

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 650**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12M 1/00 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12Q 1/6851 (2008.01)

C12Q 1/6818 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2016 PCT/JP2016/074976**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2017 WO17038682**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2016 E 16841714 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 3339447**

54 Título: **Método para analizar ácido nucleico molde, método para analizar sustancia objetivo, kit de análisis para ácido nucleico molde o sustancia objetivo y analizador para ácido nucleico molde o sustancia objetivo**

30 Prioridad:

28.08.2015 JP 2015169833

13.05.2016 JP 2016096998

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

27.04.2021

73 Titular/es:

**KABUSHIKI KAISHA DNAFORM (100.0%)
75-1, Ono-cho, Tsurumi-ku
Yokohama-shi, Kanagawa 230-0046, JP**

72 Inventor/es:

**TANAKA, YUJI;
HAYASHIZAKI, YOSHIHIDE y
TSUJIMARU, KOICHIRO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 821 650 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para analizar ácido nucleico molde, método para analizar sustancia objetivo, kit de análisis para ácido nucleico molde o sustancia objetivo y analizador para ácido nucleico molde o sustancia objetivo

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para analizar un ácido nucleico molde, un método para analizar una sustancia objetivo, un kit de análisis para un ácido nucleico molde o una sustancia objetivo y un analizador para un ácido nucleico molde o una sustancia objetivo.

10

Antecedentes de la técnica

En el análisis génico, se usa ampliamente un método de análisis que utiliza la amplificación de un ácido nucleico molde usando un cebador y la detección del producto amplificado o la detección de la hibridación entre el producto amplificado obtenido y una sonda. En el análisis, se usa una sonda que detecta la reacción de amplificación de un ácido nucleico molde, una sustancia que se intercala en el producto amplificado, una sonda que genera o interrumpe la fluorescencia mediante hibridación con el producto amplificado y similares. Este método puede conseguir, por ejemplo, el análisis de la presencia o ausencia de una secuencia objetivo (análisis cualitativo), el análisis de la cantidad de la secuencia objetivo (análisis cuantitativo), el tipado de un sitio de polimorfismo en la secuencia objetivo y similares. El tipado puede determinar, por ejemplo, el tipo de la base (por ejemplo, tipo silvestre o tipo mutante) del sitio de polimorfismo, el genotipo (homocigótico o heterocigótico) y similares.

15

20

En el análisis génico usando la amplificación de un ácido nucleico molde, sin embargo, en ocasiones se producen la amplificación y el sesgo de amplificación de una secuencia de ácido nucleico distinta del ácido nucleico molde, lo que provoca los problemas en la especificidad, la cuantificación, la sensibilidad y similares. El documento WO2011/142836 A2 describe métodos basados en la amplificación para la detección del genotipo, las mutaciones y/o la aneuploidía. El documento EP2873731 A1 desvela una sonda de ácido nucleico y un método para detectar una secuencia objetivo. En el campo médico, existe la necesidad de detectar una cantidad pequeña de ácido nucleico molde en una muestra. Por tanto, existe la demanda de un método de análisis génico con mayor precisión.

25

30

Breve resumen de la invención

Problema que ha de resolverse mediante la invención

Por tanto, la presente invención tiene por objeto proporcionar un método para analizar un ácido nucleico molde, un método para analizar una sustancia objetivo, el uso de un kit de análisis para un ácido nucleico molde o una sustancia objetivo y el uso de un analizador para un ácido nucleico molde o una sustancia objetivo, que tengan una excelente precisión.

35

40

Medios para resolver problemas

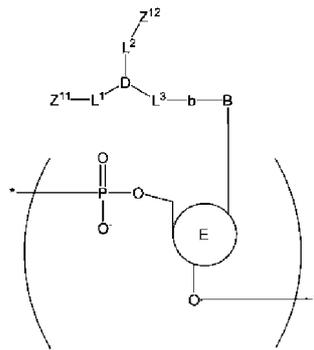
Para lograr el objeto anterior, la presente invención proporciona un método para analizar un ácido nucleico molde, que incluye las etapas de: fraccionar una muestra que contiene un ácido nucleico molde en una pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde; amplificar una secuencia objetivo y su secuencia complementaria en el ácido nucleico molde con respecto a cada fracción de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde en presencia de un reactivo de amplificación de ácido nucleico; detectar la generación o interrupción de una señal que muestra una amplificación de la secuencia objetivo o la secuencia complementaria con respecto a cada fracción de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde después de la etapa de amplificación; y discriminar una fracción de ácido nucleico molde en la que la generación o interrupción de una señal que muestra la amplificación se ha detectado entre la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde como una fracción amplificada en la que la secuencia objetivo o la secuencia complementaria se ha amplificado, en donde el reactivo de amplificación de ácido nucleico contiene un conjunto de cebadores que amplifica la secuencia objetivo y la secuencia complementaria y una sustancia generadora de señales que genera o interrumpe una señal en respuesta a la amplificación, y la sustancia generadora de señales genera una señal en un estado en el que se une de manera dependiente de la secuencia e interrumpe una señal en un estado en el que no se une o interrumpe una señal en un estado en el que se une de manera dependiente de la secuencia y genera una señal en un estado en el que no se une, y la generación y la interrupción de una señal son reversibles; en donde la sustancia generadora de señales incluye una sonda fluorogénica que comprende al menos dos grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón como la sustancia generadora de señales por molécula y los al menos dos grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón están comprendidos en una base que comprende un par de grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón comprende una estructura representada por la siguiente fórmula (16), (16b), (17) o (17b):

45

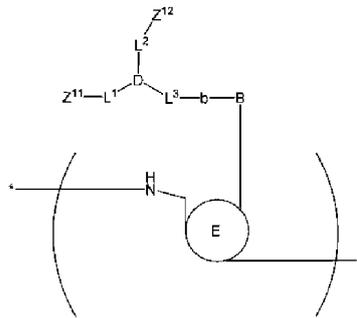
50

55

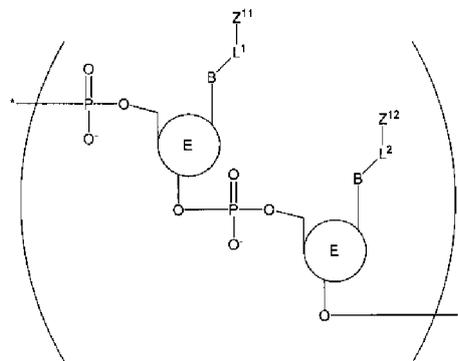
60



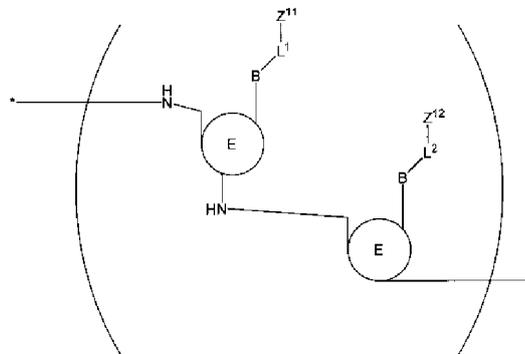
(16)



(16b)



(17)



(17b)

5

en las fórmulas (16), (16b), (17), (17b),

10

B es un grupo atómico que tiene una cadena principal de nucleobases naturales (adenina, guanina, citosina, timina o uracilo) o una cadena principal de nucleobases artificiales,

E es:

- (i) un grupo atómico que tiene una cadena principal de desoxirribosa, una cadena principal de ribosa o una estructura derivada de cualquiera de ellas, o
 5 (ii) un grupo atómico que tiene una estructura peptídica o una estructura peptoide,

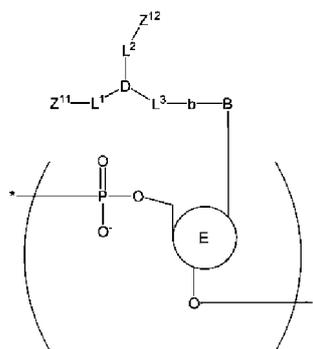
Z^{11} y Z^{12} son cada uno un grupo atómico que presenta fluorescencia, y pueden ser idénticos o diferentes entre sí, L^1 , L^2 y L^3 son cada uno un enlazador (un átomo de unión o un grupo atómico), la longitud de la cadena principal (el número de átomos de la cadena principal) de los mismos es arbitraria, L^1 , L^2 y L^3 cada uno puede o no contener cada uno de entre C, N, O, S, P y Si en la cadena principal, L^1 , L^2 y L^3 cada uno puede o no contener cada uno de entre un enlace simple, un doble enlace, un triple enlace, un enlace amida, un enlace éster, un enlace disulfuro, un grupo imino, un enlace éter, un enlace tioéter y un enlace tioéster en la cadena principal, y L^1 , L^2 y L^3 pueden ser idénticos o diferentes entre sí,

D es CR, N, P, P=O, B o SiR donde R es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo o un sustituyente arbitrario, y b es un enlace simple, un doble enlace o un triple enlace, o como alternativa, en las fórmulas (16) y (16b), L^1 y L^2 son cada uno un enlazador, L^3 , D y b pueden no estar presentes, y L^1 y L^2 pueden unirse directamente a B, a condición de que:

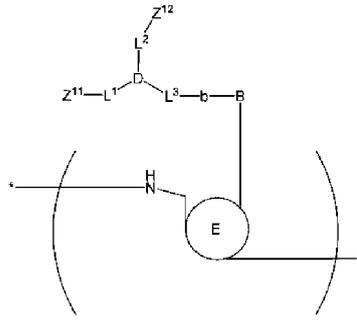
- en las fórmulas (16) y (17), E sea un grupo atómico descrito en el punto (i) y al menos un átomo O en un enlace de ácido fosfórico puede estar sustituido con un átomo de S;
 en las fórmulas (16b) y (17b), E sea un grupo atómico descrito en el punto (ii); y
 en las fórmulas (17) y (17b), los respectivos B pueden ser idénticos o diferentes entre sí, y los respectivos E pueden ser idénticos o diferentes entre sí.

La presente invención también proporciona un método para analizar una sustancia objetivo, que comprende las etapas de:

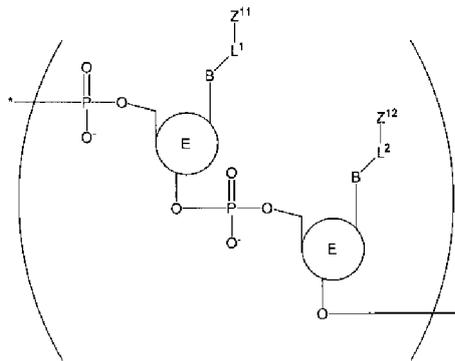
- poner en contacto una muestra que comprende al menos una sustancia objetivo con al menos una sonda fluorogénica que comprende una sustancia generadora de señales que genera una señal en un estado en el que se une específicamente a la sustancia objetivo e interrumpe una señal en un estado en el que no se une a la sustancia objetivo o interrumpe una señal en un estado en el que se une específicamente a la sustancia objetivo y genera una señal en un estado en el que no se une en una solución de reacción para poner al menos una sustancia objetivo en contacto con cada sonda fluorogénica; y
 35 detectar la generación o interrupción de una señal de la sonda fluorogénica en respuesta a la unión entre la sustancia objetivo y la sonda;
 en donde la sonda fluorogénica comprende al menos dos grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón como la sustancia generadora de señales por molécula y los al menos dos grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón están comprendidos en una base que comprende un par de grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón comprende una estructura representada por la siguiente fórmula (16), (16b), (17) o (17b):



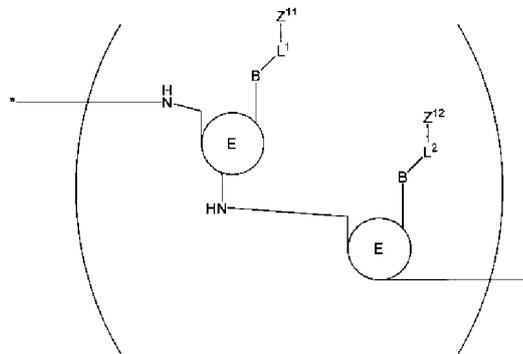
(16)



(16b)



(17)



(17b)

5

en las fórmulas (16), (16b), (17), (17b),

10

B es un grupo atómico que tiene una cadena principal de nucleobases naturales (adenina, guanina, citosina, timina o uracilo) o una cadena principal de nucleobases artificiales, E es:

15

- (i) un grupo atómico que tiene una cadena principal de desoxirribosa, una cadena principal de ribosa o una estructura derivada de cualquiera de ellas, o
- (ii) un grupo atómico que tiene una estructura peptídica o una estructura peptoide,

20

Z¹¹ y Z¹² son cada uno un grupo atómico que presenta fluorescencia, y pueden ser idénticos o diferentes entre sí, L¹, L² y L³ son cada uno un enlazador (un átomo de unión o un grupo atómico), la longitud de la cadena principal (el número de átomos de la cadena principal) de los mismos es arbitraria, L¹, L² y L³ cada uno puede o no contener cada uno de entre C, N, O, S, P y Si en la cadena principal, L¹, L² y L³ cada uno puede o no contener cada uno de entre un enlace simple, un doble enlace, un triple enlace, un enlace amida, un enlace éster, un enlace disulfuro, un grupo imino, un enlace éter, un enlace tioéter y un enlace tioéster en la cadena principal, y L¹, L² y L³ pueden ser idénticos o diferentes entre sí,

25

D es CR, N, P, P=O, B o SiR donde R es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo o un sustituyente arbitrario, y b es un enlace simple, un doble enlace o un triple enlace,

o como alternativa,

en las fórmulas (16) y (16b), L^1 y L^2 son cada uno un enlazador, L^3 , D y b pueden no estar presentes, y L^1 y L^2 pueden unirse directamente a B, a condición de que:

5 en las fórmulas (16) y (17), E sea un grupo atómico descrito en el punto (i) y al menos un átomo O en un enlace de ácido fosfórico puede estar sustituido con un átomo de S;
 en las fórmulas (16b) y (17b), E sea un grupo atómico descrito en el punto (ii); y
 en las fórmulas (17) y (17b), los respectivos B pueden ser idénticos o diferentes entre sí, y los respectivos E pueden ser idénticos o diferentes entre sí. Un método para analizar una sustancia objetivo, que incluye las etapas de: poner en contacto una muestra que contiene al menos una sustancia objetivo con al menos una sonda fluorogénica para cada sustancia objetivo en una solución de reacción; y se describe también la detección de la generación o interrupción de una señal de la sonda fluorogénica en respuesta a la unión entre el ácido nucleico objetivo y la sonda fluorogénica.

15 La presente invención también proporciona el uso de un kit de análisis para un ácido nucleico molde o una sustancia objetivo para ejecutar el método de análisis de acuerdo con la presente invención.

La presente invención también proporciona el uso de un analizador para un ácido nucleico molde o una sustancia objetivo para ejecutar el método de análisis de acuerdo con la presente invención.

20

Efectos de la invención

De acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico molde puede analizarse con precisión.

25 Breve descripción de los dibujos

[FIG. 1] La FIG. 1 es una vista esquemática que muestra el esbozo del diseño de cebadores y sondas en la presente invención.

30 [FIG. 2] La FIG. 2A es un gráfico que muestra el valor medido del número de copias de ADN en el caso en el que el número de copias de ADN molde preparadas es de 375 o 750 en el Ejemplo 1; y la FIG. 2B es un gráfico que muestra el tiempo de detección en el caso en el que el número de copias de ADN molde preparadas es de 375 o 750 en el Ejemplo Comparativo 1

[FIG. 3] La FIG. 3 es un gráfico que muestra la comparación entre la relación de concentración de modelo de ácido nucleico de caso/control y la relación de tasa de variación de fluorescencia de TO/TP en el Ejemplo 2.

35 [FIG. 4] Las FIG. 4A y 4B muestran imágenes que muestran cada una la generación de una señal en el Ejemplo 3.

[FIG. 5] La FIG. 5 es un gráfico que muestra la concentración medida de una sustancia objetivo calculada a partir de la señal de fluorescencia en una solución de reacción en el Ejemplo 3.

40 [FIG. 6] La FIG. 6 es un gráfico que muestra la concentración medida de una sustancia objetivo calculada a partir de la señal de fluorescencia en una solución de reacción en el Ejemplo 4.

[FIG. 7] La FIG. 7 es un gráfico que muestra la concentración medida de una sustancia objetivo calculada a partir de la señal de fluorescencia en una solución de reacción en el Ejemplo 5.

45 Modo de realizar la invención

En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente divulgación, por ejemplo, la sustancia generadora de señales incluye una sustancia de unión generadora de señales que incluye la sustancia generadora de señales. La sustancia de unión generadora de señales es una sustancia que se une específicamente a la secuencia objetivo o a la secuencia complementaria. Asimismo, la sustancia generadora de señales es una sustancia que genera la señal en un estado en el que se une a un objetivo e interrumpe la señal en un estado en el que se disocia del objetivo o una sustancia que interrumpe la señal en un estado en el que se une a un objetivo y genera la señal en un estado en el que se disocia del objetivo.

55 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente divulgación, por ejemplo, la sustancia generadora de señales incluye una sonda fluorogénica que incluye la sustancia generadora de señales. La sonda fluorogénica es una sonda que genera la señal en un estado en el que se une a un objetivo e interrumpe la señal en un estado en el que se disocia del objetivo o una sonda que interrumpe la señal en un estado en el que se une a un objetivo y genera la señal en un estado en el que se disocia del objetivo.

60 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención la sonda fluorogénica incluye al menos dos grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón como la sustancia generadora de señales por molécula.

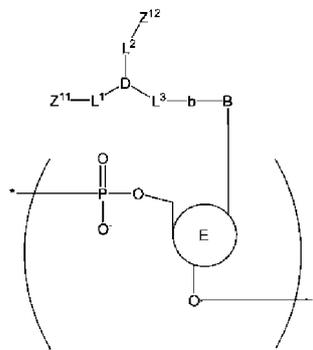
65 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, el ácido nucleico molde es un ácido nucleico molde en un estado en el que se une a una sustancia que se une específicamente al ácido nucleico molde. La unión entre el ácido nucleico molde y una sustancia que se une específicamente al ácido nucleico molde

puede ser una unión basada en la especificidad de la sustancia de unión o una unión no basada en la especificidad de la sustancia de unión, por ejemplo. En el último caso, la sustancia de unión puede ser, por ejemplo, una sustancia de unión marcada con el ácido nucleico molde.

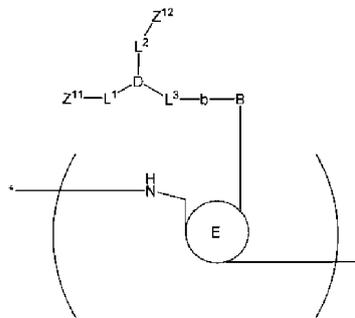
5 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, el conjunto de cebadores incluye un cebador fluorogénico que incluye la sustancia generadora de señales. El cebador fluorogénico es un cebador que genera la señal en un estado en el que se une a un objetivo e interrumpe la señal en un estado en el que se disocia del objetivo o un cebador que interrumpe la señal en un estado en el que se une a un objetivo y genera la señal en un estado en el que se disocia del objetivo.

10 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, el cebador fluorogénico incluye al menos dos grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón como la sustancia generadora de señales por molécula.

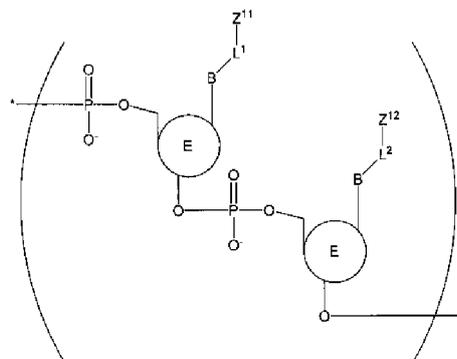
15 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, una base que incluye un par de grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón tiene una estructura representada por la siguiente fórmula (16), (16b), (17) o (17b).



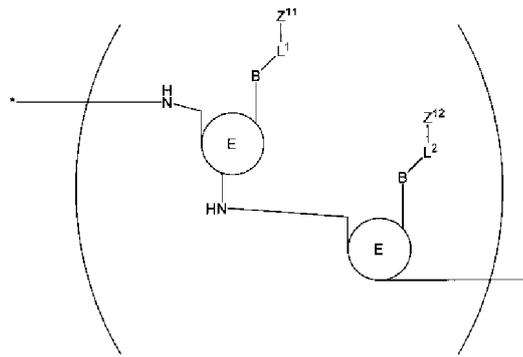
(16)



(16b)



(17)



(17b)

5 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, un método de amplificación adoptado en la etapa de amplificación es al menos uno de entre un método de amplificación isotérmica y un método de PCR.

10 El método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención incluye adicionalmente la etapa de recuperar la fracción amplificada de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde después de la etapa de discriminación, por ejemplo.

15 El método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención incluye adicionalmente la etapa de amplificar la secuencia objetivo y la secuencia complementaria en el ácido nucleico molde con respecto a la fracción amplificada después de la etapa de discriminación, en donde la etapa de amplificación es una segunda amplificación, por ejemplo. El método de amplificación adoptado en la segunda etapa de amplificación es al menos uno de entre un método de amplificación isotérmica y un método de PCR, por ejemplo.

En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, la etapa de detección se realiza mediante un análisis de curva de fusión.

20 El método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención incluye adicionalmente la etapa de realizar un análisis mediante un análisis de curva de fusión después de la etapa de detección, por ejemplo.

25 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, una muestra que contiene el ácido nucleico molde incluye el reactivo de amplificación de ácido nucleico. En la etapa de fraccionamiento, la muestra que contiene el ácido nucleico molde y el reactivo de amplificación de ácido nucleico se fracciona en una pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde.

30 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, la etapa de fraccionamiento provoca que cada fracción de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde contenga el reactivo de amplificación de ácido nucleico.

35 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, la etapa de fraccionamiento es una etapa de formación de una emulsión a partir de la muestra, la fracción de ácido nucleico molde es una gota de la muestra dispersada en la emulsión y la etapa de detección es una etapa de detectar la generación o interrupción de una señal con respecto a la gota en la emulsión.

40 En la etapa de detección del método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, la emulsión se hace pasar a través de un canal de flujo y la generación o interrupción de una señal se detecta con respecto a la gota en un sitio predeterminado del canal de flujo cuando la gota en la emulsión pasa a través del canal de flujo.

En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, la emulsión es una emulsión de agua en aceite (de tipo W/O).

45 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, la etapa de fraccionamiento es una etapa de fraccionar la muestra en una pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde dispensando la muestra a un chip provisto de una pluralidad de porciones de formación de fracciones de ácido nucleico molde sobre su superficie.

50 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, en el chip, una superficie de la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es hidrófila, y una superficie de una región que excluye la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es hidrófoba. La etapa de fraccionamiento es una etapa

de fraccionar la muestra en una pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde mediante la aplicación de la muestra a la superficie del chip para separar la muestra en las porciones de formación de fracciones de ácido nucleico molde.

