lugares para éste, produciendo mellas, dando lugar a un producto de amplificación, donde alrededor de 10^6 ($1E+06$) copias de una secuencia diana, se producen en 10 minutos. En otras formas de realización, en 10 minutos se producen alrededor de 10^7 ($1E + 07$) copias bajo condiciones isotérmicas. Para los ensayos multipléxicos, el tiempo para producir la misma cantidad de copias, puede aumentarse hasta alrededor, por ejemplo, de 12, 14, 15, 18 ó 20 minutos. El tamaño de la secuencia diana en estos ensayos, para calcular la eficiencia, puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 20 a alrededor de 40 nucleótidos, o, de 20 a 30 nucleótidos, o por ejemplo, de alrededor de 20 a 33 nucleótidos, aproximadamente. El tiempo de la reacción se calcula desde el momento en el que todos los productos de la reacción se encuentran en el mismo receptáculo, recipiente, o similares, de forma que la reacción de amplificación pueda empezar hasta el momento en el que se aplica calor o se añaden los agentes químicos para interrumpir la reacción.

En otra forma de realización ejemplificativa, se proporcionan unos procedimientos para amplificar una secuencia diana ácido nucleica bicatenaria que comprende poner en contacto una molécula diana de ADN que incluye una secuencia diana bicatenaria, que posee una hebra codificante y una hebra no codificante, con una matriz anterógrada y una matriz inversa, donde la matriz anterógrada comprende una secuencia ácido nucleica que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la hebra no codificante de la secuencia diana; un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado por encima de la región de reconocimiento y una región estabilizante por encima del sitio de unión del enzima de mellado, y el sitio de mellado; la matriz inversa comprende una secuencia de nucleótidos que incluye una región de reconocimiento en el extremo 3' que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la hebra codificante de la secuencia diana, un sitio de unión del enzima de mellado

y un sitio de mellado por encima de la región de reconocimiento, y una región estabilizante por encima del sitio de unión del enzima de mellado, y el sitio de mellado; proporcionando un primer enzima de mellado que puede producir mellas en el sitio de mellado de la matriz anterógrada, y que no produce mellas en el interior de la secuencia diana; proporcionando un segundo enzima de mellado que puede producir mellas en el sitio de mellado de la matriz inversa y que no produce mellas en el interior de la secuencia diana; y proporcionando una ADN polimerasa; bajo condiciones en las que la amplificación se realiza mediante ciclos múltiples de la polimerasa que extiende las matrices anterógradas e inversa a lo largo de la secuencia diana, produciendo un sitio bicatenario para provocar mellas, y los enzimas de mellado que producen mellas en los sitios de mellado, dando lugar a un producto de amplificación, en el que alrededor de 10^6 ($1E+06$) copias de una secuencia diana, se producen en 10 minutos, bajo condiciones isotérmicas. En otras formas de realización, se producen en 10 minutos alrededor de 10^7 ($1E+07$) copias. Para los ensayos multipléxicos, el tiempo para producir la misma cantidad de copias puede aumentar a por ejemplo, 12, 14, 15, 18 ó 20 minutos. El tamaño de la secuencia diana en estos ensayos, para calcular la eficiencia, puede ser, por ejemplo de 20 a 40 nucleótidos, por ejemplo, de 20 a 33 nucleótidos aproximadamente. El tiempo de reacción se calcula a partir del momento en el que todos los productos de reacción se encuentran en el mismo receptáculo, recipiente o similar, de forma que la reacción de amplificación puede empezar.

Estos procedimientos no necesitan la utilización del ciclado de la temperatura, pues a menudo es necesario, en los procedimientos de amplificación, disociar la secuencia diana del ácido nucleico amplificado. La temperatura de la reacción puede variar, basándose en la longitud de la secuencia, y en la concentración de GC, pero, tal como apreciarán los expertos en la materia, la temperatura será lo bastante alta para minimizar la unión no específica. La temperatura deberá ser también apropiada para las enzimas de la reacción, el enzima de mellado y la polimerasa. Por ejemplo, la reacción puede procesarse a alrededor de 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C ó 60°C. En algunas formas de realización, la reacción se procesa a aproximadamente 37°C-85°C, 37°C-60°C, 54°C-60°C, 55°C-60°C, 58°C-60°C y, en formas de realización ejemplificativas entre 56°C-58°C. No existe una etapa de desnaturalización en el procedimiento. El proceso de amplificación completo, incluyendo las matrices que interaccionan con el ácido nucleico diana, se lleva a cabo en sustancialmente condiciones isotérmicas y sin una etapa de desnaturalización (por ejemplo, un incremento de temperatura no significativo (por ejemplo, sin un aumento a 90-110°C) en la temperatura.

Así; en ciertas formas de realización ejemplificativas, se proporcionan procedimientos para amplificar una secuencia diana ácido nucleica bicatenaria, que comprende la puesta en contacto de una molécula diana de ADN, que incluye una secuencia diana bicatenaria, con una hebra codificante y una no codificante, con una matriz anterógrada y una matriz inversa donde la matriz anterógrada comprende una secuencia ácido nucleica que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' y que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la hebra no codificante de la secuencia diana, un sitio de unión enzimática para mellado, y un sitio de mellado por encima de la región de reconocimiento y una región de estabilización por encima del enzimático de unión para mellado en el sitio de mellado; la matriz inversa comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' y que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la hebra codificante de la secuencia diana, un sitio de unión de enzima de mellado, y un sitio de mellado por encima de la región de reconocimiento, y una región de estabilización por encima del sitio de unión de enzima de mellado y el sitio de mellado; proporcionando un primer enzima de mellado que puede producir mellas en el sitio de mellado de la matriz anterógrada no provocando mellas en el interior de la secuencia diana; proporcionando un segundo enzima de mellado que puede producir mellas en el sitio de mellado de la matriz inversa y que no produce mellas en el interior de la secuencia diana, y proporcionando una ADN polimerasa; bajo condiciones en las que la amplificación se lleva a cabo mediante ciclos múltiples de la polimerasa, extendiendo las matrices anterógradas e inversas a lo largo de la secuencia diana dando lugar a un sitio de mellado bicatenario, y los enzimas de mellado produciendo mellas en los sitios de mellado, dando lugar a un producto de amplificación, en el que las etapas siguientes se llevan a cabo bajo condiciones isotérmicas.

En otra forma de realización ejemplificativa, se proporcionan unos procedimientos para amplificar una secuencia diana ácido nucleica monocatenaria, que comprende poner en contacto un ácido nucleico diana que incluye una secuencia diana monocatenaria con una matriz inversa, donde la matriz inversa comprende una secuencia de nucleótidos que incluye una región de reconocimiento en el extremo 3' que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la secuencia diana, un sitio de unión de enzima de mellado, y un sitio de mellado por encima de la región de reconocimiento, y una región estabilizante por encima del sitio de unión del enzima de mellado y el sitio de mellado; proporcionando un primer enzima de mellado que puede provocar mellas en el sitio de mellado de la matriz inversa, y que no mella en el interior de la secuencia diana; proporcionando una ADN polimerasa bajo condiciones en las que la polimerasa extiende la matriz inversa a lo largo de la secuencia diana; poniendo en contacto la matriz inversa extendida con una matriz anterógrada, donde ésta comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' que es idéntica al extremo 5' de la secuencia diana, un sitio de unión de enzima de mellados, y un sitio de mellado por encima de la región de reconocimiento, y una región estabilizante por encima del sitio de unión de enzima de mellado, y el sitio de mellado; proporcionando un segundo enzima de mellado que puede provocar mellas en el sitio de mellado de la matriz anterógrada y que no provoca mellas en el interior de la secuencia diana, bajo condiciones en las que la amplificación se lleva a cabo mediante ciclos múltiples de la polimerasa, que extiende las matrices anterógrada e inversa a lo largo de la secuencia diana, dando lugar a un

sitio de mellado bicatenario, produciendo mellas los enzimas de mellado en los sitios de mellado, dando lugar a un producto de amplificación, en el que las etapas siguientes se llevan a cabo bajo condiciones isotérmicas.

5 La polimerasa puede mezclarse con la molécula ácido nucleica diana antes, después o al mismo tiempo que, el enzima de mellado. En formas de realización ejemplificativas, se optimiza un tampón reactivo para que sea apropiado para tanto el enzima de mellado como para la polimerasa.

10 Las reacciones pueden tener lugar hasta que se cumplen, esto es, cuando uno de los recursos se agota o, la reacción puede detenerse utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, la inactivación térmica, o la adición de EDTA, sales potentes, o detergentes. En formas de realización ejemplificativas, si va a utilizarse la espectrometría de masas después de la amplificación, puede usarse EDTA para parar la reacción.

15 **Componentes de la reacción**

En un tubo Eppendorf de 1,5 ml se combinan los reactivos siguientes desde la parte superior al fondo:

| Reactivo añadido | Microlitros por reacción |
|---------------------------|--------------------------|
| H ₂ O | 31,4 |
| 10X tampón (NEB) | 5 |
| 10X NEB tampón 3 | 2,5 |
| 100 mM MgSO ₄ | 4,5 |
| 10 mM dNTP | 1,5 |
| 8 U/microlitros Bst POL | 0,6 |
| 10 U/microlitros N.BstNBI | 1,5 |
| 20 matriz anterógrada | 0,25 |
| 20 mezcla reactiva | 0,25 |
| | |
| Mezcla reactiva total | 47,5 |
| Muestra diana | 2,5 |
| Volumen reactivo total | 50 microliters |

20 Las concentraciones de componentes para las condiciones reactivas en este ejemplo son las siguientes:

| Concentración | Componente |
|----------------------|--|
| 45,7 mM | Tris-HCl |
| 13,9 mM | KCl |
| 10 mM | (NH ₄) ₂ SO ₄ |
| 50 mM | NaCl |
| 0,5 mM | DTT |
| 15 mM | MgCl ₂ |
| 0,10% | Triton X-100 |
| 0,008 mM | EDTA |
| 6 µg/mL | BSA |
| 3,90% | glicerol (puede ser inferior si se utiliza un almacenamiento enzimático más concentrado) |
| 0,3 U/microliter | Nt.BstNBI |
| 0,1-0,4 U/microliter | Bst polimerasa (fragmento grande) |
| 0,1 micromolar | Matriz anterógrada |
| 0,1 micromolar | Matriz inversa |

25 Las variaciones en las condiciones de los tampones, concentraciones de MgSO₄, concentración de polimerasas, y concentraciones de las matrices, pueden ser todas optimizadas basándose en la secuencia de los ensayos, y del procedimiento de detección. La cantidad de glicerol puede, por ejemplo, disminuirse, si se utiliza un almacenamiento de enzima más concentrado. En ciertas formas de realización, la concentración de iones Mg²⁺ añadida como reactivo está entre 9 mM a 25 mM aproximadamente, entre 9 mM a 21 mM aproximadamente, entre 9 a 21 mM aproximadamente, entre 9 a 20 mM aproximadamente, entre 9 a 15 mM aproximadamente, y, en formas de realización ejemplificativas, entre 10 mM a 18 mM aproximadamente, en tre 10 mM a 25 mM aproximadamente, entre 10 mM a 21 mM aproximadamente, entre 12 a 21 mM aproximadamente, entre 10 a 20 mM aproximadamente, entre 10 a 15 mM aproximadamente, entre 10,3 a 20 mM aproximadamente, entre 10,3 a 14,9 mM aproximadamente, o alrededor de 15 mM, por ejemplo. Asimismo, los expertos en la materia apreciarán que la reacción puede procesarse sin EDTA o BSA, estos componentes pueden encontrarse en la reacción como parte de los tampones de almacenamiento para los enzimas. Los volúmenes pueden escalarse para volúmenes de reacción totales más grandes o más pequeños. El volumen se encuentra habitualmente entre 5 µl y 100 µl.

35

Las concentraciones de las matrices se encuentran típicamente en exceso de la concentración de la diana. Las concentraciones de las matrices anterógrada e inversa pueden ser las mismas o diferentes con respecto a la preferencia de amplificación de un producto respecto al otro. La concentración de cada una está habitualmente entre 10 nM y 1 µM.

5 Los aditivos tales como BSA, detergentes no iónicos tales como Triton X-100 o Tween-20, DMSO, DTT, y el inhibidor de la RNasa, pueden incluirse con propósitos de optimización sin que afecten adversamente a la reacción de amplificación.

10 Preparación/Añadido de la Diana

Las dianas pueden diluirse en 1 x Tampón Thermopol II, 1 x TE (pH 7,5) o agua en condiciones calientes de salida permiten una amplificación más rápida y específica. En este caso, la mezcla reactiva (menos enzimas, o matrices y diana) se calienta a la temperatura de reacción durante 2 minutos, añadiéndose a continuación la mezcla reactiva a los otros componentes (enzimas o matrices/diana). La diana puede añadirse en un volumen cualquiera hasta la cantidad total de agua que se requiera para la reacción. En este caso, la diana deberá diluirse en agua. En el ejemplo anterior para un volumen de reacción total de 50 microlitros, 2,5 microlitros de la diana preparada deberán añadirse por reacción para llevar el volumen total reaccionante a 50 microlitros. Los volúmenes de reacción de estos procedimientos pueden aumentarse o disminuirse dependiendo de las necesidades del usuario. Los volúmenes de reacción de, por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 microlitros o más, o volúmenes de reacción más grandes de, por ejemplo, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 microlitros, por ejemplo, pueden utilizarse en estos procedimientos.

25 Procesamiento de la reacción

La reacción se procesa a una temperatura constante, habitualmente entre 54 y 60°C para la combinación enzimática de la polimerasa Bst (fragmento grande) y el enzima de mellado Nt.Bst.NB1. Pueden utilizarse otras combinaciones enzimáticas y la temperatura óptima de reacción se basará en la temperatura óptima tanto para el enzima de mellado como para la polimerasa, para trabajar concertadamente, así como con la temperatura de fusión de los productos de reacción. Las reacciones se mantienen a esa temperatura durante 2,5 a 10 minutos, por ejemplo, hasta que la cantidad deseada de amplificación, se alcance. La reacción puede pararse mediante una etapa de inactivación térmica para inactivar los enzimas (cuando se utilizan enzimas que pueden eliminarse por el calor). Alternativamente, la reacción puede detenerse añadiendo EDTA a la reacción.

35 Lectura

La secuencia diana amplificada puede detectarse mediante cualquier procedimiento que sea conocido por los expertos en la materia. Como ejemplos no limitativos, en la presente memoria se dan a conocer varios de estos procedimientos conocidos. En un procedimiento, los productos amplificados pueden detectarse mediante electroforesis en gel, detectando de este modo los productos de reacción que presenten una longitud específica. Los nucleótidos pueden, por ejemplo, marcarse, tal como por ejemplo con biotina. Las secuencias amplificadas marcadas con la biotina pueden capturarse utilizando avidina unida a un enzima que genere una señal, por ejemplo, peroxidasa.

45 Los procedimientos de detección ácido nucleica pueden utilizar colorantes que tiñan específicamente el ADN dicatenario. La intercalación de colorantes que muestran una potenciación de la fluorescencia cuando se unen al ADN o ARN, constituyen una herramienta básica en la biología celular y molecular. Los colorantes pueden ser, por ejemplo, fluoróforos que se intercalan en el ADN o en el ARN y que pueden incluir pero no se limitan a los ejemplos siguientes: naranja de acridina, bromuro de etidio, colorantes Hoechst, PicoGreen, yoduro de pidio, SYBR I (un colorante asimétrico de cianina), SYBR II, TOTO (un dímero naranja de tiaxol) y YOYO (un dímero amarillo de oxazol), y similares. Los colorantes proporcionan una oportunidad para aumentar la sensibilidad de la detección ácido nucleica cuando se utilizan conjuntamente con varios procedimientos de detección, y pueden tener parámetros de utilización óptimos variables. Por ejemplo, el bromuro de etidio se utiliza habitualmente para teñir ADN en geles de agarosa después de la electroforesis en gel y durante la PCR (Hiquchi et al., Nature Biotechnology 10; 413-417, april 1992); el yoduro de propidio y Hoechst 33258 se utilizan en citometría de flujo para determinar la ploidía del ADN celular, SYBR Green I se ha utilizado en el análisis de ADN bicatenario mediante electroforesis capilar con detección fluorescente inducida mediante láser, y Pico Green se ha utilizado para potenciar la detección de ADN bicatenario después de cromatografía de pares iónicos apareados de polinucleótidos (Singer et al., Analytical Biochemistry 249, 229-238, 1997).

60 Los procedimientos de detección ácido nucleica pueden también utilizar nucleótidos marcados que se incorporan directamente a la secuencia diana o a sondas que contienen secuencias complementarias o sustancialmente complementarias para la diana de interés. Dichos marcadores pueden ser radioactivos y/o fluorescentes de forma natural y pueden ser detectados de cualquiera de las formas que se consideran en la presente memoria. Los nucleótidos marcados, que pueden detectarse pero que funcionan de otro modo como nucleótidos originales, tienen que distinguirse de los nucleótidos modificados, que no funcionan como nucleótidos originales.

Los procedimientos para detectar y/o monitorizar continuamente la amplificación de los productos ácido nucleicos, son también bien conocidos por los expertos en la materia y a continuación se describen varios ejemplos.

5 La producción o presencia de ácidos nucleicos diana y de secuencias ácido nucleicas puede detectarse y monitorizarse mediante balizas moleculares. Éstos son oligonucleótidos en forma de alfiler para pelo, que contienen un fluoróforo en un extremo y un colorante en extinción en el extremo opuesto. El asa del alfiler para pelo contienen una secuencia de una sonda que es complementaria o sustancialmente complementaria a una secuencia diana, estando formado el eje por la hibridación de secuencias complementarias o sustancialmente complementarias del brazo (del eje) que se localizan a cada lado de la secuencia de la sonda. Un fluoróforo y una molécula en extinción están unidas covalentemente en los extremos opuestos de cada brazo. Bajo condiciones que evitan que los oligonucleótidos se hibriden a su diana complementaria o sustancialmente complementaria, o cuando la baliza molecular está libre en solución, las moléculas fluorescentes y en extinción están próximas entre ellas, y evitando así la transferencia energética de resonancia de fluorescencia (FRET). Cuando la baliza molecular se encuentra con una molécula diana, tiene lugar la hibridación; la estructura de asa se convierte en una conformación rígida más estable, lo que provoca la separación del fluoróforo y de las moléculas en extinción, lo que lleva a la fluorescencia /Tyagi et al., *Nature Biotechnology* 14: March 1996, 303-308). Debido a la especificidad de la sonda, la generación de fluorescencia se debe exclusivamente a la síntesis del producto que va a amplificarse.

20 Las balizas moleculares son extraordinariamente específicos y pueden discernir un simple polimorfismo nucleótido. Las balizas moleculares pueden también sintetizarse con distintos fluoróforos coloreados y diferentes secuencias diana, permitiendo varios productos en la misma reacción pueden cuantificarse simultáneamente. Para procedimientos cuantitativos de amplificación, las balizas moleculares pueden unirse específicamente a la diana amplificada, después de cada ciclo de amplificación, y a causa de que las balizas moleculares no hibridadas son oscuras, no es necesario aislar los híbridos diana-sonda para determinar cuantitativamente la cantidad del producto amplificado. La señal resultante es proporcional a la cantidad del producto amplificado. Esto puede hacerse en tiempo real. Como con otros formatos en tiempo real, las condiciones reactivas específicas deben optimizarse para cada conjunto cebador/sonda para asegurar la exactitud y la precisión.

30 La producción o presencia de ácidos nucleicos diana y de secuencias ácido nucleicas puede también detectarse y monitorizarse mediante transferencia energética de resonancia de fluorescencia (FRET). La FRET constituye un mecanismo de transferencia energética entre dos cromóforos, una molécula donadora y una receptiva. Brevemente, una molécula donadora de fluoróforo es excitada con una longitud de onda específica de excitación. La emisión subsiguiente a partir de la molécula donadora, pues vuelve a su estado basal, puede transferir energía de excitación a la molécula receptiva mediante una interacción dipolo-dipolo de amplio espectro. La intensidad de la emisión de la molécula receptora puede monitorizarse y es una función de la distancia entre el donador y el receptor, del solapamiento del espectro de emisión del donador y del espectro de absorción del receptor y de la orientación del momento del dipolo de emisión del donador y del momento del dipolo de absorción del receptor. La FRET es una útil herramienta para cuantificar la dinámica molecular, por ejemplo, en las interacciones ADN-ADN tal como se aprecia con las balizas moleculares. Para monitorizar la producción de un producto específico, puede marcarse una sonda con una molécula donadora, en un extremo y una molécula receptora en el otro. La hibridación sonda-diana conlleva un cambio en la distancia u orientación del donador y del receptor, observándose un cambio en FRET. (Joseph R. Lakowicz, "Principles of Fluorescence Spectroscopy", Plenum Publishing Corporation, 2nd edition (July 1, 1999)).

45 La producción o presencia de ácidos nucleicos diana y de secuencias ácido nucleicas puede detectarse y monitorizarse también mediante espectrometría de masas. Ésta constituye una técnica analítica que puede utilizarse para determinar la estructura y cantidad de las especies ácido nucleicas de la diana, pudiéndose utilizar para proporcionar un análisis rápido de mezclas complejas. Siguiendo el procedimiento, las muestras se ionizan, separándose los iones resultantes en campos eléctricos y/o magnéticos, según su proporción masa-a-carga, y un detector mide la proporción masa-a-carga de los iones. (Crain, P.F. and McCloskey, J.A., *Current Opinion in Biotechnology* 9: 25-34 (1998)). Los procedimientos de espectrometría de masas incluyen, por ejemplo, MALDI, MALDI/TOF o electropulverización. Estos procedimientos pueden combinarse con cromatografía de gas (GC/MS) y cromatografía líquida (LC/MS). MS se aplicó a la determinación de oligonucleótidos de las secuencias de ADN y ARN (Limbach P., *MassSpectrom. Rev.* 15: 297-336 (1996); Murray K., *J. Mass Spectrom.* 31: 1203-1215 (1996)). MS y más particularmente, la desorción/ionización MS de la matriz asistida por láser (MALDI MS), posee el potencial de un rendimiento muy alto debido a la adquisición de una señal a alta velocidad y al análisis automatizado de las superficies sólidas. Se ha puesto de manifiesto que MS, además del tiempo de ahorro, mide una propiedad intrínseca de las moléculas, y por tanto, produce una señal significativamente más informativa (Koster H. et al., *Nature Biotechnol.*, 14: 1123-1128 (1996)).

60 La producción o presencia de ácidos nucleicos diana y secuencias ácido nucleicas, puede también detectarse y monitorizarse mediante diversos procedimientos de electroforesis en gel. Ésta implica la separación de ácidos nucleicos mediante una matriz, generalmente un polímero reticulado, utilizando una fuerza electromotriz que empuja las moléculas a través de la matriz. Las moléculas se desplazan a través de ésta, a distintas velocidades,

provocando una separación entre los productos que puede visualizarse e interpretarse a través de distintos procedimientos, que incluyen pero no se limitan a: autorradiografía, fósforoimagen y tinción con colorantes quelantes a ácidos nucleicos.

5 La producción o presencia de ácidos nucleicos diana y secuencias ácido nucleicas puede también detectarse y monitorizarse mediante electroforesis capilar en gel. Ésta (CGE) es una combinación de electroforesis en gel tradicional y cromatografía líquida que utiliza un medio tal como la poliacrilamida en una estrecha perforación capilar para generar separaciones rápidas y muy eficientes de moléculas de ácidos nucleicos con resoluciones de hasta incluso bases aisladas. La CGE se combina habitualmente con la detección mediante fluorescencia inducida por láser (LIF), donde pueden detectarse hasta tanto como seis moléculas del ADN teñido. La detección CGE/LIF implica generalmente la utilización de colores fluorescentes que se intercalan en el ADN que incluyen bromuro de etidio, YOYO y SYBR Green, pero pueden también implicar la utilización de derivados fluorescentes del ADN, donde el colorante fluorescente se une covalentemente al ADN. La identificación simultánea de distintas secuencias diana puede llevarse a cabo utilizando este procedimiento.

15 La producción o presencia de ácidos nucleicos diana y de secuencias ácido nucleicas puede detectarse asimismo, y monitorizarse, mediante varios procedimientos de captura superficial. Esto se lleva a cabo mediante inmovilización de oligonucleótidos a una superficie, produciendo un biosensor que es tanto muy selectivo como sensible. Las superficies que se usan en este procedimiento pueden incluir, pero no se limitan a oro y carbono, y pueden utilizar diversos procedimientos de enlace covalente o no covalente, para unir la sonda a la superficie. La detección subsiguiente de un ADN diana, puede monitorizarse mediante distintos procedimientos.

20 Los procedimientos electroquímicos implican generalmente la medición del pico catódico de intercaladores, tal como el azul metileno, sobre el electrodo sonda de ADN y su visualización con los voltamogramas de ondas cuadradas. La unión de la secuencia diana puede observarse por una disminución en la magnitud de las señales de reducción voltamétrica del azul de metileno, pues interacciona con dsADN y ssADN, reflejando de forma distinta el grado de la formación del híbrido.

25 La Resonancia Plasmon Superficial (SPR) puede también utilizarse para monitorizar la cinética de la unión de la sonda, así como del procedimiento de captura de la diana, SPR no necesita utilizar sondas fluorescentes u otras marcas. La SPR se basa en el principio de la reflexión y refracción de la luz sobre una interfaz de dos medios transparentes de distintos índices de refracción. Utilizando luz monocromática y p-polarizada y dos medios transparentes con una interfaz que incluye una capa fina de oro, se observa el reflejo total de la luz se observa más allá de un ángulo crítico, pero, sin embargo, el componente del campo electromagnético de la luz penetra en el medio de índice de refracción más bajo, creando una onda evanescente y una sombra afilada (resonancia plasmar de superficie). Esto se debe a la transferencia energética de resonancia entre la onda y los plasmones de superficie. Las condiciones de resonancia están influenciadas por el material adsorbido en la fina capa metálica y las concentraciones de moléculas ácido nucleicas, proteínas y azúcares pueden medirse basándose en la relación entre las unidades de resonancia y la concentración de la masa.

30 La producción o presencia de ácidos nucleicos diana y secuencias ácido nucleicas puede detectarse también, y monitorizarse mediante dispositivos de flujo lateral. Los dispositivos de flujo lateral son bien conocidos. Incluyen generalmente una vía de flujo de fluido permeable en fase sólida a través de la cual fluye el fluido mediante la fuerza capilar. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a ensayos con tiras reactivas y placas cromatográficas de capaz delgadas con varios groesos apropiados. Inmovilizados en las vías de flujo, se encuentran diversos reactivos de unión para la muestra, parejas o conjugadas de unión que implican parejas de unión para la muestra y los sistemas productores de señal. La detección de las muestras puede alcanzarse de varias formas, detección enzimática, detección de nanopartículas, detección colorimétrica y detección fluorescente, por ejemplo. La detección enzimática puede implicar sondas mareadas enzimáticamente, que se hibridizan a dianas ácido nucleicas complementarias o sustancialmente complementarias en la superficie del dispositivo de flujo lateral. El complejo resultante puede tratarse con marcadores apropiados para desarrollar una señal que pueda leerse. La detección mediante nanopartículas implica la tecnología de las perlas que puede utilizar oro coloidal, látex y nanopartículas paramagnéticas. En un ejemplo, las perlas pueden conjugarse a un anticuerpo antibiotina. Las secuencias diana pueden biotinilarse directamente, o las secuencias diana pueden hibridarse a sondas biotiniladas de secuencia específica. El oro y el látex dan lugar a señales colorimétricas visibles a simple vista, y las partículas paramagnéticas dan lugar a una señal no visual cuando son excitadas en un campo magnético y pueden interpretarse por un lector especializado.

35 Los procedimientos de detección de flujo lateral basados en la fluorescencia también son conocidos, por ejemplo, procedimientos de sondas oligo marcadas dualmente con fluorescencia y biotina UPT-NALF utilizando informadores convertidores de fósforo compuestos de elementos lantánidos incluidos en un cristal (Corstjens et al., *Clinical Chemistry*, 47:10, 1885-1893, 2001), así como la utilización de puntos cuánticos.