- 5 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, en el chip, la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es una muesca de la superficie del chip, y la región que excluye la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde no es una muesca. La etapa de fraccionamiento es una etapa de fraccionar la muestra mediante la introducción de la muestra en la muesca de la superficie del chip.
- 10 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, en el chip, la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es una muesca de la superficie del chip, una superficie interna de la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es hidrófila, la región que excluye la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde no es una muesca y una superficie de la región que excluye la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es hidrófoba.
- 15 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, el reactivo de amplificación de ácido nucleico se dispone en la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde del chip. La etapa de fraccionamiento provoca que la fracción de ácido nucleico molde contenga el reactivo de amplificación de ácido nucleico en la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde del chip.
- 20 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, la etapa de detección es una etapa de obtener una imagen de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde sobre al menos un chip y la etapa de discriminación es una etapa de discriminar la fracción de ácido nucleico molde sobre el chip en el que la generación o interrupción de una señal se ha detectado en la imagen como la fracción amplificada.
- 25 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, la etapa de fraccionamiento es una etapa de fraccionar la muestra en la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde haciendo gotear la muestra.
- 30 En la etapa de fraccionamiento del método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, un volumen promedio de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde es de 0,0001 a 5000 nl.
- 35 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, la muestra contiene al menos dos ácidos nucleicos molde, el reactivo de amplificación de ácido nucleico contiene al menos dos conjuntos de cebadores y al menos dos sustancias generadoras de señales, los al menos dos conjuntos de cebadores amplifican cada uno la secuencia objetivo y la secuencia complementaria en cada uno de los diferentes ácidos nucleicos molde, y las al menos dos sustancias generadoras de señales tienen cada una la misma propiedad de fluorescencia y generan o interrumpen una señal en respuesta a una amplificación de la secuencia objetivo y la secuencia complementaria en cada uno de los diferentes ácidos nucleicos molde.
- 40 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, la muestra contiene al menos dos ácidos nucleicos molde, el reactivo de amplificación de ácido nucleico contiene al menos dos conjuntos de cebadores y al menos dos sustancias generadoras de señales, los al menos dos conjuntos de cebadores amplifican cada uno la secuencia objetivo y la secuencia complementaria en cada uno de los diferentes ácidos nucleicos molde, y las al menos dos sustancias generadoras de señales tienen, cada una, una propiedad de fluorescencia diferente entre sí y generan o interrumpen una señal en respuesta a una amplificación de la secuencia objetivo y la secuencia complementaria en cada uno de los diferentes ácidos nucleicos molde.
- 45 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, la muestra contiene al menos dos ácidos nucleicos molde, el reactivo de amplificación de ácido nucleico contiene al menos dos conjuntos de cebadores y una sonda no fluorogénica, los al menos dos conjuntos de cebadores amplifican cada uno la secuencia objetivo y la secuencia complementaria en cada uno de los diferentes ácidos nucleicos molde, y cada una de entre la sustancia generadora de señales y la sonda no fluorogénica genera o interrumpe una señal en respuesta a una amplificación de la secuencia objetivo y la secuencia complementaria en cada uno de los diferentes ácidos nucleicos molde.
- 50 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, la generación o interrupción de una señal que muestra una amplificación de la secuencia objetivo o la secuencia complementaria se detecta con respecto a cada fracción de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde antes de la etapa de amplificación. En la etapa de discriminación, mediante la comparación de una señal detectada antes de la etapa de amplificación y una señal detectada después de la etapa de amplificación, una fracción de ácido nucleico molde en la que la generación o interrupción de una señal que muestra la amplificación se ha detectado entre la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde se discrimina como una fracción amplificada en la que la secuencia objetivo o la secuencia complementaria se ha amplificado.
- 55 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, la generación o interrupción de una señal que muestra una amplificación de la secuencia objetivo o la secuencia complementaria se detecta con respecto a cada fracción de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde antes de la etapa de amplificación. En la etapa de discriminación, mediante la comparación de una señal detectada antes de la etapa de amplificación y una señal detectada después de la etapa de amplificación, una fracción de ácido nucleico molde en la que la generación o interrupción de una señal que muestra la amplificación se ha detectado entre la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde se discrimina como una fracción amplificada en la que la secuencia objetivo o la secuencia complementaria se ha amplificado.
- 60 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, la generación o interrupción de una señal que muestra una amplificación de la secuencia objetivo o la secuencia complementaria se detecta con
- 65

5 respecto a la muestra que contiene el ácido nucleico molde antes de la etapa de fraccionamiento. En la etapa de discriminación, mediante la comparación de una señal detectada antes de la etapa de fraccionamiento y una señal detectada después de la etapa de amplificación, una fracción de ácido nucleico molde en la que la generación o interrupción de una señal que muestra la amplificación se ha detectado entre la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde se discrimina como una fracción amplificada en la que la secuencia objetivo o la secuencia complementaria se ha amplificado.

10 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, un análisis del ácido nucleico molde es un análisis de una modificación del ácido nucleico molde. El método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención incluye adicionalmente la etapa de pretratar el ácido nucleico molde antes de la etapa de amplificación.

15 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, un análisis del ácido nucleico molde es un análisis de metilación del ácido nucleico molde y la etapa de pretratamiento es una etapa de convertir un resto de citosina no metilada del ácido nucleico molde en un resto de uracilo o un resto de derivado de uracilo.

20 En la etapa de pretratamiento del método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, la conversión se realiza usando bisulfito.

En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, un análisis del ácido nucleico molde es un análisis de metilación del ácido nucleico molde y la etapa de pretratamiento es una etapa de escindir una región no metilada o una región metilada del ácido nucleico molde.

25 En la etapa de pretratamiento del método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, la escisión se realiza usando una enzima de restricción.

30 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, un análisis del ácido nucleico molde es un análisis de metilación del ácido nucleico molde y la etapa de pretratamiento es una etapa de enriquecer un ácido nucleico molde metilado.

35 En la etapa de pretratamiento del método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, usando al menos uno de entre una proteína de unión a ADN metilado y un anticuerpo antimetilcitosina, el ácido nucleico molde metilado se enriquece mediante la unión de al menos uno de entre la proteína de unión a ADN metilado y el anticuerpo antimetilcitosina al ácido nucleico molde metilado.

40 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, un análisis del ácido nucleico molde es un análisis de hidroximetilación del ácido nucleico molde y la etapa de pretratamiento es una etapa de convertir un resto de hidroximetilcitosina del ácido nucleico molde en un resto de base no hidroximetilada.

En la etapa de pretratamiento del método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, un resto de hidroximetilcitosina se convierte en un resto de timina o un resto de derivado de timina usando un agente oxidante de wolframio.

45 En la etapa de pretratamiento del método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, un resto de hidroximetilcitosina se convierte en un resto de uracilo o un resto de derivado de uracilo usando perrutenato de potasio (KRuO₄) y bisulfito.

50 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, un análisis del ácido nucleico molde es un análisis de hidroximetilación del ácido nucleico molde. La etapa de pretratamiento incluye las etapas de glicosilar una región hidroximetilada de un ácido nucleico molde hidroximetilado; y escindir la región glicosilada del ácido nucleico molde hidroximetilado.

55 En la etapa de pretratamiento del método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, la escisión se realiza usando una enzima de restricción sensible a la glicosilación.

60 En el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, un análisis del ácido nucleico molde es un análisis de hidroximetilación del ácido nucleico molde. La etapa de pretratamiento incluye las etapas de glicosilar una región hidroximetilada de un ácido nucleico molde hidroximetilado; y enriquecer el ácido nucleico molde hidroximetilado glicosilado.

65 En la etapa de pretratamiento del método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo, usando un anticuerpo hidroximetilado de glicosilación, el ácido nucleico molde hidroximetilado glicosilado se enriquece mediante la unión del anticuerpo al ácido nucleico molde hidroximetilado glicosilado.

En el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, la sustancia objetivo es un

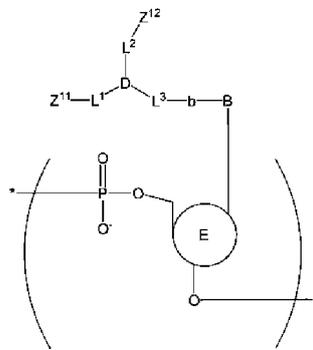
ácido nucleico o una secuencia de ácido nucleico.

5 En el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, la sonda fluorogénica es una sonda que incluye una sustancia generadora de señales y es una sonda que genera la señal en un estado en el que se une a un objetivo e interrumpe la señal en un estado en el que se disocia del objetivo o una sonda que interrumpe la señal en un estado en el que se une a un objetivo y genera la señal en un estado en el que se disocia del objetivo.

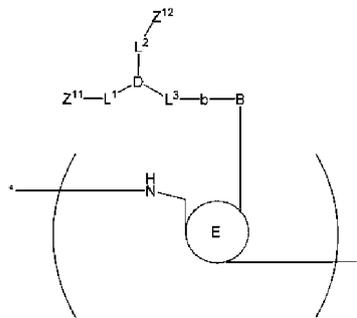
10 En el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, la sustancia generadora de señales es fluorogénica.

En el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, la sonda fluorogénica incluye al menos dos grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón como la sustancia generadora de señales por molécula.

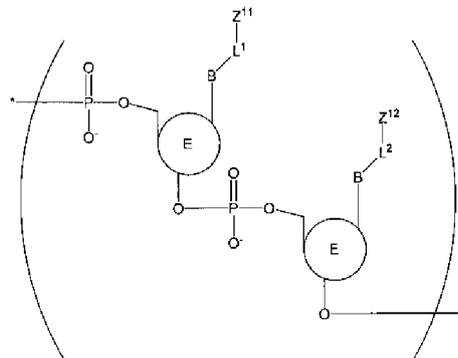
15 En el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, una base que incluye un par de grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón tiene una estructura representada por la siguiente fórmula (16), (16b), (17) o (17b).



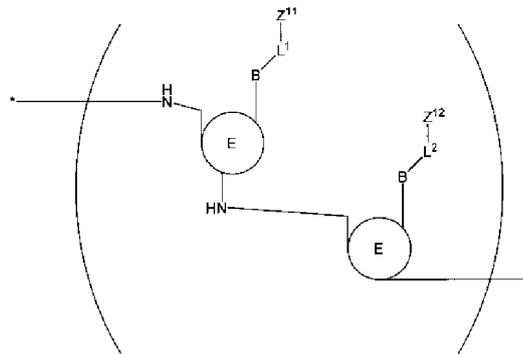
(16)



(16b)



(17)



(17 b)

5 En el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, la etapa de detección es una etapa de detectar el brillo o la intensidad de al menos una clase de la señal en la solución de reacción.

10 En el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, la etapa de detección es una etapa de detectar al menos una clase de la señal en la solución de reacción mediante el recuento a nivel molecular de la sonda fluorogénica.

15 En el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, se analizan al menos dos sustancias objetivo y al menos dos clases de sustancias objetivo son adyacentes entre sí, se usan al menos dos sondas fluorogénicas para las sustancias objetivo, y las sondas fluorogénicas incluyen, cada una, una sustancia generadora de señales que tiene una propiedad de fluorescencia diferente entre sí y genera o interrumpe una señal en respuesta a la unión a diferentes sustancias objetivo con una transferencia de energía de resonancia de fluorescencia.

20 En el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, se analizan al menos dos sustancias objetivo y al menos dos tipos de sustancias objetivo son adyacentes entre sí, se usan al menos dos sondas fluorogénicas para las sustancias objetivo, y las sondas fluorogénicas incluyen, cada una, una sustancia generadora de señales que tiene una propiedad de fluorescencia diferente entre sí, se genera o se interrumpe una señal en respuesta a la unión a diferentes sustancias objetivo y se detecta la presencia o ausencia de una superposición espacial de una pluralidad de clases de las señales.

25 En la etapa de contacto y la etapa de detección del método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, se controla una temperatura de la solución de reacción.

30 En el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, la sustancia objetivo es una sustancia objetivo en un estado en el que se une a una sustancia que se une específicamente a la sustancia objetivo. La unión entre la sustancia objetivo y una sustancia que se une específicamente a la sustancia objetivo puede ser una unión basada en la especificidad de la sustancia objetivo de la sustancia de unión o una unión no basada en la especificidad de la sustancia objetivo de la sustancia de unión, por ejemplo. En el último caso, la sustancia de unión puede ser, por ejemplo, una sustancia de unión marcada con la sustancia objetivo.

35 En el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, un análisis de la sustancia objetivo es un análisis de una modificación de la sustancia objetivo. El método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención incluye adicionalmente la etapa de pretratar la sustancia objetivo antes de la etapa de detección.

40 El método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención incluye adicionalmente la etapa de amplificar una sustancia objetivo pretratada después de la etapa de pretratamiento y antes de la etapa de detección, por ejemplo. El producto amplificado obtenido en la etapa de amplificación se usa como la sustancia objetivo en la etapa de detección.

45 En el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, un análisis de la sustancia objetivo es un análisis de metilación de la sustancia objetivo y la etapa de pretratamiento es una etapa de convertir un resto de citosina no metilada de la sustancia objetivo en un resto de uracilo o un resto de derivado de uracilo.

En la etapa de pretratamiento del método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, la conversión se realiza usando bisulfito.

50 En el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, un análisis de la sustancia objetivo es un análisis de metilación de la sustancia objetivo y la etapa de pretratamiento es una etapa de escindir una región no metilada o una región metilada de la sustancia objetivo.

En la etapa de pretratamiento del método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, la escisión se realiza usando una enzima de restricción.

5 En el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, un análisis de la sustancia objetivo es un análisis de metilación de la sustancia objetivo y la etapa de pretratamiento es una etapa de enriquecer una sustancia objetivo metilada.

10 En la etapa de pretratamiento del método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, usando al menos uno de entre una proteína de unión a ADN metilado y un anticuerpo antimetilcitosina, la sustancia objetivo metilada se enriquece mediante la unión de al menos uno de entre la proteína de unión a ADN metilado y el anticuerpo antimetilcitosina a la sustancia objetivo metilada.

15 En el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, un análisis de la sustancia objetivo es un análisis de hidroximetilación de la sustancia objetivo y la etapa de pretratamiento es una etapa de convertir un resto de hidroximetilcitosina de la sustancia objetivo en un resto de base no hidroximetilada.

20 En la etapa de pretratamiento del método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, un resto de hidroximetilcitosina se convierte en un resto de timina o un resto de derivado de timina usando un agente oxidante de wolframio.

25 En la etapa de pretratamiento del método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, un resto de hidroximetilcitosina se convierte en un resto de uracilo o un resto de derivado de uracilo usando perrutenato de potasio (KRuO₄) y bisulfito.

30 En el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, un análisis de la sustancia objetivo es un análisis de hidroximetilación de la sustancia objetivo. La etapa de pretratamiento incluye las etapas de glicosilar una región hidroximetilada de una sustancia objetivo hidroximetilada; y escindir la región glicosilada de la sustancia objetivo hidroximetilada.

35 En la etapa de pretratamiento del método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, la escisión se realiza usando una enzima de restricción sensible a la glicosilación.

40 En el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, un análisis de la sustancia objetivo es un análisis de hidroximetilación de la sustancia objetivo. La etapa de pretratamiento incluye las etapas de glicosilar una región hidroximetilada de una sustancia objetivo hidroximetilada; y enriquecer la sustancia objetivo hidroximetilada glicosilada.

45 En la etapa de pretratamiento del método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, usando un anticuerpo hidroximetilado de glicosilación, la sustancia objetivo hidroximetilada glicosilada se enriquece mediante la unión del anticuerpo a la sustancia objetivo hidroximetilada glicosilada.

50 En la presente invención, el término "fraccionamiento" significa fraccionamiento que se realiza dividiendo una muestra que contiene el ácido nucleico molde (en lo sucesivo en el presente documento, también denominada "muestra") en una pluralidad de fracciones. En la presente invención, el término "fluorogénico" significa, por ejemplo, generar una señal en un estado de unión específica a una sustancia objetivo e interrumpir una señal en un estado de no unión o interrumpir una señal en un estado de unión específica a una sustancia objetivo y generar una señal en un estado de no unión. La generación y la interrupción de una señal son reversibles. En cuanto a la sustancia objetivo, se describen detalles a continuación. En el caso en el que la sustancia objetivo sea un ácido nucleico, el término "fluorogénico" significa, por ejemplo, generar una señal en un estado de unión dependiente de la secuencia a un ácido nucleico e interrumpir una señal en un estado de no unión o interrumpir una señal en un estado de unión dependiente de la secuencia a un ácido nucleico y generar una señal en un estado de no unión. La generación y la interrupción de una señal son reversibles. La secuencia significa, por ejemplo, la secuencia de un ácido nucleico que es la sustancia objetivo.

55 En la presente invención, la sonda puede ser cualquier sustancia siempre que se una específicamente a la sustancia objetivo y los ejemplos de la sonda incluyen ácidos nucleicos, anticuerpos, aficuerpos y aptámeros. En el caso en el que la sustancia objetivo sea un ácido nucleico, la sonda puede ser, por ejemplo, una sonda de ácido nucleico, un anticuerpo, un aficuerpo, un aptámero o similar que sea complementario a la secuencia de la sustancia objetivo.

60 La presente invención se describe a continuación con referencia a ejemplos específicos. La presente invención, sin embargo, no está limitada por la siguiente descripción. En el método de análisis que se describe a continuación, los ejemplos de cada etapa pueden combinarse con ejemplos de otras etapas, por ejemplo, a menos que se indique otra cosa.

65 <Método para analizar un ácido nucleico molde>

El método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, como se ha descrito anteriormente, incluye las etapas de fraccionar una muestra que contiene un ácido nucleico molde en una pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde; amplificar una secuencia objetivo y su secuencia complementaria en el ácido nucleico molde con respecto a cada fracción de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde en presencia de un reactivo de amplificación de ácido nucleico; detectar la generación o interrupción de una señal que muestra una amplificación de la secuencia objetivo o la secuencia complementaria con respecto a cada fracción de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde después de la etapa de amplificación; y discriminar una fracción de ácido nucleico molde en la que la generación o interrupción de una señal que muestra la amplificación se ha detectado entre la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde como una fracción amplificada en la que la secuencia objetivo o la secuencia complementaria se ha amplificado, en donde el reactivo de amplificación de ácido nucleico contiene un conjunto de cebadores que amplifica la secuencia objetivo y la secuencia complementaria y una sustancia generadora de señales que genera o interrumpe una señal en respuesta a la amplificación, y la sustancia generadora de señales genera una señal en un estado en el que se une de manera dependiente de la secuencia e interrumpe una señal en un estado en el que no se une o interrumpe una señal en un estado en el que se une de manera dependiente de la secuencia y genera una señal en un estado en el que no se une, y la generación y la interrupción de una señal son reversibles.

El método de análisis de la presente invención se caracteriza por que la muestra que contiene el ácido nucleico molde se fracciona en la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde en la etapa de fraccionamiento y la generación o interrupción de una señal que muestra una amplificación de la secuencia objetivo o la secuencia complementaria se detecta con respecto a cada fracción de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde en la etapa de detección después de la etapa de amplificación, y otras etapas y condiciones no están particularmente limitados. En el método de análisis de la presente invención, mediante el fraccionamiento de la muestra que contiene el ácido nucleico molde en una pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde, por ejemplo, la secuencia objetivo y la secuencia complementaria se amplifican después de fraccionar una pluralidad de ácidos nucleicos molde en la muestra en fracciones separadas de ácidos nucleicos molde. Además, la amplificación se detecta usando la sustancia generadora de señales que es fluorogénica con respecto a cada fracción de ácido nucleico molde. Por tanto, de acuerdo con el método de análisis de la presente invención, por ejemplo, incluso cuando la concentración de un ácido nucleico molde contenido en la muestra es baja hasta el grado de que no puede detectarse mediante un método normal de análisis génico, mediante el fraccionamiento de la muestra en una pluralidad de fracciones, el ácido nucleico molde puede enriquecerse en la fracción de ácido nucleico molde que incluye el ácido nucleico molde. Por tanto, de acuerdo con el método de análisis de la presente invención, el ácido nucleico molde puede analizarse con precisión. Además, puesto que el método de análisis de la presente invención usando la sustancia generadora de señales fluorogénica puede detectar el ácido nucleico molde con especificidad alta, el ácido nucleico molde puede analizarse con más precisión.

La presente invención puede aplicarse a cualquier análisis de un ácido nucleico molde siempre que utilice la detección de la amplificación de la secuencia objetivo o la secuencia complementaria y el contenido del análisis de un ácido nucleico molde no esté particularmente limitado. La detección de la amplificación puede ser la detección del producto amplificado o la detección de la asociación del producto amplificado y la sonda o la disociación del asociado, por ejemplo.

En la presente invención, en cuanto a "generar una señal en un estado de unión dependiente de la secuencia a un ácido nucleico e interrumpir una señal en un estado de no unión o interrumpir una señal en un estado de unión dependiente de la secuencia a un ácido nucleico y generar una señal en un estado de no unión", la unión puede ser, por ejemplo, dependiente de la secuencia directa o dependiente de la secuencia indirecta. El primer caso puede ser, por ejemplo, interrupción o generación de una señal de una sustancia generadora de señales en respuesta a la unión dependiente de la secuencia de la propia sustancia generadora de señales de la sonda fluorogénica o del cebador fluorogénico que se describe a continuación. El último caso puede ser, por ejemplo, interrupción o generación de una señal de un intercalador en respuesta a la unión dependiente de la secuencia de una sonda no fluorogénica o de un cebador no fluorogénico.

El primer ejemplo del análisis de un ácido nucleico molde en la presente invención puede ser el análisis de la presencia o ausencia de un ácido nucleico molde (análisis cualitativo) o el análisis de la cantidad (análisis cuantitativo). En este caso, la secuencia objetivo y su secuencia complementaria en el ácido nucleico molde se amplifican, mediante la detección del producto amplificado obtenido, la asociación del producto amplificado obtenido y la sonda, o la disociación del asociado, la presencia o ausencia o la cantidad de ácido nucleico molde pueden analizarse.

El segundo ejemplo del análisis de un ácido nucleico molde en la presente invención puede ser el análisis de una mutación de ácido nucleico presente en un sitio de mutación de ácido nucleico en el ácido nucleico molde, que es lo que se denomina tipado. El sitio de mutación de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un sitio de polimorfismo tal como el polimorfismo de un solo nucleótido. Los ejemplos específicos del análisis de la mutación de ácido nucleico incluyen la discriminación entre el tipo silvestre y el tipo mutante en el sitio de mutación de ácido nucleico, la discriminación entre diferentes tipos de mutantes en el sitio de la mutación de ácido nucleico y la discriminación entre el homocigoto y el heterocigoto. En este caso, la secuencia objetivo y su secuencia complementaria en el ácido nucleico molde se amplifican, la asociación del producto amplificado obtenido y la sonda o la disociación del asociado se detectan y el tipado del sitio de mutación de ácido nucleico puede realizarse a partir de las condiciones (por ejemplo,

temperatura, pH, concentración desnaturalizante, concentración de sal, etc.) con las que se produce la asociación o la disociación.

5 En el método de análisis de la presente invención, la secuencia objetivo es la secuencia de una región que contiene un sitio arbitrario en la secuencia molde y la secuencia complementaria es una secuencia complementaria a la secuencia objetivo. En el método de análisis de la presente invención, la secuencia objetivo y la secuencia complementaria se amplifican en la etapa de amplificación. No hay ninguna limitación particular en el sitio arbitrario.

10 Cuando la presente invención se aplica al tipado, el sitio arbitrario es, por ejemplo, un sitio de mutación de ácido nucleico. El sitio de mutación de ácido nucleico es, por ejemplo, un sitio en el que una mutación de ácido nucleico prevista que se ha de detectar está presente en el ácido nucleico molde. En este caso, la secuencia objetivo es la secuencia de una región que contiene el sitio de mutación de ácido nucleico en el ácido nucleico molde y la secuencia complementaria es una secuencia complementaria a la secuencia objetivo.

15 En el método de análisis de la presente invención, la muestra no está particularmente limitada y pueden usarse muestras que tengan la posibilidad de incluir un ácido nucleico molde o la sustancia objetivo que se describe a continuación. Los ejemplos de la sustancia objetivo incluyen diversos ácidos nucleicos tales como los ADN y los ARN. Los ejemplos de la muestra incluyen muestras obtenidas del organismo, muestras obtenidas de alimentos y bebidas, y muestras de origen ambiental. El organismo no está particularmente limitado y los ejemplos del mismo incluyen animales, incluyendo seres humanos; mamíferos no humanos tales como vacas, cerdos, ovejas, ratones, ratas, conejos y caballos; aves; y peces. Los ejemplos de la muestra obtenida del organismo incluyen fluidos corporales, tejidos y células de los organismos. Los ejemplos de los fluidos corporales incluyen la sangre, tal como sangre entera, célula sanguínea, plasma sanguíneo, suero sanguíneo y similares; fluidos intraoculares tales como el humor acuoso y similares; linfa; fluidos cerebrospinales; lágrimas; sudor; semen; saliva; moco; orina; secreción nasal; e hisopado
20 nasal. Los ejemplos de este tejido incluyen tejidos intraoculares tales como el cuerpo vítreo y similares; y tejidos que tienen un patógeno tal como un tumor y similares. Los ejemplos de la muestra obtenida de alimentos y bebidas incluyen bebidas, alimentos y materias primas alimenticias. La presente invención puede aplicarse, por ejemplo, a la inspección de infecciones, la inspección de intoxicaciones alimentarias y similares. Los ejemplos de la muestra de origen ambiental incluyen el agua; agua de mar; agua mineral; agua del río; agua de lago; agua subterránea; agua de desecho; aguas residuales; tierra; atmósfera; y materias adheridas en las fábricas de procesamiento de alimentos, cocinas y similares. La muestra contiene, por ejemplo, un ácido nucleico molde, la sustancia objetivo descrita anteriormente y similares. El origen de la muestra no está particularmente limitado y puede ser, por ejemplo, seres humanos, animales no humanos y similares.

35 En el método de análisis de la presente invención, el ácido nucleico molde puede ser, por ejemplo, una muestra de ácido nucleico o similares. La muestra de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico monocatenario o un ácido nucleico bicatenario. En el primer caso, por ejemplo, el ácido nucleico monocatenario es el ácido nucleico molde. En el último caso, por ejemplo, uno cualquiera de un par de ácidos nucleicos monocatenarios que componen el ácido nucleico bicatenario puede establecerse como un ácido nucleico molde que incluya la secuencia objetivo. Específicamente, por ejemplo, una cadena sentido del par de ácidos nucleicos monocatenarios puede establecerse como un ácido nucleico molde que incluye la secuencia objetivo o una cadena antisentido del par de ácidos nucleicos monocatenarios puede establecerse como un ácido nucleico molde que incluye la secuencia objetivo.

45 Los ejemplos del ácido nucleico molde incluyen ácidos nucleicos tales como los ADN y los ARN. El ácido nucleico es, por ejemplo, un ácido nucleico originado a partir de la muestra. El ADN originado en la muestra puede ser, por ejemplo, ADN contenido en la muestra o ADNc generado a partir de ARN contenido en la muestra mediante transcripción inversa. Los ejemplos de ARN contenido en la muestra incluyen ARN y ARNm totales. El ácido nucleico puede ser, por ejemplo, ADN tumorales circulantes (ADNtc) y ARN tumorales circulantes (ARNtc).

50 En el método de análisis de la presente invención, el ácido nucleico molde puede ser, por ejemplo, un complejo de ácido nucleico molde que contiene sustancias distintas del ácido nucleico. Específicamente, el complejo de ácido nucleico molde puede contener adicionalmente una sustancia objetivo y una sustancia de unión que se une específicamente a la sustancia objetivo, por ejemplo. En este caso, la sustancia de unión se une directamente al ácido nucleico molde, por ejemplo, y puede decirse que es una sustancia de unión marcada con el ácido nucleico molde. El enlace directo es, por ejemplo, enlace covalente. La sustancia objetivo no está particularmente limitada, y puede hacerse referencia a la descripción a continuación, por ejemplo. La sustancia de unión puede ser cualquier sustancia siempre que pueda unirse específicamente a la sustancia objetivo, por ejemplo. Específicamente, puede hacerse referencia a la descripción en cuanto a la sonda. El complejo de ácido nucleico molde puede formarse poniendo en contacto una muestra que contenga la sustancia objetivo con una sustancia de unión marcada con el ácido nucleico
55 molde, por ejemplo. En el caso en el que el ácido nucleico molde sea el complejo de los ácidos nucleicos molde, preferentemente, el ácido nucleico molde es ADN que tiene una secuencia que se diseña artificialmente, por ejemplo.

65 En la presente invención, el número de clases de un ácido nucleico molde contenido en la muestra es al menos 1, y es, por ejemplo, al menos 2, al menos 5 o al menos 20. El límite superior del número de clases de un ácido nucleico molde no está particularmente limitado y es, por ejemplo, como máximo 200, como máximo 100 y como máximo 50, y el intervalo es, por ejemplo, de 1 a 200, de 2 a 100 o de 5 a 50.

En el método de análisis de la presente invención, el reactivo de amplificación de ácido nucleico puede discriminarse en función del método de amplificación adoptado en la etapa de amplificación que se describe a continuación, por ejemplo. Específicamente, el reactivo de amplificación de ácido nucleico contiene un conjunto de cebadores que
5 amplifica la secuencia objetivo y la secuencia complementaria y una sustancia generadora de señales que genera o interrumpe una señal en respuesta a la amplificación. La clase del conjunto de cebadores no está particularmente limitada, y puede hacerse referencia a los ejemplos de la clase del ácido nucleico molde, por ejemplo. El número de clases del conjunto de cebadores puede ser, por ejemplo, el mismo número o un número diferente del número de clases del ácido nucleico molde. Cuando la muestra contiene al menos dos ácidos nucleicos molde, el conjunto de
10 cebadores puede diseñarse de manera que un solo conjunto de cebadores pueda amplificar al menos dos ácidos nucleicos molde, por ejemplo. Cuando el reactivo de amplificación de ácido nucleico contiene al menos dos conjuntos de cebadores, los conjuntos de cebadores pueden amplificar cada uno la secuencia objetivo y la secuencia complementaria en el mismo ácido nucleico molde o pueden amplificar la secuencia objetivo y la secuencia complementaria en diferentes ácidos nucleicos molde, prefiriéndose esto último.

15 El conjunto de cebadores se describe en detalle. En lo sucesivo en el presente documento, en el conjunto de cebadores, un cebador que sintetiza la secuencia objetivo se denomina también un "primer cebador" y un cebador que sintetiza la secuencia complementaria se denomina también un "segundo cebador".

20 En el método de análisis de la presente invención, la polimerasa cebada a partir del extremo 3' del primer cebador sintetiza la secuencia objetivo y la polimerasa cebada a partir del extremo 3' del segundo cebador sintetiza la secuencia complementaria. El primer cebador y el segundo cebador pueden determinarse adecuadamente de acuerdo con la secuencia del ácido nucleico molde, por ejemplo.

25 Con respecto al primer cebador y al segundo cebador, por ejemplo, puede hacerse referencia a la FIG. 1. La FIG. 1 es una vista esquemática que muestra la relación entre el ácido nucleico molde y el primer cebador y la relación entre el ácido nucleico molde y el segundo cebador. En la FIG. 1, una región de contorno denota una región que tiene la misma secuencia que un sitio correspondiente del ácido nucleico molde y una región sólida denota una región que
30 tiene una secuencia complementaria a un sitio correspondiente del ácido nucleico molde (en lo sucesivo en el presente documento, se aplica lo mismo). Como se muestra en la FIG. 1, el primer cebador tiene la misma secuencia que una región corriente arriba de un sitio arbitrario (por ejemplo, el sitio de mutación de ácido nucleico) en el ácido nucleico molde, por ejemplo. El primer cebador solo puede contener la misma secuencia o puede contener la misma secuencia y otra secuencia o secuencias, por ejemplo. En el último caso, preferentemente, el primer cebador tiene la misma secuencia en su región terminal 3'. El segundo cebador tiene una secuencia complementaria a una región corriente
35 abajo de un sitio arbitrario (por ejemplo, el sitio de mutación de ácido nucleico) en el ácido nucleico molde, por ejemplo. El segundo cebador solo puede contener la secuencia complementaria o puede contener la secuencia complementaria y otra secuencia o secuencias, por ejemplo. En el último caso, preferentemente, el segundo cebador tiene la secuencia complementaria en su región terminal 3'. Cuando el reactivo de amplificación de ácido nucleico contiene al menos dos conjuntos de cebadores, los primeros cebadores de los al menos dos conjuntos de cebadores pueden ser secuencias complementarias a la misma secuencia o secuencias complementarias a secuencias diferentes, prefiriéndose esto
40 último. Asimismo, los segundos cebadores de los al menos dos conjuntos de cebadores pueden ser secuencias complementarias a la misma secuencia o secuencias complementarias a secuencias diferentes, prefiriéndose esto último.

45 En el método de análisis de la presente divulgación, la sustancia generadora de señales puede ser cualquier sustancia siempre que sea fluorogénica. La sustancia generadora de señales se añade preferentemente a una sustancia de unión que se une específicamente a la secuencia objetivo o a la secuencia complementaria, por ejemplo. Es decir, la sustancia generadora de señales se usa preferentemente como una sustancia de unión generadora de señales que incluye la sustancia generadora de señales o un cebador que incluye la sustancia generadora de señales. Cuando el
50 reactivo de amplificación de ácido nucleico contiene al menos dos sustancias generadoras de señales, las sustancias generadoras de señales pueden ser sustancias generadoras de señales de la misma clase o pueden ser sustancias generadoras de señales de diferentes clases. La clase de la sustancia generadora de señales no está particularmente limitada, y puede hacerse referencia a los ejemplos de la clase del ácido nucleico molde, por ejemplo. El número de clases de la sustancia generadora de señales puede ser, por ejemplo, el mismo número o un número diferente del
55 número de clases del ácido nucleico molde y/o el conjunto de cebadores. Cuando la muestra contiene al menos dos ácidos nucleicos molde, una sustancia generadora de señales puede generar o interrumpir una señal en respuesta a la amplificación de las secuencias objetivo y las secuencias complementarias en al menos dos ácidos nucleicos molde, por ejemplo. Cuando el reactivo de amplificación de ácido nucleico contiene al menos dos sustancias generadoras de señales, las sustancias generadoras de señales pueden tener cada una la misma propiedad de fluorescencia o una
60 propiedad de fluorescencia diferente entre sí, por ejemplo, y esto último es preferible ya que permite analizar de forma sencilla al menos dos ácidos nucleicos molde. Los ejemplos de la propiedad de fluorescencia incluyen una longitud de onda de excitación y una longitud de onda de fluorescencia. Que tienen la misma propiedad de fluorescencia significa, por ejemplo, que tienen la misma longitud de onda de excitación y la misma longitud de onda de fluorescencia. Que tienen una propiedad de fluorescencia diferente significa, por ejemplo, que tienen una longitud de onda de excitación
65 diferente o una longitud de onda de fluorescencia diferente. Cuando el reactivo de amplificación de ácido nucleico contiene al menos dos sustancias generadoras de señales, preferentemente, las sustancias generadoras de señales

generan o interrumpen, cada una, una señal en respuesta a la amplificación de cada una de las secuencias objetivo y las secuencias complementarias en diferentes ácidos nucleicos molde ya que permite analizar de forma sencilla al menos dos ácidos nucleicos molde. Cuando el reactivo de amplificación de ácido nucleico contiene al menos dos sustancias generadoras de señales, en cuanto a la generación o interrupción de una señal, por ejemplo, puede utilizarse o puede no utilizarse una transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET).

La sustancia de unión generadora de señales que incluye la sustancia generadora de señales, puede ser, por ejemplo, una sustancia que se une específicamente a la secuencia objetivo o a la secuencia complementaria. La sustancia de unión generadora de señales que incluye la sustancia generadora de señales, puede ser, por ejemplo, una sustancia que genera la señal en un estado en el que se une a un objetivo e interrumpe la señal en un estado en el que se disocia del objetivo o una sustancia que interrumpe la señal en un estado en el que se une a un objetivo y genera la señal en un estado en el que se disocia del objetivo. Específicamente, la sustancia de unión generadora de señales que incluye la sustancia generadora de señales, puede ser, por ejemplo, una sonda fluorogénica que incluye la sustancia generadora de señales. En este caso, la sonda fluorogénica puede ser, por ejemplo, una sonda que genera la señal en un estado en el que se une a un objetivo e interrumpe la señal en un estado en el que se disocia del objetivo o una sonda que interrumpe la señal en un estado en el que se une a un objetivo y genera la señal en un estado en el que se disocia del objetivo.

La sustancia generadora de señales de la sonda fluorogénica puede ser, como se ha descrito anteriormente, cualquier sustancia siempre que sea fluorogénica. Los ejemplos específicos de la sustancia generadora de señales incluyen una sustancia que presenta un fenómeno de interrupción de fluorescencia y un grupo atómico fluorescente que presenta un efecto de excitón. Los ejemplos específicos de la sonda fluorogénica incluyen una sonda que incluye una sustancia que presenta un fenómeno de interrupción de la fluorescencia (sonda de fenómeno de interrupción (en lo sucesivo en el presente documento, también denominada "sonda Q" (del inglés *quench*)), una sonda que incluye al menos dos grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón como la sustancia generadora de señales por molécula (en lo sucesivo en el presente documento, también denominada "sonda E") y una baliza molecular. Cuando el reactivo de amplificación de ácido nucleico contiene al menos dos sondas fluorogénicas, las sondas fluorogénicas pueden ser sondas fluorogénicas de la misma clase o pueden ser sondas fluorogénicas de diferentes clases.

La sonda fluorogénica puede ser una sonda que se hibrida con la secuencia objetivo que incluye el sitio arbitrario o una sonda que se hibrida con la secuencia complementaria. La secuencia puede determinarse adecuadamente de acuerdo con la secuencia del ácido nucleico molde, por ejemplo. Cuando el reactivo de amplificación de ácido nucleico contiene al menos dos sondas fluorogénicas, las sondas fluorogénicas pueden ser sondas que se hibriden con la misma secuencia o sondas que se hibriden con secuencias diferentes, prefiriéndose esto último. La sonda anterior tiene una secuencia que se hibrida con la secuencia objetivo, por ejemplo. La sonda solo puede contener la secuencia que se hibrida con la secuencia objetivo o puede contener la secuencia que se hibrida con la secuencia objetivo y otra secuencia o secuencias. Esta última sonda tiene una secuencia que se hibrida con la secuencia complementaria, por ejemplo. La sonda solo puede contener la secuencia que se hibrida con la secuencia complementaria o puede contener la secuencia que se hibrida con la secuencia complementaria y otra secuencia o secuencias.

Con respecto a la sonda, puede hacerse referencia a la FIG. 1, por ejemplo. La FIG. 1 es una vista esquemática que muestra la relación entre el ácido nucleico molde y las sondas. Como se muestra en la FIG. 1, cuando la sonda es una sonda que se hibrida con la secuencia objetivo (sonda Tseq (del inglés *target sequence*)), por ejemplo, la sonda puede diseñarse para que contenga una secuencia complementaria a una región que contenga un sitio arbitrario N (por ejemplo, el sitio de mutación de ácido nucleico) en el ácido nucleico molde. En la sonda Tseq, un sitio que corresponde a un sitio arbitrario N en el ácido nucleico molde incluye Nc complementario al sitio arbitrario N. Cuando la sonda es una sonda que se hibrida con la secuencia complementaria (sonda Cseq (del inglés *complementary sequence*)), por ejemplo, la sonda puede diseñarse para que contenga la misma secuencia que una región que contenga un sitio arbitrario (por ejemplo, el sitio de mutación de ácido nucleico) en el ácido nucleico molde.

Cuando el método de análisis de la presente invención se aplica al tipado, la base del sitio de mutación de ácido nucleico en el ácido nucleico molde puede ser de tipo silvestre o de tipo mutante, por ejemplo. Cuando existe una pluralidad de tipos mutantes, la base puede ser de cualquiera de los tipos mutantes.

Cuando el método de análisis de la presente invención se aplica al tipado, puede decirse que la sonda es, por ejemplo, una sonda de tipado. En cuanto a la sonda, por ejemplo, existen las siguientes primera realización y segunda realización. En la primera realización, la temperatura de disociación o la temperatura de asociación difiere entre el caso en el que la sonda no se aparea con el sitio de mutación de ácido nucleico y el caso en el que la sonda se aparea totalmente con el sitio de mutación de ácido nucleico, y la sonda puede detectar la mutación de ácido nucleico del sitio de mutación de ácido nucleico en función de la temperatura de disociación o la temperatura de asociación. La sonda de la primera realización puede determinar si la sonda no se aparea con el sitio de mutación de ácido nucleico o se aparea totalmente con el sitio de mutación de ácido nucleico en función de la temperatura de disociación o la temperatura de asociación. Como resultado, la sonda de la primera realización puede detectar si la base del sitio de mutación de ácido nucleico es una mutación prevista (por ejemplo, de tipo mutante o de tipo silvestre). Cuando la sonda, por ejemplo, es una sonda mt (del inglés *mutant type*) que se aparea totalmente con un sitio de mutación de

ácido nucleico de tipo mutante, la sonda mt muestra una potencia de asociación más fuerte a una secuencia objetivo de tipo mutante mt que tiene el sitio de mutación de ácido nucleico con el que la sonda se aparea totalmente, que una secuencia objetivo de tipo silvestre wt (del inglés *wild type*) que tiene el sitio de mutación de ácido nucleico con el que la sonda no se aparea. Por tanto, la temperatura de asociación de la sonda mt y la secuencia objetivo de tipo mutante mt es superior a la temperatura de asociación de la sonda mt y la secuencia objetivo de tipo silvestre wt.

En la segunda realización, la temperatura de disociación o la temperatura de asociación difiere entre el caso en el que la sonda no se aparea con el sitio de mutación de ácido nucleico y el caso en el que la sonda no se aparea totalmente con el sitio de mutación de ácido nucleico con un valor diferente de temperatura de fusión (Tf), y la sonda puede detectar la mutación de ácido nucleico del sitio de mutación de ácido nucleico en función de la temperatura de disociación o la temperatura de asociación. La sonda de la segunda realización puede determinar cuál de los desapareamientos está presente en función de la temperatura de disociación o la temperatura de asociación. Como resultado, la sonda de la segunda realización puede detectar si la base del sitio de mutación de ácido nucleico es una mutación prevista (por ejemplo, de tipo mutante o de tipo silvestre).

La sonda E es, como se ha descrito anteriormente, una sonda que incluye al menos dos grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón como la sustancia generadora de señales por molécula. Con respecto a la sonda E, por ejemplo, puede hacerse referencia a la Patente japonesa N.º 4370385 y el documento WO2014/013954.

En la secuencia de bases de la sonda que compone la sonda E, la posición de unión donde los dos grupos atómicos fluorescentes se unen no está limitada a posiciones particulares, y puede ser cualquier posición. La posición de unión puede ser, por ejemplo, la misma base o dos bases adyacentes en la sonda. Los dos grupos atómicos fluorescentes pueden unirse directamente a la sonda o pueden unirse indirectamente a la sonda, por ejemplo. En el último caso, los dos grupos atómicos fluorescentes se unen a la sonda a través de un enlazador, por ejemplo.

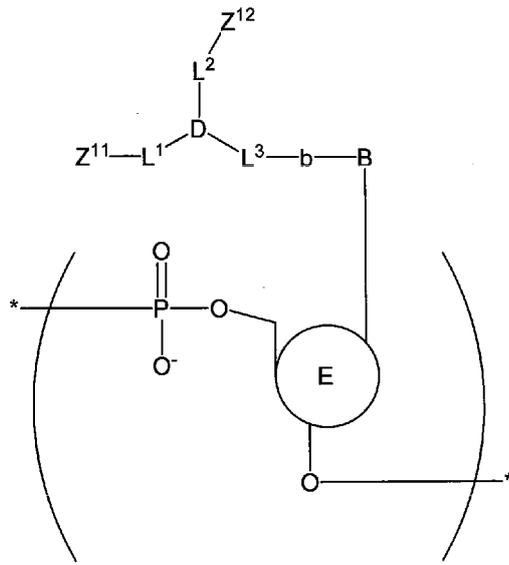
La sonda E es una sonda en la que se introducen dos grupos atómicos fluorescentes (por ejemplo, naranja de tiazol y su sustancia similar). La sonda E tiene la propiedad de apenas emitir fluorescencia debido al efecto de excitón que se obtiene cuando dos grupos atómicos fluorescentes forman exciplex en el caso una cadena simple, pero emite fluorescencia fuertemente, resolviéndose el efecto de excitón, cuando dos grupos atómicos fluorescentes se alejan el uno del otro tras su hibridación con un objetivo. Obsérvese en el presente documento que mientras que "sonda E" es el nombre comercial del producto de Kabushiki Kaisha DNAFORM ("Eprobe" es una marca registrada), la "sonda E" en la presente invención puede ser idéntica o diferente de un producto con el nombre comercial de la "sonda E" o la "Eprobe".

El extremo 3' de la sonda E puede modificarse de manera que no pueda prolongarse, por ejemplo. Específicamente, por ejemplo, el extremo 3' de la sonda E puede modificarse químicamente con un grupo OH enlazador.