40 Los ácidos nucleicos pueden también capturarse en los dispositivos de flujo lateral. Los medios de captura pueden incluir procedimientos independientes y dependientes de anticuerpos. La captura dependiente de anticuerpos comprende generalmente una progenie de captura de anticuerpos y una sonda marcada que es una secuencia

complementaria o sustancialmente complementaria a la diana. La captura independiente del anticuerpo utiliza generalmente interacciones no covalentes entre dos parejas unidas, por ejemplo, la unión irreversible y de alta afinidad entre una sonda biotinilada y una progenia de estreptavidina. Las sondas de captura pueden inmovilizarse directamente en las membranas del flujo lateral. Ambos procedimientos, los anticuerpos dependientes y los anticuerpos independientes pueden utilizarse en la multiplexión.

La producción o la presencia de ácidos nucleicos diana y de secuencias ácido nucleicas pueden detectarse también, y monitorizarse mediante la secuenciación del ADN multiplexico. La secuencia del ADN multiplexico es un medio para identificar de un conjunto de ADN. La técnica permite el procesamiento simultáneo de muchas matrices secuenciadoras. Las matrices del conjunto múltiple pueden resolverse en secuencias individuales cuando finaliza el procesamiento. Brevemente, las moléculas de ADN se juntan, se amplifican y se fragmentan químicamente. Los productos se fraccionan por tamaño en geles para secuenciación, y se transfieren a membranas de nailon. Las membranas se sondan y autorradiografían utilizando procedimientos similares a los utilizados en las técnicas estándar de secuenciación del ADN (Church et al., Science 1998 Apr 8; 240 (4849): 185-188). Las autorradiografías pueden evaluarse, pudiéndose cuantificar la presencia de secuencias ácido nucleicas diana.

Kits

Los kits que se utilizan en estos procedimientos pueden incluir, por ejemplo, una o más polimerasas, matrices anterógradas e inversas, y uno o más enzimas de mellado, tal como se describe en la presente memoria. Si una diana va a amplificarse, en el kit pueden incluirse uno o dos enzimas de mellado. Si van a amplificarse múltiples secuencias diana, y las matrices diseñadas para aquellas secuencias diana, incluyen los sitios de unión de enzima de mellado para idéntico enzima de mellado, entonces, pueden incluirse uno o dos enzimas de mellado. O, si las matrices son reconocidas por distintos enzimas de mellado, pueden incluirse en el kit más enzimas de mellado, como por ejemplo, 3 o más.

Los kits utilizados por estos procedimientos pueden también incluir uno o varios de los componentes en cualquier número de recipientes separados, conjuntos, tubos, viales, placas de microtitulación y similares o los componentes pueden combinarse en varias combinaciones en dichos recipientes.

Los componentes del kit pueden por ejemplo, estar presentes en uno o más recipientes, por ejemplo, todos los componentes pueden estar en un recipiente, o, por ejemplo, los enzimas pueden estar en un recipiente separado de las matrices. Los componentes, pueden, por ejemplo, liofilizarse, o estar en un tampón estable. En un ejemplo, la polimerasa y los enzimas de mellado están en forma liofilizada en un recipiente único, y las matrices están bien liofilizadas, o en tampón, en un recipiente distinto. O, en otro ejemplo, la polimerasa, los enzimas de mellado, y las matrices, están, de forma liofilizada, en un recipiente único. O, la polimerasa y el enzima de mellado, pueden separarse en recipientes distintos.

Los kits pueden incluir, además, por ejemplo, dNTP utilizados en la reacción, o nucleótidos modificados, recipientes u otros recipientes que se utilizan para la reacción, o un vial de agua o tampón para rehidratar los componentes liofilizados. El tampón utilizado puede, por ejemplo, ser apropiado para la actividad, tanto de la polimerasa como para la del enzima de mellado.

Los kits utilizados para estos procedimientos pueden también incluir instrucciones para llevar a cabo uno o más procedimientos que se describen en la presente memoria, y/o una descripción de una o más composiciones o reactivos que se hayan descrito en la presente memoria. Las instrucciones y/o las descripciones pueden estar impresas y pueden incluirse en una inserción en el kit. Un kit puede también incluir una descripción escrita de un sitio en Internet que proporcione dichas instrucciones o descripciones.

Los kits pueden comprender además reactivos que se utilicen para procedimientos de detección, tales como, por ejemplo, reactivos utilizados para FRET, dispositivos de flujo lateral, tiras reactivas, colorantes fluorescentes, partículas de oro coloidal, partículas de látex, una baliza molecular, o perlas de poliestireno.

Una ventaja de estos procedimientos y de estos kits, es que pueden utilizarse en cualquier dispositivo que proporciona una temperatura constante, incluyendo cicladores térmicos, estufas para incubación, baños de agua, y bloques térmicos.

De este modo, en estos procedimientos se proporciona uno para la amplificación de las secuencias nucleótidas que comprende: la combinación de un ácido nucleico diana que presenta una secuencia de nucleótidos diana con (i) una polimerasa, (ii) un primer ácido nucleico matriz que se hibridiza a una primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana, y (iii) un segundo ácido nucleico matriz que se hibridiza al complemento de la primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana, en una reacción de amplificación, bajo condiciones en las que la polimerasa extiende los ácidos nucleicos de la matriz, generando, por tanto, amplicones ácido nucleicos de la matriz extendida; donde la secuencia de nucleótidos diana está entre 20 y 40 nucleótidos de longitud; la secuencia de nucleótidos diana se amplifica $1E+6$ veces o más en alrededor de 10 minutos; y las etapas que siguen se llevan a cabo bajo condiciones sustancialmente isotérmicas.

También se proporciona un procedimiento para la amplificación de la secuencia de nucleótidos, que comprende: la combinación de un ácido nucleico diana que presenta una secuencia de nucleótidos diana con (i) una polimerasa, (ii) un primer ácido nucleico matriz que se hibridiza a la primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana, y (iii) un segundo ácido nucleico matriz que se hibridiza al complemento de la primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana, en una reacción de amplificación, bajo condiciones en las que la polimerasa extiende los ácidos nucleicos de la matriz, generando, por tanto, amplicones ácido nucleicos de la matriz extendida; donde la secuencia de nucleótidos diana tiene entre 20 y 40 nucleótidos de longitud; la primera matriz comprende una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una primera región de reconocimiento de matriz en el extremo 3' que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana; la segunda matriz comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una segunda región de reconocimiento de matriz en el extremo 3' que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' del complemento de la primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana; la secuencia de nucleótidos diana comprende de 1 a 5 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de la primera región de reconocimiento de matriz y la segunda región de reconocimiento de matriz; la secuencia de nucleótidos diana se amplifica $1E+6$ veces o más en alrededor de 10 minutos; y las etapas a continuación se llevan a cabo bajo condiciones sustancialmente isotérmicas.

También se proporciona un procedimiento para la amplificación de una secuencia de nucleótidos, que comprende: la combinación de un ácido nucleico diana que posee una secuencia de nucleótidos diana con (i) una polimerasa, (ii) un primer ácido nucleico matriz que se hibridiza a una primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana, y (iii) un segundo ácido nucleico matriz que se hibridiza al complemento de la primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana, en una reacción de amplificación, bajo condiciones en las que la polimerasa extiende los ácidos nucleicos matriz, generando de este modo amplicones ácido nucleicos de la matriz extendida; donde la secuencia de nucleótidos diana tiene una longitud de entre 20 y 40 unidades; la primera matriz comprende una secuencia ácido nucleica que incluye una primera región de reconocimiento de la matriz en el extremo 3' y que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana; la segunda matriz comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una segunda región de reconocimiento de la matriz en el extremo 3' que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' del complemento de la primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana; la secuencia de nucleótidos diana comprende de 1 a 5 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de la primera región de reconocimiento de la matriz y de la segunda región de reconocimiento de la matriz; amplificándose la secuencia de nucleótidos diana $1E-6$ veces o más en alrededor de 10 minutos; llevándose a cabo las etapas siguientes bajo condiciones sustancialmente isotérmicas.

También se proporciona un procedimiento para amplificar la secuencia de nucleótidos, que comprende, la combinación de un ácido nucleico diana que posee una secuencia de nucleótidos diana con (i) una polimerasa, (ii) un primer ácido nucleico matriz que se hibridiza a la primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana, y (iii) un segundo ácido nucleico matriz que se hibridiza al complemento de la primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana, en una reacción de amplificación, bajo condiciones en las que la polimerasa extiende los ácidos nucleicos matrices, generando de este modo amplicones ácido nucleicos matrices que se han extendido; donde la primera matriz comprende una secuencia ácido nucleica que comprende una primera región de reconocimiento de la matriz en el extremo 3' que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana, donde la región de reconocimiento tiene una longitud de 8-15 nucleótidos; la segunda matriz comprende una secuencia de nucleótidos que incluye una segunda región de reconocimiento matricial en el extremo 3', que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' del complemento de la primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana, donde la región de reconocimiento tiene 8-15 nucleótidos de largo; amplificándose la secuencia de nucleótidos diana $1E+6$ veces o más, en diez minutos aproximadamente; llevándose a cabo las etapas siguientes bajo condiciones sustancialmente isotérmicas.

En ciertos aspectos de estos procedimientos, la primera matriz comprende una secuencia ácido nucleica que incluye una región de reconocimiento matricial en el extremo 3' que es complementaria y/o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana; comprendiendo la segunda matriz una secuencia de nucleótidos que incluye una segunda región de reconocimiento matricial en el extremo 3' y que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' del complemento de la primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana. En ciertos aspectos, la secuencia de nucleótidos diana comprende de 1 a 5 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de la primera región de reconocimiento matricial y de la segunda región de reconocimiento matricial. En otros aspectos, las primera y segunda matrices, comprenden sitios de unión de enzima de mellado y sitios de mellado aguas arriba de la región de reconocimiento, comprendiendo además la reacción de amplificación uno o más enzimas de mellado que pueden producir mellas en el sitio de mellado de dichas matrices inversa y anterógrada, donde cualquier enzima de mellado puede producir mellas en ambas matrices; o cada matriz puede ser mellado por lo menos, por uno de los enzimas de mellado, donde dicho enzima o más enzimas de mellar no producen mellas en el interior de dicha secuencia diana.

En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos diana comprende 1 nucleótido más que la suma de los nucleótidos de la primera región de reconocimiento matricial y de la segunda región de reconocimiento matricial.

En otras formas de realización, la secuencia de nucleótidos diana comprende 2 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de la primera región de reconocimiento y de la segunda región de reconocimiento matricial. En otras formas de realización, todavía, la secuencia de nucleótidos diana comprende 3 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de la primera región de reconocimiento matricial y de la segunda región de reconocimiento matricial.

En ciertos aspectos de estos procedimientos el ácido nucleico diana es bi- o monocatenario. En ciertos aspectos, el ácido nucleico diana es ADN bicatenario. En otros aspectos el ácido nucleico diana es ADN monocatenario. En otros aspectos todavía, el ácido nucleico diana es ARN. El ácido nucleico diana puede ser seleccionado, por ejemplo, a partir del grupo formado por ADN genómico ADN plasmídico, ADN vírico, ADN mitocondrial, y ADN sintético bicatenario. El ácido nucleico diana puede ser seleccionado, por ejemplo a partir del grupo formado por ADN vírico, cDNA y ADN sintético monocatenario. El ácido nucleico diana puede seleccionarse, por ejemplo, a partir del grupo formado por ARN mensajero, ARN vírico, ARN ribosómico, ARN transferencia, micro ARN, precursor del micro ARN y ARN sintético.

En estos procedimientos, la ADN polimerasa puede ser, por ejemplo, una polimerasa termófila. La polimerasa puede seleccionarse, por ejemplo, a partir del grupo formado por Bst (fragmento grande), 9°N, Vent_R[®] (exo-) DNA olimerasa, Therminator, and Therminator II. En ciertos aspectos, la polimerasa es Bst (fragmento grande).

En ciertas formas de realización, las primera y segunda matrices comprenden sitios de unión de enzimas de mellado reconocidos por el mismo enzima de mellado, siendo los mismos enzimas dicho primero y dicho segundo enzima de mellado. Los enzimas de mellado pueden ser, seleccionados, por ejemplo, a partir del grupo formado por Nt.BspQI, Nb.BbvCI, Nb.BsmI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, Nt.AlwI, Nt.BbvCI, Nt.BstNBI, Nt.CviPII, Nb.Bpu10I, y Nt.Bpu10I.

En algunos aspectos de este procedimiento, la parte de la secuencia ácido nucleica de la primera hebra que es complementaria o sustancialmente complementaria a la primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana tiene una longitud de 8-15 nucleótidos, donde la parte de la segunda hebra que es complementaria o sustancialmente complementaria a la secuencia de nucleótidos diana tiene una longitud de 8-15 nucleótidos. En algunos aspectos, la primera matriz es proporcionada a la misma concentración que la segunda. En otros aspectos la primera o segunda matriz se provee con respecto a la otra matriz, con una relación del orden de 1:100 o 100:1. Las reacciones de estos procedimientos pueden incluir además una segunda polimerasa. En algunos aspectos, una, por lo menos, de la primera o segunda polimerasas incluye actividad transcriptasa inversa.

En ciertas formas de realización, de este procedimiento, la amplificación se lleva a cabo entre 54 y 60°C. En otras formas de realización, la amplificación se realiza entre 56 y 58°C. En ciertas formas de realización la reacción de amplificación se mantiene a una temperatura constante durante 1 a 10 minutos. En otras formas de realización, la reacción de amplificación se mantiene a temperatura constante durante 1 a 20 minutos.

Este procedimiento puede incluir además la detección del producto amplificado. Así, en ciertos aspectos, el producto de amplificación se detecta mediante un procedimiento seleccionado a partir del grupo formado por electroforesis en gel, espectrometría de masas, SYBR I fluorescencia SYBR II fluorescencia, SYBR oro, Pico Green, TOTO-3, detección de colorante intercalado, transferencia energética de resonancia de fluorescencia (FRET), detección de baliza molecular, captura superficial, electroforesis capilar, incorporación de nucleótidos marcados para permitir la detección mediante captura, polarización de fluorescencia, y captura lateral de flujo.

En algunos aspectos, pueden amplificarse por lo menos dos secuencias diana. En ciertos aspectos, los productos de amplificación se detectan sobre una superficie sólida. En algunos aspectos, una sonda de captura, por lo menos, se inmoviliza sobre una superficie sólida. En algunas formas de realización, una de dichas matrices, por lo menos incluye un espaciador, grupo de bloqueo, o un nucleótido modificado.

En ciertas formas de realización de estos procedimientos, la secuencia de nucleótidos diana se amplía 1E+6 veces o más, en 5 minutos aproximadamente. En otras formas de realización, la secuencia de nucleótidos diana se amplifica 1E+6 veces o más en alrededor de 2,5 minutos. En otras formas de realización, la secuencia de nucleótidos diana se amplifica 1E+7 veces o más en alrededor de 5 minutos. En otras formas de realización, la secuencia de nucleótidos diana se amplifica 1E+8 veces o más, en alrededor de 5 minutos. En otras formas de realización, todavía, la secuencia de nucleótidos diana se amplifica 1E+9 veces o más, en alrededor de cinco minutos.

Estos procedimientos incluyen también uno para amplificar una secuencia diana ácido nucleica bicatenaria, que comprende la puesta en contacto de una molécula diana de ADN, que incluye una secuencia diana bicatenaria, que posee una hebra codificante y una hebra no codificante, con una matriz anterógrada y una matriz inversa, en la que dicha matriz anterógrada comprende una secuencia que incluye una región de reconocimiento en el extremo 3' y que es complementaria al extremo 3' de la hebra no codificante de la secuencia diana; un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento, y una región de estabilización aguas arriba de dicho sitio de mellado, donde la parte de la secuencia ácido nucleica que es

complementaria al extremo 3' de la hebra diana no codificante, tiene 8-15 nucleótidos de longitud, comprendiendo dicha matriz inversa una secuencia de nucleótidos que incluye la región de reconocimiento en el extremo 3' que es complementaria al extremo 3' de la hebra codificante de la secuencia diana, un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento, y una región de estabilización aguas arriba de dicho sitio de mellado, donde la parte de la secuencia ácido nucleica que es complementaria al extremo 3' de la hebra no codificante diana, tiene una longitud de 8-15 nucleótidos; proporcionando un primer enzima de mellado que puede producir mellas aguas arriba, aguas abajo, o en el sitio de mellado de dicha matriz anterógrada, no produciendo mellas en el interior de dicha secuencia diana; proporcionando un segundo enzima de mellado que puede producir mellas aguas arriba, aguas abajo, o en el sitio de mellado de dicha matriz inversa y que no produce mellas en el interior de dicha secuencia diana; y proporcionando un ADN polimerasa;

bajo condiciones esencialmente isotérmicas, donde la amplificación se realiza mediante ciclos múltiples de dicha polimerasa, que extiende dichas matrices anterógradas e inversas a lo largo de dicha secuencia diana, produciendo un sitio de mellado bicatenario; y dichos enzimas de mellado, produciendo mellas en dichos sitios de mellado, o copias amplificadas de dichos sitios, produciendo un producto de amplificación.

También se proporciona un procedimiento para amplificar una secuencia diana ácido nucleica monocatenaria, que comprende poner en contacto un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana monocatenaria con una matriz inversa, donde dicha matriz inversa comprende una secuencia ácido nucleica que incluye una región de reconocimiento en el extremo 3' que es complementaria al extremo 3' de la secuencia diana, un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento, y una región de estabilización aguas arriba de dicho sitio de mellado, donde la parte de dicha secuencia ácido nucleica que es complementaria al extremo 3' de la secuencia diana, tiene 8-15 nucleótidos de largo; proporcionando un primer enzima de mellado que puede provocar mellas en el sitio de mellado de dicha matriz inversa, y que no produce mellas en el interior de dicha secuencia diana; proporcionando una ADN polimerasa bajo condiciones en las que dicha polimerasa extiende dicha matriz inversa a lo largo de dicha secuencia diana; poniendo en contacto dicha matriz inversa extendida con una matriz anterógrada, donde dicha matriz anterógrada comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' que es complementaria al extremo 3' de la matriz inversa extendida, un sitio de unión de enzima de mellado, y un sitio de mellado, aguas arriba de dicha región de reconocimiento, y una región de estabilización aguas arriba de dicho sitio de mellado, donde la parte de la secuencia ácido nucleica que es complementaria al extremo 3' de la hebra diana no codificante tiene una longitud de 8-15 nucleótidos; proporcionando un segundo enzima de mellado que puede producir mellas en el sitio de mellado de dicha matriz anterógrada y no produce mellas en el interior de dicha secuencia diana o en el interior del complemento de dicha secuencia diana; donde la amplificación se lleva a cabo bajo condiciones esencialmente isotérmicas, donde la amplificación se lleva a cabo mediante ciclos múltiples de dicha polimerasa, que extiende dichas matrices anterógradas e inversas, a lo largo de dicha secuencia diana, produciendo sitios de mellado bicatenarios, y dichos enzimas de mellado, produciendo mellas en dichos sitios de mellado, dando lugar a un producto de amplificación. En algunos aspectos de este procedimiento, la ADN polimerasa es una polimerasa termófila. Por ejemplo la polimerasa puede seleccionarse a partir del grupo formado por Bst (fragmentos grandes), 9°N, Vent[®] (exo-) ADN polimerasa, Therminator y Therminator II. En ciertos aspectos, la polimerasa es Bst (fragmento grande).

En ciertos aspectos, los enzimas de mellado producen mellas aguas abajo del sitio de unión de los enzimas de mellado. En otros aspectos, las matrices anterógradas e inversas incluyen sitios enzimáticos de unión para mellado, reconocidos por los mismos enzimas de mellado, siendo los mismos dichos primeros y segundos enzimas de mellado. En ciertos aspectos, los enzimas de mellado se seleccionan a partir del grupo formado por Nt.BspQI, Nb.BbvCI, Nb.BsmI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, Nt.AlwI, Nt.BbvCI, Nt.BstNBI, Nt.CviPII, Nb.Bpu10I, y Nt.Bpu10I.

En algunas formas de realización de estos procedimientos, la secuencia diana comprende de 1 a 5 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de dicha región de reconocimiento de la matriz anterógrada y de dicha región de reconocimiento de la matriz inversa. En ciertas formas de realización, la secuencia diana comprende 1 nucleótido más que la suma de los nucleótidos de dicha región de reconocimiento de la matriz anterógrada y de dicha región de reconocimiento de la matriz inversa. En otras formas de realización, la secuencia diana comprende 2 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de dicha región de reconocimiento de la matriz anterógrada y de dicha región de reconocimiento de dicha matriz inversa.

En ciertos aspectos, la molécula del ADN diana se selecciona a partir del grupo formado por ADN genómico, plasmídico, mitocondrial y vírico. En otros aspectos, el ácido nucleico diana es seleccionado a partir del grupo formado por ADN vírico, ARN mensajero, micro ARN, y precursores micro ARN. En otros aspectos, la matriz anterógrada se proporciona a la misma concentración que la matriz inversa. En otros aspectos, todavía, una de las matrices anterógrada o inversa, se proporciona a la otra matriz, en una proporción del orden de 1:100 o 100:1.

En ciertas formas de realización, este procedimiento comprende además una segunda polimerasa. Por ejemplo, una de las polimerasas, por lo menos, puede incluir una actividad transcriptasa inversa. En ciertos aspectos, la amplificación se lleva a cabo entre 54 y 60°C. En otros aspectos, la reacción de amplificación se mantiene a una temperatura constante durante 1 a 10 minutos.

Este procedimiento puede comprender además la detección del producto de amplificación. Por ejemplo, el producto de amplificación puede detectarse mediante un procedimiento seleccionado a partir del grupo formado por electroforesis en gel, espectrometría de masas, fluorescencia SYBR I, fluorescencia SYBR II SYBR oro, Pico Green, TOTO-3, detección de colorante intercalado, FRET, detección de baliza molecular, captura superficial, electroforesis capilar, incorporación de nucleótidos marcados para permitir la detección mediante captura, polarización de fluorescencia, y captura lateral de flujo.

En ciertos aspectos, dos secuencias diana son capaces, por lo menos, de amplificarse. En otros aspectos, los productos de amplificación se detectan sobre una superficie sólida. En algunos aspectos, una sonda de captura, se inmoviliza, por lo menos, sobre una superficie sólida. En otros aspectos, por lo menos, una de dichas matrices incluye un espaciador, un grupo de bloqueo, o un nucleótido modificado.

Estos procedimientos incluyen también uno para amplificar una secuencia diana ácido nucleica bicatenaria, que comprende la puesta en contacto de una molécula de ADN diana, que incluye una secuencia diana bicatenaria, que posee una hebra codificante y una hebra no codificante, con una matriz anterógrada y una matriz inversa, donde dicha matriz anterógrada comprende una secuencia ácido nucleica que incluye una región de reconocimiento del extremo 3' y que es complementaria al extremo 3' de la hebra no codificante de la secuencia diana; un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento y una región estabilizante aguas arriba de dicho sitio de mellado; comprendiendo dicha matriz inversa una secuencia de nucleótidos que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' que es complementaria al extremo 3' de la hebra codificante de la secuencia diana, un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento, y una región estabilizante aguas arriba de dicho sitio de mellado; comprendiendo dicha secuencia diana de 1 a 5 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de dicha región de reconocimiento de la matriz anterógrada y de dicha región de reconocimiento de la matriz inversa; proporcionando un primer enzima de mellado que puede producir mellas en el sitio de mellado de dicha matriz anterógrada, y que no produce mellas en el interior de dicha secuencia diana; proporcionando un segundo enzima de mellado que puede producir mellas en el sitio de mellado de dicha matriz inversa y que no produce mellas en el interior de dicha secuencia diana; y proporcionando una ADN polimerasa; bajo condiciones esencialmente isotérmicas, donde la amplificación se lleva a cabo mediante ciclos múltiples de dicha polimerasa, que extiende dichas matrices anterógrada e inversa a lo largo de dicha secuencia diana, produciendo un sitio bicatenario para mellado, produciendo mellas dichos enzimas de mellado en dichos sitios de mellado, o copias amplificadas de dichos sitios, produciendo un producto de amplificación.

También se proporciona un procedimiento para amplificar una secuencia diana ácido nucleica monocatenaria, que comprende la puesta en contacto de un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana monocatenaria con una matriz inversa, donde dicha matriz inversa comprende una secuencia ácido nucleica que incluye una región de reconocimiento en el extremo 3' y que es complementaria al extremo 3' de la secuencia diana, un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento y una región de estabilización aguas arriba de dicho sitio de mellado, donde la parte de la secuencia ácido nucleica que es complementaria al extremo 3' de la secuencia diana tiene 8-15 nucleótidos de longitud; proporcionando un primer enzima de mellado que puede provocar mellas en el sitio de mellado de dicha matriz inversa, y que no provoca mellas en el interior de dicha secuencia diana, que proporciona una ADN polimerasa bajo condiciones en las que dicha polimerasa extiende dicha matriz inversa a lo largo de dicha secuencia diana; poniendo en contacto dicha matriz inversa extendida con una matriz anterógrada, donde dicha matriz anterógrada comprende una región de reconocimiento en el extremo 3', que es complementaria al extremo 3' de la matriz inversa extendida, un sitio de unión del enzima de mellado, y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento, y una región estabilizante aguas arriba de dicho sitio de mellado, donde dicha secuencia diana comprende de 1 a 5 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de dicha región de reconocimiento de la matriz anterógrada y de dicha región de reconocimiento de la matriz inversa; proporcionando un segundo enzima de mellado que puede provocar mellas en el sitio de mellado de dicha matriz anterógrada que no produce mellas en el interior de dicha secuencia diana, o dentro del complemento de dicha secuencia diana; donde la amplificación se lleva a cabo bajo condiciones esencialmente isotérmicas donde la amplificación se realiza mediante ciclos múltiples de dicha polimerasa que extiende dichas matrices anterógradas e inversas a lo largo de dicha secuencia diana, produciendo sitios de mellado bicatenarios, produciendo dichos enzimas de mellado, mellas en dichos sitios de mellado, dando lugar a un producto de amplificación.

En ciertas formas de realización, la secuencia diana comprende 1 nucleótido más que la suma de los nucleótidos de dicha región de reconocimiento de la matriz anterógrada y de dicha matriz inversa. En otras formas de realización, la secuencia diana comprende 2 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de dicha región de reconocimiento de la matriz anterógrada y de dicha región de reconocimiento de la matriz inversa. En otras formas de realización, la secuencia diana comprende 3 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de dicha región de reconocimiento de la matriz anterógrada y de dicha región de reconocimiento de la matriz inversa.

También se proporciona un procedimiento para amplificar una secuencia diana ácido nucleica bicatenaria, que comprende la puesta en contacto de una molécula del ADN diana que incluye una secuencia diana bicatenaria que posee una hebra codificante y una hebra no codificante, con una matriz anterógrada y una matriz inversa, donde

dicha matriz anterógrada comprende una secuencia ácido nucleica que comprende una región de reconocimiento del extremo 3' que es complementaria al extremo 3' de la hebra descodificante de la secuencia diana; un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento y una región estabilizante aguas arriba de dicho sitio de mellado; dicha matriz inversa comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' y que es complementaria al extremo 3' de la hebra codificante de la secuencia diana, un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento, un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento, y una región de estabilización aguas arriba de dicho sitio de mellado; proporcionando un primer enzima de mellado en el sitio de mellado de dicha matriz anterógrada y no se producen mellas en el interior de dicha secuencia diana; proporcionando un segundo enzima para producir mellas en el sitio de mellado de dicha matriz inversa y no produce mellas en el interior de dicha secuencia diana; y proporcionando una ADN polimerasa; bajo condiciones esencialmente isotérmicas, donde la amplificación se lleva a cabo mediante ciclos múltiples de dicha polimerasa, que extiende dichas matrices anterógrada e inversa a lo largo de dicha secuencia diana, produciendo un sitio de mellado bicatenario, y provocando mellas dichos enzimas de mellado en dichos sitios de mellado, o copias amplificadas de dichos sitios, dando lugar a un producto de amplificación.