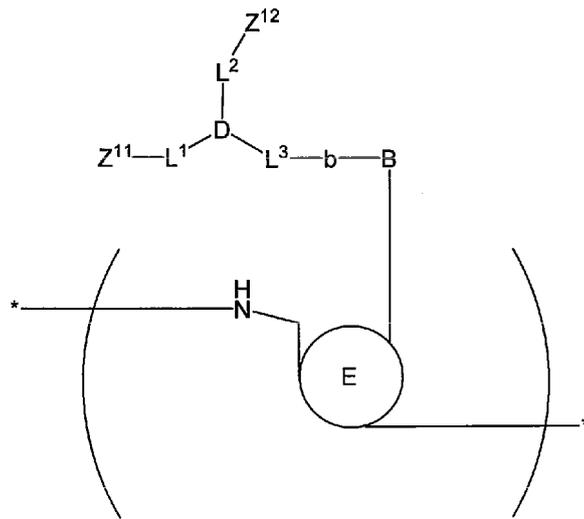
En la sonda E, grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón son cada uno:

- (i) el que emite fluorescencia, con dos estructuras químicas planares contenidas en una molécula, que no existen en el mismo plano sino con un determinado ángulo formado entre ellas, estando ubicadas de manera que se dispongan en el mismo plano cuando la molécula experimenta intercalación en o se une mediante un surco a un ácido nucleico,
- (ii) el compuesto por al menos dos grupos de moléculas de colorante que no presentan emisión de fluorescencia debido al efecto de excitón obtenido cuando al menos dos moléculas de colorante se agregan en paralelo entre sí pero presentan emisión de fluorescencia, resolviéndose el estado de agregación cuando las moléculas experimentan intercalación en o se unen mediante un surco a una molécula objetivo, por ejemplo, un ácido nucleico, o
- (iii) el caracterizado por tener una estructura química de al menos dos moléculas de colorante contenidas en una molécula, no presentando las al menos dos moléculas de colorante emisión de fluorescencia debido al efecto de excitón obtenido cuando se agregan en paralelo entre sí pero presentando emisión de fluorescencia, resolviéndose el estado de agregación cuando las moléculas experimentan intercalación en o se unen mediante un surco a una molécula objetivo, por ejemplo, un ácido nucleico. En el caso de (ii) o (iii), es preferible que la molécula de colorante sea la que se describe en el punto (i).

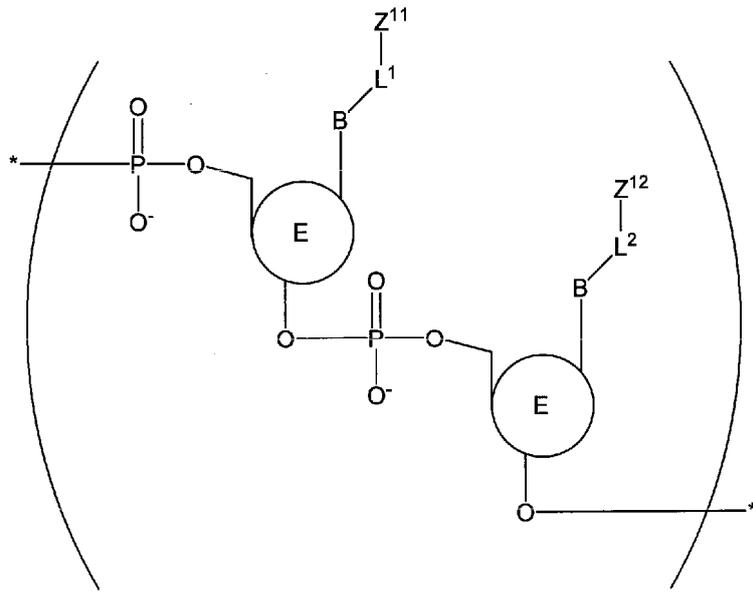
En la sonda E, la estructura de la molécula de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico marcado que contiene al menos una de las estructuras representadas por las siguientes fórmulas (16), (16b), (17), (17b), (18) y (18b). En la presente invención, el ácido nucleico marcado también abarca tautómeros y estereoisómeros de estas estructuras, así como sales de estas estructuras, tautómeros y estereoisómeros. En lo sucesivo en el presente documento, las estructuras representadas por las siguientes fórmulas respectivas y que tienen los grupos atómicos Z¹¹ y Z¹² que presentan fluorescencia pueden denominarse cada una "estructura marcada". El ácido nucleico marcado que contiene la estructura marcada puede denominarse "sonda marcada".



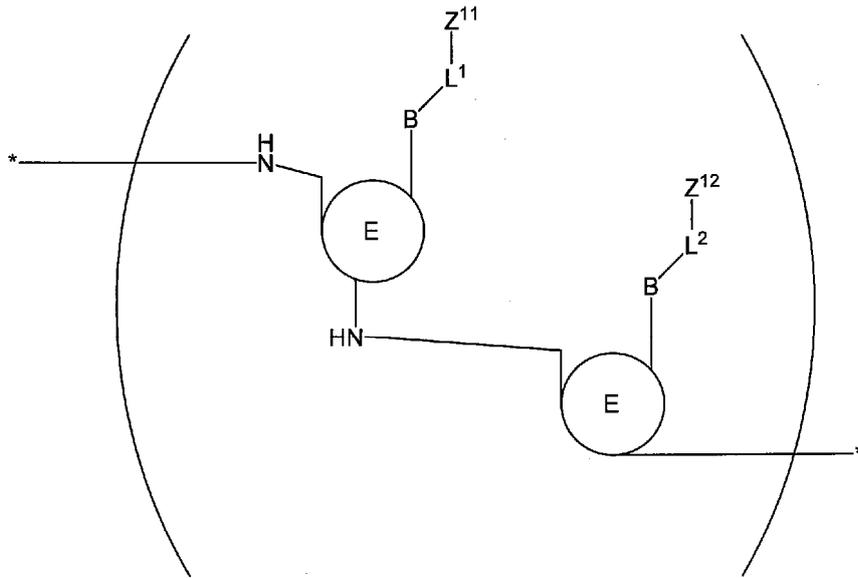
(16)



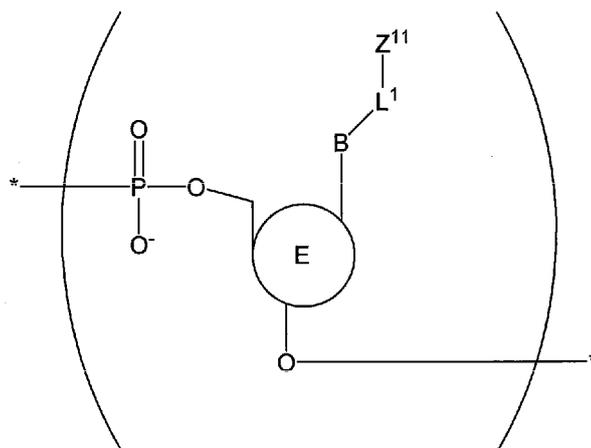
(16b)



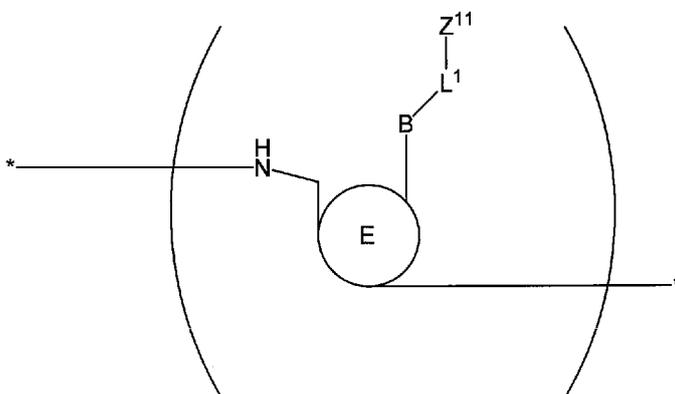
(17)



(17 b)



(1 8)



(1 8 b)

5 En las fórmulas (16), (16b), (17), (17b), (18) y (18b),
 B es un grupo atómico que tiene una cadena principal de nucleobases naturales (adenina, guanina, citosina, timina o uracilo) o una cadena principal de nucleobases artificiales,
 E es:

- 10 (i) un grupo atómico que tiene una cadena principal de desoxirribosa, una cadena principal de ribosa o una estructura derivada de cualquiera de ellas, o
 (ii) un grupo atómico que tiene una estructura peptídica o una estructura peptoide,

15 Z^{11} y Z^{12} son cada uno un grupo atómico que presenta fluorescencia, y pueden ser idénticos o diferentes entre sí,
 L^1 , L^2 y L^3 son cada uno un enlazador (un átomo de unión o un grupo atómico), la longitud de la cadena principal (el número de átomos de la cadena principal) de los mismos es arbitraria, L^1 , L^2 y L^3 cada uno puede o no contener cada uno de entre C, N, O, S, P y Si en la cadena principal, L^1 , L^2 y L^3 cada uno puede o no contener cada uno de entre un enlace simple, un doble enlace, un triple enlace, un enlace amida, un enlace éster, un enlace disulfuro, un grupo imino, un enlace éter, un enlace tioéter y un enlace tioéster en la cadena principal, y L^1 , L^2 y L^3 pueden ser idénticos o
 20 diferentes entre sí,
 D es CR, N, P, P=O, B o SiR donde R es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo o un sustituyente arbitrario, y
 b es un enlace simple, un doble enlace o un triple enlace,
 o como alternativa,
 25 en las fórmulas (16) y (16b), L^1 y L^2 son cada uno un enlazador, L^3 , D y b pueden no estar presentes, y L^1 y L^2 pueden unirse directamente a B, a condición de que:

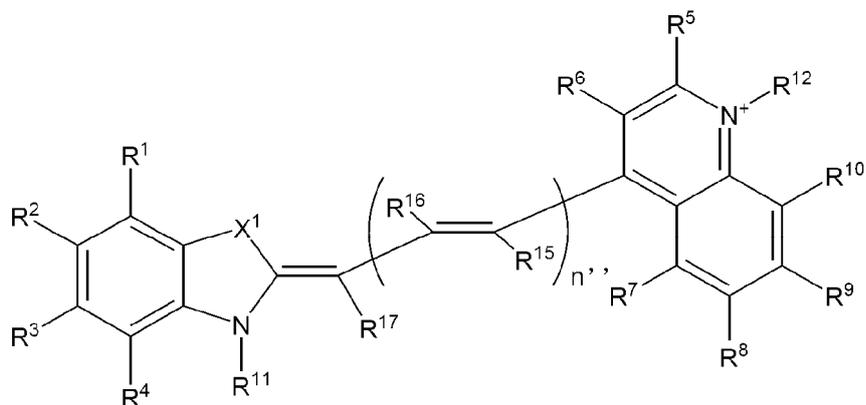
en las fórmulas (16), (17) y (18), E sea un grupo atómico descrito en el punto (i) y al menos un átomo O en un enlace de ácido fosfórico puede estar sustituido con un átomo de S;
 en las fórmulas (16b), (17b) y (18b), E sea un grupo atómico descrito en el punto (ii); y
 30 en las fórmulas (17) y (17b), los respectivos B pueden ser idénticos o diferentes entre sí, y los respectivos E pueden ser idénticos o diferentes entre sí.

En las fórmulas (16), (17), (16b), (17b), (18) y (18b), la longitud de la cadena principal (el número de átomos de la cadena principal) de cada uno de L¹, L² y L³ preferentemente es un número entero de 2 o más. El límite superior del mismo no está particularmente limitado, y es, por ejemplo, de 100 o menos, más preferentemente de 30 o menos y en particular preferentemente de 10 o menos.

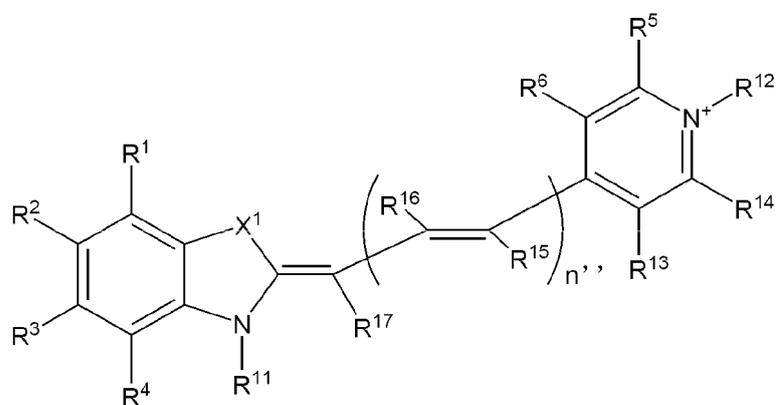
Z¹¹ y Z¹² son grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón. Esto permite que el entorno alrededor de los colorantes fluorescentes cambie cuando la sonda se une a una secuencia objetivo, por ejemplo, la fluorescencia aumentará en gran medida cuando se forme una estructura de doble hélice, de manera que la secuencia objetivo pueda detectarse con mayor eficacia.

Z¹¹ y Z¹² no están particularmente limitados siempre que sean grupos atómicos fluorescentes que presenten un efecto de excitón. Más preferentemente, Z¹¹ y Z¹² son, por ejemplo, cada uno independientemente un grupo derivado de uno cualquiera de entre naranja de tiazol, amarillo de oxazol, cianina, hemicianina, otros colorantes de cianina, rojo de metilo, colorantes azoicos y derivados de los mismos. Además, un grupo derivado de cualquier otro colorante conocido también puede usarse según sea adecuado. Se han publicado muchos colorantes fluorescentes que cambian la intensidad de fluorescencia mediante la unión a ácidos nucleicos tales como el ADN. En un ejemplo típico, se ha sabido que el bromuro de etidio presenta una fuerte fluorescencia mediante la intercalación en una estructura de doble hélice de ADN, y se usa frecuentemente para la detección de ADN. Además, también se conocen colorantes fluorescentes cuya intensidad de fluorescencia puede controlarse de acuerdo con la polaridad microscópica, tales como la pirenocarboxiamida y prodan. El naranja de tiazol es un colorante fluorescente con un anillo de benzotiazol y un anillo de quinolina unidos entre sí con un grupo metino. Por lo general presenta una fluorescencia débil pero proporciona una emisión fuerte de fluorescencia mediante intercalación en el ADN que tiene una estructura de doble hélice. Otros ejemplos incluyen colorantes tales como fluoresceína y Cy3.

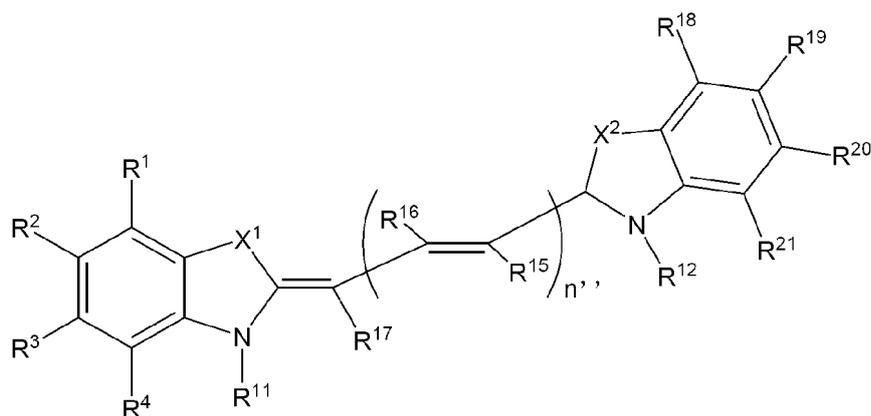
Más preferentemente, Z¹¹ y Z¹² son cada uno independientemente un grupo atómico representado por una cualquiera de las siguientes fórmulas (7) a (9).



(7)



(8)



(9)

En las fórmulas (7) a (9),

X^1 y X^2 son S, O o Se,

5 n' es 0 o un número entero positivo,

R^1 a R^{10} y R^{13} a R^{21} son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo inferior, un grupo alcoxi inferior, un grupo nitro o un grupo amino,

uno de entre R^{11} y R^{12} es un grupo de unión que se une a L^1 o L^2 en las fórmulas (16), (17), (16b), (17b), (18) y (18b),

y el otro es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior,

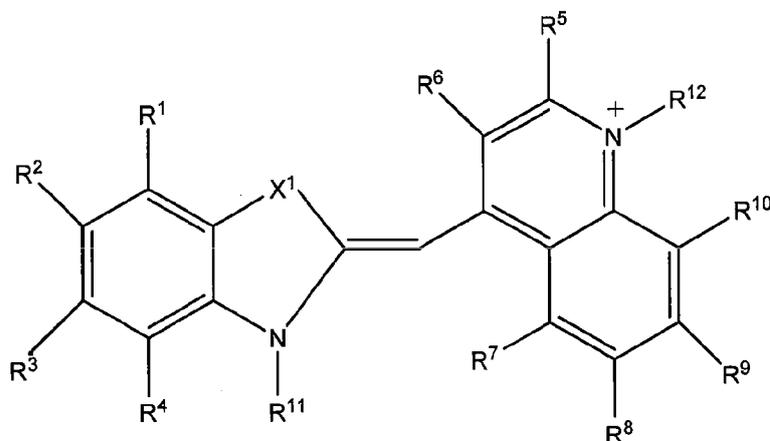
10 cuando hay presente una pluralidad de R^{15} en la fórmula (7), (8) o (9), pueden ser idénticos o diferentes entre sí,

cuando hay presente una pluralidad de R^{16} en la fórmula (7), (8) o (9), pueden ser idénticos o diferentes entre sí, y X^1 , X^2 y R^1 a R^{21} en Z^{11} y X^1 , X^2 y R^1 a R^{21} en Z^{12} pueden ser idénticos o diferentes entre sí, respectivamente.

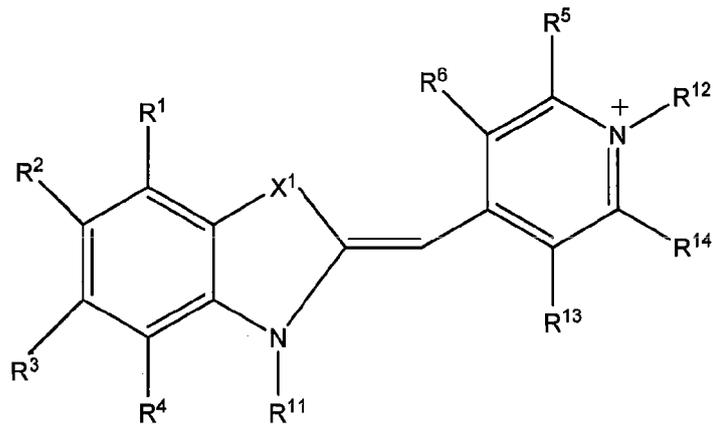
En las fórmulas (7) a (9), es más preferible que, en R^1 a R^{21} , el grupo alquilo inferior es un grupo alquilo lineal o ramificado con un número de carbonos de 1 a 6, y el grupo alquilo inferior es un grupo alquilo lineal o ramificado con un número de carbono de 1 a 6.

En las fórmulas (7) a (9), es más preferible que en R^{11} y R^{12} , el grupo de unión es un grupo polimetilencarbonilo con un número de carbono de al menos 2 y se une a L^1 o L^2 en la fórmula (16), (17), (16b), (17b), (18) o (18b) en el resto de grupo carbonilo. El límite superior del número de carbonos del grupo polimetilencarbonilo no está particularmente limitado, y es, por ejemplo, de 100 o menos, preferentemente de 50 o menos, más preferentemente de 30 o menos y en particular preferentemente de 10 o menos.

25 Cuando Z^{11} y Z^{12} se representan cada uno por una cualquiera de las fórmulas (7) a (9), es más preferible que sean, por ejemplo, cada uno independientemente un grupo representado por la fórmula (19) o (20).



(19)

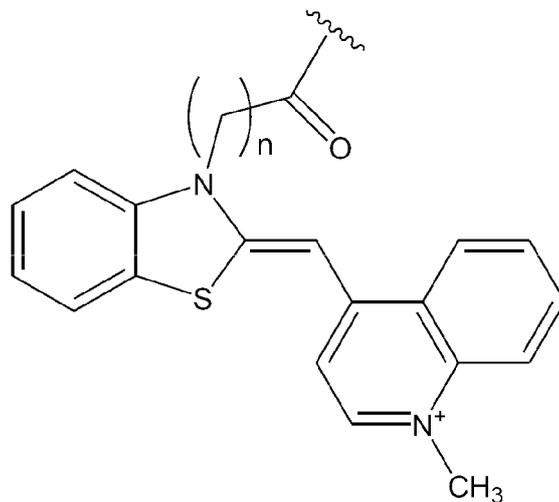
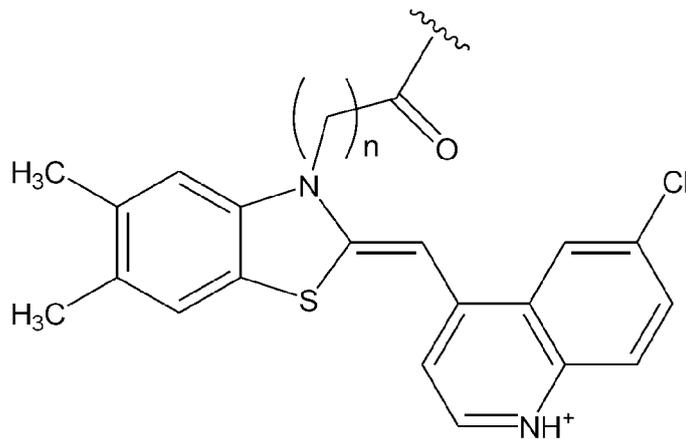


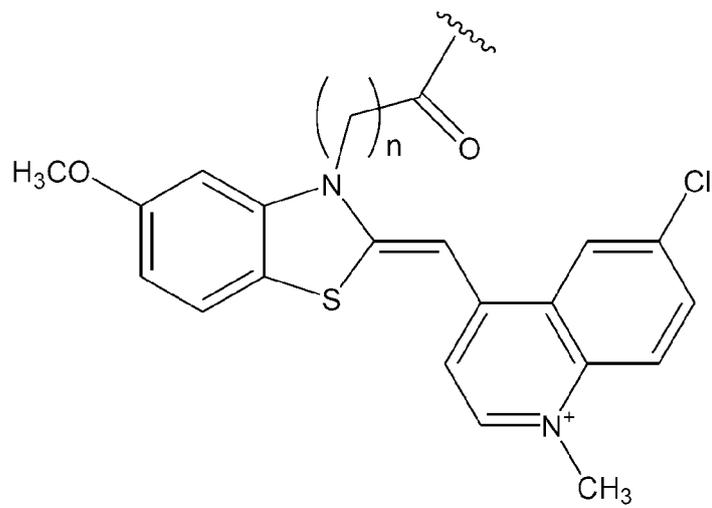
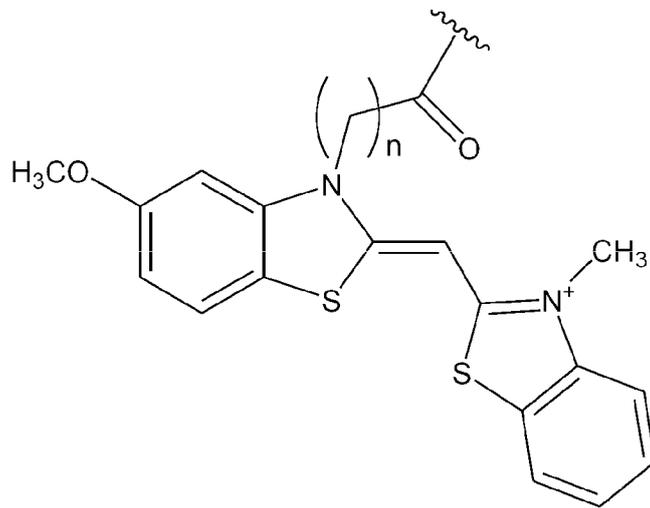
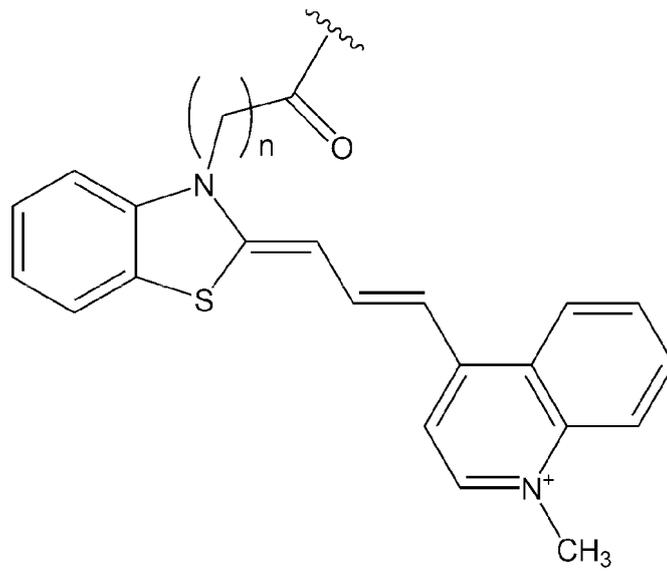
(20)

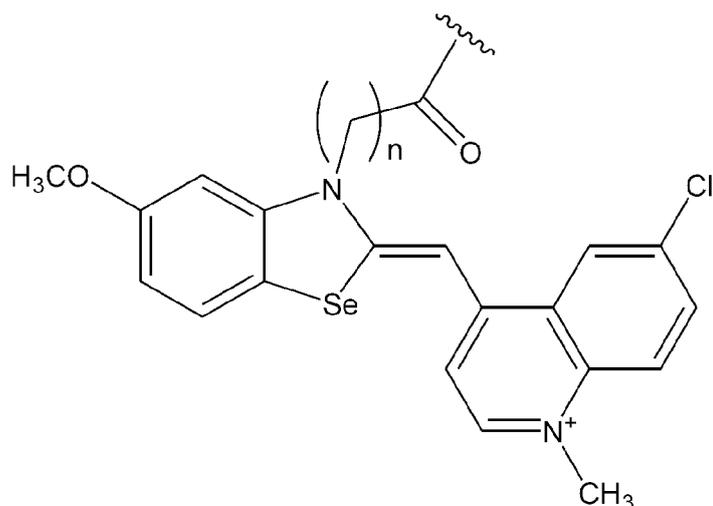
En las fórmulas (19) y (20), X¹ denota -S- o -O-. R¹ a R¹⁰ y R¹³ y R¹⁴ indican cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo inferior, un grupo alcoxi inferior, un grupo nitro o un grupo amino.
 5 Uno de entre R¹¹ y R¹² es un grupo de unión que se une a L¹ o L² en las fórmulas (16), (17), (16b), (17b), (18) y (18b), y el otro es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior.

Particular y preferentemente, Z¹¹ y Z¹² son cada uno independientemente un grupo atómico representado por una cualquiera de las siguientes fórmulas químicas.

10

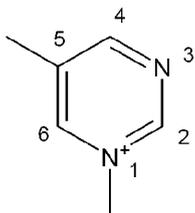




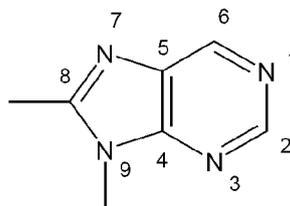


En cada una de las fórmulas químicas anteriores, es particularmente preferible que n sea un número entero positivo y en el intervalo de 2 a 6.

5 En las fórmulas (16), (17), (16b), (17b), (18) y (18b), B puede tener una cadena principal de nucleobases naturales, y además, como se ha descrito anteriormente, puede tener una cadena principal de nucleobases artificiales. Por ejemplo, B es preferentemente una estructura representada por Py (anillo de pirimidina), Py der., Pu (anillo de purina) o Pu der. La Py es un grupo atómico que tiene un enlace covalente a E en la posición 1 y un enlace covalente a un resto enlazador en la posición 5 en un anillo de seis miembros representado por la siguiente fórmula (11). La Py der. es un grupo atómico en el que al menos uno de todos los átomos del anillo de seis miembros de la Py se ha sustituido con un átomo de N, C, S u O, y el átomo de N, C, S u O opcionalmente puede tener una carga eléctrica, un átomo de hidrógeno o un sustituyente. La Pu es un grupo atómico que tiene un enlace covalente a E en la posición 9 y un enlace covalente a un resto enlazador en la posición 8 en un anillo condensado representado por la siguiente fórmula (12). La Pu der. es un grupo atómico en el que al menos uno de todos los átomos de un anillo de cinco miembros de la Pu se ha sustituido con un átomo de N, C, S u O, y el átomo de N, C, S u O opcionalmente puede tener una carga eléctrica, un átomo de hidrógeno o un sustituyente.

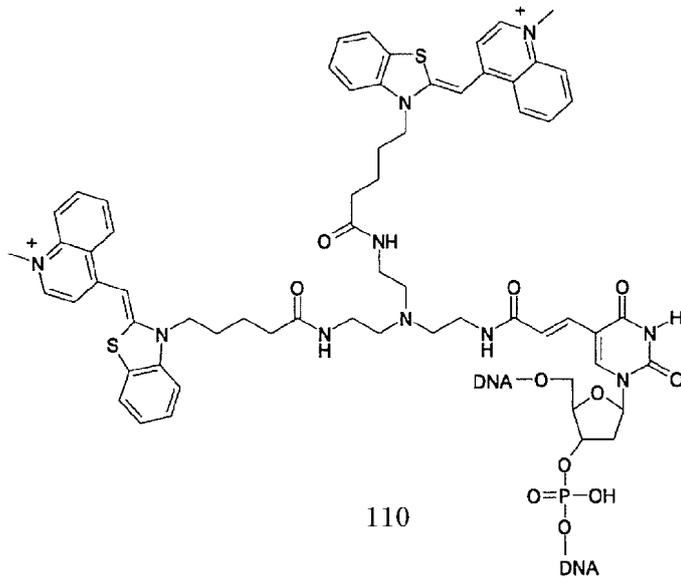
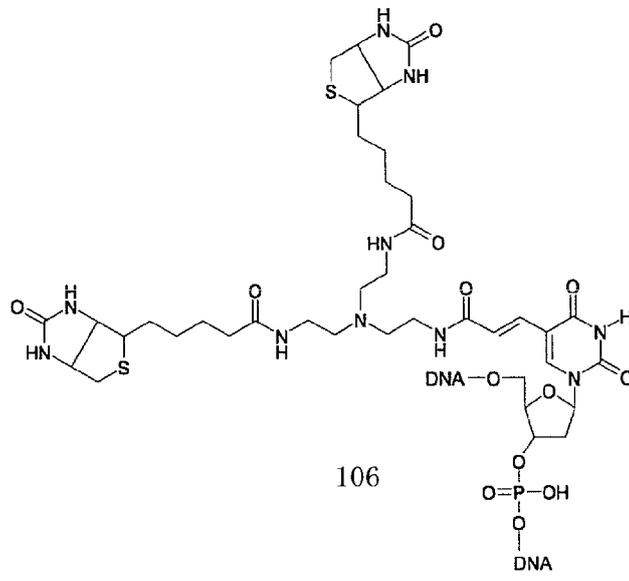


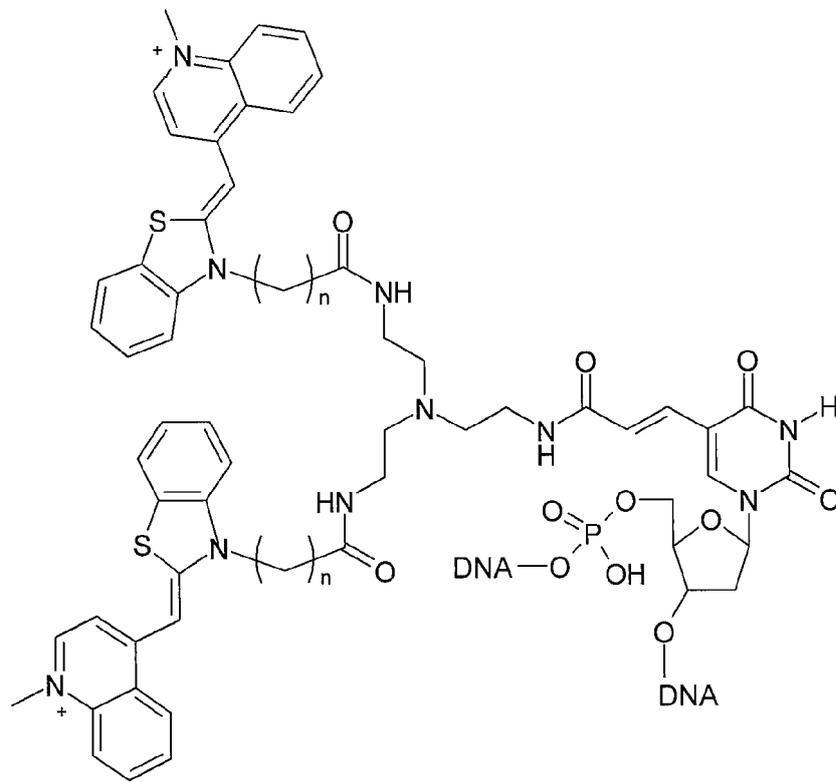
(1 1)



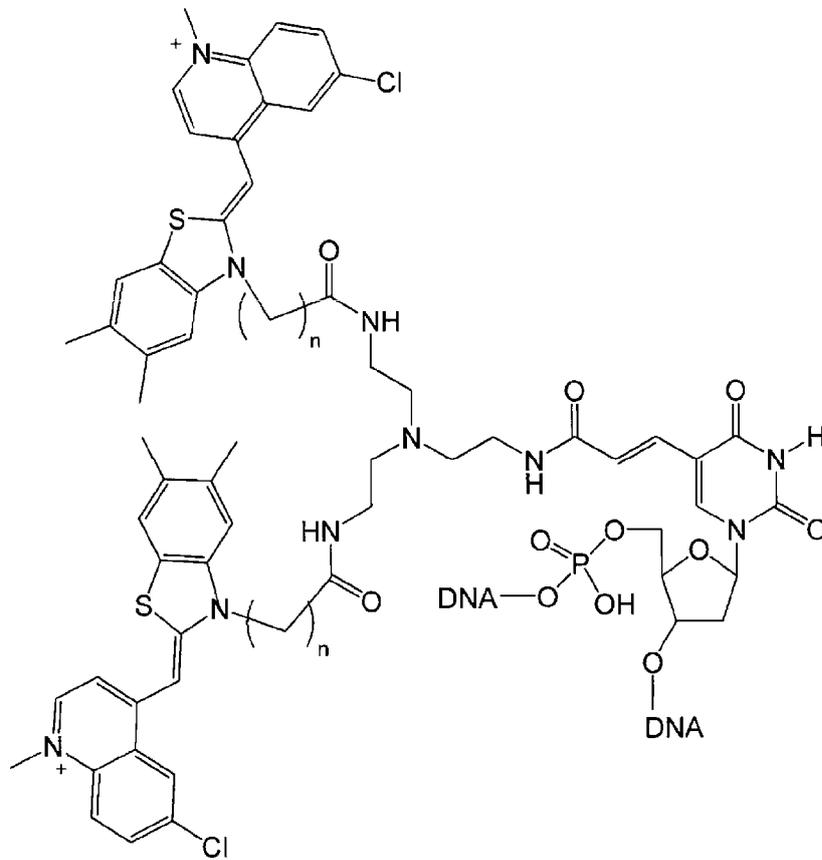
(1 2)

20 La molécula de ácido nucleico en la sonda E puede incluir, por ejemplo, al menos una de las estructuras representadas por las siguientes fórmulas químicas 106, 110, 113, 117, 120, 122, 123, 124 y 114-2, isómeros geométricos y estereoisómeros de las mismas, y sales de las mismas.

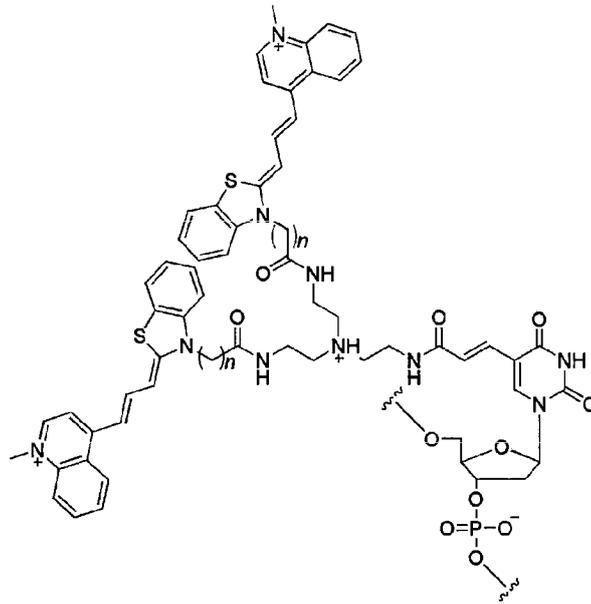




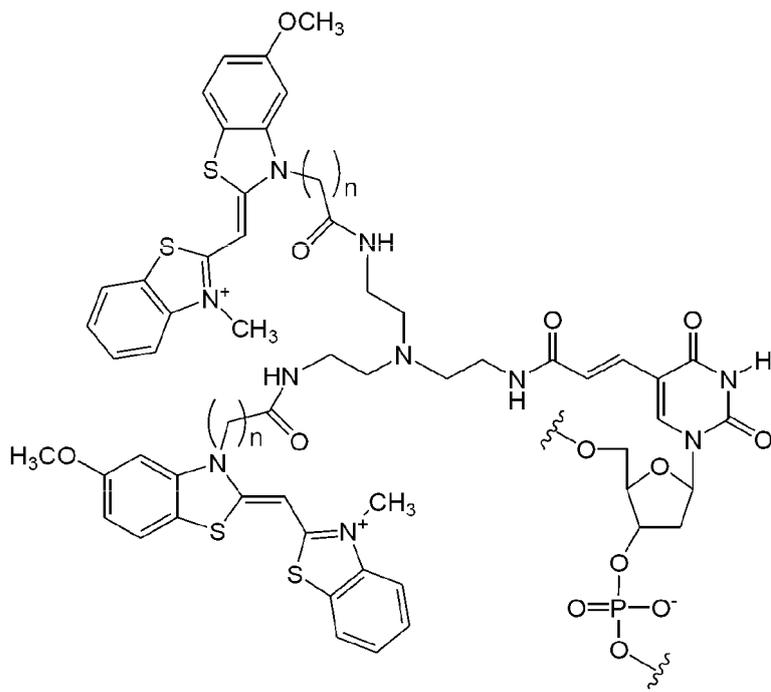
1 1 3



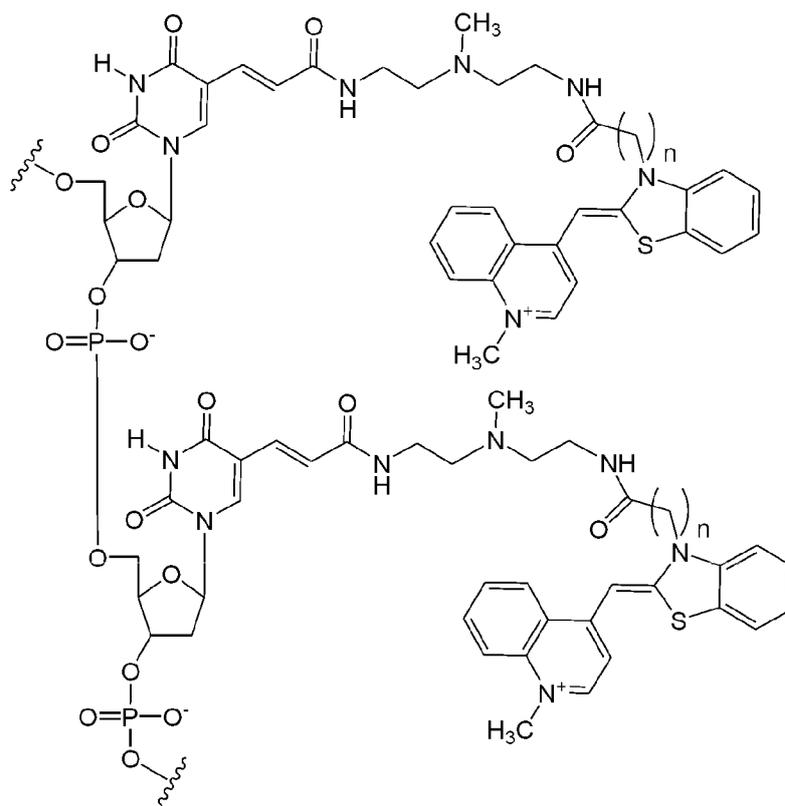
1 1 7



120



(122)



(1 1 4 - 2)

En las fórmulas químicas 106, 110, 113, 117, 120, 122, 123, 124 y 114-2, la longitud del enlazador n preferentemente es un número entero positivo y en el intervalo de 2 a 6.

5 El número de las estructuras marcadas contenidas en la sonda E no está particularmente limitado, y es, por ejemplo, aproximadamente de 1 a 100 o aproximadamente de 1 a 20. En la sonda E, el sitio en el que la estructura marcada está incluida tampoco está particularmente limitada.

10 La sonda puede estar compuesta una cualquiera por un resto de nucleótido natural, un resto no nucleotídico, un resto de nucleótido modificado y una cadena principal no natural, por ejemplo, y la sonda puede contener uno, dos, tres o cuatro de ellos. La cadena principal no natural no está particularmente limitada y los ejemplos de la misma incluyen ANL, ANP y ácidos nucleicos que tienen un enlace fosfodiéster modificado. Además, el resto de nucleótido modificado no está particularmente limitado y puede ser un resto de nucleótido de fosforioato, y el resto de nucleótido puede
15 contener un átomo de azufre (S) o puede modificarse con un átomo de azufre (S).

La cadena principal básica de la sonda no está particularmente limitada. Los ejemplos de la misma incluyen oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos, oligonucleósidos modificados, polinucleótidos, polinucleótidos modificados, polinucleósidos, polinucleósidos modificados, ADN, ADN modificados, ARN, ARN
20 modificados, ANL, ANP (ácidos nucleicos peptídicos), moléculas quiméricas de los mismos, y otras estructuras. Además, la cadena principal básica del ácido nucleico puede ser una natural o una sintetizada artificialmente. Cuando el ácido nucleico es una sonda, el ácido nucleico no está particularmente limitado siempre que pueda proporcionar apareamiento de bases, por ejemplo. Cuando el ácido nucleico es una muestra de ácido nucleico o una secuencia de ácido nucleico objetivo, el ácido nucleico no está particularmente limitado siempre que, por ejemplo, sirva como molde
25 para sintetizar una cadena complementaria. Por tanto, el ácido nucleico puede ser un derivado de nucleótido, una parte o la totalidad del cual están compuestas por una estructura totalmente artificial, por ejemplo. Los ejemplos de bases artificiales que componen el ácido nucleico incluyen, pero sin limitación, 2-amino-6-(N,N-dimetilamino)purina, piridin-2-ona, 5-metilpiridina-2-ona, 2-amino-6-(2-tienil)purina, pirrol-2-carbaldehído, 9-metilimidazo[(4,5)-b]piridina, 5-yodo-2-oxo(1H)piridina, 2-oxo-(1H)piridina, 2-amino-6-(2-tiazolil)purina y 7-(2-tienil)-imidazo[4,5-b]piridina.

30 En el método de análisis de la presente invención, el "nucleótido" puede ser un desoxinucleótido o un ribonucleótido, por ejemplo, y el "oligonucleótido" y el "polinucleótido" pueden estar compuestos por cada uno de desoxinucleótido y ribonucleótidos o pueden contener ambos. En la sonda, el número de bases que componen el ácido nucleico no está particularmente limitado. Generalmente, la expresión "ácido nucleico" es sinónimo con el término "polinucleótido".
35 Generalmente, el término "oligonucleótido" se usa como un término que indica un polinucleótido compuesto por un número particularmente pequeño de bases, entre otros. En general, un polinucleótido de, por ejemplo, de 2 a 100 monómeros, más generalmente aproximadamente de 2 a 50 monómeros se denomina "oligonucleótido", pero no está

limitado por estos valores numéricos. En el primer método de análisis, el término "polinucleótido" también debe interpretarse como que abarca, por ejemplo, polinucleótido y oligonucleótido, así como ácidos nucleicos sintetizados artificialmente tales como ácido nucleico peptídico, ácido nucleico de morfolina, ácido nucleico de metilfosfonato y ácido S-oligonucleico.

5 Generalmente, el ácido nucleico peptídico (ANP) tiene una estructura en la que una cadena principal de desoxirribosa se ha sustituido con una cadena principal peptídica. Los ejemplos de la cadena principal peptídica incluyen una unidad repetitiva de N-(2-aminoetil)glicina unida mediante un enlace amida. Los ejemplos de la base que ha de unirse a la cadena principal peptídica del ANP incluyen, pero sin limitación: bases de origen natural tales como timina, citosina, adenina, guanina, inosina, uracilo, 5-metilcitosina, tiouracilo y 2,6-diaminopurina; y bases artificiales tales como bromotimina, azaadenina y azaguanina.

15 Generalmente, el ANL es un ácido nucleico que tiene dos estructuras cíclicas en las que, en una cadena principal de azúcar-ácido fosfórico, un átomo de oxígeno en la posición 2' y un átomo de carbono en la posición 4' de la ribosa se unen entre sí mediante entrecruzamiento de metileno. Cuando el oligonucleótido que contiene ANL se hibrida con el ADN, la conformación bicatenaria cambia, por lo que la estabilidad térmica mejora. El ANL tiene una afinidad de unión más fuerte con un ácido nucleico que el oligonucleótido común. Por tanto, por ejemplo, estableciendo adecuadamente las condiciones de diseño de los oligonucleótidos, puede conseguirse una hibridación más fiable y más fuerte.

20 El número de bases contenidas en la sonda no está particularmente limitado, y puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100, aproximadamente de 6 a 50 o aproximadamente de 6 a 25.