También se proporciona un procedimiento para amplificar una secuencia diana ácido nucleica bicatenaria, que comprende la puesta en contacto una molécula diana de ADN que comprende una secuencia diana bicatenaria, que posee una hebra codificante y una hebra no codificante, con una matriz anterógrada y una matriz inversa, donde dicha matriz anterógrada comprende una secuencia ácido nucleica que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' que es complementaria al extremo 3' de la hebra no codificante de la secuencia diana; un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de unión aguas arriba de dicha región de reconocimiento, y una región de estabilización aguas arriba de dicho sitio de mellado; comprendiendo dicha matriz inversa una secuencia de nucleótidos que incluye una región de reconocimiento en el extremo 3' que es complementaria al extremo 3' de la hebra codificante de la secuencia diana, un sitio de unión al enzima de mellado, y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento, y una región estabilizante aguas arriba de dicho sitio de mellado; proporcionando un primer enzima de mellado que puede producir mellas aguas arriba, aguas abajo o en el sitio de mellado de dicha matriz y anterógrado, no produciendo mellas en el interior de dicha secuencia diana; proporcionando un segundo enzima de mellado que puede producir mellas por encima, por debajo o en el sitio de mellado de dicha matriz inversa, y que no produce mellas en el interior de dicha secuencia diana; y proporcionando una ADN polimerasa bajo condiciones normales isotérmicas, donde la amplificación en la que ésta se lleva a cabo mediante ciclos múltiples de dicha polimerasa que extiende dichas matrices anterógrada e inversa a lo largo de dicha secuencia diana, lo que produce un sitio de mellado bicatenario produciendo dichos enzimas de mellado mellas en dichos sitios de mellado, o copias amplificadas de dichos sitios, produciendo un producto de amplificación.

También se proporciona un procedimiento para amplificar una secuencia diana ácido nucleica bicatenaria, que comprende la puesta en contacto de una molécula diana de ADN que incluye una secuencia diana bicatenaria, que posee una hebra codificante y una no codificante, con una matriz anterógrada y una inversa, donde dicha matriz anterógrada comprende una secuencia ácido nucleica que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' que es complementaria al extremo 3' de la hebra no codificante de la secuencia diana; un sitio de unión enzimática para mellado y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento y una región estabilizante aguas arriba de dicho sitio de mellado; comprendiendo dicha matriz inversa una secuencia de nucleótidos que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' que es complementaria al extremo 3' de la hebra codificante de la secuencia diana, un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento, y una región estabilizante aguas arriba de dicho sitio de mellado, proporcionando un primer enzima de mellado que puede provocar mellas en el sitio de mellado de dicha matriz anterógrada; y que no produce mellas en el interior de dicha secuencia diana; proporcionando un segundo enzima de mellado que puede provocar mellas en el sitio de mellado de dicha matriz inversa y que no produce mellas en el interior de dicha secuencia diana, u proporcionando una ADN polimerasa; bajo condiciones esencialmente isotérmicas, donde la amplificación se lleva a cabo mediante ciclos múltiples de dicha polimerasa que extiende dichas matrices anterógradas e inversas a lo largo de dicha secuencia diana, dando lugar a un sitio de mellado bicatenario y dichos enzimas de mellado produciendo mellas en dichos sitios de mellado, o copias amplificadas de dichos sitios, dando lugar a un producto de amplificación, en el que por lo menos, se obtiene una amplificación de $1E+7$ veces de una secuencia diana de 22-35 nucleótidos de longitud, cuando la reacción de amplificación se procesa durante 12 minutos.

Este procedimiento proporciona asimismo la forma de amplificar una secuencia diana ácido nucleica bicatenaria, que comprende la puesta en contacto de una molécula diana de ADN que comprende una secuencia diana bicatenaria, que posee una hebra codificante y una no codificante, con una matriz anterógrada y una inversa, donde dicha matriz anterógrada comprende una secuencia ácido nucleica que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' y que es complementaria al extremo 3' de la hebra no codificante de la secuencia diana; un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento, y una región estabilizante por encima de dicho sitio de mellado, donde la parte de la secuencia ácido nucleica que es complementaria al extremo 3' de la hebra no codificante diana tiene una longitud de 8-15 nucleótidos, comprendiendo dicha matriz inversa una secuencia de nucleótidos que incluye la región de reconocimiento en el

extremo 3' que es complementaria al extremo 3' de la hebra codificante de la secuencia diana, un sitio de unión de enzima de mellado, y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento, y una región de estabilización aguas arriba de dicho sitio de mellado, donde la parte de la secuencia ácido nucleica que es complementaria al extremo 3' de la hebra no codificante diana tiene 8-15 nucleótidos de largo; proporcionando un primer enzima de mellado que puede producir mellas aguas arriba, aguas abajo o en el sitio de mellado de dicha matriz anterógrada, y que no produce mellas en el interior de dicha secuencia diana; proporcionando un segundo enzima de mellado, que puede provocar mellas aguas arriba, aguas abajo o en el sitio de mellado de dicha matriz inversa, y no provoca mellas en el interior de dicha secuencia diana; y proporcionando una ADN polimerasa; bajo condiciones esencialmente isotérmicas, donde la amplificación se lleva a cabo mediante ciclos múltiples de dicha polimerasa, que extiende dichas matrices anterógradas e inversas a lo largo de dicha secuencia diana, produciendo un sitio de mellado bicatenario, y dichos enzimas de mellado dando lugar a mellas en dichos sitios de mellado, o copias amplificadas de dichos sitios, dando lugar a un producto de amplificación, en el que por lo menos, se obtiene una amplificación de $1E+7$ veces de una secuencia diana de 22-35 nucleótidos de largo, cuando la reacción de amplificación se procesa durante 12 minutos.

También se divulgan unos kits para amplificar una secuencia diana ácido nucleica, que comprende una ADN polimerasa; una primera matriz para la amplificación de ácido nucleico, que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' que es complementaria al extremo 3' de una hebra codificante de la secuencia diana; un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento; y una región de estabilización aguas arriba de dicho sitio de mellado, donde la parte de la secuencia ácido nucleica que es complementaria al extremo 3' de la hebra codificante de la secuencia diana, tiene una longitud de 8-15 nucleótidos; una segunda matriz para la amplificación de ácido nucleico, que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' que es complementaria al extremo 3' del complemento de la hebra codificante de la secuencia diana; un sitio de unión enzimática para mellado, y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento; y una región estabilizante aguas arriba de dicho sitio de mellado, donde la parte de la secuencia ácido nucleica que es complementaria al extremo 3' del complemento de la hebra codificante de la secuencia diana, tiene una longitud de 8-15 nucleótidos; y uno o dos enzimas termoestables para mellado, donde un enzima puede producir mellas en el sitio de mellado de dichas primeras y segundas matrices, o un primer enzima puede provocar mellas en el sitio de mellado de dicho primer cebador y un segundo enzima puede provocar mellas en el sitio enzimático de dicho segundo cebador.

En ciertas formas de realización la polimerasa, los enzimas de mellado y las matrices, se encuentran en un recipiente. En ciertas formas de realización, la polimerasa, enzimas de mellado y matrices, se encuentran en dos recipientes. En otras formas de realización, la polimerasa y los enzimas de mellado están en un primer recipiente y dichas matrices están en un segundo recipiente. En algunos aspectos, la polimerasa, los enzimas de mellado y las matrices están liofilizados. En algunos aspectos, los kits incluyen además una cubeta. O, por ejemplo, los kits pueden incluir además un dispositivo lateral de flujo o de tiras reactivas. En algunos aspectos, el dispositivo lateral de flujo o tira reactiva comprende además una sonda de captura. En algunos aspectos, el kit comprende además un componente detector seleccionado a partir del grupo formado por un colorante fluorescente, partículas de oro coloidal, partículas de látex, una baliza molecular, y perlas de poliestireno. En algunos aspectos del kit, al menos una de dichas matrices incluye un espaciador, grupo de bloqueo, o un nucleótido modificado.

También se divulga un kit para amplificar una secuencia diana ácido nucleica, que comprende una ADN polimerasa; una primera matriz para la amplificación de ácido nucleico, que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' que es complementaria al extremo 3' de una hebra codificante de la secuencia diana; un sitio de unión de enzima de mellado, y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento; y una región estabilizante aguas arriba de dicho sitio de mellado; una segunda matriz para amplificación de ácido nucleico, que comprende una región de reconocimiento en el extremo 3' y que es complementaria al extremo 3' del complemento de la hebra codificante de la secuencia diana; un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado aguas arriba de dicha región de reconocimiento; y una región de estabilización aguas arriba de dicho sitio de mellado, donde dicha secuencia diana comprende de 1 a 5 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de dicha primera región de reconocimiento de la matriz y de dicha segunda región de reconocimiento de la matriz; y uno o dos enzimas termoestables para mellado, donde un enzima puede producir mellas en el sitio de mellado de dichas primera y segunda matrices, o un primer enzima puede producir mellas en el sitio de mellado de dicho primer cebador y un segundo enzima que puede producir mellas en el sitio enzimático de dicho segundo cebador. En determinados aspectos del kit, la parte de la secuencia ácido nucleica de la primera matriz que es complementaria al extremo 3' de la hebra codificante de la secuencia diana tiene 8-15 nucleótidos de longitud, y la parte de la secuencia ácido nucleica de la segunda matriz que es complementaria al extremo 3' del complemento de la hebra codificante de la secuencia diana tiene una longitud de 8-15 nucleótidos.

En ciertos casos, la polimerasa, enzimas de mellado, y matrices, están en dos recipientes. En otros casos, la polimerasa y enzimas de mellado se encuentran en un primer recipiente, y dichas matrices, en un segundo recipiente. En algunos casos, la polimerasa, los enzimas de mellado, y las matrices, están liofilizadas. En algunos casos, los kits comprenden además instrucciones para seguir el procedimiento de amplificación. Los kits pueden comprender además una cubeta. O, por ejemplo, los kits pueden comprender además un dispositivo lateral de flujo o tiras reactivas. En algunos casos, el dispositivo lateral de flujo o las tiras reactivas comprenden además una

sonda de captura. En algunos aspectos, el kit comprende además un componente detector seleccionado a partir del grupo formado por un colorante fluorescente, partículas de oro coloidal, partículas de látex, una baliza molecular y perlas poliestirénicas. En algunos casos del kit, una de dichas matrices comprende, por lo menos, un espaciador, un grupo de bloqueo, o un nucleótido modificado.

5

Ejemplos

Ejemplo 1: Ensayo de amplificación de la muestra NEAR™

10 Este ejemplo se refiere a un típico ensayo “húmedo” del ADN de este procedimiento. Los expertos en la materia entienden que pueden llevarse a cabo numerosas modificaciones en los volúmenes y formatos de la reacción, del tiempo durante el que se realiza el ensayo y de las cantidades de cada reactivo.

15 Se utilizan, para determinar ensayos “húmedos” dos placas de microtitulación de 96 pocillos, una placa “Matriz/Diana” y una placa de Mezcla “madre”. Para empezar, 5 microlitros de matrices se reparten en pocillos apropiados sobre la placa “Matriz/Diana”. Para los pocillos “diana” (pocillos de control sin diana), se añaden 5 microlitros de dH₂O. Combinando un tampón, sal dNTP, enzimas y dH₂O de forma conjunta en un tubo único, se creó una “mezcla madre”, utilizando volúmenes apropiados de cada uno, basándose en el número de muestras que se ensayaban (véase Tabla en este Ejemplo). Se repartieron 40 microlitros de la “mezcla madre” reactiva en dos pocillos de la placa “Mezcla madre” (“-diana” y “+ diana”, pocillos de control con la diana), precintándose la placa con un precinto térmico. Todas las etapas previas se completaron en un lugar “preamplificador”, finalizándose en un espacio posamplificador la totalidad de las etapas subsiguientes. El precintado térmico se eliminó de la placa “Matriz/Diana”, a partir sólo de los pocillos a los que se añadirían las dianas, dejando los “-pocillos” precintados para evitar la contaminación potencial. Se repartieron 5 microlitros de dianas en pocillos “+ diana” apropiados. La placa “Matriz/Diana” se volvió a precintarse con precinto térmico. Tanto la placa “Matriz/Diana” como la “Mezcla madre” se incubaron durante 2-3 minutos a temperatura de ensayo (por ejemplo, a 56, 57 ó 58°C), utilizando cicladores térmicos. El precinto térmico se eliminó de ambas placas 40 microlitros de la “mezcla madre” reactiva de los pocillos de la placa “Mezcla madre” se transfirieron a los pocillos apropiados en la placa “Matriz/Diana”, volviéndose a precintarse con precinto térmico esta placa “Matriz/Diana”. Las muestras se incubaron durante 5-10 minutos a la temperatura del ensayo. Se calculó el tiempo para la reacción a partir del momento en el que empezó la incubación, inmediatamente después de que la mezcla madre reactiva se transfiriera a los pocillos en la placa “Matriz/Diana” la placa se precintó, y se dispuso en el termociclador. Las reacciones se detuvieron añadiendo SDS al 0,1% o superior, o incubando las muestras durante 2 minutos a 80°C.

35 Para detectar los productos amplificados, por ejemplo, se añadieron a cada pocillo 3-5 microlitros de una baliza molecular 5 micromolar, mezclándose mediante pipeteo arriba y abajo varias veces. Se llevó a cabo una lectura de fluorescencia a la longitud de onda apropiada basada en el fluoróforo presente en la baliza molecular, a temperatura del ensayo, después de 1 minuto de incubación.

40 Degradación típica del reactivo para reacciones única de 50 microlitros de ADN (todos los volúmenes en microlitros).

| Reactivo | - diana | + diana | Concentración final |
|--------------------------|---------|---------|---------------------|
| 5XIB2 tampón | 10,0 | 10,0 | 1X |
| 100 mM MgSO ₄ | 2,5 | 2,5 | 10+ 5mM |
| 10 mM dNTP | 1,5 | 1,5 | 0,3 mM |
| 8 U/microlitro Bst Pol | 2,4 | 2,4 | 19,2 unidades |
| 10 U/microlitro N.BstNB1 | 1,50 | 1,50 | 15 unidades |
| Matriz 1 | 2,5 | 2,5 | 10-1000 nM |
| Matriz 2 | 2,5 | 2,5 | 10-1000 nM |
| Diana | 0 | 5,0 | |
| H ₂ O | 27,1 | 22,1 | |
| Total | 50,0 | 50,0 | |

El tampón 5X IB2 consiste en:

- 45 250 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 75 mM (NH₄)₂SO₄
 75 mM Na₂SO₄
 50 mM MgSO₄
 5 mM DTT
 50 0,5% Triton X-100

Una reacción típica no tiene una concentración estándar de la diana, pero la copia diana por reacción puede ser del orden de desde 10-50 en el extremo más bajo, por ejemplo, a $1E+6$ copias en el extremo más alto, por ejemplo, o más. En términos de concentraciones molares, un ensayo de 50 microlitros con 10 copias de diana es $3,32e-13$ micromolar, en el que un ensayo de 50 mililitros con 50 copias de diana es $1,66e-12$ micromolar y un ensayo de 50 microlitros con $1e6$ copias de diana es $3,32e-8$ micromolar.

La muestra diana puede estar formada, por ejemplo, por ADN o ARN purificado, que se ha vuelto a suspender en dH_2O o TE, o muestra que no se ha purificado. Por ejemplo, se recogieron muestras clínicas endocervicales mediante una torunda eluyéndose y lisándose la muestra a partir de las torundas de algodón, utilizando el reactivo Pierce's Lyse-N-Go PCR reagent (Cat # 78882). El Lyse-N-Go es una formulación farmacéutica que se basa en un detergente no iónico. Alícuotas de cada muestra eluida lisada se añadieron directamente, entonces, a los ensayos no indicando los resultados de pérdida de la actividad del ensayo. También se han llevado a cabo ensayos utilizando muestras clínicas que se recogieron en medios de transporte viral (VTM), bien M4 o M5. Las muestras que se recogieron en VTM se mezclaron con reactivo Pierce's Lyse-N-Go PCR para lisar las células diana, añadiéndose subsiguientemente alícuotas de estas muestras a los ensayos, sin pérdida de actividad. Finalmente, el ensayo se llevó a cabo en presencia de varios inhibidores potenciales, tales como arena, aceite, arcilla, orina y suero, tolerándose bien cada uno de estos inhibidores.

Ejemplo 2: Detección de los productos del ensayo DNA NEAR™ mediante electroforesis en gel

Los productos de reacción de la amplificación pueden visualizarse mediante electroforesis en gel. En ausencia de la diana, las matrices (con bases extremo 3' complementarias o sustancialmente complementarias) se solapan mediante una o más bases, la polimerasa se extiende en cada dirección para generar el dúplex NEAR™ de amplificación (Figura 1B); y la amplificación se lleva a cabo mediante un mecanismo similar a la amplificación NEAR™ para amplificar un producto que es dos bases más corto que el producto diana amplificado. En el caso de un ensayo de 25 unidades metaméricas donde las matrices acaban en A y T, el producto anterior resultante es de 23 bases. El ensayo de 27 unidades metaméricas forma también un antecedente de 23 unidades metaméricas y un producto de 27 unidades metaméricas. También se amplifican productos más largos de reacción. La secuencia de estos productos es hipotetizada debido a la extensión de la polimerasa antes de que el enzima de mellado pueda producir mellas en ambos lados del dúplex NEAR™ de amplificación, según las etapas 9B en la figura 1C. La figura 2 muestra que los productos NEAR™ de reacción se distinguen claramente de los productos anteriores mediante la electroforesis en gel.

Ejemplo 3: Detección de los productos del ensayo de ARN mediante electroforesis en gel

La reacción de este procedimiento puede también amplificar dianas del ARN. En este caso, la diana es el ARN Armado del Ébola, que es una hebra de 600 bases aproximadamente del ARN, encapsulada mediante proteínas de recubrimiento del fago MS2, para simular una partícula vírica. La reacción se diseña para amplificar una región de 25 bases del genoma del Ébola contenida en el interior de la secuencia encapsulada del ARN. Los productos reactivos procesados sobre un gel de poliacrilamida al 20% (Figura 3), muestran el producto amplificado de 25 unidades metaméricas junto con los productos anteriores de 23 y 20 unidades metaméricas. Este ejemplo demuestra la capacidad de la reacción para amplificar el ARN liberado a partir de las partículas similares al virus.

Ejemplo 4: Detección de los productos del ensayo de ADN y ARN mediante espectrometría de masas

Los productos de la reacción de amplificación de estos procedimientos, pueden detectarse también mediante espectrometría de masas utilizando un sistema ESI/TOF con un LC frontal final. Los productos reactivos observados son múltiples especies iónicas cargadas. Habitualmente, el estado de carga -3 o -4 , constituye el nivel más alto en el espectro (del orden de 1000-3000 AMU), dependiendo de la longitud del producto oligonucleótido. El aducto sódico se encuentra presente habitualmente en el espectro, como un pico adyacente al pico mayor, a un 20-25% con una intensidad del 20-25%. Los picos únicos para las reacciones positivas en presencia de la diana, son visibles en las dos figuras 4 y 5, para las reacciones de ADN y ARN, respectivamente. Los productos anteriores formados en estas reacciones no se muestran en el intervalo de masa de estos espectros.

Ejemplo 5: Detección en tiempo real de la amplificación del ensayo

La reacción de amplificación de este procedimiento puede también monitorizarse, tal como se muestra en la figura 6, en tiempo real, con fluorescencia SYBR II. La fluorescencia aumenta pues SYBR II se intercala en los productos bicarióticos amplificados. Los productos anteriores también generan fluorescencia a una velocidad más lenta que el producto verdadero. La optimización de la secuencia de amplificación, la temperatura de reacción y las condiciones reaccionantes del tampón, son necesarias para visualizar una separación distinta entre las reacciones positivas y los controles negativos.

Ejemplo 6: Detección FRET de la amplificación en tiempo real del ensayo NEAR™

La amplificación NEAR™ puede monitorizarse mediante la transferencia energética de Resonancia (FRET), tal

como se muestra en la figura 7. La amplificación tiene lugar utilizando matrices duales marcadas, una en cada extremo (5'-FAM, 3'-BHQ). La fluorescencia se genera a partir del oligonucleótido FAM marcado, después de desintegración de la matriz por el enzima de mellado, cuando se convierte en bicatenario. Ya que la fluorescencia se produce mediante la reacción inicial para mellado, este procedimiento de detección responde extremadamente. Ya que los extremos 3' de las matrices están bloqueados a partir de la extensión por la señal de extinción, la producción de la fluorescencia anterior se inhibe.

Ejemplo 7: Detección de la baliza molecular de la amplificación NEAR™ en tiempo real

Un tercer procedimiento para monitorizar la amplificación en tiempo real es utilizar balizas moleculares, tal como se muestra en la figura 8. En este caso, el producto amplificado se hibridiza a la región de bucle de la baliza molecular, dando lugar a un aumento en la fluorescencia a partir de la separación del fluoróforo y del extintor en cada extremo del eje de la horquilla. Debido a que esta interacción tiene lugar después de la amplificación, se considera tiempo pseudoreal y puede ser ligeramente más lento en la respuesta con relación al enfoque del FRET.

Ejemplo 8: Ensayo de la tasa de falsos positivos

El experimento se diseñó para sondear la probabilidad de que la reacción de amplificación de este procedimiento dé lugar a un producto verdadero en la reacción negativa, o a un falso positivo. Las reacciones dirigidas a la amplificación específica de una región de 25 unidades metaméricas específicas para el genoma de *Bacillus subtilis*, se procesaron en presencia (n = 120) y ausencia (n = 320) de un ADN genómico de *Bacillus subtilis*. Las reacciones finales se procesaron en el espectrómetro de masas y se analizó el área bajo la curva (AUC) para el nivel máximo de la masa del producto en el espectro de masas. Tal como se muestra en la figura 9, los resultados muestran que ninguna de las 320 reacciones negativas dieron un falso positivo con valores de AUC iguales al control acuoso. Los valores AUC positivos verdaderos estaban, por lo menos, 3 desviaciones estándar aparte de los negativos verdaderos. Generalmente estos resultados demuestran la naturaleza reproducible de los ensayos de estos procedimientos.

El ensayo del *Bacillus subtilis* se desarrolló para focalizar una región de 25 nucleótidos de la región del gen mobA-nprE, con la secuencia 5'-TTAACGTCTCTAATTTTCAGCTTTTG-3'. Las matrices que se utilizaron para amplificar esta región fueron T1 5'-ATGCATGCATGAGTCACATTTAACGTCTCTA-3', y T2 5'-ATGCATGCATGAGTCACATCAAAAAGCTGAAA-3'. El ensayo se llevó a cabo esencialmente tal como se describe en el Ejemplo, y con la modificación, de aquí, durante 4 minutos a 56°C con 10.000 copias del ADN genómico de *Bacillus subtilis* más 100.000 copias del ADN genómico de *Bacillus thuringiensis* (positivos verdaderos), 10.000 copias del ADN genómico del ADN de *Escherichia coli*, más 100.000 ADN genómico de *Bacillus thuringiensis* (negativos verdaderos), o sin diana (control acuoso). Se analizaron entonces mediante espectroscopia de masas de ionización por electropulverización para determinar la cantidad de producto específico producido en cada reacción, utilizando cálculos del área bajo la curva (AUC).

Ejemplo 9: Detección de la baliza: Reproducibilidad del ensayo con la detección de las balizas.

La detección de balizas moleculares de los productos de reacción de este procedimiento puede utilizarse también como una lectura final. Tal como se muestra en la figura 10, la proporción de los productos de reacción puede manipularse variando la proporción de entrada de las matrices anterógradas e inversas inclinando a las matrices a favorecer uno de los productos de reacción, permite que el producto monocatenario esté disponible para hibridarse a una baliza molecular. La baliza abierta genera una señal fluorescente. Este procedimiento de detección es extremadamente reproducible. En este estudio, dos operarios llevaron a cabo réplicas del mismo ensayo de dos formas distintas. Los resultados de este estudio demuestran la reproducibilidad del ensayo desde un día hasta el siguiente, así como la reproducibilidad entre operadores.

Ejemplo 10: Sensibilidad del ensayo con detección de las balizas

La sensibilidad del ensayo con lectura de las balizas se ensayó utilizando una dilución del ADN genómico de *Francisella tularensis*. Tal como se muestra en la figura 11, se detectaron tanto como 50 copias antes del control sin diana.

Ejemplo 11: Concentración de productos amplificados para la amplificación del ADN

La sensibilidad del ensayo se ha estudiado también utilizando la detección mediante espectrometría de masas de los productos reactivos. La figura 12 muestra señales antes del control sin dianas por debajo de 100 copias. Los datos de este estudio se utilizaron para correlacionar el número de copias de entrada con la cantidad final del producto amplificado. En este sentido, los valores de AUC de los niveles máximo de espectrometría de masas del producto, se adscribieron a una curva estándar para dar lugar a la concentración final estimada del producto amplificado para el ensayo. La cantidad de producto amplificado es del orden de 250 nM aproximadamente a casi 1 µM para 1E+2 y 1E+5 copias, respectivamente. Esta cantidad de producto da lugar a una amplificación de 1E+8 a 7E+10 veces. Estas reacciones se llevaron a cabo sin condiciones de un inicio "térmico", ya que, de hecho, las

condiciones de inicio térmico se han mostrado aumentar de forma importante la cantidad de producto amplificado, por lo que se alcanza un aumento posterior en la amplificación. La reacción de amplificación de cero copias muestra una concentración final positiva, debido al valor de interceptación y en la ecuación de la curva estándar.

5 **Ejemplo 12: concentración de productos amplificados para el ensayo de ARN**

Se llevó a cabo un estudio similar con respecto a la amplificación del ARN utilizando este procedimiento. Se amplificó una dilución de dianas de ARN mediante el ensayo de este procedimiento. Los productos se procesaron mediante espectrometría de masas, y se analizaron los valores AUC de los niveles máximos del producto, con respecto a una curva estándar, para determinar la concentración del producto final, tal como se muestra en la figura 13. Un inicio de la amplificación de 12 minutos con 30 y 30.000 copias de dianas iniciales, dio lugar a una amplificación de $3E+9$ a $1E+7$, respectivamente. El grado más bajo de amplificación comparado con la del ADN podría deberse a la capacidad transcriptasa inversa menos eficiente de la polimerasa, comparada con sus capacidades replicativas. Asimismo, el híbrido ARN:ADN formado después de la extensión de la matriz inversa constituye una interacción más intensa comparada con un híbrido normal ADN:ADN, que mostrará una capacidad respiratoria menor para dejar que la matriz anterógrada u otra matriz inversa desplace una hebra. Sin embargo, los productos de amplificación a partir de la reacción del ARN se detectaron por debajo de < 100 copias.

20 **Ejemplo 13: NEAR™ especificidad reaccional para el ADN**

Ya que los productos de la reacción tienen una longitud habitualmente de entre 20 y 30 bases, surge la pregunta de si estos cortos ensayos de amplificación pueden ser o no lo bastante específicos, para hacer diana en una región secuencial única, estando presentes otros genomas vecinos cercanos. La reacción se ensayó, en cuanto a su especificidad, procesando la reacción de amplificación en presencia y ausencia de cantidades variables del ADN genómico vecino cercano (Figura 14). En este caso el ensayo detecta una secuencia específica en el plásmido pXO_2 de *Bacillus anthracis* y en el genoma vecino cercano de *Bacillus thuringiensis* (kurstaki). Las reacciones se analizaron mediante los valores AUC para los picos del producto. La figura a continuación demuestra que en ausencia de la diana correcta (*Bacillus anthracis*), no se amplifica ningún producto verdadero (los niveles son tan bajos que no se aprecian en la escala del gráfico). La cantidad de amplificación de las reacciones positivas, está de acuerdo con barras de error más voluminosas para las 0 y $5E+5$ copias de *Bacillus thuringiensis* ($5E+4$ copias de *Bacillus anthracis*), debido a un valor único más bajo para uno de los procesamientos por triplicado. En general, el experimento demuestra que la reacción es muy específica para la secuencia diana, cuando el ensayo se diseña en el interior de una región única de sustancias.