25 El conjunto de cebadores fluorogénicos que incluye una sustancia generadora de señales puede ser, por ejemplo, un cebador que genera la señal en un estado en el que se une a un objetivo e interrumpe la señal en un estado en el que se disocia del objetivo o un cebador que interrumpe la señal en un estado en el que se une a un objetivo y genera la señal en un estado en el que se disocia del objetivo.

30 La sustancia generadora de señales del cebador fluorogénico puede ser, como se ha descrito anteriormente, cualquier sustancia siempre que sea fluorogénica. Los ejemplos específicos de la sustancia generadora de señales incluyen una sustancia que presenta un fenómeno de interrupción de fluorescencia y un grupo atómico fluorescente que presenta un efecto de excitón. Los ejemplos específicos del cebador fluorogénico incluyen un cebador que incluye una sustancia que presenta un fenómeno de interrupción de la fluorescencia (cebador de fenómeno de interrupción (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado "cebador Q" (del inglés *quenching*))) y un cebador que incluye al menos dos grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón como la sustancia generadora de señales por molécula (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado "cebador E").

40 El cebador E es, como se ha descrito anteriormente, un cebador que incluye al menos dos grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón como la sustancia generadora de señales por molécula. Con respecto al cebador E, puede hacerse referencia a la descripción en cuanto a la sonda E reemplazando "sonda E" por "cebador E" y "sonda" por "cebador", a menos que se indique otra cosa. El número de las estructuras marcadas contenidas en el cebador E no está particularmente limitado, y es, por ejemplo, de 1 a 100 o de 1 a 20. En el cebador E, un sitio que contiene la estructura marcada no está particularmente limitado.

45 El número de bases contenidas en el cebador no está particularmente limitado, y puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100, aproximadamente de 6 a 50 o aproximadamente de 6 a 25.

50 En el método de análisis de la presente invención, el reactivo de amplificación de ácido nucleico puede contener otros reactivos, por ejemplo. Los ejemplos del otro reactivo incluyen una sonda no fluorogénica, una enzima tal como la polimerasa y ácido nucleico monomérico (dNTP) para la amplificación. Por ejemplo, puede provocarse que la muestra que contiene el ácido nucleico molde contenga preliminarmente el reactivo de amplificación de ácido nucleico, puede provocarse que la muestra que contiene el ácido nucleico molde contenga el reactivo de amplificación de ácido nucleico en la etapa de fraccionamiento, puede provocarse que las fracciones de ácido nucleico molde cada una contenga el reactivo de amplificación de ácido nucleico en la etapa de fraccionamiento, o puede provocarse que las fracciones de ácido nucleico molde cada una contenga el reactivo de amplificación de ácido nucleico después de la etapa de fraccionamiento y antes de la etapa de amplificación. Cuando la muestra que contiene el ácido nucleico molde contiene el reactivo de amplificación de ácido nucleico, la muestra que contiene el ácido nucleico molde y el reactivo de amplificación de ácido nucleico puede fraccionarse en la pluralidad de fracciones en la etapa de fraccionamiento que se describe a continuación.

60 La sonda no fluorogénica es una sonda que genera o interrumpe una señal en respuesta a la amplificación de la secuencia objetivo y la secuencia complementaria en el ácido nucleico molde. La sonda no fluorogénica es una sonda que no es fluorogénica, y puede ser, por ejemplo, una sonda que no sea la sonda fluorogénica. Los ejemplos de la sonda no fluorogénica incluyen sondas marcadas con fluorescencia con sustancias fluorescentes. Específicamente, los ejemplos incluyen una sonda TaqMan®, una sonda de ciclado, una sonda Alexa Fluor® y Qdot®. En el método de análisis de la presente invención, puede usarse un intercalador tal como SYBR® Green en lugar de la sonda no fluorogénica, por ejemplo. Con respecto a la posición y la secuencia de la sonda no fluorogénica que ha de hibridarse

con una secuencia prevista, por ejemplo, puede hacerse referencia a la descripción en cuanto a la posición y la secuencia de la sonda fluorogénica que ha de hibridarse con una secuencia prevista. Cuando el reactivo de amplificación de ácido nucleico contiene una sonda no fluorogénica, la clase de la sonda no fluorogénica no está particularmente limitada, y puede hacerse referencia a los ejemplos de la clase del ácido nucleico molde, por ejemplo.

5 El número total de las clases de la sonda no fluorogénica y las clases de la sustancia generadora de señales es preferentemente el mismo que el número de las clases del ácido nucleico molde, por ejemplo. Cuando el reactivo de amplificación de ácido nucleico contiene una sonda no fluorogénica, la sustancia generadora de señales y la sonda no fluorogénica pueden generar o interrumpir señales en respuesta a la amplificación de la secuencia objetivo y la secuencia complementaria en el mismo ácido nucleico molde o pueden generar o interrumpir señales en respuesta a la amplificación de las secuencias objetivo y las secuencias complementarias en los diferentes ácidos nucleicos molde, y esto último es preferible ya que permite analizar de forma sencilla al menos dos ácidos nucleicos molde.

15 En la etapa de fraccionamiento, el volumen promedio de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde no está particularmente limitado y es, por ejemplo, de 0,0001 a 5000 nl, de 0,0001 a 2000 nl, de 0,005 a 2000 nl, de 0,005 a 1000 nl, de 0,01 a 1000 nl, de 0,05 a 500 nl, de 0,1 a 500 nl, de 0,2 a 500 nl, de 0,5 a 500 nl, de 0,5 a 200 nl, de 0,5 a 100 nl, de 1 a 100 nl, de 1 a 50 nl, de 2 a 50 nl o de 5 a 50 nl.

20 En el método de análisis de la presente invención, preferentemente, cada etapa se realiza en una solución de reacción, por ejemplo. La solución de reacción puede contener un reactivo necesario de manera adecuada de acuerdo con el tipo del método de amplificación, por ejemplo.

1. Etapa de fraccionamiento

25 En la etapa de fraccionamiento, la muestra que contiene el ácido nucleico molde se fracciona en la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde. En la etapa de fraccionamiento, el método para fraccionar la muestra no está particularmente limitado, y el método puede ser, por ejemplo, un método para fraccionar la muestra en la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde haciendo gotear la muestra. Como ejemplo específico, la etapa de fraccionamiento incluye, por ejemplo, la siguiente etapa (1-1) o la etapa (1-2).

30 (1-1) Etapa de formación de una emulsión a partir de la muestra
(1-2) Etapa de fraccionamiento de la muestra en la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde dispensando la muestra a un chip provisto de una pluralidad de porciones de formación de fracciones sobre su superficie

Etapa (1-1)

35 En la etapa (1-1), se forma una emulsión a partir de la muestra. En la emulsión, la fracción de ácido nucleico molde es una gota de la muestra dispersada en la emulsión. La emulsión puede formarse usando un disolvente insoluble en agua y un disolvente hidrosoluble (disolvente acuoso), que forman una emulsión, poniendo en contacto el disolvente insoluble en agua con el disolvente hidrosoluble en presencia de la muestra para formar una pluralidad de gotas en el disolvente insoluble en agua. Con respecto al contacto, por ejemplo, el disolvente hidrosoluble puede ponerse en contacto con el disolvente insoluble en agua o el disolvente insoluble en agua puede ponerse en contacto con el disolvente hidrosoluble. El método de formación puede ser, por ejemplo, un método de formación de gotitas usando un canal de micro flujo (por ejemplo, el sistema RainDrop® producido por RainDnace Technologies, el sistema de PCR digital de gotitas QX200® AutoDG® producido por BIO-RAD, etc.). La muestra puede estar contenida en un disolvente insoluble en agua o en un disolvente hidrosoluble, por ejemplo. Cuando ácido nucleico molde es, por ejemplo, una muestra dispersada en el disolvente hidrosoluble, la muestra puede usarse como disolvente hidrosoluble. En cuanto a la formación de emulsión, puede usarse un método común para formar una emulsión. El método de formación de emulsiones no está particularmente limitado y puede usarse un dispositivo emulsionador, por ejemplo. El dispositivo emulsionador puede ser, por ejemplo, un canal de flujo provisto de un canal de flujo de muestra, un canal de flujo de reactivo de amplificación de ácido nucleico, un canal de flujo de disolvente insoluble en agua, una porción de acoplamiento de la misma y un canal de flujo de entrega entregado desde la porción de acoplamiento. Cuando se usa el dispositivo emulsionador, por ejemplo, el disolvente insoluble en agua se introduce en la porción de acoplamiento desde el canal de flujo de disolvente insoluble en agua y después la muestra se introduce desde el canal de flujo de muestra, y el reactivo de amplificación de ácido nucleico se introduce desde el canal de flujo de reactivo de amplificación de ácido nucleico en la porción de acoplamiento en la que se ha introducido disolvente insoluble en agua. Después, por ejemplo, el disolvente insoluble en agua, la muestra y el reactivo de amplificación de ácido nucleico se ponen en contacto entre sí en la porción de acoplamiento, y la mezcla de los mismos se emulsiona y se entrega desde la porción de acoplamiento al canal de flujo de entrega en forma de la emulsión. En cuanto a la muestra y el reactivo de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, uno de ellos puede estar contenido en el disolvente insoluble en agua y el otro puede estar contenido en el disolvente hidrosoluble, o ambos pueden estar contenidos en uno de entre el disolvente insoluble en agua y el disolvente hidrosoluble. El reactivo de amplificación de ácido nucleico, como se ha descrito anteriormente, puede estar contenido en la muestra. En este caso, la emulsión puede formarse de la misma manera que se ha descrito anteriormente usando un dispositivo emulsionador provisto de un canal de flujo de muestra, un canal de flujo de disolvente insoluble en agua, una porción de acoplamiento y un canal de flujo de entrega entregado desde la porción de acoplamiento, por ejemplo.

Los ejemplos de disolvente insoluble en agua incluyen aceite, aceite mineral, cloroformo y compuestos aromáticos. Uno de los disolventes insolubles en agua puede usarse solo o pueden usarse dos o más de ellos en combinación.

5 Los ejemplos del disolvente hidrosoluble incluyen agua, soluciones tampón y soluciones de polímero hidrosoluble. Uno de los disolventes hidrosolubles puede usarse solo o pueden usarse dos o más de ellos en combinación.

En la etapa (1-1), la relación de volumen (N : A) de un disolvente insoluble en agua (N) y un disolvente hidrosoluble (A) que han de ponerse en contacto entre sí es, por ejemplo, 1 : 0.00001 a 2, 1 : 0,0001 a 1 o 1 : 0,001 a 0,5.

10 La emulsión formada en la etapa (1-1) es, por ejemplo, una emulsión de agua en aceite (de tipo W/O). El volumen promedio de la gota en la emulsión es, por ejemplo, de 0,0001 a 50000 nl, de 0,001 a 500 nl o de 0,01 a 50 nl. El número de gotas en la emulsión no está limitado siempre que sea más de uno, y es, por ejemplo, de 2 a 1000000000, de 1000 a 1000000000 o de 10000 a 1000000000. Las concentraciones del ácido nucleico molde y del reactivo de amplificación de ácido nucleico contenido en la gota no están particularmente limitadas. La concentración del ácido nucleico molde en la gota es, por ejemplo, de 0 a 5000 µg/l, de 0 a 500 µg/l o de 0 a 50 µg/l.

Etapa (1-2)

20 En la etapa (1-2), la muestra se fracciona en la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde dispensando la muestra a un chip provisto de una pluralidad de porciones de formación de fracciones sobre su superficie. El chip utilizado en la etapa (1-2) puede ser cualquier chip siempre que esté provisto de una pluralidad de porciones de formación de fracciones sobre su superficie. Los ejemplos específicos del chip incluyen el siguiente chip (A), chip (B) y chip (C). En lo sucesivo en el presente documento, la etapa (1-2) se denomina etapa (1-2A) cuando se usa el chip (A), la etapa (1-2) se denomina etapa (1-2B) cuando se usa el chip (B) y la etapa (1-2) se denomina etapa (1-2C) cuando se usa el chip (C).

(A) Un chip en el que la superficie de la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es hidrófila, y la superficie de la región que excluye la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es hidrófoba.

30 (B) Un chip en el que la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es una muesca de la superficie del chip, y una región que excluye la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde no es una muesca.

(C) Un chip en el que la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es una muesca del chip y la superficie interna de la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es hidrófila, y una región que excluye la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde no es una muesca y la superficie de la región que excluye la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es hidrófoba.

35

Etapa (1-2A)

40 La etapa (1-2A) es una etapa de usar el chip (A). En el chip (A), la superficie de la porción de formación de fracción es hidrófila y la superficie de la región que excluye la porción de formación de fracción es hidrófoba. Por tanto, mediante la aplicación de la muestra a la superficie del chip, la muestra se separa en las porciones de formación de fracciones de ácido nucleico molde hidrófilas, de manera que la muestra pueda fraccionarse en la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde.

45 En el chip (A), la porción de formación de fracción puede formarse mediante la aplicación de un disolvente que contenga una sustancia hidrófila y un disolvente que contenga una sustancia hidrófoba al sustrato del chip, por ejemplo. Cuando el sustrato es hidrófilo o hidrófobo, la porción de formación de fracción puede formarse mediante la aplicación del disolvente que contiene una sustancia hidrófoba o el disolvente que contiene una sustancia hidrófila al sustrato. La sustancia hidrófila y la sustancia hidrófoba no están particularmente limitadas y pueden usarse sustancias conocidas públicamente. En el chip (A), el número de las porciones de formación de fracciones no está particularmente limitado siempre que sea más de uno. Cuando existe una pluralidad de porciones de formación de fracciones, la distancia entre las porciones de formación de fracciones puede determinarse adecuadamente de acuerdo con el tamaño de cada fracción de ácido nucleico molde, por ejemplo. Específicamente, la distancia puede ser una distancia con la que las fracciones de ácido nucleico molde no están en contacto entre sí.

55 Etapa (1-2B)

60 La etapa (1-2B) es una etapa de usar el chip (B). En el chip (B), la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es una muesca de la superficie del chip, y la región que excluye la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde no es una muesca. Por tanto, mediante la aplicación de la muestra a la superficie del chip, la muestra se introduce en las porciones de formación de fracciones de ácido nucleico molde, que son muescas en el chip, de manera que la muestra pueda fraccionarse en la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde.

65 En el chip (B), la porción de formación de fracción puede formarse cortando el sustrato del chip, por ejemplo. En el chip (B), el número de las porciones de formación de fracciones no está particularmente limitado siempre que sea más de uno. El producto interno de la porción de formación de fracción no está particularmente limitado y puede determinarse adecuadamente de acuerdo con el volumen promedio de las fracciones de ácido nucleico molde, por

ejemplo.

Etapa (1-2C)

5 La etapa (1-2C) es una etapa de usar el chip (C). En el chip (C), la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es una muesca del chip y la superficie interna de la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es hidrófila, y la región que excluye la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde no es una muesca y la superficie de la región que excluye la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es hidrófoba. Por tanto, mediante la aplicación de la muestra a la superficie del chip, la muestra se separa en las porciones de formación de fracciones de ácido nucleico molde hidrófilas, de manera que la muestra pueda fraccionarse en la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde. El chip (C) puede fraccionar la muestra en la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde con rapidez y precisión debido a la combinación de la muesca y la hidrofilia en las porciones de formación de fracciones y la combinación de la no muesca y la hidrofobia en la región que excluye las porciones de formación de fracciones.

15 Con respecto al método de formación, el número y los productos internos de las porciones de formación de fracciones del chip (C), puede hacerse referencia a las descripciones en cuanto al chip (A) y el chip (B).

20 En la etapa (1-2), el reactivo de amplificación de ácido nucleico puede disponerse en la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde del chip, y puede provocarse que la fracción de ácido nucleico molde contenga el reactivo de amplificación de ácido nucleico en la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde sobre el chip en la etapa de fraccionamiento. El número de los chips utilizados en la etapa (1-2) no está particularmente limitado y puede determinarse adecuadamente de acuerdo con el número de las fracciones de ácido nucleico molde que han de fraccionarse en la etapa de fraccionamiento. Específicamente, el número de los chips utilizados en la etapa (1-2) puede ser uno o más de uno.

2. Etapa de amplificación

30 En la etapa de amplificación, la secuencia objetivo y su secuencia complementaria en el ácido nucleico molde se amplifican en presencia del reactivo de ácido nucleico con respecto a cada fracción de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde. Específicamente, la etapa de amplificación se realiza sometiendo el disolvente insoluble en agua a condiciones de reacción de amplificación de ácido nucleico. De este modo, la secuencia objetivo y su secuencia complementaria en el ácido nucleico molde se amplifican a partir de cada uno de entre el primer cebador y el segundo cebador con respecto a la fracción de ácido nucleico molde que contiene el ácido nucleico molde y el reactivo de amplificación de ácido nucleico entre la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde.

35 En el método de análisis de la presente invención, el método de amplificación adoptado en la etapa de amplificación puede ser, por ejemplo, un método de amplificación isotérmica y una amplificación no isotérmica. El método de amplificación isotérmica puede ser, por ejemplo, un método SmartAmp (*NATURE METHODS* (2007) VOL. 4 N.º 3 pág. 257, Patente japonesa N.º 3897805), un método de amplificación de desplazamiento de cadena (SDA, por sus siglas en inglés) (documento JP H7(1995)-114718 B), un método SDA modificado (Patente de los EE.UU. N.º 5824517, documento WO 99/09211, documento WO 95/25180), un método de amplificación de secuencia de ácido nucleico (NASBA, por sus siglas en inglés) (Patente japonesa N.º 2650159), un método de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, por sus siglas en inglés) (Patente japonesa N.º 3313358, *Nucleic Acids Research*, 2000, Vol. 28, N.º 12, e63), una amplificación isotérmica y quimérica iniciada por cebador de ácidos nucleicos (ICAN, por sus siglas en inglés) (documento WO 02/16639), un método de replicación de secuencia autosostenida (3SR, por sus siglas en inglés), un método de amplificación mediada por transcripción (TMA, por sus siglas en inglés), un método invasivo y un método de amplificación de ciclo rodante (RCA, por sus siglas en inglés). Las etapas y condiciones de la amplificación isotérmica no están particularmente limitados y pueden adoptarse las etapas y condiciones de reacciones de amplificación isotérmica convencionales. El método de amplificación no isotérmica puede ser, por ejemplo, un método de PCR. Las etapas y condiciones de la amplificación no isotérmica no están particularmente limitados y pueden adoptarse las etapas y condiciones de reacciones de amplificación no isotérmica convencionales. Además, como se describe a continuación, por ejemplo, en el caso de analizar la metilación del ácido nucleico molde, la hidroximetilación del ácido nucleico molde, o similar, el método de amplificación puede ser, por ejemplo, un método de PCR específico de extremo (ESPCR, por sus siglas en inglés), un método de reacción en cadena dependiente de auxiliar (HDCR, por sus siglas en inglés) y similares. Las etapas y condiciones del método de ESPCR y del método de HDCR no están particularmente limitados y pueden adoptarse las etapas y condiciones convencionales.

60 Como se ha descrito anteriormente, el método de amplificación de la presente invención puede incluir adicionalmente la etapa de generar ADNc a partir de ARN mediante transcripción inversa cuando el ácido nucleico molde en la etapa de amplificación es ADNc, por ejemplo. En este caso, por ejemplo, el ARN es un ácido nucleico molde de la transcripción inversa en la etapa de transcripción inversa y el ADNc obtenido en la etapa de transcripción inversa es un ácido nucleico molde para la reacción de amplificación en la etapa de amplificación. El ARN puede ser, como se ha descrito anteriormente, ARN contenido en la muestra de organismo, por ejemplo.

65

3. Etapa de detección

En la etapa de detección, la generación o la interrupción de una señal que muestra una amplificación de la secuencia objetivo o la secuencia complementaria se detectan con respecto a la pluralidad de fracciones, después de la etapa de amplificación. La clase de la señal no está particularmente limitada y puede determinarse adecuadamente de acuerdo con la clase de la sustancia generadora de señales. Los ejemplos de la clase de la señal incluyen la fluorescencia y la luminiscencia. En la etapa de detección, por ejemplo, el grado de la amplificación puede detectarse mediante la medición de una intensidad de señal. La memoria descriptiva de la presente invención se describe a continuación con referencia a una señal de fluorescencia como la señal, a menos que se indique lo contrario. La presente divulgación, sin embargo, no se limita a esto y la "señal de fluorescencia" puede reemplazarse con una "señal de luminiscencia", por ejemplo.

En la etapa de detección, como se ha descrito anteriormente, la detección de la señal que muestra la amplificación puede ser, por ejemplo, la detección del producto amplificado obtenido usando el cebador o la detección de asociación del producto amplificado y la sonda o disociación del asociado. En el primer caso, la detección de una señal puede ser, por ejemplo, la detección de la formación o la disociación de una estructura bicatenaria. El método de detección de la formación o la disociación de una estructura bicatenaria no está particularmente limitado. En el último caso, la detección de la señal que muestra la amplificación puede ser, por ejemplo, la detección de la asociación de la sonda y el producto amplificado o la disociación del asociado de acuerdo con el cambio de temperatura, el cambio de pH, el cambio de concentración o el cambio de concentración de sal de un desnaturalizante. Generalmente, se ha sabido que un par de ácidos nucleicos monocatenarios que tienen las secuencias complementarias entre sí se asocian (formación de estructura bicatenaria) o se disocian (disociación de estructura bicatenaria a estructura monocatenaria) de acuerdo con los cambios descritos anteriormente. En la etapa de detección, el método de detección de la asociación o la disociación del asociado de acuerdo con el cambio de temperatura, el cambio de pH y el cambio de concentración o el cambio de la concentración de sal de un desnaturalizante no está particularmente limitado, y puede ser, por ejemplo, un método de detección realizado mediante un análisis de la curva de fusión.

En la etapa de detección, el método de detección de la señal con respecto a la pluralidad de las fracciones de ácido nucleico molde no está particularmente limitado y puede determinarse adecuadamente de acuerdo con la clase de la señal. El método de detección puede ser, por ejemplo, la detección usando un citómetro de flujo, un microscopio de fluorescencia, un espectrómetro de fluorescencia, o similares. Además, el método de detección puede ser un método de detección altamente preciso que permite analizar la intensidad de fluorescencia por molécula en la fracción de ácido nucleico molde, ya que aumenta la sensibilidad de detección de la señal y permite analizar con mayor precisión el ácido nucleico molde. Los ejemplos del método de detección altamente preciso incluyen espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS, por sus siglas en inglés), análisis de distribución de intensidad de fluorescencia (FIDA, por sus siglas en inglés), polarización FIDA (FIDA-PO, por sus siglas en inglés), y cribado de recuento de una sola molécula (SSMC, por sus siglas en inglés).

Cuando la etapa de fraccionamiento es la etapa (1-1), se detecta la generación o interrupción de una señal con respecto a la gota en la emulsión en la etapa de detección. El método de detección de la señal no está particularmente limitado, y puede ser, por ejemplo, un método de detección de una emulsión que pasa a través de un canal de flujo, un método de detección de una emulsión después de desarrollarla en una forma planar y similares.

En el caso de detectar la emulsión que pasa a través del canal de flujo, preferentemente, la emulsión se hace pasar a través de un canal de flujo y la generación o interrupción de una señal se detecta con respecto a la gota en un sitio predeterminado del canal de flujo cuando la gota en la emulsión pasa a través del canal de flujo. En el canal de flujo, el sitio predeterminado puede establecerse en cualquier posición. No existen limitaciones particulares en la forma y la longitud del canal de flujo. El diámetro interno del canal de flujo no está particularmente limitado, y puede estarlo, por ejemplo, el diámetro medio de la gota. El canal de flujo puede tener un diámetro interno fijo como una totalidad o puede tener parcialmente diferentes diámetros interiores, por ejemplo. El canal de flujo puede ser, por ejemplo, un canal de flujo que tenga un diámetro interno en el sitio predeterminado que permita que las gotas pasen al menos una a una. Mediante el diseño del canal de flujo que tiene un diámetro interno de este tipo, por ejemplo, puede detectarse cada una de la pluralidad de gotas en el sitio predeterminado, lo que permite analizar con más precisión el ácido nucleico molde.

Además, en el caso de detectar la emulsión que pasa a través del canal de flujo, pueden recuperarse gotas en cada una de las cuales la amplificación se ha detectado (fracciones amplificadas) mediante la etapa de recuperación en la etapa de detección del método de análisis de la presente invención. En la etapa de recuperación, también pueden recuperarse gotas en cada una de las cuales no se ha detectado la amplificación. Específicamente, en el caso de recuperar gotas en cada una de las cuales se ha detectado la amplificación y gotas en cada una de las cuales no se ha detectado la amplificación en la etapa de detección, el canal de flujo incluye, desde el lado corriente ascendente hacia el lado corriente abajo, un primer canal de flujo y un segundo canal de flujo y un tercer canal de flujo que divergen desde el extremo del primer canal de flujo en el lado corriente abajo. El primer canal de flujo es un canal de flujo a través del cual pasa el disolvente insoluble en agua sometido a la etapa de detección, el segundo canal de flujo es un canal de flujo a través del cual pasan las gotas en cada una de las cuales se ha detectado la amplificación en la etapa de detección, y el tercer canal de flujo es un canal de flujo a través del cual pasan las gotas en cada una de las cuales no se ha detectado la amplificación en la etapa de detección. Además, el primer canal de flujo incluye el sitio

predeterminado en su región terminal corriente abajo y una etapa de recuperación en la que se recuperan las gotas en cada una de las cuales se ha detectado la amplificación y las gotas en cada una de las cuales no se ha detectado la amplificación. En la etapa de detección, las gotas que pasan a través del sitio predeterminado del primer canal de flujo se introducen en el segundo canal de flujo mediante la etapa de recuperación tras la detección de la amplificación y se introducen en el tercer canal de flujo mediante la etapa de recuperación tras la no detección de amplificación. El primer método de análisis con el canal de flujo que tiene una estructura de este tipo puede recuperar las gotas en cada una de las cuales se ha detectado la amplificación y las gotas en cada una de las cuales la amplificación no se ha detectado mediante la etapa de recuperación. Por tanto, por ejemplo, las gotas en cada una de las cuales se ha detectado la amplificación pueden analizarse de nuevo, lo que permite analizar con más precisión el ácido nucleico molde. En la región terminal corriente abajo, solo se requiere que el sitio predeterminado y la etapa de recuperación se eliminen de manera que la etapa de recuperación pueda recuperar las gotas en función de la detección de la amplificación en la gota. Por ejemplo, en la región terminal corriente abajo, el sitio predeterminado se dispone en el lado corriente arriba del primer canal de flujo con respecto a la etapa de recuperación.

En la etapa de detección, el método de recuperación de gotas en cada una de las cuales se ha detectado la amplificación y las gotas en cada una de las cuales no se ha detectado la amplificación no está particularmente limitado y puede adoptarse un método de recuperación de gotitas conocido públicamente. Los ejemplos del método de recuperación incluyen un método de recuperar las gotas por succión y un método de recuperar las gotas por carga. En la etapa de recuperación, por ejemplo, las gotas pueden cargarse positiva o negativamente. En el caso de recuperar las gotas por carga, la etapa de recuperación puede ser, por ejemplo, una unidad de carga que carga las gotas que han de introducirse en el primer canal de flujo o las gotas que se han introducido en el primer canal de flujo. En el último caso, la etapa de recuperación puede ser, por ejemplo, una unidad de carga que carga las gotas que han pasado a través del sitio predeterminado. En este caso, el segundo canal de flujo tiene uno cualquiera de un electrodo positivo y un electrodo negativo y el tercer canal de flujo tiene el otro. En la etapa de detección, cuando se detecta la amplificación de la gota que ha pasado a través del sitio predeterminado del primer canal de flujo, la gota se carga al contrario de la polaridad del segundo canal de flujo y se introduce en el segundo canal de flujo mediante la etapa de recuperación. En la etapa de detección, cuando no se detecta la amplificación de la gota que ha pasado a través del sitio predeterminado del primer canal de flujo, la gota se carga al contrario de la polaridad del tercer canal de flujo y se introduce en el tercer canal de flujo mediante la etapa de recuperación. En la etapa de recuperación, la gota puede cargarse ya sea positiva o negativamente. En este caso, el segundo y el tercer canal de flujo tienen cada uno un electrodo que ha de cargarse positiva o negativamente. Cuando se detecta la amplificación de la gota que se ha cargado mediante la etapa de recuperación y ha pasado a través del sitio predeterminado del primer canal de flujo, el segundo canal de flujo se carga al contrario de la polaridad de la gota y la gota se introduce en el segundo canal de flujo. Cuando no se detecta la amplificación de la gota que se ha cargado mediante la etapa de recuperación y ha pasado a través del sitio predeterminado del primer canal de flujo, el tercer canal de flujo se carga al contrario de la polaridad de la gota y la gota se introduce en el tercer canal de flujo.

En el caso de detectar la señal desarrollando la emulsión en una forma planar, preferentemente, la etapa de detección obtiene la imagen de gotas en la emulsión que se ha desarrollado en una forma planar. Puede obtenerse la imagen de gotas, por ejemplo, mediante una unidad de formación de imágenes conocida públicamente tal como un microscopio de fluorescencia.

Cuando la etapa de fraccionamiento es la etapa (1-2), la imagen de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde sobre al menos un chip se obtiene en la etapa de detección. Se puede obtener la imagen de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde, por ejemplo, mediante la unidad de formación de imágenes descrita anteriormente.

Cuando la muestra contiene al menos dos ácidos nucleicos molde, en la etapa de detección, la generación o interrupción de una señal que muestra la amplificación puede detectarse por separado con respecto a cada uno de los ácidos nucleicos molde, la generación o interrupción de una señal puede detectarse simultáneamente con respecto a algunos de los ácidos nucleicos molde y por separado con respecto al resto de los ácidos nucleicos molde, o la generación o interrupción de una señal puede detectarse simultáneamente con respecto a todos los ácidos nucleicos molde. Específicamente, cuando la muestra contiene al menos dos ácidos nucleicos molde, por ejemplo, la amplificación de cada uno de los ácidos nucleicos molde puede detectarse mediante la detección de la sustancia generadora de señales que genera o interrumpe una señal con respecto a cada uno de los ácidos nucleicos molde.

Cuando el reactivo de amplificación de ácido nucleico contiene una sonda no fluorogénica, en la etapa de detección, la amplificación del ácido nucleico molde puede detectarse mediante la detección de la generación o interrupción de una señal de la sonda no fluorogénica, por ejemplo.

En la presente invención, por ejemplo, la etapa de detección puede realizarse durante la etapa de amplificación. En este caso, la generación o interrupción de una señal puede detectarse al menos una vez a lo largo del tiempo en la etapa de amplificación, por ejemplo.

4. Etapa de discriminación

En la etapa de discriminación, una fracción de ácido nucleico molde en la que la generación o interrupción de una

- señal que muestra la amplificación se ha detectado entre la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde se discrimina como una fracción amplificada en la que la secuencia objetivo o la secuencia complementaria se ha amplificado. La etapa de discriminación puede realizarse en función de la presencia o ausencia de una señal o de la intensidad de una señal, por ejemplo. En el último caso, se establece el umbral de la intensidad de la señal y la fracción de ácido nucleico molde en la que se ha detectado la intensidad de señal igual o superior al umbral o la intensidad de la señal igual o inferior al umbral se discrimina como la fracción amplificada, por ejemplo. Como ejemplo específico, cuando una señal se genera mediante la amplificación, la fracción de ácido nucleico molde en la que la intensidad de señal igual o superior al umbral se ha detectado se discrimina como la fracción amplificada y la fracción de ácido nucleico molde en la que la intensidad de señal inferior al umbral se ha detectado no se discrimina como la fracción amplificada.
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- Cuando la imagen de las gotas se obtiene en la etapa de detección, la etapa de discriminación discrimina la gota en la emulsión en la que la generación o interrupción de una señal se ha detectado en la imagen como la fracción amplificada. En la etapa de detección, cuando se obtiene la imagen de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde, la etapa de discriminación discrimina la fracción de ácido nucleico molde sobre el chip en la que la generación o interrupción de una señal se ha detectado en la imagen como la fracción amplificada. La discriminación puede realizarse en función de la presencia o ausencia de una señal o de la intensidad de una señal, por ejemplo.
- Cuando la muestra contiene al menos dos ácidos nucleicos molde, la etapa de discriminación puede discriminar una fracción de ácido nucleico molde en la que la amplificación de un ácido nucleico molde se ha detectado como la fracción amplificada, discriminar una fracción de ácido nucleico molde en la que la amplificación de al menos dos ácidos nucleicos molde se ha detectado como la fracción amplificada o discriminar una fracción de ácido nucleico molde en la que la amplificación de todos los ácidos nucleicos molde se ha detectado como la fracción amplificada.
- Cuando el reactivo de amplificación de ácido nucleico contiene una sonda no fluorogénica, por ejemplo, la etapa de discriminación puede discriminar una fracción de ácido nucleico molde en la que la amplificación del ácido nucleico molde se ha detectado como la fracción amplificada mediante la detección de la generación o interrupción de una señal de la sonda no fluorogénica.
- En el método de análisis de la presente invención, la combinación de la sustancia generadora de señales, la etapa de fraccionamiento y la etapa de amplificación no está particularmente limitada, y puede ser, por ejemplo, las combinaciones (i) a (xii) que se muestran en la siguiente Tabla 1. En la Tabla 1, la sustancia generadora de señales, la etapa de fraccionamiento y la etapa de amplificación adoptadas en las combinaciones (i) a (xii) se indican con "círculos abiertos (○)".

[Tabla 1]

Sustancia generadora de señales	Sustancia de unión generadora de señales	(i)	(ii)	(iii)	(iv)	(v)	(vi)
	Cebador de señal	○	○	○	○	○	○
Etapa de fraccionamiento	etapa (1-1)	○	○			○	○
	etapa (1-2)			○	○		
Etapa de amplificación	Método de amplificación no isotérmica	○	○	○	○	○	○
	Método de amplificación isotérmica		○		○		○
Sustancia generadora de señales	Sustancia de unión generadora de señales	(vii)	(viii)	(ix)	(x)	(xi)	(xii)
	Cebador de señal	○	○	○	○	○	○
Etapa de fraccionamiento	etapa (1-1)			○	○		
	etapa (1-2)	○	○			○	○
Etapa de amplificación	Método de amplificación no isotérmica	○	○	○	○	○	○
	Método de amplificación isotérmica		○		○		○

- 5 Cuando el ácido nucleico molde es un complejo de ácido nucleico molde que contiene la sustancia objetivo y la sustancia de unión, el método de análisis de la presente invención puede incluir la etapa de formar un complejo de ácido nucleico molde poniendo en contacto una muestra que contenga la sustancia objetivo con una sustancia de unión marcada con el ácido nucleico molde antes de la etapa de fraccionamiento. Además, cuando el ácido nucleico molde es un complejo de ácido nucleico molde que contiene la sustancia objetivo y la sustancia de unión, por ejemplo, la determinación de la presencia o ausencia de la sustancia objetivo (análisis cualitativo), la determinación de la cantidad de la sustancia objetivo (análisis cuantitativo) y similares pueden realizarse en función del resultado obtenido en la etapa de determinación que se describe a continuación.
- 10 En el método de análisis de la presente invención, por ejemplo, la generación o interrupción de una señal que muestra una amplificación de la secuencia objetivo o la secuencia complementaria puede detectarse con respecto a cada fracción de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde antes de la etapa de amplificación, y una fracción de ácido nucleico molde en la que la generación o interrupción de una señal que muestra la amplificación se ha detectado entre la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde puede discriminarse como una fracción amplificada en la que la secuencia objetivo o la secuencia complementaria se han amplificado comparando la señal detectada antes de la etapa de amplificación y la señal detectada después de la etapa de amplificación en la etapa de discriminación.
- 15 Además, en el método de análisis de la presente invención, la generación o interrupción de una señal que muestra una amplificación de la secuencia objetivo o la secuencia complementaria puede detectarse con respecto a cada fracción de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde antes de la etapa de fraccionamiento, y una fracción de ácido nucleico molde en la que la generación o interrupción de una señal que muestra la amplificación se ha detectado entre la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde puede discriminarse como una fracción amplificada en la que la secuencia objetivo o la secuencia complementaria se han amplificado comparando la señal detectada antes de la etapa de fraccionamiento y la señal detectada después de la etapa de amplificación en la etapa de discriminación. De acuerdo con el método de análisis de la presente invención, por ejemplo, la influencia del fondo en la discriminación puede evitarse mediante la discriminación de la fracción amplificada en la etapa de discriminación usando la señal detectada antes de la etapa de fraccionamiento o antes de la etapa de amplificación, lo que permite analizar el ácido nucleico molde con más precisión. Específicamente, en el caso en el que se genere una señal mediante la amplificación y la discriminación se realice estableciendo el umbral de la intensidad de señal, la discriminación puede realizarse usando la diferencia de intensidad de señal obtenida restando la intensidad de señal detectada antes de la etapa de amplificación o la intensidad de señal detectada antes de la etapa de fraccionamiento de la intensidad de señal detectada después de la etapa de amplificación. Más específicamente, la fracción de ácido nucleico molde en la que una diferencia de intensidad de señal es igual o superior al umbral se discrimina como la fracción amplificada y la fracción de ácido nucleico molde en la que la diferencia de intensidad de señal es inferior al umbral no se discrimina como la fracción amplificada.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40 En el método de análisis de la presente invención, la combinación de la sustancia generadora de señales, la etapa de fraccionamiento, la etapa de amplificación y la etapa de detección no están particularmente limitadas, y pueden ser, por ejemplo, las combinaciones (i-1) a (xii-3) que se muestran en la siguiente Tabla 2. En la Tabla 2, la sustancia generadora de señales, la etapa de fraccionamiento, la etapa de amplificación y la etapa de detección adoptadas en las combinaciones (i-1) a (xii-3) se indican con "círculos abiertos (○)".

[Tabla 2]

	(i-1)	(i-2)	(i-3)	(ii-1)	(ii-2)	(ii-3)	(iii-1)	(iii-2)	(iii-3)	(iv-1)	(iv-2)	(iv-3)
Sustancia generadora de señales	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Sustancia de unión generadora de señales												
Cebador de señal												
Etapa de fraccionamiento	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
etapa (1-1)												
etapa (1-1)												
Etapa de amplificación	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Método de amplificación no isotérmica												
Método de amplificación isotérmica												
Antes de la etapa de fraccionamiento			o									
Antes de la etapa de amplificación		o										
Etapa de detección	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Después de la etapa de amplificación												

Sustancia generadora de señales	Sustancia de unión generadora de señales	(v-1)	(v-2)	(v-3)	(vi-1)	(vi-2)	(vi-3)	(vii-1)	(vii-2)	(vii-3)	(viii-1)	(viii-2)	(viii-3)
	Cebador de señal	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	etapa (1-1)	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	etapa (1-2)												
	Método de amplificación no isotérmica	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	Método de amplificación isotérmica				o	o	o				o	o	o
	Antes de la etapa de fraccionamiento			o			o						o
	Antes de la etapa de amplificación		o				o					o	
	Después de la etapa de amplificación	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o

		(ix-1)	(ix-2)	(ix-3)	(x-1)	(x-2)	(x-3)	(xi-1)	(xi-2)	(xi-3)	(xii-1)	(xii-2)	(xii-3)
Sustancia generadora de señales	Sustancia de unión generadora de señales	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Etapa de fraccionamiento	Cebador de señal	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	etapa (1-1)	o			o								
	etapa (1-2)		o	o				o	o	o	o	o	o
Etapa de amplificación	Método de amplificación no isotérmica	o	o	o				o	o	o			o
	Método de amplificación isotérmica				o	o	o				o	o	o
Etapa de detección	Antes de la etapa de fraccionamiento			o			o						o
	Antes de la etapa de amplificación		o									o	
	Después de la etapa de amplificación	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o

El método de análisis de la presente invención puede incluir adicionalmente la etapa de realizar un análisis mediante un análisis de curva de fusión después de la etapa de detección, por ejemplo. De acuerdo con el método de análisis de la presente invención, por ejemplo, la amplificación de la secuencia objetivo o la secuencia complementaria puede analizarse de forma más específica y precisa mediante la combinación de una sustancia generadora de señales fluorogénicas y la etapa de análisis realizada mediante un análisis de la curva de fusión, lo que permite analizar el ácido nucleico molde con más precisión.

El método de análisis de la presente invención puede incluir adicionalmente, después de la etapa de discriminación, la etapa de recuperar la fracción amplificada en la que la amplificación de la secuencia objetivo o la secuencia complementaria se ha detectado en la etapa de discriminación, por ejemplo. En el método de análisis de la presente invención, debido a la etapa de recuperación, por ejemplo, la fracción amplificada en la que se ha detectado amplificación puede volver a analizarse, lo que permite analizar con más precisión el ácido nucleico molde. La etapa de recuperación puede realizarse, por ejemplo, mediante la unidad de recuperación.

En la etapa de discriminación, cuando la amplificación de la secuencia objetivo o la secuencia complementaria se discrimina en función de la imagen de las gotas, la etapa de recuperación recupera la gota que se ha discriminado como la fracción amplificada de la emulsión desarrollada en una forma planar. Además, en la etapa de discriminación, cuando la amplificación de la secuencia objetivo o la secuencia complementaria se discrimina en función de la imagen de la pluralidad de fracciones molde, la etapa de recuperación recupera la fracción de ácido nucleico molde que se ha discriminado como la fracción amplificada del chip. En la etapa de recuperación, por ejemplo, puede usarse un aparato de recuperación de solución conocido públicamente y similares.

Cuando el método de análisis de la presente invención incluye la etapa de recuperación, preferentemente, el método de análisis incluye adicionalmente la etapa de amplificar la secuencia objetivo y la secuencia complementaria en el ácido nucleico molde con respecto a la fracción amplificada. Esta amplificación se denomina una segunda etapa de amplificación. En el método de análisis de la presente invención, debido a la segunda etapa de amplificación, por ejemplo, la señal de la fracción amplificada puede amplificarse, lo que permite analizar con más precisión el ácido nucleico molde. La segunda etapa de amplificación puede realizarse de la misma manera que la etapa de amplificación, por ejemplo.

El método de análisis de la presente invención puede incluir adicionalmente la etapa de determinar el ácido nucleico molde en función del resultado de detección obtenido en la etapa de detección, por ejemplo. Obsérvese que, la determinación del ácido nucleico molde no está particularmente limitada, y ejemplos de la misma incluyen la determinación de la presencia o ausencia del ácido nucleico molde (análisis cualitativo), la determinación de la cantidad del ácido nucleico molde (análisis cuantitativo) y la determinación del tipo de la base del sitio de mutación de ácido nucleico en el ácido nucleico molde (tipado) como se ha descrito anteriormente. Cuando la muestra contiene al menos dos ácidos nucleicos molde, puede determinarse un ácido nucleico molde, pueden determinarse al menos dos ácidos nucleicos molde o pueden determinarse todos los ácidos nucleicos molde en la etapa de determinación de ácido nucleico molde. Además, cuando el reactivo de amplificación de ácido nucleico contiene una sonda no fluorogénica, por ejemplo, el ácido nucleico molde puede determinarse en función del resultado de detección obtenido usando la sonda no fluorogénica además del resultado de detección obtenido usando la sustancia generadora de señales. Por otra parte, cuando se ha detectado la generación o interrupción de una señal que muestra la amplificación antes de la etapa de fraccionamiento o antes de la etapa de amplificación, el ácido nucleico molde puede determinarse en la etapa de determinación en función de la señal detectada antes de la etapa de fraccionamiento y la señal detectada en la etapa de detección después de la etapa de amplificación.

En el método de análisis de la presente invención, puede aplicarse pretratamiento al ácido nucleico molde contenido en la muestra de acuerdo con el fin del análisis, por ejemplo. El pretratamiento puede realizarse antes de la etapa de amplificación, específicamente antes de la etapa de fraccionamiento, o puede realizarse después de la etapa de fraccionamiento y antes de la etapa de amplificación, por ejemplo. En el último caso, por ejemplo, puede introducirse en la fracción un reactivo necesario para el pretratamiento. Preferentemente, el pretratamiento se realiza antes de la etapa de fraccionamiento, por ejemplo. Es decir, en el método de análisis de la presente invención, preferentemente, después de la aplicación del pretratamiento al ácido nucleico molde contenido en la muestra, se realiza la etapa de fraccionamiento y posteriormente se realiza la etapa de amplificación.

En el caso de analizar la modificación del ácido nucleico molde mediante el método de análisis de la presente invención, preferentemente, se aplica pretratamiento al ácido nucleico molde en la etapa de pretratamiento. Los ejemplos de la modificación incluyen la metilación y la hidroximetilación. En el caso de analizar la modificación del ácido nucleico molde, los ejemplos de pretratamiento incluyen los siguientes métodos (1) a (3):

- (1) pretratamiento de conversión de una base X no modificada o una base X modificada en el ácido nucleico molde en otra base Y;
- (2) pretratamiento de enriquecimiento de un ácido nucleico molde modificado usando una sustancia de unión que se une a un ácido nucleico modificado; y
- (3) pretratamiento de escisión de una región no modificada o una región modificada.

En el caso del método (1), por ejemplo, si X en un sitio específico en un ácido nucleico molde no se modifica, el sitio específico se convierte en la base Y, y si la base X en el sitio específico se modifica, el sitio específico no se convierte en la base Y. Como alternativa, por ejemplo, si la base X en un sitio específico en un ácido nucleico molde se modifica, el sitio específico se convierte en la base Y, y si la base X en el sitio específico no se modifica, el sitio específico no se convierte en la base Y. En consecuencia, la modificación en un ácido nucleico molde puede analizarse en función de la diferencia en la conversión.