35 **Ejemplo 14: Ensayo de sustancias interferentes**

Se ensayó un conjunto de sustancias interferentes para monitorizar el efecto de cada una sobre la amplificación. La figura 15 demuestra la fuerte naturaleza de este ensayo en presencia de sustancias interferentes. Algunos interferentes que son conocidos por inhibir la PCR, tal como el ácido húmico, no parecieron inhibir el ensayo, aunque la cantidad de cada interferente es desconocida. A partir de análisis estadístico, sólo los interferentes B, C y E fueron estadísticamente distintos del ensayo x de control. En los casos B, C y E, la diferencia dio lugar a una amplificación aumentada.

45 **Ejemplo 15: Multiplexión de dos secuencia con ensayos de ADN**

Un ADN dúplex se diseñó para la detección de electroforesis capilar (CE). Los productos de amplificación fueron 25 bases (*Bacillus anthracis* ensayo, *Ba*) y 27 bases (*Bacillus subtilis* ensayo, *Bs*) de longitud con producción anterior de 23 unidades metaméricas. La reacción se procesó durante 10 minutos en presencia o ausencia de $5E+5$ copias de la respectiva diana de ADN genómico. Las muestras se procesaron sobre un gel de poliacrilamida al 20% para vinalizar los productos de la reacción. La figura 16 indica la presencia de la amplificación positiva del producto cuando sólo está presente *Bacillus subtilis*, así como también cuando están presentes *Bacillus subtilis* y *Bacillus anthracis*.

55 **Ejemplo 16: Especificidad del ensayo del ADN dúplex**

La reacción del ADN dúplex con *Bacillus subtilis* (*Bs*) y *Bacillus anthracis* (*Ba*) se mostró específica para los genomas respectivos. Los ensayos se llevaron a cabo en presencia del vecino cercano, *Bacillus thuringiensis*, tal como se muestra en la figura 17. En la reacción negativa en la que ambos conjuntos de matrices están presentes, así como también el ADN genómico de *Bacillus thuringiensis*, no existieron bandas del producto en la región de 25 ó 27 unidades metaméricas. Las bandas del producto aparecen sólo cuando está presente la diana genómica específica, lo que demuestra la especificidad de la reacción dúplex.

65 **Ejemplo 17: Multiplexión con ensayos ARN**

Se desarrollaron y multiplexaron un ensayo MS2 que amplifica un producto de 27 unidades metaméricas y un ensayo de Ébola que amplifica un producto de 25 unidades metaméricas, de forma que todas las matrices están

presentes en cada ensayo, y la amplificación de los productos depende de la diana que está presente. Esta combinación de matrices forma productos anteriores que tienen una longitud de 23 y 20 bases. El gel que se muestra en la figura 18 demuestra la capacidad de la reacción de este procedimiento para amplificar múltiples dianas de ARN en una única reacción.

5

Ejemplo 18: Amplificación a partir de esporas lisadas

Se llevó a cabo la amplificación sobre muestras semiprocesadas para determinar si es posible amplificar el ADN liberado a partir de esporas mediante lisis. La reacción de control negativo contenía esporas tratadas con DNasa, no lisadas, de forma que no debía encontrarse ADN para amplificar. La reacción de control positivo contenía ADN genómico purificado a concentraciones de alrededor de la cantidad estimada de ADN que deberá liberarse mediante la lisis. Los resultados en la figura 19 muestran que la amplificación con esporas no lisadas y tratadas con DNasa, no dio lugar a la amplificación del producto tal como se esperaba, mientras que las tres muestras lisadas antes de la amplificación, produjeron cantidades de productos del orden de las cantidades teóricas.

10

15

Ejemplo 19: Captura y extensión

Los productos reactivos de este procedimiento pueden también detectarse sobre una superficie sólida. Una sonda de captura unida en el extremo 5' a la superficie mediante biotina/estreptavidina, puede unir a los productos de reacción a partir de los cuales la polimerasa se extiende para formar un dúplex estable que SYBR y cualquier colorante intercalante puede detectar. La sonda de captura se diseña para favorecer la extensión mediante la unión al producto verdadero con respecto a los productos anteriores, a causa de que la base del extremo 3' de la sonda de captura es complementaria a la base espaciadora media en el producto, que no se encuentra presente en ninguna de las matrices o de los productos anteriores. La figura 20 demuestra el aumento de la fluorescencia de los productos en presencia de la sonda de captura y de la polimerasa con respecto a la unión promedio (idéntica reacción en ausencia de polimerasa, para impedir la extensión de la sonda de captura) y el no control de la diana donde sólo son amplificados productos anteriores, pero que no pueden formar un dúplex estable con la sonda de captura para la extensión de la polimerasa.

20

25

30

Ejemplo 20: Ensayo de superficie NEAR™ FRET DNA

La reacción de este procedimiento puede también llevarse a cabo con las matrices inmovilizadas sobre la superficie. Las matrices para la detección FRET de amplificación superficial presentan habitualmente tres modificaciones: una biotina del extremo 5' con un espaciador TEG, un fluoróforo FAM interno a la biotina, y un extintor sobre el extremo 3' que sirve para bloquear la amplificación anterior, así como también para la extinción de fluoróforo FAM. La matriz se inmoviliza sobre la superficie mediante la unión biotina/estreptavidina. La figura 21 demuestra que con ambas matrices inmovilizadas y mezclado adicional, la reacción se realiza a una velocidad mucho más lenta que la velocidad de amplificación en solución (amplificación 16 minutos para 1E+6 copias de ADN genómico). Cuando una única matriz se inmoviliza en la superficie y la otra matriz está libre en solución, la reacción de amplificación aumenta a 10 minutos, la detección para 1E+6 copias del ADN genómico. La fluorescencia de los productos anteriores se observa -3,5 minutos después de la señal del producto, similar a lo que se observa para la cinética de fase de la solución, pero con un retardo considerable.

35

40

45

Ejemplo 21: Ejemplo de cuidado de la salud

Ensayo de *Chlamydia trachomatis* (Ct)

Se llevó a cabo un ensayo de este procedimiento para detectar la presencia de una secuencia diana (Ct) de *Chlamydia trachomatis*. Se utilizó una serie de diluciones dobles de ADN sintético que contenía la secuencia diana para el ensayo Ct P2_2, para determinar el límite de detección del ensayo. La reacción se llevó a cabo esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 1, con algunas modificaciones tal como se describe en este ejemplo. La serie de diluciones empezó con 10.000 copias de ADN diana y se procedió a menos de 1 copia por reacción. Una muestra de control "sin diana" se incluyó también en este experimento. Las reacciones se llevaron a cabo en una placa de microtitulación de 96 pocillos en volúmenes de 50 microlitros en los tampones siguientes: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 30 mM NaCl, 15 mM (NH₄)₂(SO₂), 15 mM Mg₂SO₄, 1 mM DTT, 0,1% Triton X-100 with 0,3 mM dNTP, 19,2 unidades de BstADN olicerasa y 15 unidades del enzima de mellado Nt.BstNBI. Las matrices se añadieron en una proporción de 200 nM: 100 nM (Matriz 1: Matriz 2). Las reacciones se realizaron de la siguiente forma: En la placa 1, se añadieron 5 microlitros de mezcla de matrices a cada pocillo en un lugar de preamplificación, y se precintó. En la placa 2, se añadieron a cada pocillo 40 microlitros de "mezcla madre" en un lugar de "preamplificación", sellándose también. La "mezcla madre" estaba formada por dH₂O más todos los componentes del ensayo mencionados anteriormente, excepto las matrices. Las dos placas se transfirieron entonces a un lugar de post-amplificación donde 5 microlitros de diana se añadieron a cada pocillo de la placa 1 (excluyendo los pocillos de control "no diana"). Las dos placas se transfirieron entonces a cicladores térmicos precalentados a 56°C durante preincubaciones de 2-3 minutos a 56°C. El contenido de la placa 2 se transfirió entonces a la placa 1, que se incubó, entonces durante 5 minutos a 56°C (etapa de amplificaciones). Después de esta incubación, las reacciones se detuvieron inactivando los enzimas a 80°C durante 2 minutos.

50

55

60

65

Subsiguientemente, una baliza molecular específica para el producto Ct P2_2 amplificado, se añadió a una concentración final de 300 nM, detectándose la fluorescencia a 56°C. Todas las muestras se realizaron por triplicado, con barras de error que mostraban la desviación estándar.

- 5 El ensayo Ct P2_2 se realizó utilizando dos matrices, 1 (5'-ATGCATGCATGAGTCACATAGGCTTATGGAG-3'), y la matriz 2 (5'-ATGCATGCATGAGTCACATTTATACCGCTTA-3'), a la concentración final de la matriz de 200 nM:100 nM. La baliza molecular que se utilizó para la detección de fluorescencia, MB 5,18, contenía un fluoróforo 5'-FAM y un extintor 3'-BHQ1, con la secuencia siguiente: TACCGCTTAACTCCATAAgccag-3'.
- 10 Los resultados se muestran en la figura 22, y muestran que el ensayo puede detectar eficientemente menos de 10 copias de la diana en una muestra. La figura 22B muestra que, incluso alrededor de 1-2 copias pueden detectarse, pero a causa del experimento de dilución, algunos pocillos pueden, estadísticamente, no tener ningún ADN diana (compárese la Fig. 22b, barras 1,2 a, b y c).
- 15 La secuencia diana para el ensayo Ct P2_2 es 5'-AGGCTTATGGAGTTAAGCGGTATAA-3'. Pueden prepararse muestras clínicas, tal como las recuperadas en torundas vaginales o endocervicales, o las recogidas en torundas y transferidas entonces, a medios de transporte viral tal como M4 o M5, para utilizarlas en un ensayo, de la forma siguiente: cada torunda se dispone en un tubo Eppendorf de 1,5 o 2,0 mililitros que contienen de 300 microlitros a 1 mililitro del reactivo Pierce's Lyse-N-Go PCR (Cat # 78882). La mezcla se deja incubar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos, con mezcla ocasional. Entonces, una alícuota de la muestra eluida y lisada, se añade directamente a un ensayo. Para muestras que se encuentran en medios de transporte vírico puede transferirse una alícuota de la muestra a un tubo de Eppendorf que contenga un volumen igual o mayor del reactivo Pierce's Lyse-N-Go PCR (con una proporción de muestra Lyse-N-Go ratio de 1:1, 1:2, 1:10, 1:20, etc., y dejar que se incube a temperatura ambiente durante 5-10 minutos, con mezcla ocasional. Una alícuota de la muestra eluida y lisada se añade entonces directamente a un ensayo.
- 20
- 25

Ejemplo 22: Aplicaciones de seguridad alimentaria

Ensayo de *Listeria monocytogenes*

- 30 Para demostrar la efectividad del ensayo de este procedimiento para la detección específica de un patógeno alimentario, se llevaron a cabo ensayos en *Listeria monocytogenes*, una de las amenazas más significativas para la seguridad alimentaria a partir de los productos alimentarios "preparados para comer". Los ensayos se realizaron esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 1, con modificaciones descritas en este Ejemplo. El ADN genómico de la cepa EGD-e de *L. monocytogenes* se ensayó con cantidades crecientes de ADN genómico a partir de especies no patogénicas estrechamente emparentadas con la cepa clip 1 1262 de *L. innocua*. Tal como se muestra en la figura 23, las reacciones negativas de control sin ADN presente mostraron sólo niveles anteriores de fluorescencia y las cantidades crecientes del ADN de *L. innocua* hasta 1 millón de equivalentes genómicos por una reacción de 50 microlitros, no mostraron un aumento significativo en la fluorescencia anterior. Sin embargo, la adición de 1.000 equivalentes genómicos de *Listeria monocytogenes* fue detectada fácilmente con un aumento sustancial en la fluorescencia, y no fue afectado por la presencia de *L. innocua*, incluso cuando la *L. innocua* no patológica se encontraba con un exceso de 1.000 veces, que mostraba 1 millón de equivalentes genómicos por 50 microlitros de reacción. Cada reacción consistía en: Tampón 46 mM pH 8,5M 50 mM NaCl; 10 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 5 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 0,5 mM dithiothreitol; 0,1% Triton X-100; 0,01 mM EDTA; 0,3 mM each dATP, dCTP, dGTP y dTTP; 19,2 unidades de Bst ADN polimerasa de New England Biolabs, Inc.; 15 unidades de Nt.BstNBO endonucleasa de mellado de New England Biolabs, Inc.; 200 nM del primer oligonucleótido; y 2 micromoles del segundo oligonucleótido. Los oligonucleótidos y el ADN genómico de *Listeria*, se incubaron separadamente de la mezcla enzimática tamponada a 56°C, añadiéndose entonces 5 microlitros de esta mezcla a 45 microlitros de la mezcla enzimática tamponada. La reacción se incubó a 56°C durante 10 minutos, y entonces a 80°C durante 2 minutos. Después de esto, 3,2 microlitros de una solución 5 µM de una baliza molecular se añadieron a cada reacción. La secuencia de la baliza molecular fue específica para la secuencia amplificada de *L. monocytogenes*, con un fluoróforo y extintor (de la señal) en los extremos 5' y 3', respectivamente. Después de la adición de las balizas moleculares, las reacciones se incubaron a 56°C durante un minuto, realizándose entonces las mediciones de fluorescencia. Cada condición del ensayo se probó por duplicado, y los valores promedio de la fluorescencia se muestran. La secuencia diana para el ensayo de *L. monocytogenes* es 5'-AAAGCAAGAGAAAGTTATCGTGTAT-3'. Las secuencias de las matrices son las siguientes: T1 5'-ATGCATGCATGAGTCACATAAAGCAAGAGAA-3' y T2 5'-ATGCATGCATGAGTCACATATACACGATAAC-3'.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

Ejemplo 23: Ejemplo de ARN vírico

- 60 Se utilizaron series de dilución 10 de ARN vírico purificado de una muestra clínica viral positiva para determinar el límite de detección del ensayo. El ARN vírico se purificó utilizando un kit de purificación del ARN vírico disponible comercialmente. Se incluyó una muestra de control negativo "sin diana". Las reacciones se llevaron a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos en volúmenes de 50 microlitros en el siguiente tampón: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 30 mM NaCl, 15 mM (NH₄)₂(SO₂), 10 mM Mg₂SO₄, 1 mM DTT, 0,1% Triton X-100 con 0,1 mM dNTP, 19,2 unidades de Bst DNA polimerasa, 7,5 unidades de Nt.BstNBI enzima mellante y 4 unidades de Omniscript. Se
- 65

añadieron las matrices con una proporción de 400 nM: 20 nM (matriz 1: matriz 2). Las reacciones se realizaron de la forma siguiente: en la placa 1, 5 microlitros de mezcla de matrices se añadieron a cada pocillo en una sala de preamplificación, sellándose. En la placa 2, 40 microlitros de “mezcla madre” se añadieron a cada pocillo en una sala de preamplificación, sellándose. La “mezcla madre” consistió en agua + todos los componentes mencionados anteriormente, excepto las matrices. Las dos placas se transfirieron entonces a cicladores térmicos precalentados a 56°C durante 2-3 minutos, para realizar preincubaciones de 2-3 minutos a 56°C. El contenido de la placa 2 se transfirió entonces a la placa 1, que se incubó entonces durante 5 minutos a 56°C (etapa de amplificación). Después de esta incubación las reacciones se detuvieron inactivando los enzimas a 80°C durante 2 minutos. A continuación, una molécula específica para el producto amplificado se añadió a una concentración final de 300 nM, detectándose la fluorescencia a 56°C. Todas las muestras se realizaron por triplicado, con barras de error mostrando deserciones estándar. Los resultados se muestran en la figura 24.

El ensayo de ARN viral se realizó utilizando dos matrices (matriz 1:3 nucleótidos de largo, y matriz 2:31 nucleótidos de largo) a una concentración final de 400 nM: 20 nM. La baliza molecular utilizada para la detección de fluorescencia (MB), contenía un fluoróforo 5'-FAM y un extintor 3'-BHQ1, con una secuencia larga de 29 nucleótidos. La longitud de la secuencia diana fue de 26 nucleótidos.

Ejemplo 24: Aplicación a la agricultura: Detección de rasgos genéticamente modificados en la preparación de muestras de ensayo para cultivos para el maíz convencional (no GMO) y para el genéticamente modificado (GMO).

El ensayo de estos procedimientos puede utilizarse para detectar organismos genéticamente modificados (GMO) en aplicaciones agrícolas. El ensayo se utilizó para detectar la presencia del gen *bar*, insertado en el genoma del maíz en un fondo de ADN inmodificado de maíz. El gen *bar* confiere resistencia al herbicida glufosinato de amplio espectro. Los ensayos se llevaron a cabo esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 1, con modificaciones tal como se describe en esta Memoria. Unas semillas de maíz convencionales (no modificadas) y genéticamente modificadas, se desarrollaron a un nivel apropiado de aspereza, extrayéndose los ácidos nucleicos utilizando un tampón estándar. El material extraído se purificó, utilizando una columna de exclusión de tamaño, según las instrucciones del fabricante. Los ácidos nucleicos purificados se combinaron para dar lugar a una concentración final del maíz modificado por *bar* del 5%, en una cantidad convencional anterior (por ejemplo, 5 microlitros de un extracto de ADN de maíz *bar*, combinado con 96 microlitros de un extracto convencional de ADN de maíz), o no utilizándolo mezclado en el caso del maíz convencional al 100%. Las secuencias oligonucleótidas que se utilizaron para detectar el gen *bar* se presentan a continuación.

Matriz 1: ATGCATGCATGAGTCACATCATCGTCAACCA
Matriz 2: ATGCATGCATGAGTCACATTGTCTCGATGTA

Las matrices se diseñaron para producir los productos siguientes:

Producto 1: CATCGTCAACCACTACATCGAGACA
Producto 2: TGTCTCGATGTAGTGGTTGACGATG

Los reactivos del ensayo que se utilizaron, fueron: 9,6 unidades de polimerasa Bst. (NEB), 15 unidades de enzima N.BstNBI para mellado (NEB), 5 microlitros del tampón Thermopol I (NEB), 2,5 microlitros del tampón 3, 12 mM MgSO₄, 0,3 mM dNTP, 2,5% DMSO (dimetil sulfóxido), una muestra de 5 microlitros, matrices y agua. Los oligonucleótidos estaban inicialmente a concentraciones de 10 nM (Matriz 1) y 100 nM (Matriz 2). El agua se utilizó para ajustar el volumen final a 50 microlitros, llevándose a cabo un ensayo de 10 minutos, a 56°C, seguido por una incubación de 2 minutos a 94°C para inactivar los enzimas, seguido por la detección de 56°C con una baliza molecular específica a una concentración final de 300 nM. La secuencia de esta baliza molecular es:

5' FAM-CCTCGCCGTCAACCACTACATCGAGCGAGG-BHQ1-3'

Los resultados se muestran en la figura 25.

Ejemplo 25: Detección de MicroARN (mRNA)

Preparación de una muestra de ensayo para microARN a partir de células cancerosas MDA-MB-231 humanas de mama.

Se sabe que las células cancerosas MDA-MB-231 humanas de mama (ATCC nº HTB-26), expresan niveles elevados de micro ARN -21 (Iorio, M.V. et al., 2005. Desregulación de la expresión en el cáncer mamario humano *Cancer Res.* 65:7065-7070. Se desarrolló un ensayo para miR-21 que detecta la secuencia madura del micro ARN-21:

5' UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA 3'

Las secuencias de las matrices utilizadas fueron (las secuencias enzimáticas para mellado se subrayan):

Matriz 1: ATGCATGCATGAGTCACATTAGCTTATCA
 Matriz 2: ATGCATGCATGAGTCACATTCAACATCAG

Las matrices se diseñaron para producir los productos siguientes:

Producto 1: TAGCTTATCAGACTGATGTTGA
 Producto 2: TCAACATCAGTCTGATAAGCTA

El ensayo se llevó a cabo esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 1, con modificaciones que se describen en la presente memoria. Para obtener RNA, MDA-MB-231, las células se propagaron y subcultivaron, utilizando procedimientos estándar que son conocidas por los expertos en la materia, en el medio de Eagle modificado por Dulbecco (Invitrogen) suplementado con suero bovino fetal al 10%, glucosa y antibióticos. Antes de alcanzar la confluencia, las células se eliminaron de la placa mediante tratamiento con tripsina, lavándose a continuación en solución salina tamponada en fosfato antes de congelarla -80°C . Las células se descongelaron después y una parte se utilizó para el aislamiento de ARN con reactivo TRI (Molecular Research Center, Inc.), según las instrucciones del fabricante. El ARN purificado se cuantificó utilizando la absorbencia UV a 260 nm.

Según el manual del reactivo TRI del Molecular Research Center, 1 ng de ARN purificado corresponde a aproximadamente 100 células del material inicial. Diversas cantidades de ARN purificado se utilizaron en un ensayo que incluía los reactivos siguientes: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 30 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 30 mM Na_2SO_4 , 1 mM DTT, 0,1% Triton X-100, 10 mM MgSO_4 , 0,1 mM dNTP, 19,2 unidades de Polimerasa Bst (New England Biolabs), 7,5 unidades del enzima de mellado N.BstNBI (New England Biolabs), 7,4 unidades de Transcriptasa Inversa Omniscript (Qiagen), dos oligonucleótidos con 100 nM cada uno, la muestra y agua. Ésta se utilizó para ajustar el volumen final a 50 microlitros, llevándose a cabo un ensayo de 20 minutos a 56°C , seguido por 2 minutos de incubación a 94°C para inactivar enzimas. El producto se midió utilizando una espectrometría de masas mediante ionización por electropulverización, cuantificándose las cantidades del producto calculando el área bajo la curva. Los resultados del ensayo se muestran en la figura 26.

Ejemplo 26: Detección de una diana de ADN genómico

Se llevó a cabo un ensayo de este procedimiento, esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 1, utilizando oligomatrices diseñadas para unirse a una diana genómica. Se realizaron experimentos de dilución para determinar el límite inferior de detección. Tal como se muestra en la figura 27, existió una detección consistente con 50 copias genómicas. Cuando la muestra diluida contenía 10 copias genómicas, se produjo detección, pero sin embargo, estadísticamente, no fue consistente.

Ejemplo 26. La figura 27 muestra un ensayo de *Neisseria gonorrhoeae*. El ensayo se centra en el gen pilQ, específicamente en la secuencia 5'-ACTCTACCAACACGGAACCTCAAAA-3'. Las secuencias de la matriz que se utilizaron para amplificar esta diana fueron: T1 5'-ATGCATGCATGAGTCACATTTTTTGAGTTCC-3' y T2 5'-ATGCATGCATGAGTCACATACTCTACCAACA-3'. El ensayo se llevó a cabo esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 1, con las modificaciones realizadas en esta Memoria. Brevemente, se realizó el ensayo durante 5 minutos a 56°C , seguido por una etapa de inactivación térmica a 80°C durante 2 minutos para detener la reacción. La detección del extremo del producto específico amplificado se realizó utilizando 300 nanomoles de una baliza molecular que contenía un 5'-fluoróforo y un 3'-extintor que fue específico para la aplicación, después de 1 minuto de incubación a 56°C . La secuencia de la baliza molecular fue 5'-CGCATGGAGTTCCGTGTTGGTAGACATGCG-3'.

Ejemplo 27: El cálculo del producto específico generado en un Ensayo de *B. Subtilis*

Un ensayo de este procedimiento, se llevó a cabo esencialmente, tal como se describe en el Ejemplo 1, utilizando oligomatrices diseñadas para unirse a una secuencia diana de *Bacillus subtilis*. La diana fue el gen ppsA:

Secuencia diana (25 unidades metaméricas) 5'-CCAAGCTCAAAAAGGAATCGTGAA-3',
 T1 5'-ATGCATGCATGAGTCACATCCAAGCTCAAAA-3'
 T2 5'-ATGCATGCATGAGTCACATTTTCACGATTCT-3'

Tal como se muestra en la figura 28, la regresión lineal mostró una correlación excelente entre la cantidad del oligo de referencia que se añadió a una muestra y el área bajo la curva (AUC). Esta ecuación se utilizó para determinar la cantidad de producto específico generado cuando 50 ó 500 copias de la diana del ADN genómico se añadieron a una reacción. Ésta se llevó a cabo durante 5 minutos. La amplificación de un número de veces se calculó y se presenta en la Tabla a continuación.

Tabla 5

| Muestra | Señal AUC | Producto (nM) | Producto (reacción de 50 microlitros en pmoles) | Nº de amplificaciones |
|---------|-----------|---------------|---|-----------------------|
| 50-1 | 1.394 | 2.851 | 0,1426 | 1,72E+09 |
| 50-2 | 1.495 | 3.049 | 0,1525 | 1,84E+09 |
| 50-3 | 1.175 | 2.421 | 0,1211 | 1,46E+09 |
| 50-4 | 1.072 | 2.219 | 0,1110 | 1,34E+09 |
| 500-1 | 1.799 | 3.645 | 0,1823 | 2,20E+08 |
| 500-2 | 1.837 | 3.720 | 0,1860 | 2,24E+08 |
| 500-3 | 1.472 | 3.004 | 0,1502 | 1,81E+08 |
| 500-4 | 1.438 | 2.937 | 0,1469 | 1,77E+08 |

5 Los cálculos se basaron en lo siguiente: Genoma de *B. Subtilis* = 4214814 nucleótidos, peso molecular (g/mol) de 2781777240, número de Avogadro (moléculas/ml) = 6,02E+23. Para 50 copias genómicas en moles, esto da lugar a 8,30E+23, para 500 copias genómicas en moles, esto da lugar a 8,30E+22.

10 Ejemplo 28: Efecto de distintas longitudes del espaciador.

10 Se llevaron a cabo una serie de ensayos (Ct) de *Chlamidia trachomatis*, tal como se describe esencialmente en los Ejemplos 1 y 21, utilizando varias matrices, tal como se muestra en las figuras 29 y 30. La figura 29 muestra los resultados de la reacción, la 30 proporciona más detalles como el diseño de la matriz. La reacción se llevó a cabo durante 10 minutos utilizando 0 o 100 copias de la diana. Se preparó una serie de matrices oligonucleótidas, con longitudes de la región espaciadora (número de nucleótidos en la secuencia diana entre los sitios de unión de las oligomatrices, si las matrices estaban unidas) comprendidas entre 1 y 11. Las longitudes óptimas del espaciador para este experimento fueron 1, 2, 3 ó 4.

15 Un conjunto similar de experimentos se llevó a cabo para una diana de RNA vírico, siguiendo esencialmente los mismos procedimientos que los descritos en el Ejemplo 23m, utilizando longitudes del espaciador de 2, 5, 6, 7 y 8. Como se determinó mediante espectrometría de masas, se descubrió una detección óptima del producto específico utilizando longitudes del espaciador de 2 y 5, no detectándose producto específico en este ensayo si la longitud del espaciador era 6 o superior, y la reacción se procesó durante 20 minutos.

20 Se realizaron experimentos similares también con otras dianas. Para algunas, como miR-21, cuando no se incluyeron nucleótidos del espaciador en el diseño de la matriz, se detectó el producto si o no una secuencia diana estaba presente en la reacción. El producto se detectó si el ADN diana se encontraba o no en el ensayo indicando que el conjunto de matrices estaba produciendo el producto específico sin necesidad de que la diana estuviera presente. En otros experimentos, una región del espaciador, de 0 nucleótidos dio lugar al producto específico. Por tanto, al diseñar matrices para los ensayos que se consideran en la presente memoria, deberá prepararse más de un conjunto de matrices para determinar la longitud de la región espaciadora que sea óptima para producir el producto específico a partir de una diana particular.

25 Ejemplo 29: Efecto de las regiones de estabilización

30 Se llevó a cabo un conjunto de ensayos (ct) de *Chlamydia trachomatis* tal como se describe, esencialmente, en los Ejemplos 1 y 21. Se prepararon matrices que incluían o no la región estabilizante (5'ATGCATGCAT). La reacción se realizó durante 10 minutos, con 0 o 100 copias del ADN diana. Se hicieron análisis utilizando una detección SybrGreen de fluorescencia utilizando tiempo real. Tal como se muestra en la figura 31, las muestras que contenían matrices sin regiones de estabilización, no mostraron amplificación. En otro conjunto de ensayos, utilizando ARN viral, se incluyeron en el ensayo 0 a 1.000 copias de diana. Las muestras que contenían matrices sin regiones estabilizantes no presentaron amplificación, mientras que las que presentaban regiones estabilizantes mostraban una amplificación rápida.

35 Ejemplo 30: Efecto de la concentración de Mg⁺²

40 Un conjunto de ensayos (Ct) de *Chlamydia trachomatis* se llevó a cabo esencialmente tal como se describe en los Ejemplos 1 y 21. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando concentraciones variables de Mg⁺². Tal como se muestra en la figura 32, para este conjunto de ensayos, se descubrió una pérdida completa de actividad cuando se encontraban presentes 6 mM de Mg⁺², y una caída significativa en la actividad se encontró cuando estaban presentes 9 mM de Mg⁺². A concentraciones entre 12 y 21 mM de Mg⁺², el ensayo se realizó de forma óptima.

45 Ejemplo 31: Ejemplos de otras combinaciones matriz/diana

50 Estos procedimientos no están limitados a matrices y diana específicas proporcionadas en estas formas de

realización y ejemplos. Pueden utilizarse otras dianas y matrices para llevar a cabo los procedimientos de amplificación isotérmica que se consideran en la presente memoria. Los ejemplos de otras dianas y matrices comprenden de manera no limitativa las que se presentan en la figura 34. Los expertos en la materia apreciarán que otras matrices pueden diseñarse para las dianas presentadas en la figura, secuencias diana relacionadas con las presentadas en la figura, pueden utilizarse en la reacción, incluyéndose en el alcance de estos procedimientos las secuencias diana que no se incluyen en la figura.

La cita de las patentes, las solicitudes de patente, las publicaciones y los documentos anteriores no resulta un reconocimiento de que cualquiera de los anteriores es una técnica anterior relevante, ni constituye un reconocimiento respecto al contenido o la fecha de estas publicaciones o documentos.

Las formas singulares uno/una y el/la incluyen referencias plurales, a menos que el contexto signifique claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "un subconjunto", incluye varios de dichos subconjuntos, la referencia a un "ácido nucleico" incluye uno o más ácidos nucleicos y sus equivalentes conocidos por los expertos en la materia, y así sucesivamente. El término "o" no pretende ser limitativo para uno de los términos que designa. Por ejemplo, si se utiliza en una frase de la estructura "A o B", puede denotar A solo, B solo, o ambos A y B.

Si no se define de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en la presente memoria, tienen idénticos significados tal como se entienden habitualmente por un experto en la materia al que esta invención pertenece. Aunque cualquier procedimiento y sistema similar o equivalente a los descritos en la presente memoria, puede utilizarse en la puesta en práctica o ensayo de la presente invención, se describen los procedimientos, dispositivos y materiales.

Las modificaciones pueden realizarse en el futuro sin apartarse de los aspectos básicos de la invención. Aunque la invención se ha descrito sustancialmente detallada haciendo referencia a una o más formas de realización específicas, los expertos en la materia apreciarán que pueden realizarse cambios en las formas de realización que se han dado a conocer específicamente en esta solicitud, y todavía estas modificaciones y mejoras se encuentran dentro del alcance de la divulgación. La invención que se describe ilustrativamente en la presente memoria puede ponerse en práctica en ausencia de cualquier elemento (o elementos) que no se ha dado a conocer específicamente en la presente memoria.

Así, los términos y expresiones que se han utilizado y empleado como términos descriptivos y no limitativos, equivalentes a las características que se muestran y describen, o sus partes, no están excluidas, y se reconoce que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de la divulgación.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la amplificación de secuencia de nucleótidos, que comprende:

- 5 combinar un ácido nucleico diana que presenta una secuencia de nucleótidos diana con
- (i) una polimerasa;
- 10 (ii) un primer ácido nucleico de matriz que comprende (a) una primera región de reconocimiento de matriz en el extremo 3' que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' de la primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana, (b) un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado aguas arriba de la región de reconocimiento y (c) una región estabilizante aguas arriba de dicho enzima de mellado;
- 15 (iii) un segundo ácido nucleico de matriz que comprende (a) una segunda región de reconocimiento de matriz en el extremo 3' que es complementaria o sustancialmente complementaria al extremo 3' del complemento de la primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana, (b) un sitio de unión de enzima de mellado y un sitio de mellado aguas arriba de la región de reconocimiento y (c) una región estabilizante aguas arriba de dicho sitio de mellado; y
- 20 (iv) uno o más enzimas de mellado que son aptos para mellar en el sitio de mellado de dicho primer y dicho segundo ácidos nucleicos de matriz, en el que un enzima de mellado es apto para mellar ambas de dichas matrices, o cada matriz es apta para ser mellada mediante por lo menos uno de los enzimas de mellado, y en el que dichos uno o más enzimas de mellado no mellan dentro de dicha secuencia diana;
- 25 en una reacción de amplificación, bajo unas condiciones en las que la polimerasa extiende los ácidos nucleicos de matriz, generando así unos amplicones de ácido nucleico de matriz extendidos; en el que
- el ácido nucleico diana no se ha sometido a una etapa de desnaturalización térmica inicial;
- 30 la secuencia de nucleótidos diana es de entre 20 y 40 nucleótidos de longitud;
- la secuencia de nucleótidos diana comprende de 1 a 5 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de la primera región de reconocimiento de matriz y la segunda región de reconocimiento de matriz; y
- 35 las etapas anteriores se llevan a cabo bajo unas condiciones sustancialmente isotérmicas.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que:

- 40 (i) las primera y segunda matrices comprenden unos sitios de unión de enzima de mellado reconocidos por el mismo enzima de mellado y dicho primer y dicho segundo enzima de mellado son el mismo; y/o
- (ii) dicho enzima de mellado es seleccionado de entre el grupo de enzimas de mellado presentado en la tabla 3 o de entre el grupo de enzimas de mellado que consiste en Nt.BspQI, Nb.BbvCI, Nb.BsmI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, Nt.AlwI, Nt.BbvCI, Nt.BstNBI, Nt.CviPII, Nb.BpuI, y Nt.BpuI, preferentemente en el que el enzima de mellado es seleccionado de entre el grupo que consiste en Nt.Bst.NBI, Nb.BsmI y Nb.BsrDI.
- 45

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la secuencia de nucleótidos diana comprende 1, 2 o 3 nucleótidos más que la suma de los nucleótidos de la primera región de reconocimiento de matriz y la segunda región de reconocimiento de matriz.

50 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ácido nucleico diana es bicatenario o monocatenario, opcionalmente en el que el ácido nucleico diana es:

- 55 (i) ADN bicatenario, por ejemplo en el que el ácido nucleico diana es seleccionado de entre el grupo que consiste en ADN genómico, ADN plasmídico, ADN vírico, ADN mitocondrial, y ADN bicatenario sintético;
- (ii) ADN monocatenario, por ejemplo en el que el ácido nucleico diana es seleccionado de entre el grupo que consiste en ADN vírico, ADNc, y ADN monocatenario sintético;
- 60 (iii) ARN, por ejemplo en el que el ácido nucleico diana es seleccionado de entre el grupo que consiste en ARN mensajero, ARN vírico, ARN ribosómico, ARN de transferencia, microARN, precursor de microARN, y ARN sintético.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que:

- 65 (i) dicha ADN polimerasa es una polimerasa termófila;

- (ii) dicha polimerasa es seleccionada de entre el grupo que consiste en Bst (fragmento grande), 9^oN, VentR[®] (exo-) ADN polimerasa, Therminator, y Therminator II;
- 5 (iii) dicha polimerasa es Bst (fragmento grande); o
- (iv) dicha polimerasa presenta unas capacidades de desplazamiento de hebra.
- 10 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que:
- (i) la parte de la secuencia de ácidos nucleicos de la primera matriz que es complementaria o sustancialmente complementaria a la primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana es de 8-12, 8-13 u 8-15 nucleótidos de longitud y en el que la parte de la segunda matriz que es complementaria o sustancialmente complementaria al complemento de la primera hebra de la secuencia de nucleótidos diana es de 8-12, 8-13 u 8-15 nucleótidos de longitud; y/o
- 15 (iii) se encuentra una horquilla interna dentro de dicha secuencia de matriz.
- 20 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que:
- (i) la primera matriz se proporciona a la misma concentración que la segunda matriz; o
- (ii) una de las primera o segunda matrices se proporciona en una relación respecto a la otra matriz en el intervalo de relaciones de 1:100 a 100:1.
- 25 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además una segunda polimerasa, opcionalmente en el que por lo menos una de las primera o segunda polimerasas comprende una actividad de transcriptasa inversa.
- 30 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la amplificación se lleva a cabo entre:
- (i) 54°C y 60°C; o
- (ii) 56°C y 58°C.
- 35 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que:
- (i) la reacción de amplificación se mantiene a una temperatura constante durante 1 a 10 o durante 1 a 20 minutos; y/o
- 40 (ii) la temperatura de la reacción de amplificación es superior a la temperatura de fusión inicial del complejo matriz/secuencia diana.
- 45 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además detectar el producto de amplificación, opcionalmente en el que dicho producto de amplificación se detecta mediante un procedimiento de detección seleccionado de entre el grupo que consiste en electroforesis en gel, espectrometría de masas, fluorescencia de SYBR I, fluorescencia de SYBR II, SYBR Gold, Pico Green, TOTO-3, detección de colorante intercalado, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), detección de baliza molecular, captura de superficie, electroforesis capilar, incorporación de nucleótidos marcados para permitir la detección mediante captura, polarización de fluorescencia, y captura de flujo lateral.
- 50 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que por lo menos dos secuencias diana son aptas para ser amplificadas.
- 55 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que:
- (i) dichos productos de amplificación son detectados sobre una superficie sólida;
- (ii) por lo menos una sonda de captura es inmovilizada sobre una superficie sólida; y/o
- 60 (iii) por lo menos una de dichas matrices comprende un espaciador, grupo de bloqueo o un nucleótido modificado.
- 65 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicha región estabilizante presenta un contenido de GC de por lo menos 40% y/o una longitud de por lo menos 6 nucleótidos.

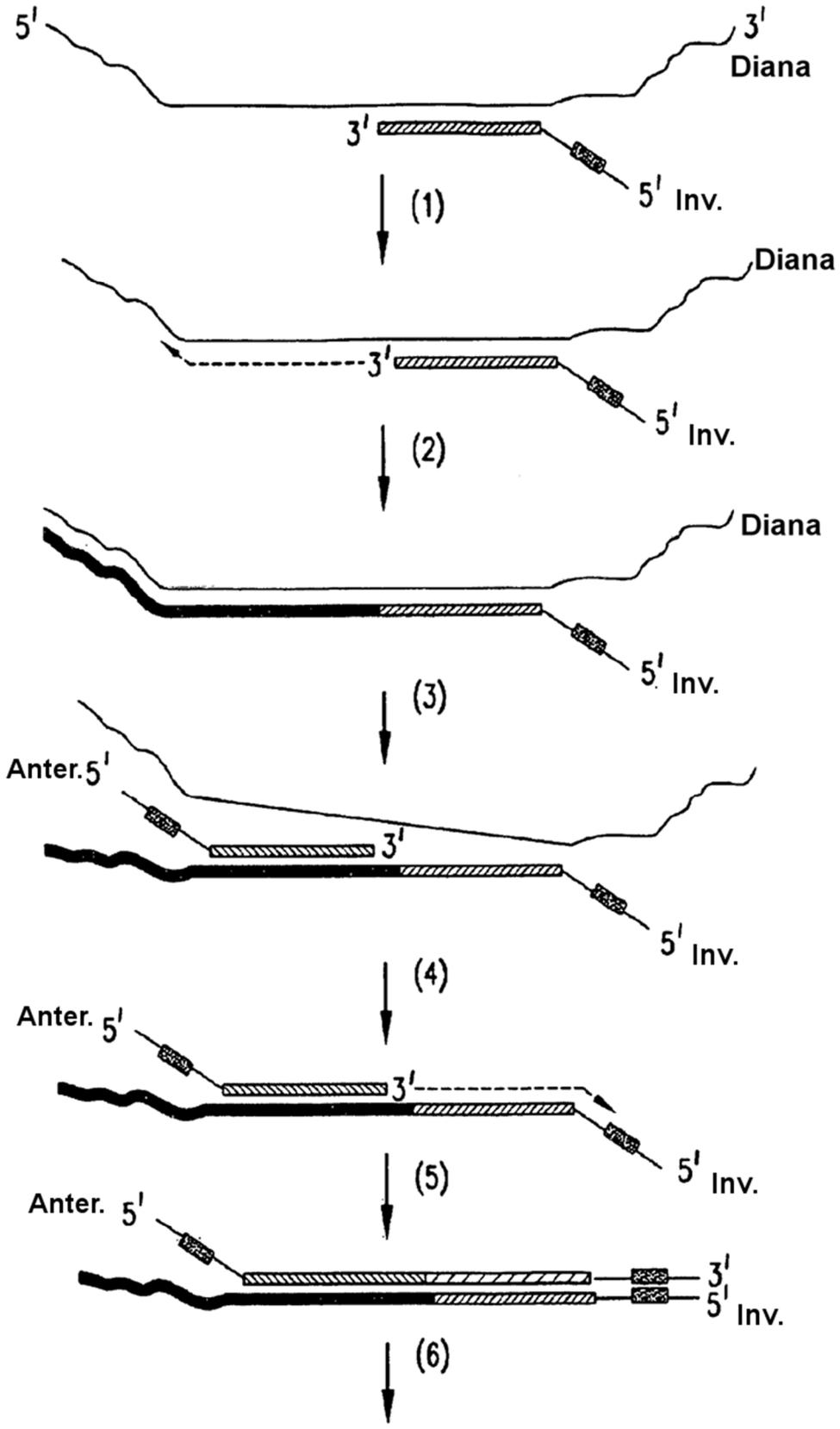


FIG.1A

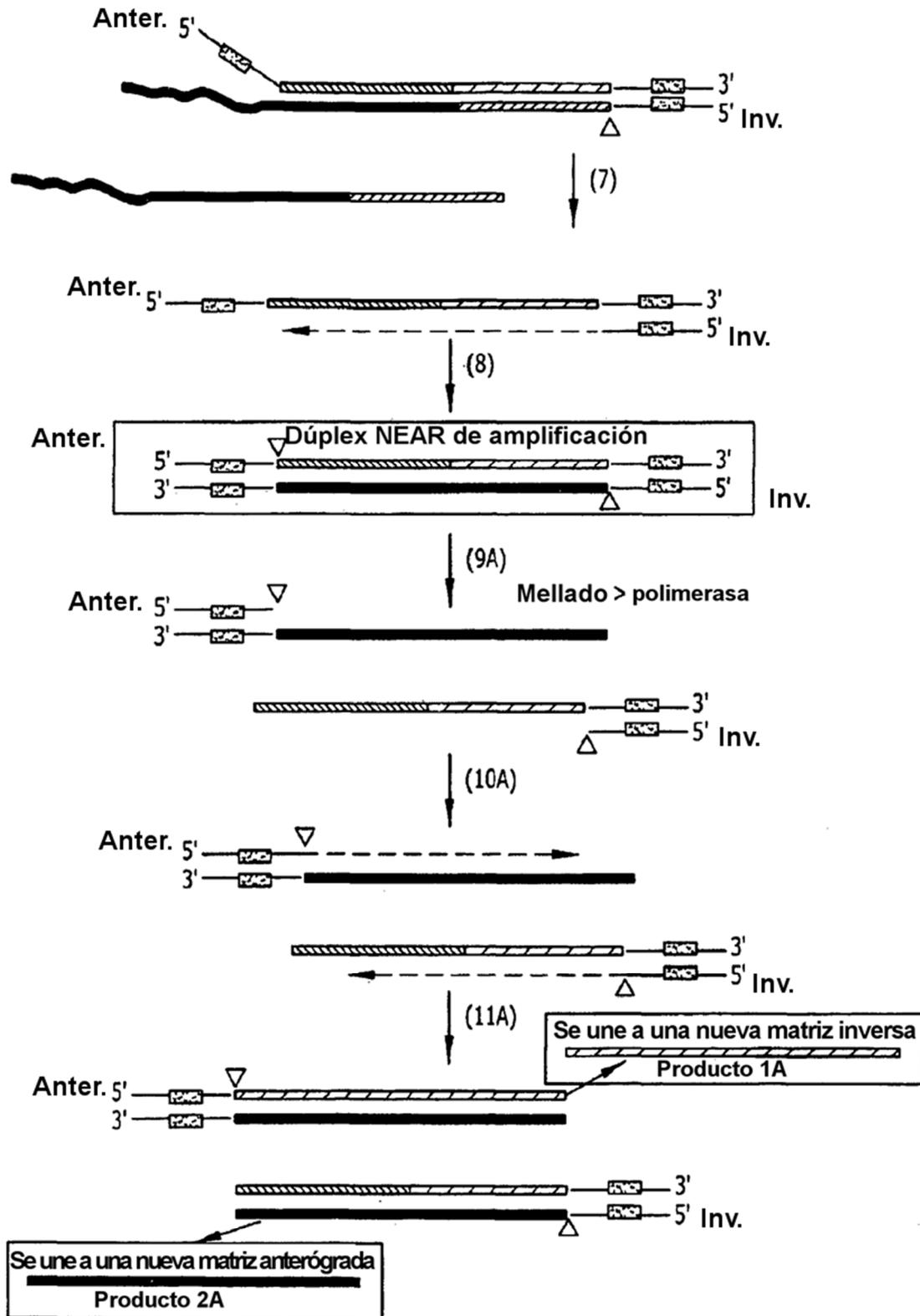


FIG. 1B

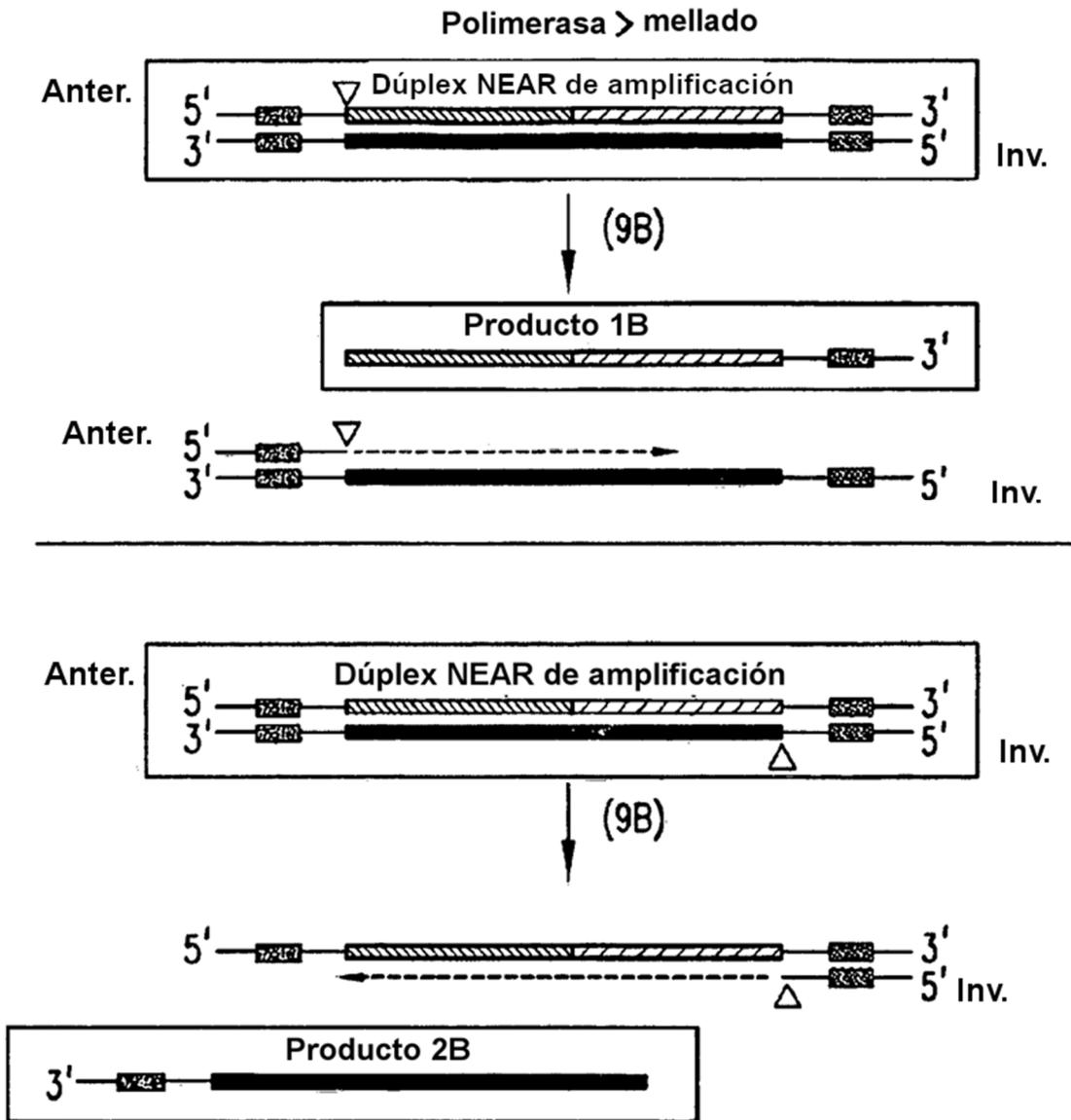


FIG.1C

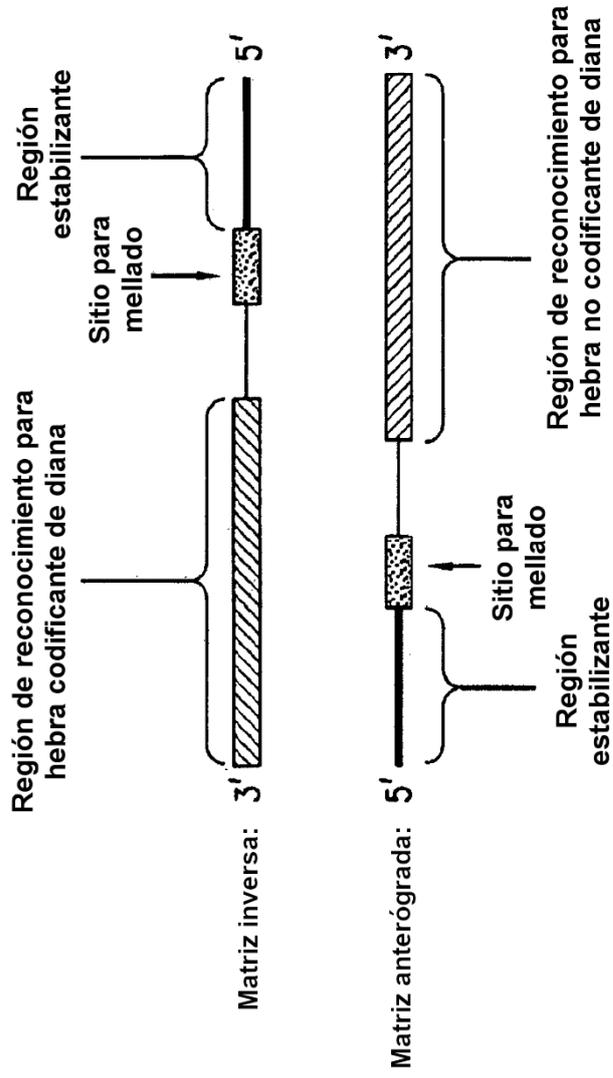


FIG.1D

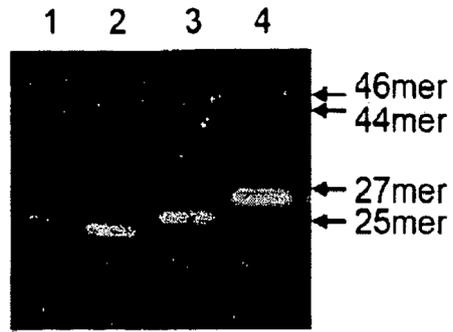


FIG.2

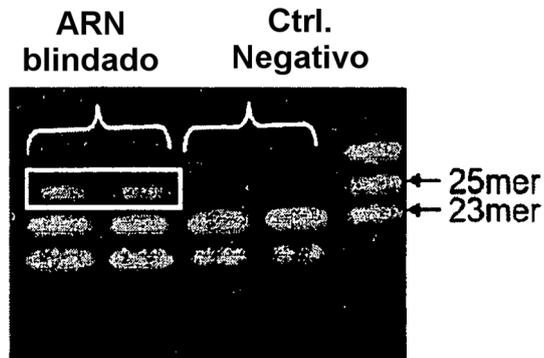


FIG.3

Frecuencia actuador 14706a

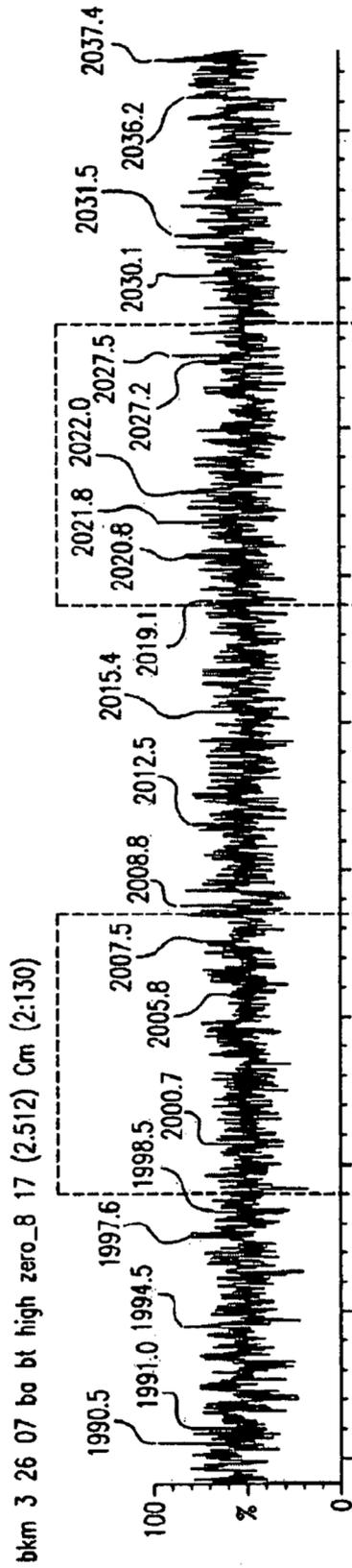


FIG. 4A

bkm 3 26 07 bo bt high zero_14_15 (2.475) Cm (3:131)

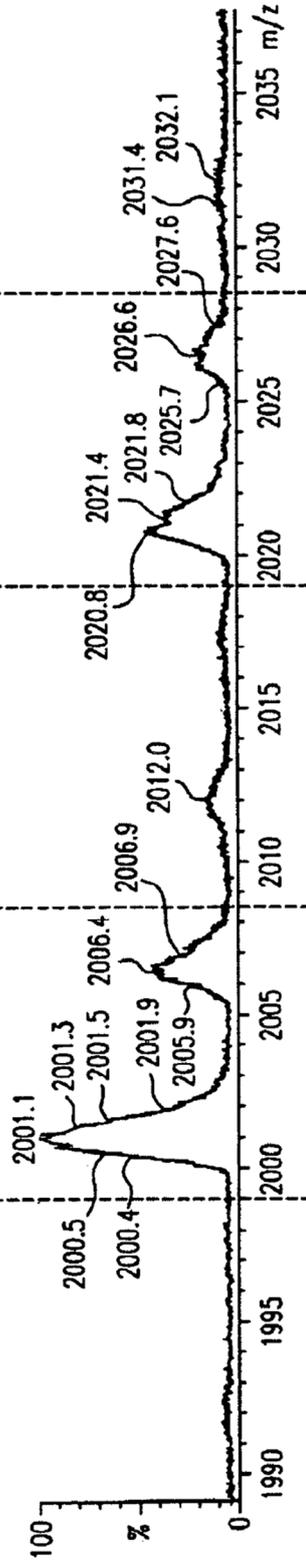
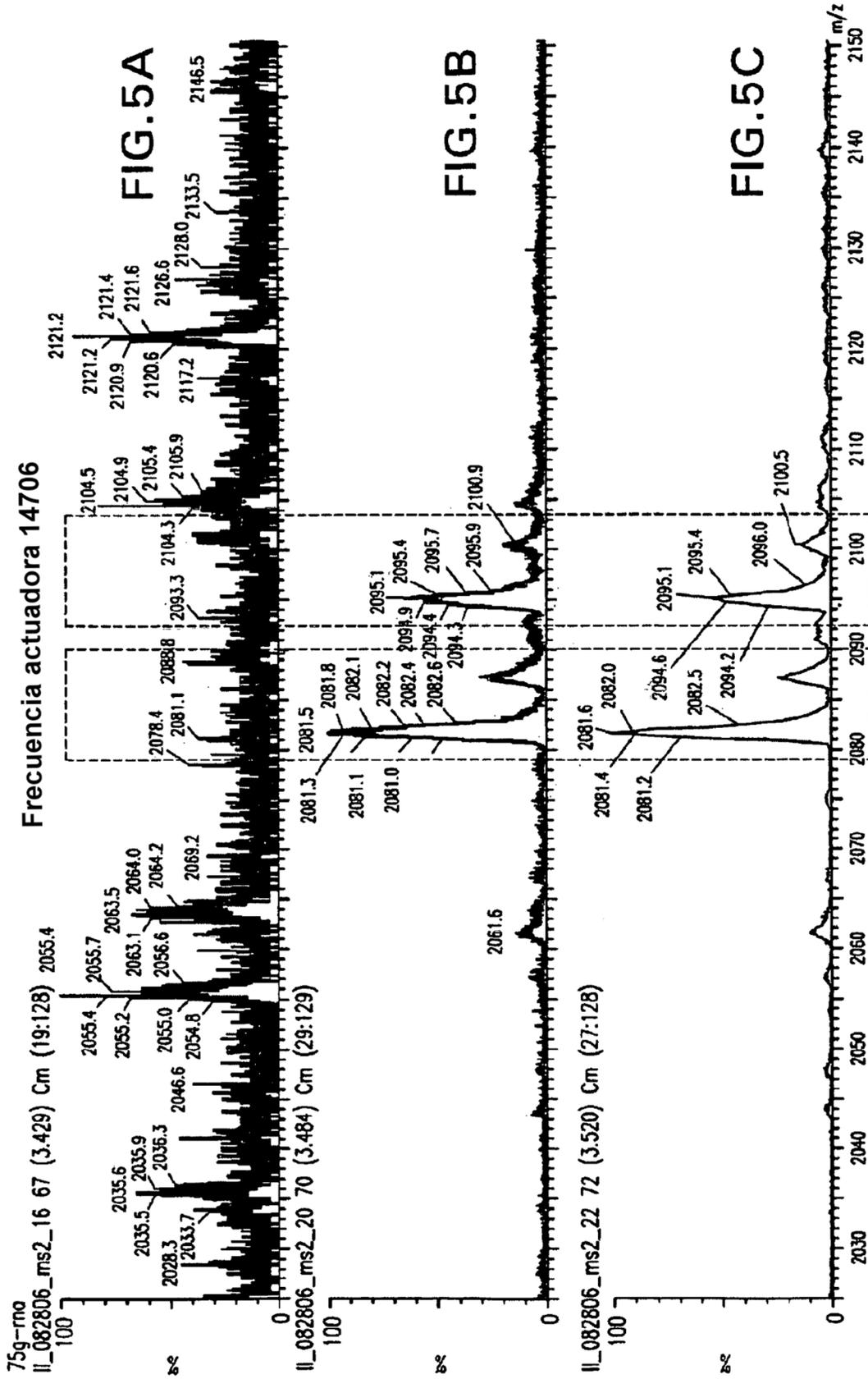


FIG. 4B



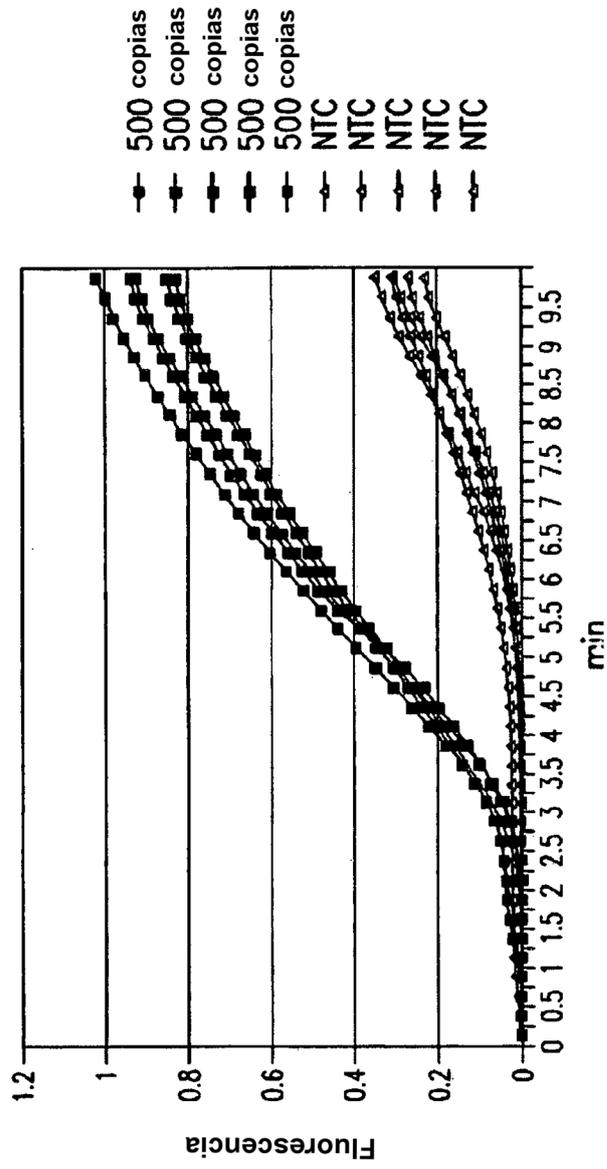


FIG.6

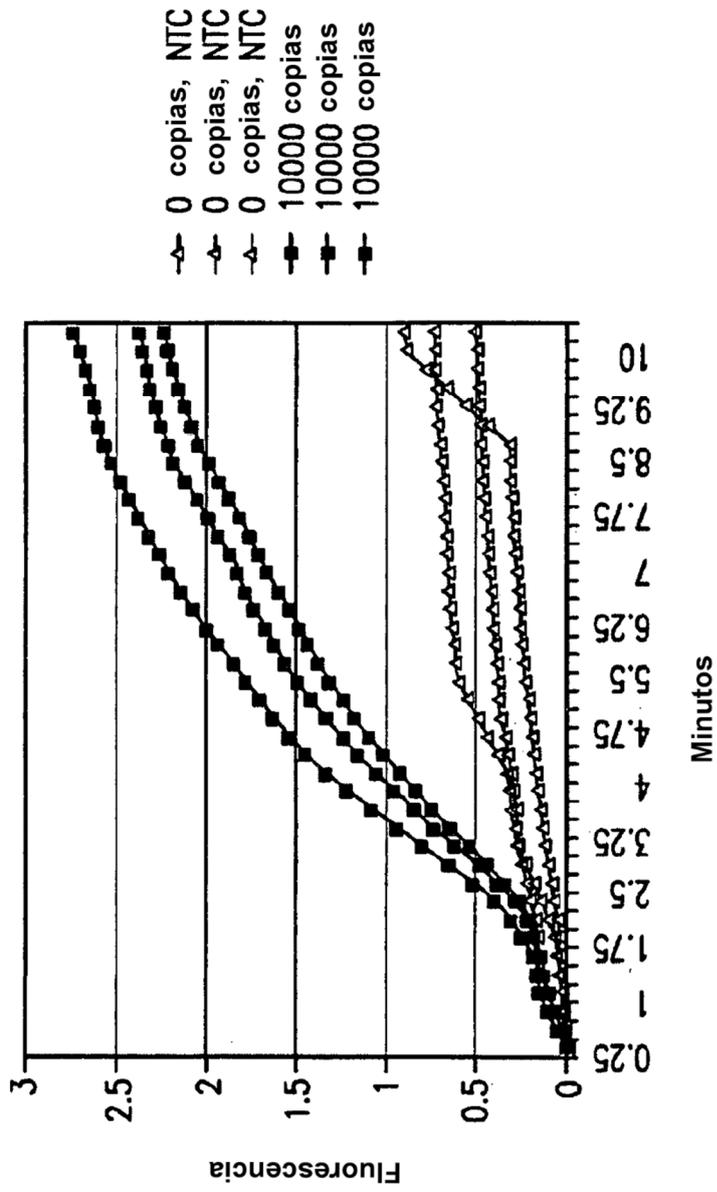


FIG.7

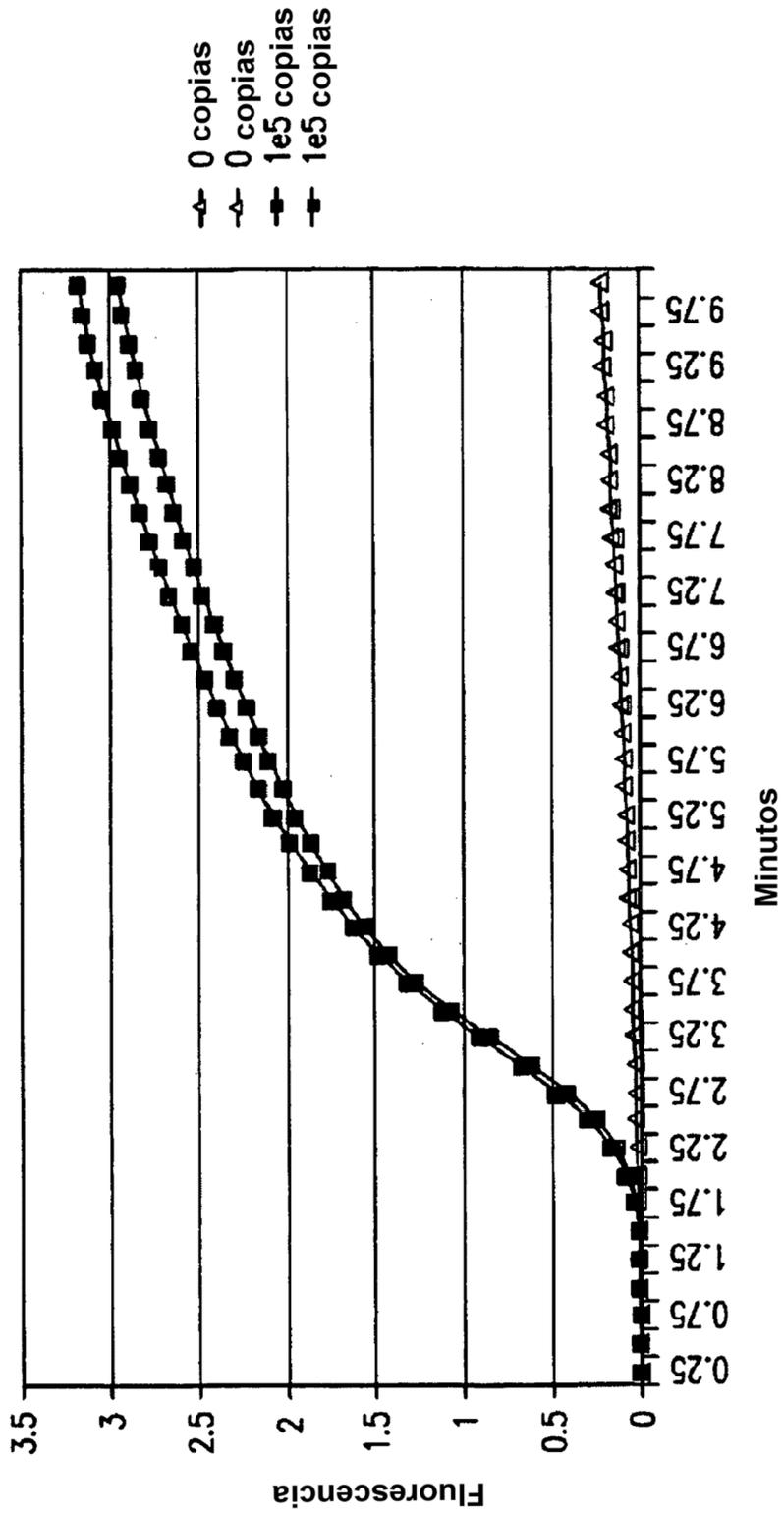


FIG.8

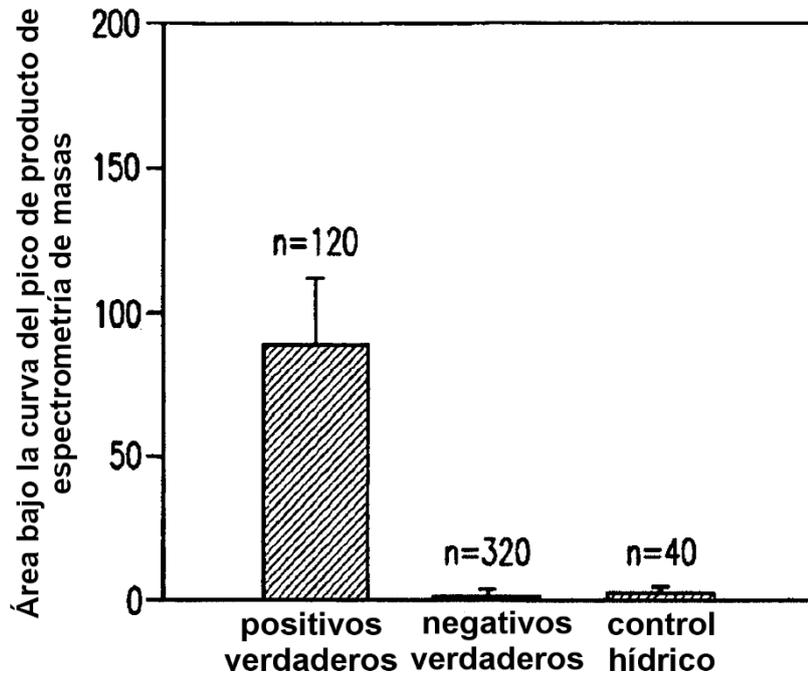


FIG.9

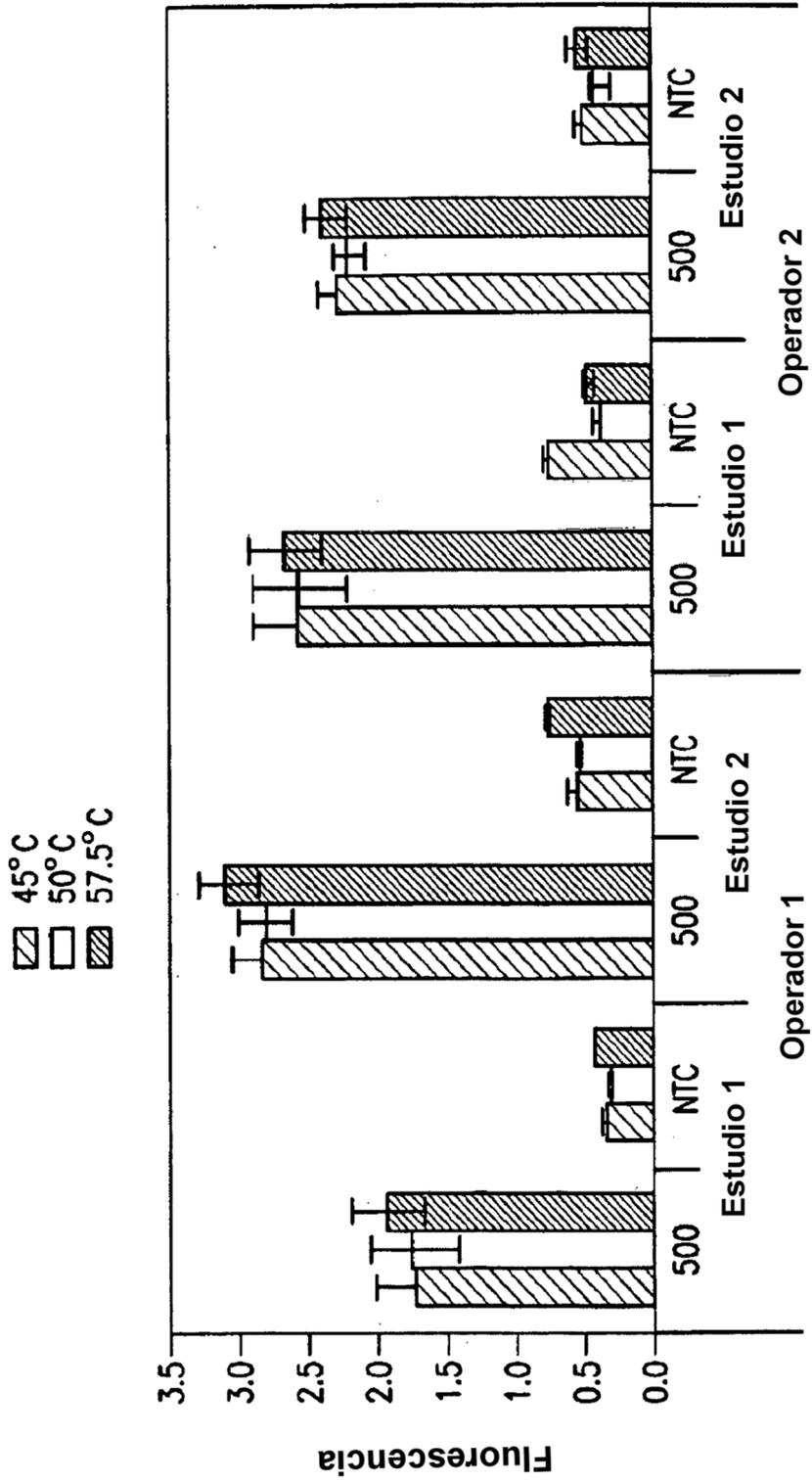


FIG.10

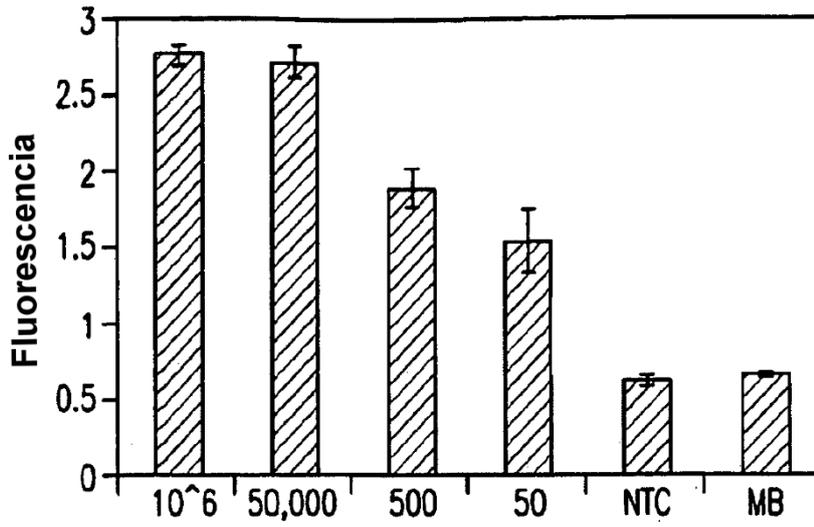


FIG.11

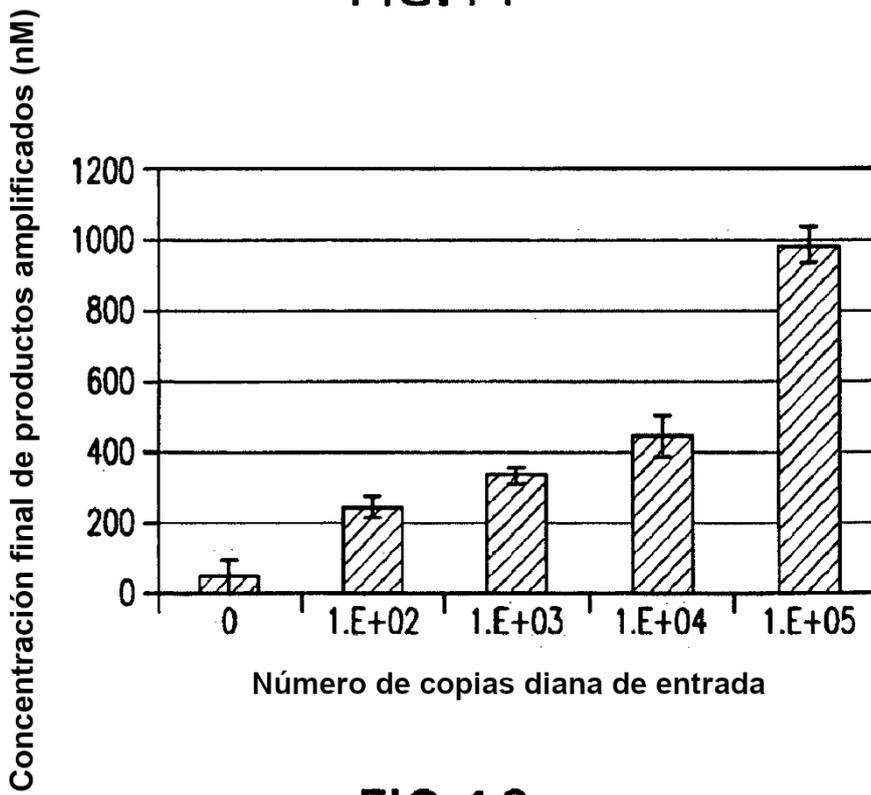


FIG.12

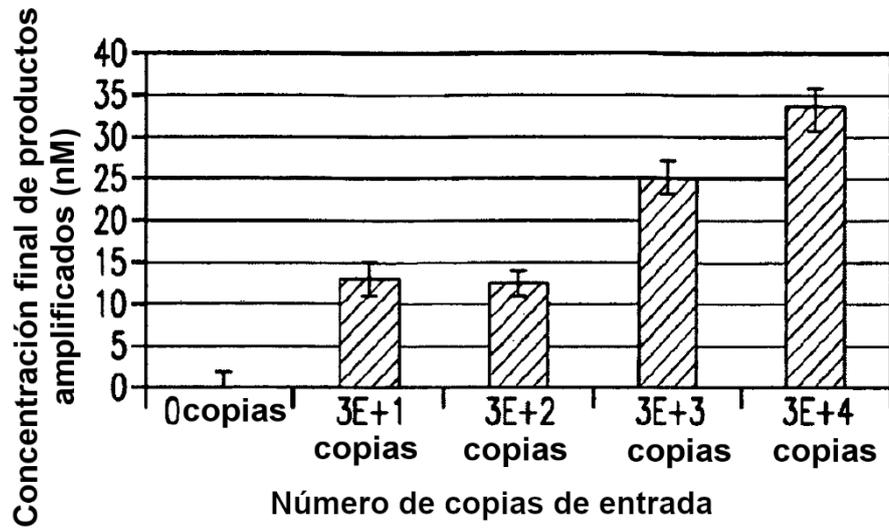


FIG. 13

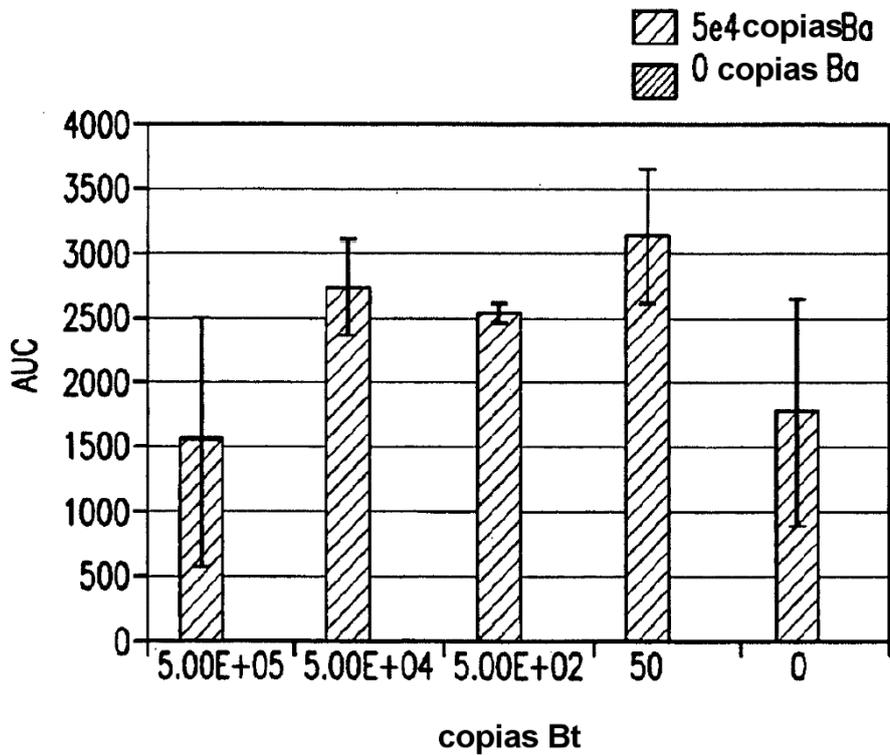


FIG. 14

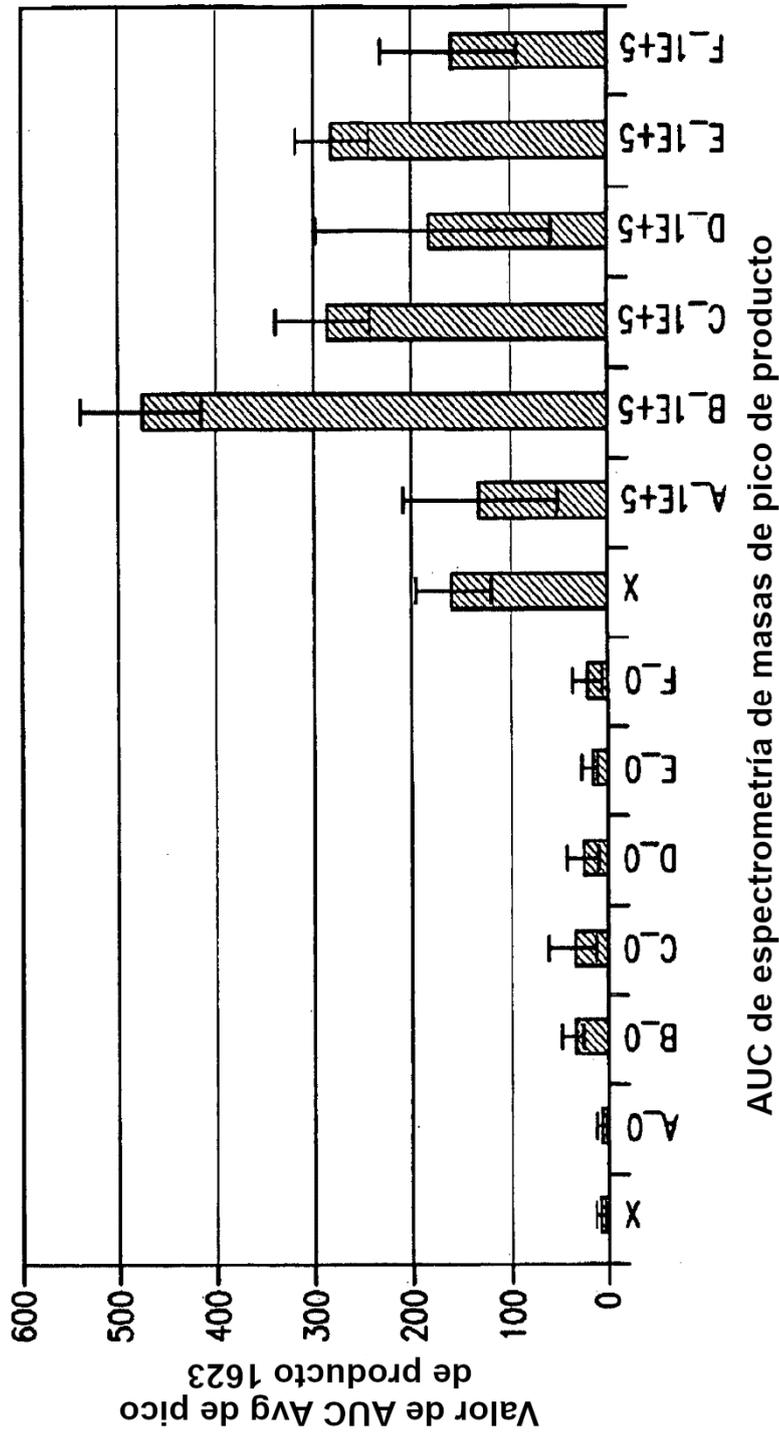


FIG.15

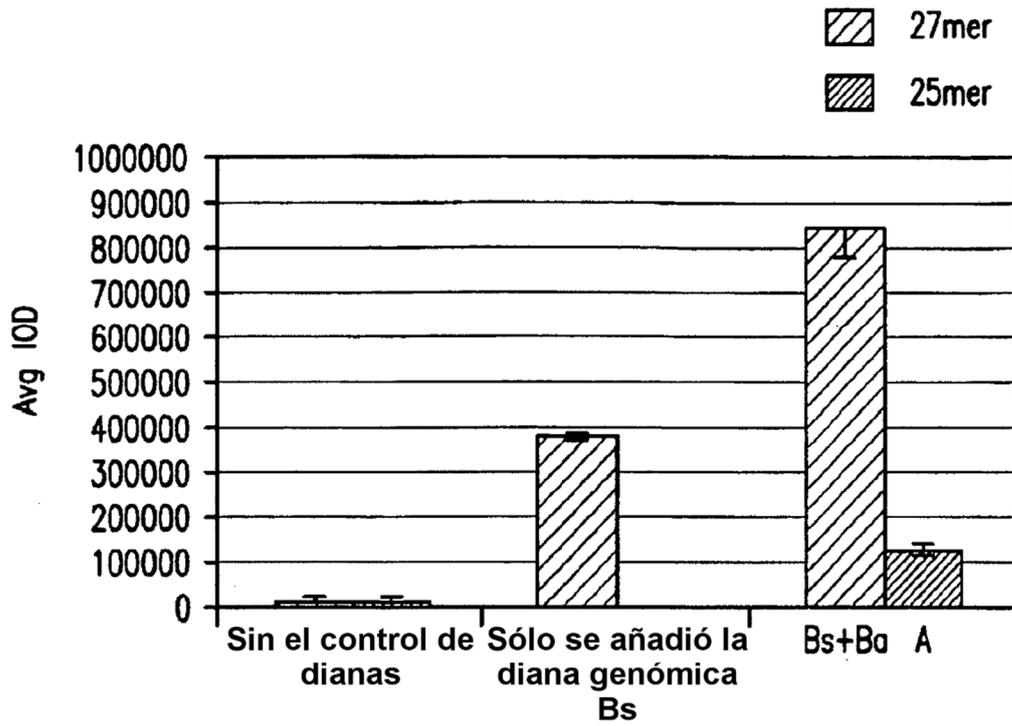


FIG.16

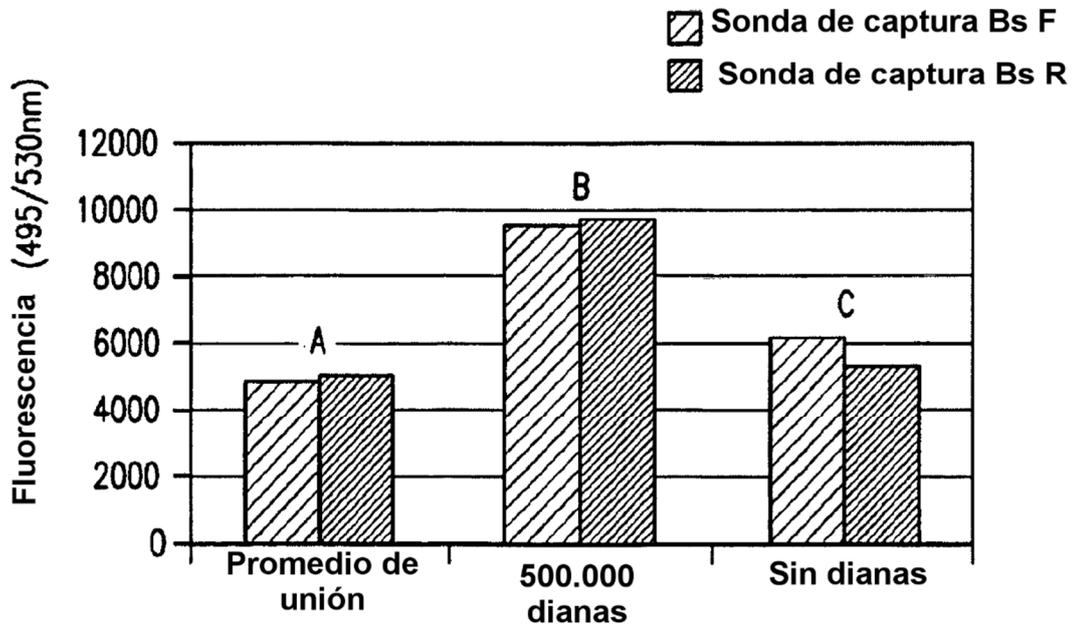


FIG.20

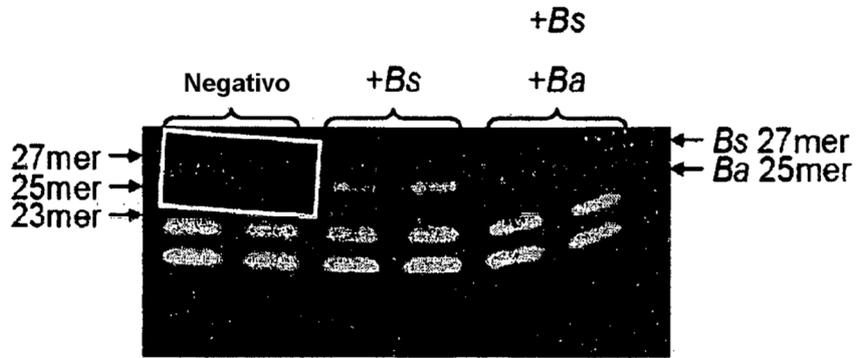


FIG.17

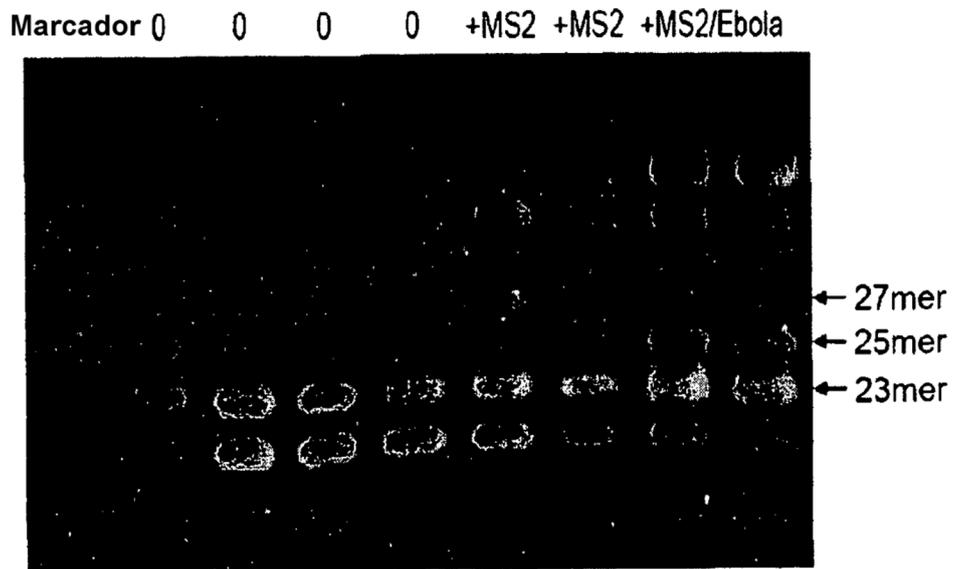


FIG. 18

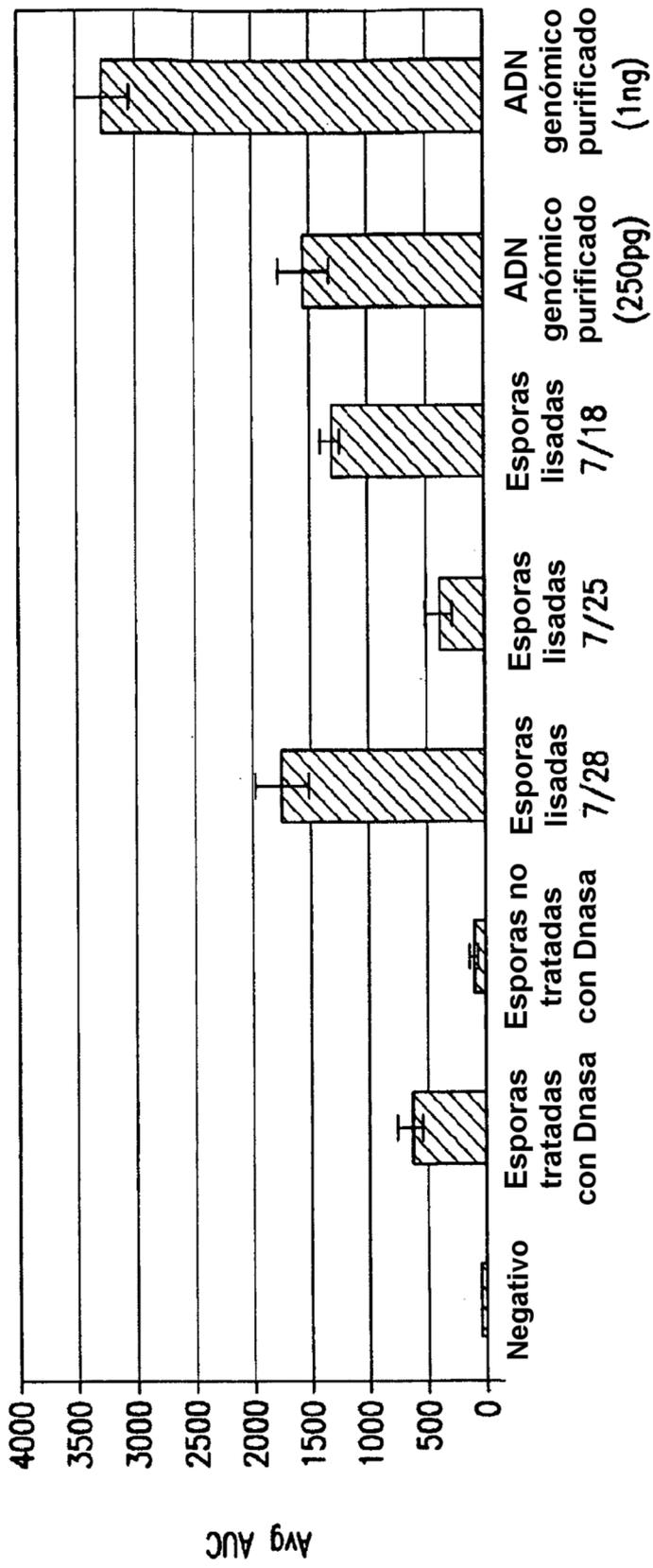


FIG.19

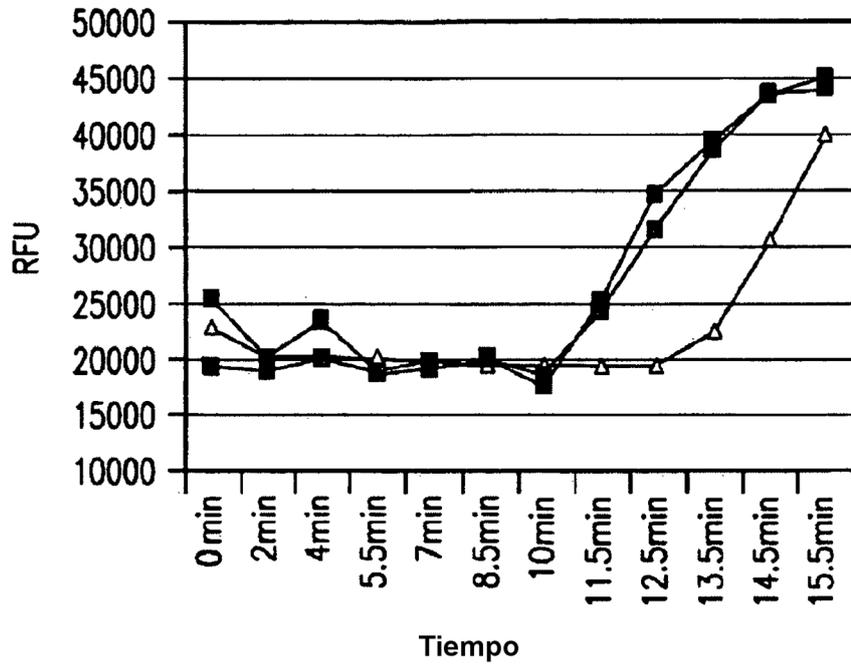


FIG.21

Ensayo de Chlamydia: LOD

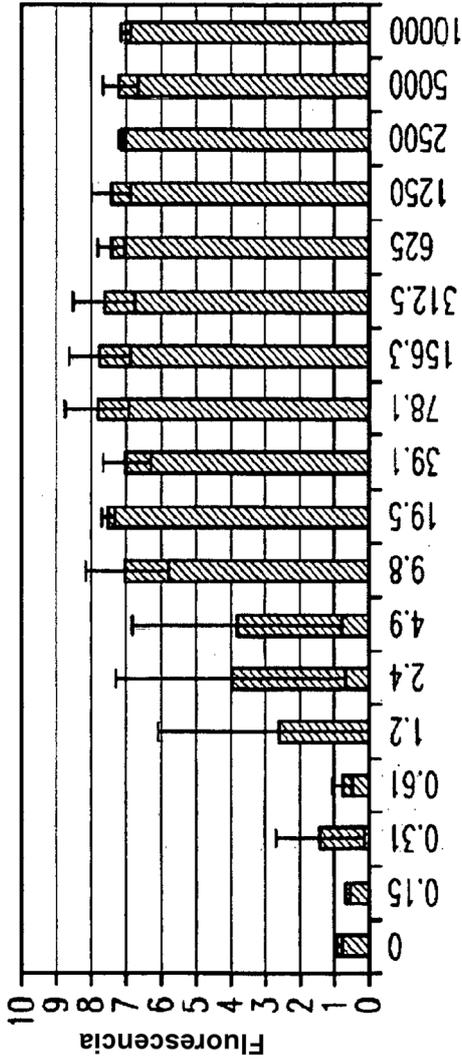


FIG.22A

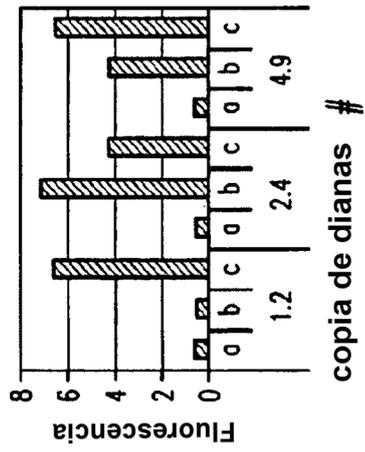
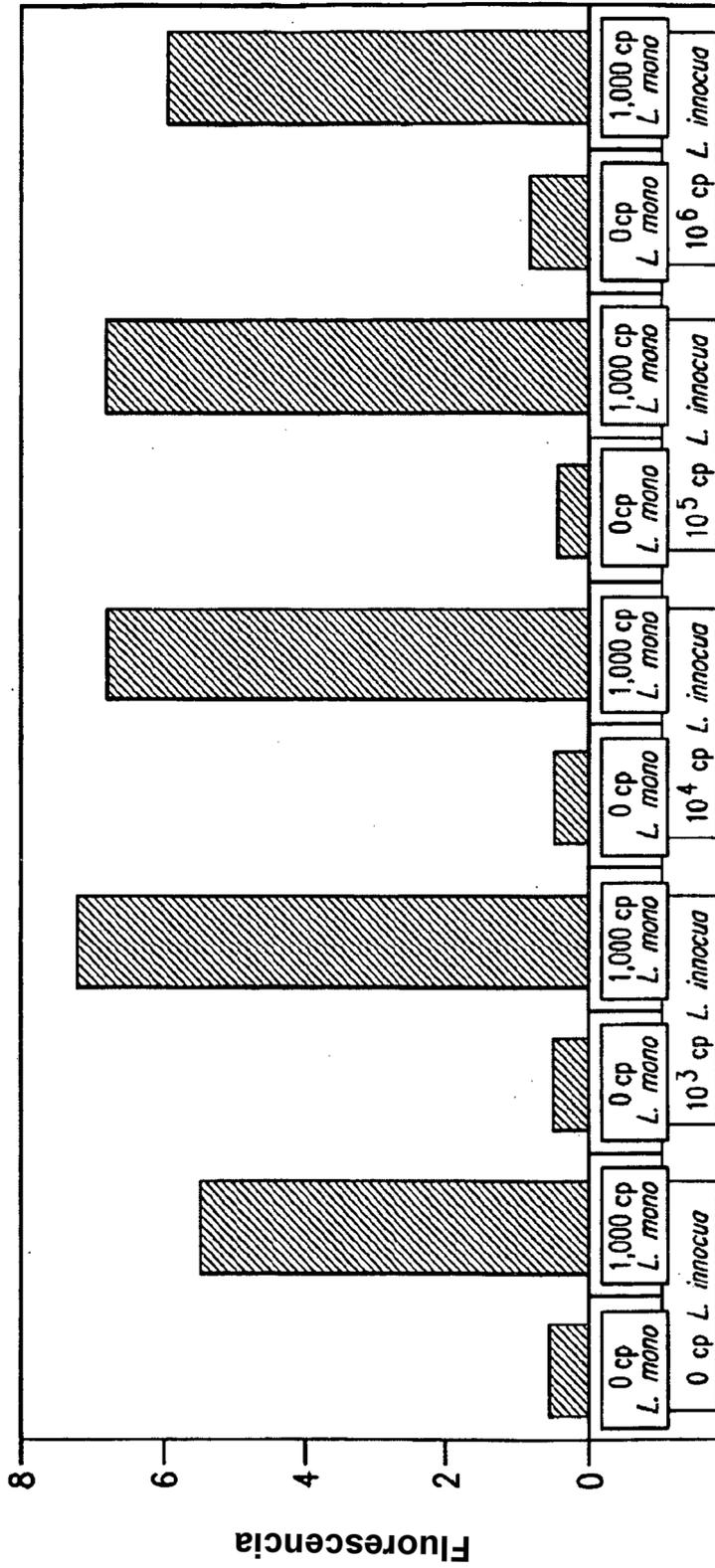


FIG.22B

Discriminación de *Listeria monocytogenes* de *L. innocua*



Copias de ADN genómico

Tiempo de reacción de 10 minutos

Promedio de duplicados

FIG.23

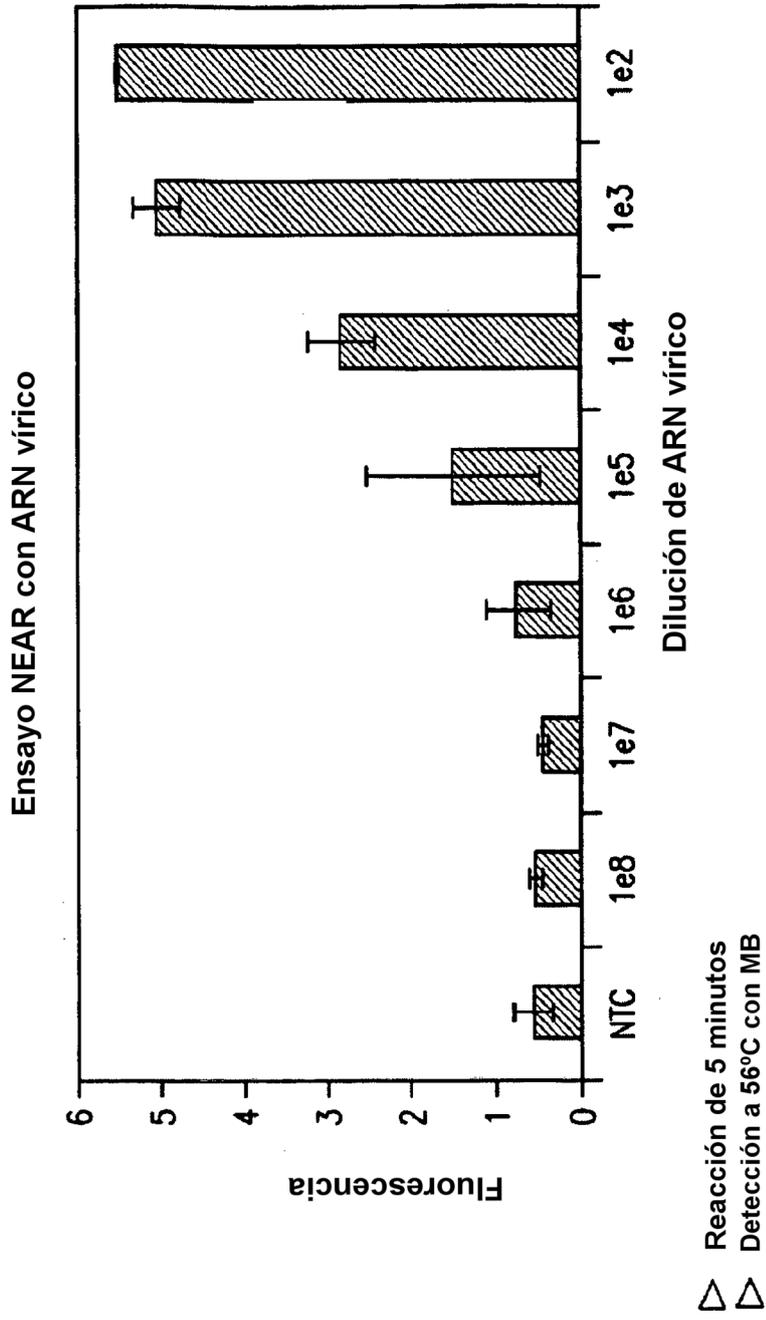


FIG.24

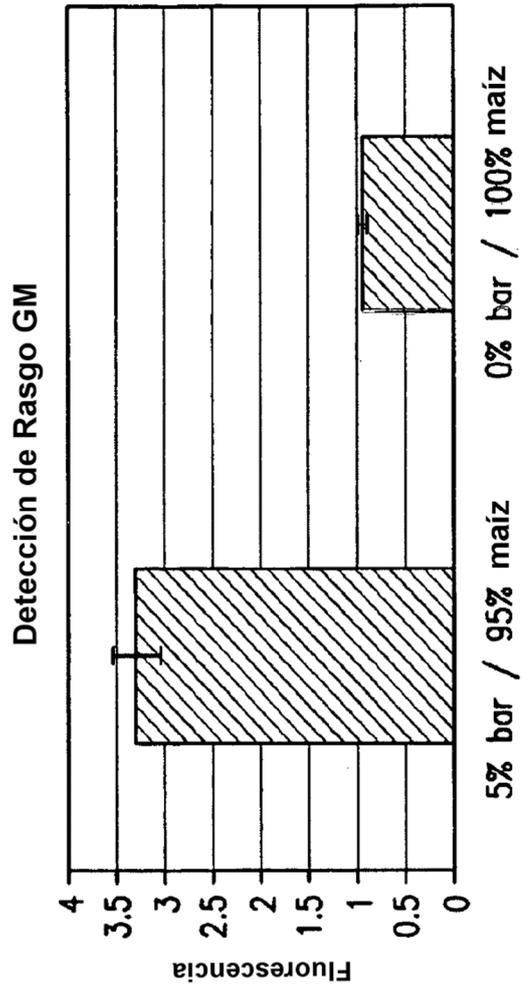
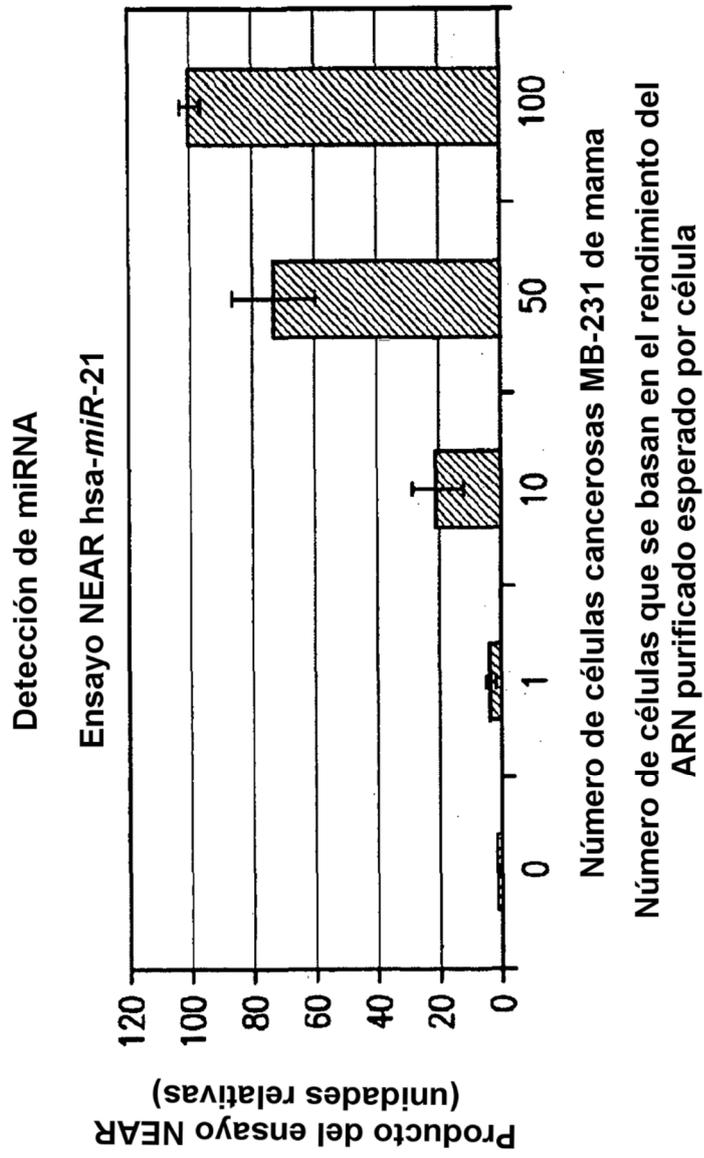


FIG.25



Ing ARN equivale aproximadamente a 100 células

FIG.26

Ensayo Gc: LOD

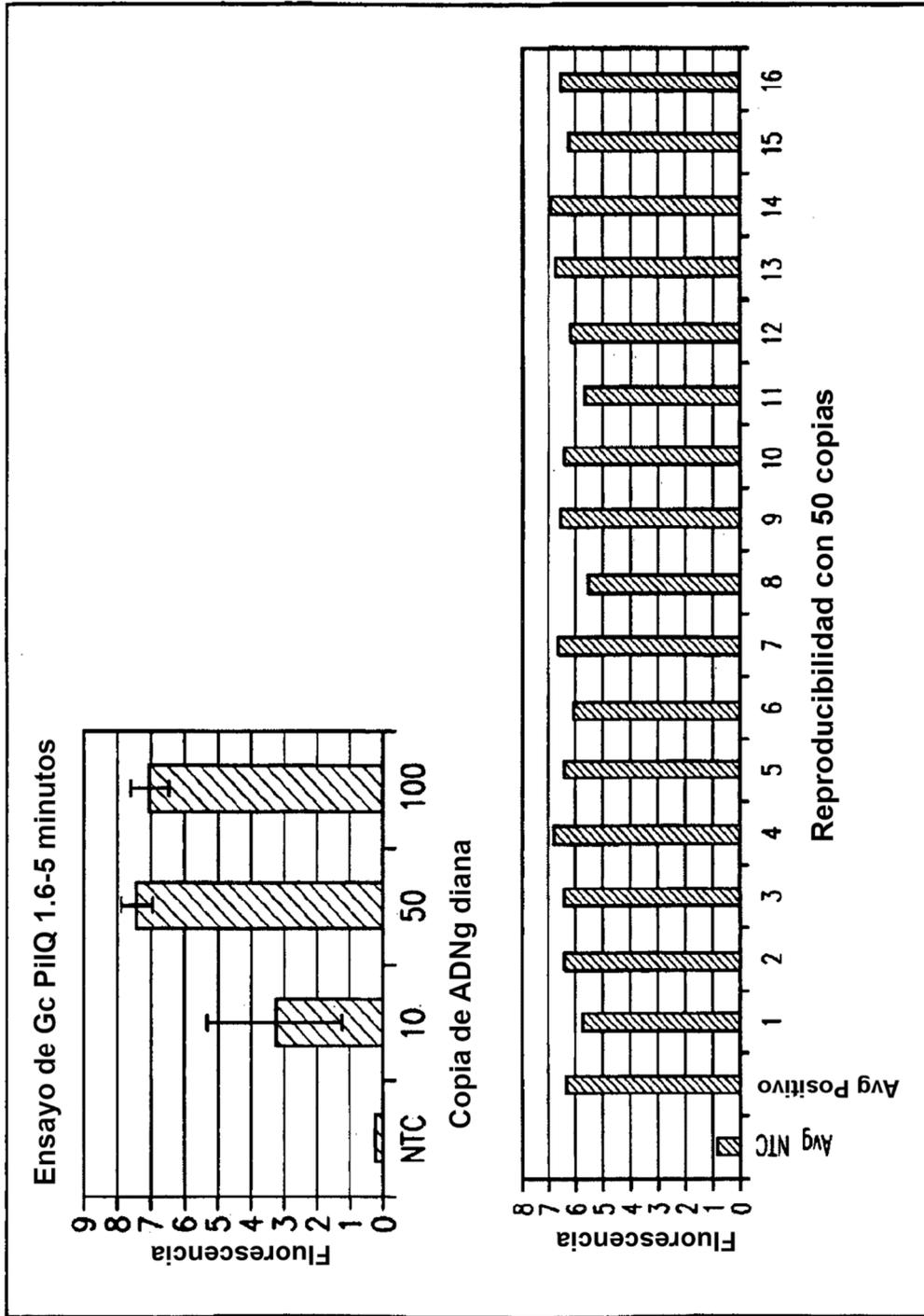


FIG.27

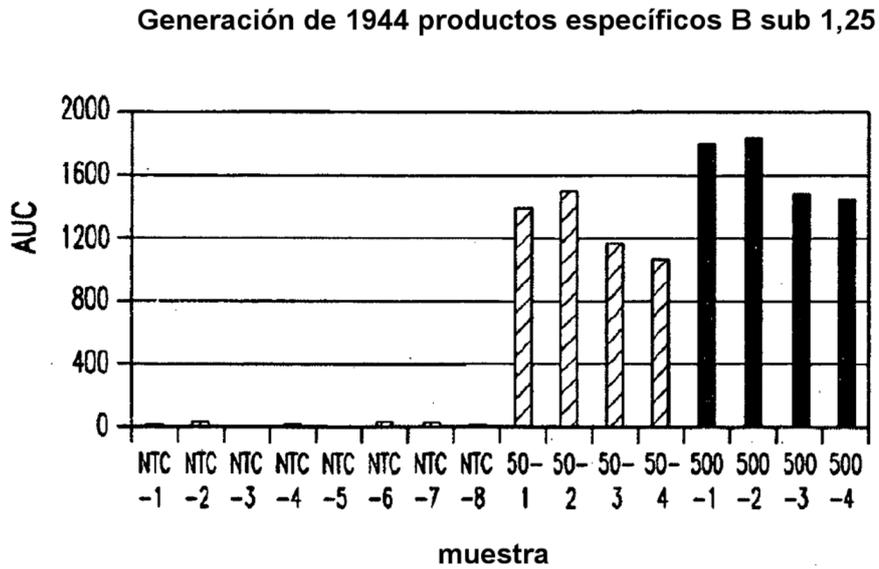
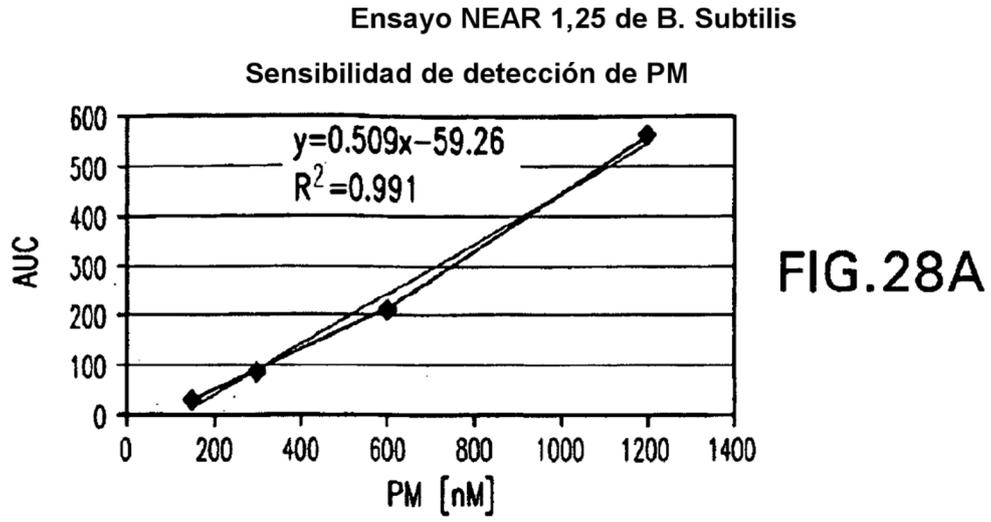


FIG.28B

| Rendimientos de 1994 productos específicos (x=y-b/m) | | |
|--|-----------|---------------|
| Muestra | Señal AUC | Producto [nM] |
| 50-1 | 1394 | 2851 |
| 50-2 | 1495 | 3049 |
| 50-3 | 1175 | 2421 |
| 50-4 | 1072 | 2219 |
| 500-1 | 1799 | 3645 |
| 500-2 | 1837 | 3720 |
| 500-3 | 1472 | 3004 |
| 500-4 | 1438 | 2937 |

FIG.28C

Ensayo Ct P2_2 NEAR - estudio de longitud del espaciador

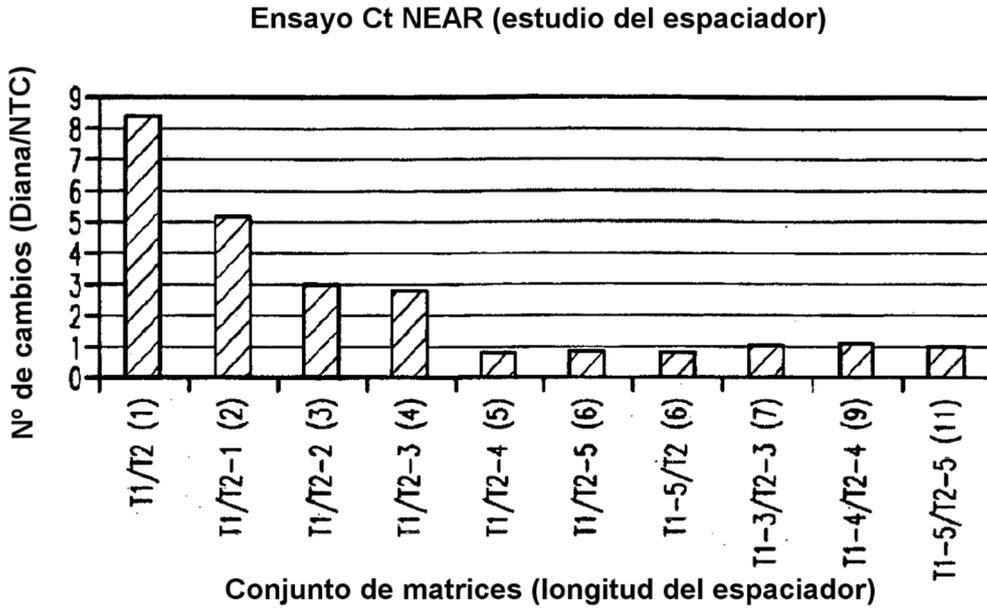


FIG. 29A

| | | |
|-------|----------|---------------------------------|
| Temp1 | 12mer | ATGCATGCATGAGTCACATAGGCTTATGGAG |
| Temp1 | -1 12mer | ATGCATGCATGAGTCACATgAGGCTTATGGA |
| Temp1 | -2 12mer | ATGCATGCATGAGTCACATagAGGCTTATGG |
| Temp1 | -3 12mer | ATGCATGCATGAGTCACAttagAGGCTTATG |
| Temp1 | -4 12mer | ATGCATGCATGAGTCACATttagAGGCTTAT |
| Temp1 | -5 12mer | ATGCATGCATGAGTCACATcttagAGGCTTA |
| Temp2 | 12mer | ATGCATGCATGAGTCACATTTATACCGCTTA |
| Temp2 | -1 12mer | ATGCATGCATGAGTCACATtTTATACCGCTT |
| Temp2 | -2 12mer | ATGCATGCATGAGTCACATtTTATACCGCT |
| Temp2 | -3 12mer | ATGCATGCATGAGTCACATgTTATACCGC |
| Temp2 | -4 12mer | ATGCATGCATGAGTCACATgtTTATACCG |
| Temp2 | -5 12mer | ATGCATGCATGAGTCACATatgtTTATACC |

FIG. 29B

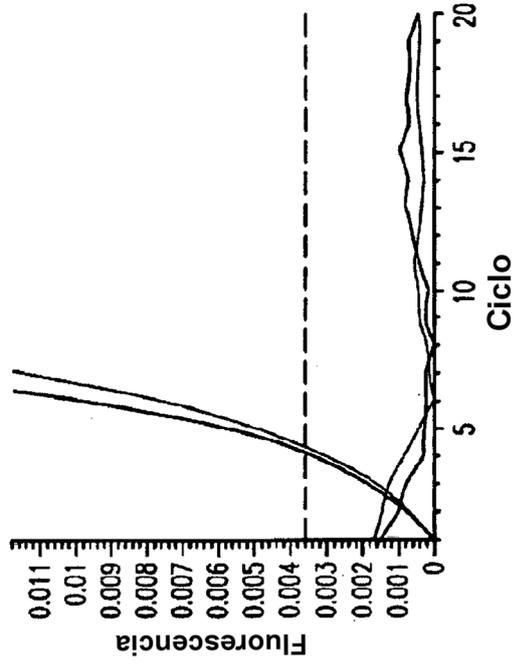
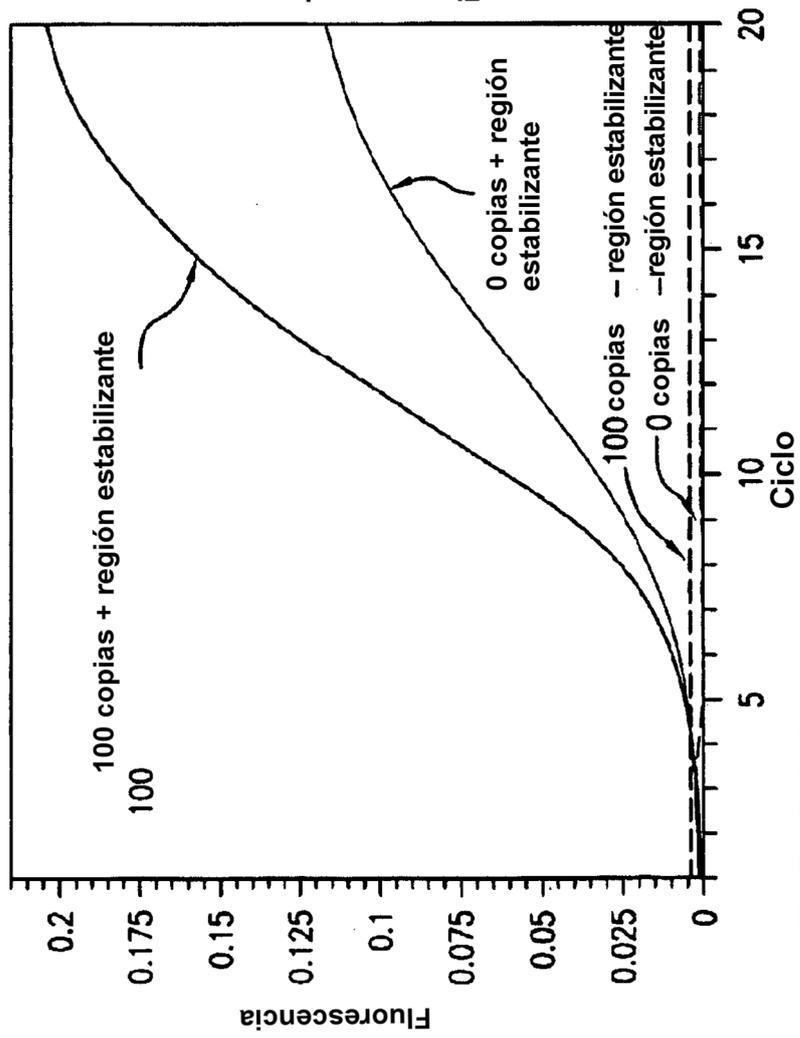
Ensayo Ct NEAR – Diseños de matrices para analizar el efecto de longitud del espaciador

| SEC ID | ORIENTACIÓN DE SECUENCIAS | SECUENCIA |
|-----------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| T2-5 | 3'/5' | CCATATTTtLgTATACACTGAGTACGTACGTA |
| T2-4 | 3'/5' | GCCATATTTtLgTACACTGAGTACGTACGTA |
| T2-3 | 3'/5' | CGCCATTTtLgTACACTGAGTACGTACGTA |
| T2-2 | 3'/5' | TGCCATATTTtTACACTGAGTACGTACGTA |
| T2-1 | 3'/5' | TTGCCATATTTTACACTGAGTACGTACGTA |
| T2 | 3'/5' | ATTGCCATATTTTACACTGAGTACGTACGTA |
| Diana codificante | 5'/3' | cttagAGGCTTATGGAGTTAAGCGGTATAAaacat |
| Diana no codificante | 3'/5' | gaatcTCCGAATACCTCAATTGCCATATTTtLgta |
| T1 | 5'/3' | ATGCATGCATGAGTCACATAGGCTTATGGAG |
| T1-1 | 5'/3' | ATGCATGCATGAGTCACATgAGGCTTATGGA |
| T1-2 | 5'/3' | ATGCATGCATGAGTCACATgAGGCTTATGG |
| T1-3 | 5'/3' | ATGCATGCATGAGTCACATLgAGGCTTATG |
| T1-4 | 5'/3' | ATGCATGCATGAGTCACATLtagAGGCTTAT |
| T1-5 | 5'/3' | ATGCATGCATGAGTCACATcLtagAGGCTTA |
| Ejemplo – Espaciador 11mer | | |
| T2-5 | 3'/5' | CCATATTTtLgTATACACTGAGTACGTACGTA |
| Diana codificante | 5'/3' | cttagAGGCTTATGGAGTTAAGCGGTATAAaacat |
| Diana no codificante | 3'/5' | gaatcTCCGAATACCTCAATTGCCATATTTtLgta |
| T1-5 | 5'/3' | ATGCATGCATGAGTCACATcLtagAGGCTTA |
| Producto (35mer) | 5'/3' | cttagAGGCTTATGGAGTTAAGCGGTATAAaacat |



FIG.30

Ensayo Ct NEAR – requerimiento para la “región estabilizante” de la matriz



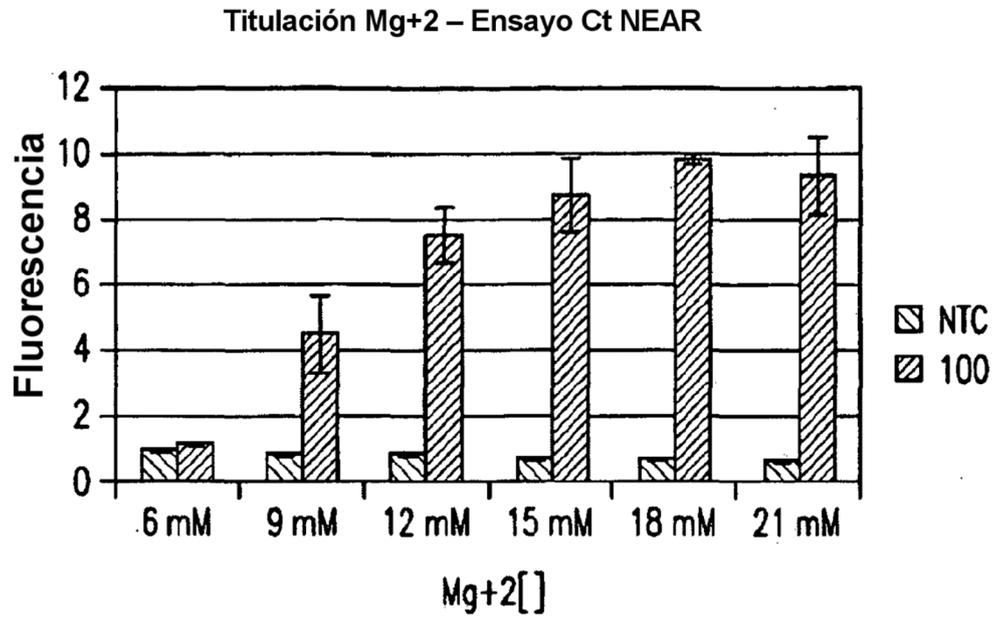


FIG.32A

| | | |
|--|------------------------------|-----------|
| Ensayo ID | Ct Ps_2 | |
| Diana | <i>Chlamydia trachomatis</i> | |
| | sintético | |
| MB ID/[nM] | MB5.18/400 | |
| Proporción de matrices [nM] | 200:100 | |
| Replicados | 2 | |
| Fecha del experimento | 1/14/2008 | |
| Etapa | Tiempo(min) | Temp (°C) |
| Reacción | 5 | 56 |
| Inactivación enzimática | 2 | 80 |
| Lectura | 1 | 56 |
| Comentarios: Se utilizó un tampón interno en 50 mM Tris-HCl, pH 8,6, 1 mM DTT, 0,1% Tx – 100 | | |

FIG.32B

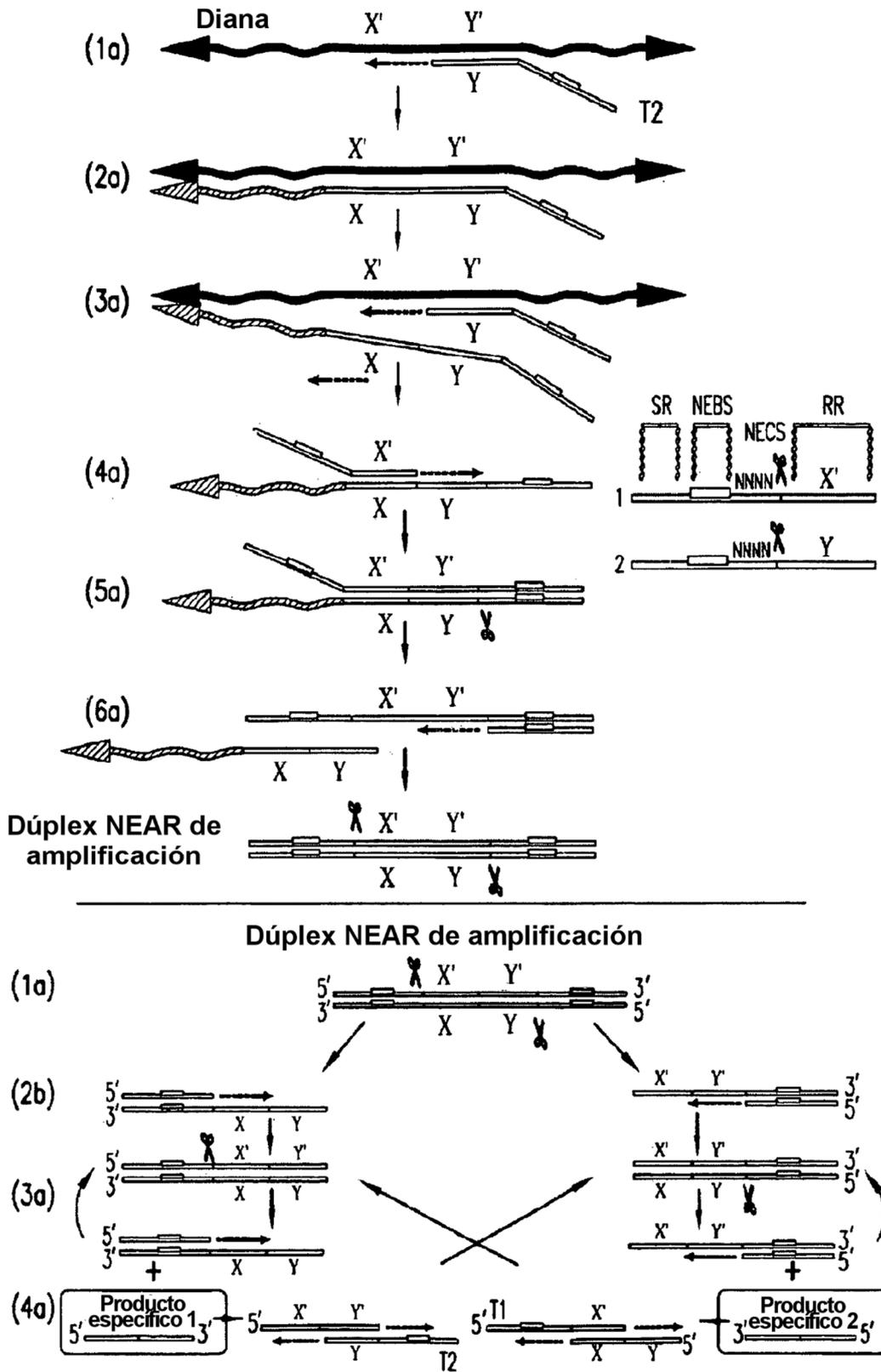


FIG.33

| Organismo diana | Diana | Genoma | Ensayo |
|--|-----------|--------|----------------------|
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | Bacteria | ADN | P2_2 |
| <i>C. trachomatis</i> | Bacteria | ARN | P2_2 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | Bacteria | ADN | 16S-4 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> | Bacteria | ADN | pilQ 1.6 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | Bacteria | ADN | ITS.23s.5s.A.F/R1.12 |
| Enterovirus | Virus | ARN | F8/R9.11 |
| <i>Clostridium difficile</i> | Bacteria | ADN | TcdB F24/R25 |
| <i>C. difficile</i> | Bacteria | ADN | TcdB F25/R25 |
| <i>C. difficile</i> | Bacteria | ADN | TcdB F24/R24 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Bacteria | ADN | Lmono 579 |
| Virus de la glosopeda | Virus | ARN | F1.2/R1.2 |
| Virus de la glosopeda | Virus | ARN | F1.7/R1.7 |
| MiARN humano | Eucariota | ARN | miRNA 21 |
| MiARN humano | Eucariota | ARN | miRNA 335 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Bacteria | ADN | ppsA 1.25 |
| <i>B. subtilis</i> | Bacteria | ARN | ppsA 1.25 |
| Adenovirus 5 | Virus | ADN | E1A 1.11 |
| <i>S. aureus</i> resistente a meticilina | Bacteria | ADN | mecA 1359 |
| MRSA | Bacteria | ADN | mecA 1520 |
| MRSA | Bacteria | ADN | SA_nuc 355 |
| MRSA | Bacteria | ADN | SA_nuc 368 |
| MRSA | Bacteria | ADN | SA_nuc 662 |
| <i>Salmonella</i> spp | Bacteria | ADN | spaO 4 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Bacteria | ADN | A.ba.gyrB.A.12.F9/R9 |
| <i>Escherichia coli</i> | Bacteria | ADN | Ecoli 4.F/R |

FIG.34A

| Matrix (5'-3') | Matrix (5'-3') | Matrix (5'-3') |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| ATGCATGCATGAGTCACATAGGCTTATGGAG | ATGCATGCATGAGTCACACATTTATACCGTTA | AGCCTTATGGAGTTAAGCGGTATAA |
| ATGCATGCATGAGTCACATAGGCTTATGGAG | ATGCATGCATGAGTCACATTTATACCGTTA | AGCCTTATGGAGTTAAGCGGTATAA |
| ATGCATGCATGAGTCACATCGCATAGCTTT | ATGCATGCATGAGTCACATCGCTTTCCCT | CGCATACGCTTGAGAGGGAAGCAGG |
| ATGCATGCATGAGTCACATTTTGGAGTCC | ATGCATGCATGAGTCACATCTACCAACA | ACTTACCACACGGAACCAAAAA |
| ATGCATGCATGAGTCACATAAACAACCTCGC | ATGCATGCATGAGTCACATAAGCGATGGT | AAACAACCTCGCAACACATCCGTT |
| ATGCATGCATGAGTCACATCGACTACTTTGG | ATGCATGCATGAGTCACATGAACACGGAC | CGACTACTTTGGGTCCCGTGTTTC |
| ATGCATGCATGAGTCACATAGAACTGGAGA | ATGCATGCATGAGTCACATCTACAATAATAG | AGAACTGGAGAACTATATTTGTAG |
| ATGCATGCATGAGTCACATGAACCTGGAGAA | ATGCATGCATGAGTCACATCTACAATAATAG | GAAACTGSAGAACTATATTTGTAG |
| ATGCATGCATGAGTCACATAGAACTGGAG | ATGCATGCATGAGTCACATCAATAATAGAT | AGAACTGGAGAACTATATTTGT |
| ATGCATGCATGAGTCACATAAAGCAAGAGAA | ATGCATGCATGAGTCACATATACCGATAAC | AAAGCAAGAGAAAGTTATCGTGAT |
| ATGCATGCATGAGTCACATAGGCTAAGGATG | ATGCATGCATGAGTCACATGGTACCTGAAGG | AGGCTAAGGATGCCCTTCAGGTACC |
| ATGCATGCATGAGTCACATGCCCTTCAGGTA | ATGCATGCATGAGTCACATGTTACCTCGGG | GCCCTTCAGGTACCCCGAGGTAACA |
| ATGCATGCATGAGTCACATTAGCTTATCA | ATGCATGCATGAGTCACATTCACATCAG | UAGCUUUCAGACUCUGAUGUUGA |
| ATGCATGCATGAGTCACATTCAGAGCAA | ATGCATGCATGAGTCACATACATTTTTCGT | UCAAGAGCAAUUACGAAAAUUGU |
| ATGCATGCATGAGTCACATCCAAAGCTCAAAA | ATGCATGCATGAGTCACATTTCAAGATTCCCT | CCAAGCTCAAAAAAGGAAATCGTGAA |
| ATGCATGCATGAGTCACATCCAAAGCTCAAAA | ATGCATGCATGAGTCACATTTCAAGATTCCCT | CCAAGCTCAAAAAAGGAAATCGTGAA |
| ATGCATGCATGAGTCACATCAAGACCTACC | ATGCATGCATGAGTCACATTTTAGGACGGC | CAAGACCTACCCCGCTCCATAAA |
| ATGCATGCATGAGTCACATCGGTTTAAAGTG | ATGCATGCATGAGTCACATGATACCTTCGTT | GATACCTTCGTTCCACTTAAAAACCG |
| ATGCATGCATGAGTCACATGCCAAATCCACA | ATGCATGCATGAGTCACATTAGACGAAACA | GCCAAATCCACATTTGTTGGGCTTA |
| ATGCATGCATGAGTCACATGATACACCTGAA | ATGCATGCATGAGTCACATTAGGATGCTTTG | GATACACCTGAAACAAGGATCCTTA |
| ATGCATGCATGAGTCACATCAAAAGCATCCTA | ATGCATGCATGAGTCACATCTACACCTTTT | CAAAGCATCCTAAAAAGGTTG TAGA |
| ATGCATGCATGAGTCACATAGACAAACGCTG | ATGCATGCATGAGTCACATTAATGACCTGAA | AAGACAACCTGATTCAGGTCATAA |
| ATGCATGCATGAGTCACATGAAATGACCTAA | ATGCATGCATGAGTCACATCAGCGA AAAA | GAATGACCTAACTTTTTCCCGTAG |
| ATGCATGCATGAGTCACATAAATTCGCTCT | ATGCATGCATGAGTCACATTTTCTTTGCTCT | AAATTCGCTCTCAGACAAAAAGAAA |
| ATGCATGCATGAGTCACATAGTTTGGACTGT | ATGCATGCATGAGTCACATGTTAAGCAGGAA | AGTTTGGACTGTTTTCTCTGCTTAAC |

FIG. 34B