En el caso del método (2), por ejemplo, un ácido nucleico modelo modificado entre ácidos nucleicos molde puede enriquecerse usando una sustancia de unión que se une a un ácido nucleico en el que la base X en un sitio específico se modifica mediante la unión de la sustancia de unión a un ácido nucleico modelo modificado. Usando el ácido nucleico molde enriquecido, puede analizarse la modificación en un ácido nucleico molde.

En el caso del método (3), por ejemplo, en el caso de escindir una región no modificada, un ácido nucleico molde modificado no se escinde y un ácido nucleico molde no modificado se escinde, y en el caso de escindir una región modificada, un ácido nucleico molde modificado se escinde y un ácido nucleico molde no modificado no se escinde. Además, por ejemplo, en el caso de escindir una región modificada, un ácido nucleico molde no modificado no se escinde y un ácido nucleico molde modificado se escinde, y en el caso de escindir una región no modificada, un ácido nucleico molde no modificado se escinde y un ácido nucleico molde modificado no se escinde. La modificación en un ácido nucleico molde puede analizarse en función de si el ácido nucleico molde se ha sido escindido.

En primer lugar, como ejemplo específico, se describe un ejemplo del pretratamiento en el caso de analizar la metilación de un ácido nucleico molde.

En el caso del método (1), preferentemente, un resto de citosina no metilada del ácido nucleico molde se convierte en un resto de uracilo o un resto de derivado de uracilo (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado resto convertido) en la etapa de pretratamiento, por ejemplo. El reactivo utilizado para el tratamiento de conversión no está limitado a reactivos particulares, y puede ser, por ejemplo, bisulfito y similares. Las etapas que siguen a la etapa de pretratamiento no están particularmente limitadas, y puede hacerse referencia a la descripción anterior. Los ejemplos específicos de esta etapa son los siguientes: puede realizarse un análisis de curva de fusión como la etapa de detección después de la etapa de amplificación, por ejemplo; y la etapa de detección puede realizarse en la etapa de amplificación después de realizar la amplificación de ácido nucleico múltiple a un ácido nucleico molde que tenga un resto de metilcitosina y un ácido nucleico molde que tenga un resto convertido, por ejemplo.

En el caso del método (3), preferentemente, una región no metilada o una región metilada del ácido nucleico molde se escinde en la etapa de pretratamiento, por ejemplo. El reactivo utilizado para la escisión no está limitado a reactivos particulares, y puede ser, por ejemplo, una enzima de restricción. Como la enzima de restricción, por ejemplo, puede usarse una enzima de restricción sensible a la metilación que pueda escindir una secuencia predeterminada si no está metilada y no pueda escindir una secuencia predeterminada si está metilada, una enzima de restricción dependiente de la metilación que puede escindir una secuencia predeterminada si está metilada y similares. Como la enzima de restricción, por ejemplo, puede usarse una o las dos de entre la enzima de restricción sensible a la metilación y la enzima de restricción dependiente de la metilación. En el caso de escindir la región no metilada, preferentemente, la enzima de restricción es una enzima de restricción que escinde una región no metilada más eficazmente que una región metilada y depende de una región no metilada (o es sensible a una región metilada), por ejemplo. En el caso de escindir la región metilada, preferentemente, la enzima de restricción es una enzima de restricción que escinde una región metilada más eficazmente que una región no metilada y depende de una región metilada (o es sensible a una región no metilada), por ejemplo. Los ejemplos de la enzima de restricción sensible a metilcitosina incluyen AatII, ApaI y BstUI. Los ejemplos de la enzima de restricción dependiente de metilcitosina incluyen MspJI y Glal. Las etapas que siguen a la etapa de pretratamiento no están particularmente limitadas, y puede hacerse referencia a la descripción anterior. Los ejemplos específicos de esta etapa son los siguientes: la etapa de detección puede realizarse, por ejemplo, después de realizar el método de ESPCR, el método de HDCR y el método de amplificación usando un cebador quimérico y un bloqueador como la etapa de amplificación; y la etapa de detección puede realizarse después de realizar la amplificación de ácido nucleico múltiple en la etapa de amplificación, por ejemplo. En la presente invención, en el caso de analizar la metilación usando la escisión de una región no metilada o una región metilada, por ejemplo, puede hacerse referencia a los siguientes trabajos de investigación. *Sensitive measurement of unmethylated repeat DNA sequences by end-specific PCR*, Keith N. Rand *et al.*, *BioTechniques* 2010, 49(4) *Sensitive and selective amplification of methylated DNA sequences using helper-dependent chain reaction in combination with a methylation-dependent restriction enzymes*, Keith N. Rand *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(1), e15. Además, la amplificación de ácido nucleico múltiple a un ácido nucleico molde que tenga un resto de metilcitosina y un ácido nucleico molde que tenga un resto convertido puede realizarse en la etapa de amplificación, por ejemplo.

En el caso del método (2), preferentemente, un ácido nucleico molde metilado se enriquece en la etapa de pretratamiento, por ejemplo. El método de enriquecimiento del ácido nucleico molde metilado no está limitado a métodos particulares y el ácido nucleico molde metilado puede enriquecerse, usando la sustancia de unión que se une a un ácido nucleico molde metilado, mediante la unión de la sustancia de unión al ácido nucleico molde metilado, por ejemplo. Los ejemplos de la sustancia de unión incluyen proteína de unión de ADN metilado y anticuerpo antimetilcitosina. La proteína de unión a ADN metilado puede ser, por ejemplo, MECP2 y similares. Las etapas que

siguen a la etapa de pretratamiento no están particularmente limitadas, y puede hacerse referencia a la descripción anterior. Los ejemplos específicos de esta etapa son los siguientes: puede realizarse el análisis de curva de fusión en la etapa de detección después de la etapa de amplificación, por ejemplo; y la etapa de detección puede realizarse después de realizar la amplificación de ácido nucleico múltiple en la etapa de amplificación, por ejemplo. En la presente invención, en el caso de analizar la metilación usando la proteína de unión a ADN metilado, por ejemplo, puede realizarse un Ensayo de Recuperación de Isla de CpG metilada (MIRA, por sus siglas en inglés). Además, en la presente invención, en el caso de analizar la metilación usando el anticuerpo antimetilcitosina, por ejemplo, puede realizarse una Inmunoprecipitación de ADN metilado (MeDIP, por sus siglas en inglés).

10 A continuación, como ejemplo específico, se describe un ejemplo del pretratamiento en el caso de analizar la hidroximetilación de un ácido nucleico molde.

En el caso del método (1), preferentemente, el resto de hidroximetilcitosina en el ácido nucleico molde se convierte en un resto de base no hidroximetilada en la etapa de pretratamiento, por ejemplo. La hidroximetilcitosina puede ser, por ejemplo, un resto de 5-hidroximetilcitosina. El resto de base no hidroximetilada puede ser, por ejemplo, un resto de timina, un resto de derivado de timina, un resto de uracilo o un resto de derivado de uracilo (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado resto convertido). El reactivo utilizado para el tratamiento de conversión no está limitado a reactivos particulares. Como ejemplo específico, en el caso de conversión en un resto de timina o un resto de derivado de timina, por ejemplo, puede usarse un agente oxidante de wolframio o similares. El agente oxidante de wolframio puede ser, por ejemplo, un complejo binuclear de peroxowolframio. Además, en el caso de conversión en un resto de uracilo o un resto de derivado de uracilo, por ejemplo, pueden usarse perrutenato de potasio (KRuO₄) y bisulfito en combinación. Las etapas que siguen a la etapa de pretratamiento no están particularmente limitadas, y puede hacerse referencia a la descripción anterior. Los ejemplos específicos de esta etapa son los siguientes: puede realizarse el análisis de curva de fusión como la etapa de detección después de la etapa de amplificación, por ejemplo; y la etapa de detección puede realizarse después de realizar la amplificación de ácido nucleico múltiple a un ácido nucleico molde que tenga un resto de metilcitosina y un ácido nucleico molde que tenga un resto convertido en la etapa de amplificación, por ejemplo. En la presente invención, en el caso de analizar la hidroximetilación usando un agente oxidante de wolframio, por ejemplo, puede hacerse referencia al siguiente trabajo de investigación.

Chem Commun (Camb). Okamoto A, Sugizaki K, Nakamura A, Yanagisawa H, Ikeda S. 2011; 47(40): 11231-3.

30 Además, en la presente invención, en el caso de analizar la hidroximetilación usando perrutenato de potasio (KRuO₄) y bisulfito en combinación, por ejemplo, puede hacerse referencia al siguiente trabajo de investigación.
Bioorganic & Medical Chemistry Letters. Seketsu Fukuzawa, Kazuo Tachibana, Shoji Tajima, Isao Suetake. 2015, 25, 5667-5671

35 En el caso del método (3), preferentemente, la etapa de pretratamiento incluye las etapas de glicosilar una región hidroximetilada de un ácido nucleico molde hidroximetilado; y escindir la región glicosilada del ácido nucleico molde hidroximetilado, por ejemplo. En la etapa de glicosilación, por ejemplo, La 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) se glicosila a una 5-hmC glicosilada. La glicosilación puede realizarse usando β -glicosil transferasa, por ejemplo. El reactivo utilizado para la escisión no está limitado a reactivos particulares, y puede ser, por ejemplo, una enzima de restricción. Como la enzima de restricción, por ejemplo, puede usarse una enzima de restricción sensible a la glicosilación que pueda escindir una secuencia predeterminada si no está glicosilada y no pueda escindir una secuencia predeterminada si está glicosilada, una enzima de restricción dependiente de la glicosilación que puede escindir una secuencia predeterminada si está glicosilada y similares. Como la enzima de restricción, por ejemplo, puede usarse una o las dos de entre la enzima de restricción sensible a la glicosilación y la enzima de restricción dependiente de la glicosilación. Preferentemente, la enzima de restricción es una enzima de restricción que escinde una región glicosilada más eficazmente que una región no glicosilada y una enzima de restricción que depende de una región glicosilada (o es sensible a una región glicosilada), por ejemplo. Los ejemplos de la enzima de restricción sensible a 5-hmC glicosilada incluyen MspI y HaeIII. Las etapas que siguen a la etapa de pretratamiento no están particularmente limitadas, y puede hacerse referencia a la descripción anterior. Los ejemplos específicos de esta etapa son los siguientes: la etapa de detección puede realizarse, por ejemplo, después de realizar el método de ESPCR, el método de HDCR y el método de amplificación usando un cebador quimérico y un bloqueador como la etapa de amplificación; y la etapa de detección puede realizarse después de realizar la amplificación de ácido nucleico múltiple en la etapa de amplificación, por ejemplo. Además, en la etapa de amplificación, por ejemplo, puede realizarse la amplificación de ácido nucleico múltiple a un ácido nucleico molde que tenga un resto de metilcitosina y un ácido nucleico molde que tenga un resto convertido.

En el caso del método (2), preferentemente, la etapa de pretratamiento incluye las etapas de glicosilar una región hidroximetilada de un ácido nucleico molde hidroximetilado; y enriquecer el ácido nucleico molde hidroximetilado glicosilado, por ejemplo. Con respecto a la etapa de glicosilación, por ejemplo, puede hacerse referencia a la descripción en cuanto al método (3). El método de enriquecimiento del ácido nucleico molde hidroximetilado glicosilado no está limitado a métodos particulares y el ácido nucleico molde hidroximetilado glicosilado puede enriquecerse, usando la sustancia de unión que se une a un ácido nucleico molde hidroximetilado glicosilado, mediante la unión de la sustancia de unión al ácido nucleico molde hidroximetilado glicosilado, por ejemplo. La sustancia de unión puede ser, por ejemplo, una proteína de unión de ADN hidroximetilado glicosilado o anticuerpo. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti 5-hmC antiglicosilada. Las etapas que siguen a la etapa de pretratamiento no están particularmente limitadas, y puede hacerse referencia a la descripción anterior. Los ejemplos específicos de esta etapa

son los siguientes: puede realizarse el análisis de curva de fusión en la etapa de detección después de la etapa de amplificación, por ejemplo; y la etapa de detección puede realizarse después de realizar la amplificación de ácido nucleico múltiple en la etapa de amplificación, por ejemplo.

5 <Método de análisis para sustancia objetivo>

El método para analizar una sustancia objetivo, como se ha descrito anteriormente, incluye las etapas de poner en contacto una muestra que contiene al menos una sustancia objetivo con al menos una sonda fluorogénica para cada sustancia objetivo en una solución de reacción; y detectar la generación o interrupción de una señal de la sonda fluorogénica en respuesta a la unión entre el ácido nucleico objetivo y la sonda fluorogénica. El método para analizar una sustancia objetivo de la presente divulgación se caracteriza por que incluye las etapas de poner en contacto una muestra que contiene al menos una sustancia objetivo con al menos una sonda fluorogénica para cada sustancia objetivo en una solución de reacción; y detectar la generación o interrupción de una señal de la sonda fluorogénica en respuesta a la unión entre el ácido nucleico objetivo y la sonda fluorogénica, y otras etapas y condiciones no están particularmente limitadas. Con respecto al método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, por ejemplo, puede hacerse referencia a la descripción en cuanto al método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, a menos que se indique otra cosa. De acuerdo con el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención, una sustancia objetivo puede analizarse con precisión.

La sustancia objetivo no está limitada a sustancias particulares, y los ejemplos de la misma incluyen ácidos nucleicos, proteínas, azúcar y lípidos. Cuando la sustancia objetivo es un ácido nucleico, la sustancia objetivo también puede denominarse ácido nucleico objetivo, por ejemplo. El ácido nucleico objetivo puede ser, por ejemplo, los ácidos nucleicos molde descritos anteriormente. La sustancia objetivo puede ser, por ejemplo, una sustancia objetivo en un estado en el que se une a una sustancia que se une específicamente a la sustancia objetivo. La sonda fluorogénica puede ser, por ejemplo, la sonda fluorogénica descrita anteriormente. Solo se requiere que una sonda que componga la sonda fluorogénica sea una sustancia que se una específicamente a una sustancia objetivo como se ha descrito anteriormente, y los ejemplos específicos de la sonda incluyen ácidos nucleicos, anticuerpos, aficuerpos y aptámeros. Mientras que la presente invención se describe a continuación con referencia al caso en el que la sustancia objetivo es un ácido nucleico, con respecto a la sustancia objetivo, puede hacerse referencia a la siguiente descripción sustituyendo la expresión "ácido nucleico objetivo" por la expresión "sustancia objetivo".

La cantidad del ácido nucleico objetivo contenido en la solución de reacción no está particularmente limitada, y es, por ejemplo, de 100 ng o menos. El volumen de la solución de reacción no está particularmente limitado, y es, por ejemplo, de 2 nl o menos.

La muestra y la sonda fluorogénica pueden ponerse en contacto entre sí, por ejemplo, añadiendo la sonda fluorogénica a la muestra, añadiendo la muestra a la sonda fluorogénica o añadiendo la sonda fluorogénica y la muestra al disolvente hidrosoluble.

La generación de una señal o la interrupción de una señal pueden detectarse mediante el método de detección adoptado en la etapa de detección del método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, por ejemplo. Los ejemplos específicos de la detección incluyen la detección del brillo o la intensidad de al menos una clase de la señal en la solución de reacción y el recuento de al menos una clase de la señal en la solución de reacción a nivel molecular de la sonda fluorogénica. El recuento a nivel molecular puede ser, por ejemplo, el método de detección de altamente preciso descrito anteriormente.

En la puesta en contacto y la detección, la temperatura de la solución de reacción no está particularmente limitada y puede determinarse adecuadamente de acuerdo con la clase de ácido nucleico objetivo y la sonda fluorogénica, por ejemplo. La temperatura de la solución de reacción puede controlarse en la puesta en contacto y la detección, por ejemplo.

Cuando la sustancia objetivo es un ácido nucleico, por ejemplo, el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención puede detectar una pequeña cantidad del ácido nucleico objetivo y no necesita incluir la etapa de amplificar el ácido nucleico objetivo.

Cuando se analizan al menos dos clases de sustancias objetivo, pueden usarse al menos dos clases de sondas fluorogénicas para los ácidos nucleicos objetivo, y el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención puede incluir la etapa de calcular la relación de concentración o la relación de abundancia de cada ácido nucleico objetivo a partir de un valor de señal detectado de las al menos dos clases de sondas fluorogénicas detectadas en la etapa de detección. El valor de señal detectada puede ser, por ejemplo, el brillo, la intensidad, y lo similar de la señal. El método de cálculo de la concentración o la cantidad del ácido nucleico objetivo en función del valor de señal detectada no está limitado a métodos particulares, y puede ser, por ejemplo, un método de cálculo en función de una curva de calibración obtenida a partir de una muestra patrón.

Cuando se analizan al menos dos ácidos nucleicos objetivo y al menos dos clases de ácidos nucleicos objetivo son adyacentes entre sí, preferentemente, se usan al menos dos sondas fluorogénicas para las sustancias objetivo y las

sondas fluorogénicas incluyen, cada una, una sustancia generadora de señales que tiene una propiedad de fluorescencia diferente entre sí y genera o interrumpe una señal en respuesta a la unión a diferentes ácidos nucleicos objetivo. En este caso, Puede utilizarse FRET o puede no utilizarse para la generación o interrupción de una señal, por ejemplo.

5 <Kit de análisis para ácido nucleico molde o sustancia objetivo>

10 El uso de un kit de análisis para un ácido nucleico molde o una sustancia objetivo de la presente invención, como se ha descrito anteriormente, consigue el método de análisis de la presente invención. El kit de análisis se caracteriza por que consigue el método de análisis de la presente invención, y otras composiciones y condiciones no están particularmente limitadas. Con respecto al kit de análisis para un ácido nucleico molde o una sustancia objetivo puede hacerse referencia a la descripción en cuanto al método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, a menos que se indique otra cosa.

15 <Analizador para ácido nucleico molde o sustancia objetivo>

20 El uso de un analizador para un ácido nucleico molde o una sustancia objetivo de la presente invención, como se ha descrito anteriormente, consigue el método de análisis de la presente invención. El analizador se caracteriza por que consigue el método de análisis de la presente invención, y otras composiciones y condiciones no están particularmente limitadas. Con respecto al analizador para un ácido nucleico molde o una sustancia objetivo, puede hacerse referencia a la descripción en cuanto al método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención, a menos que se indique otra cosa.

25 Ejemplos

Los ejemplos de la presente invención se describen a continuación. La presente invención, sin embargo, no está limitada por los ejemplos a continuación. Se usaron reactivos disponibles en el mercado en función de sus protocolos, a menos que se indique otra cosa.

30 [Ejemplo 1]

Se confirmó el hecho de que un ácido nucleico molde puede analizarse con precisión mediante el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención.

35 (1) Muestra de ADN

Se mezcló ADN plasmídico que tenía una secuencia de un gen humano MDM2 de tipo mutante 309G descrito en el siguiente Documento de Referencia 1, con agua exenta de RNasa, obteniendo de este modo una solución de muestra. Documento de referencia 1: Enokida Y *et al.* "Rapid Detection of SNP (c.309T>G) in the MDM2 Gene by the Duplex SmartAmp Method", *PLOS ONE*, 2013, Volumen 8, Número 4, e60151

(2) Preparación del reactivo

45 El reactivo se preparó con referencia al Documento de Referencia 1 en cuanto al sistema de reacción de amplificación isotérmica para la detección de la mutación 309G del gen MDM2 humano. Específicamente, en primer lugar, se mezclaron cebadores de manera de conseguir la composición que se muestra en la siguiente Tabla 3, obteniendo de este modo una mezcla de cebadores. En la siguiente mezcla de cebadores, MDM2.Bf.202-13.M.E8 (cebador E) es la sustancia generadora de señales. Además, se mezclaron componentes de manera de conseguir la composición que se muestra en la siguiente Tabla 4, preparando de este modo una premezcla en una cantidad que puede preparar una solución de reacción de 4,4 veces la reacción (14,5 µl x 4,4). Como se muestra en la siguiente Tabla 4, como la premezcla, dos clases de premezclas se prepararon cada una de manera que una solución de reacción contenga 375 o 750 copias de ADN molde por reacción.

[Tabla 3]

(Mezcla de cebadores)					
Nombre del cebador	Secuencia de bases	SEQ ID NO.	Concentración (µmo/l)	Relación de mezcla	
MDM2.Tr.238-20.205-11	5'-CGCGGGGAGGTCAGCGTTACACTAGTGACCC-3'	1	100	8	
MDM2.Ff.172-20.m	5'-ACCTTCTATACCCTCAGAAGGTCGGGAGTTCAGGGTAAAGGT-3'	2	100	8	
MDM2.Bf.237-15	5'-TCGCAGGTGCCTGTC-3'	3	100	4	
MDM2.Bf.197-12	5'-GGCTGCGGGGCC-3'	4	100	4	
MDM2.Or.262-18	5'-CAATCCCCGCCAGACTAC-3'	5	100	1	
Agua destilada				1	
MDM2.Bf.202-13.M.E8 (cebador E)	5'-CGGGGnCCGCTGC-3' (n: Timina marcada con excitón (naranja de tiazol))	6	100	1	

[Tabla 4]

(Premezcla)	
Agua destilada	21,05 μ l
50x ROX (nombre de producto, Roche Ltd.)	1,28 μ l
2x tampón	31,90 μ l
Mezcla de cebadores	4,47 μ l
Muestra de ADN	2,55 μ l
<u>(375 copias/reacción o 750 copias/reacción)</u>	
Total	61,25 μ l

(3) Análisis

- 5 La premezcla y la enzima (polimerasa) se mezclaron de manera de conseguir la composición que se muestra en la siguiente Tabla 5, preparando de este modo una solución de reacción.

[Tabla 5]

(Solución de reacción)	
Premezcla	61,25 μ l
<u>Aac polimerasa (30U)</u>	<u>2,55 μl</u>
Total	63,80 μ l

- 10 A continuación, se recogieron 14,5 μ l de cada una de las dos clases de soluciones de reacción y cada solución de reacción se introdujo en un chip (chip de PCR digital 3D QuantStudio, producto de Applied Biosystems), fraccionándose de este modo en aproximadamente veinte mil fracciones. Después del fraccionamiento, el chip se dispuso sobre un bloque de calor a 60 °C, y la secuencia objetivo y su secuencia complementaria en el ADN molde se amplificó durante 30 minutos con respecto a cada fracción. Después de la amplificación, la señal de fluorescencia de cada fracción se detectó usando un aparato de medición óptica (instrumento de PCR digital 3D QuantStudio, producto de Applied Biosystems). Con respecto a los datos obtenidos, el número de fracciones positivas para el colorante de referencia (ROX) y positivas para la señal de fluorescencia derivada del cebador E se contaron usando un software de análisis (QuantStudio 3DAnalysis Suite, producto de Applied Biosystems), calculando de este modo el valor medido del número de las copias de ADN molde contenidas en la solución de reacción. Midiendo el ROX con respecto a cada fracción, se comprobó si cada vaso diminuto de reacción de muestra en un chip estaba lleno de un reactivo de reacción correctamente (si una fracción estaba formada correctamente).

- 25 Como método de análisis del Ejemplo Comparativo 1, se recogieron 14,5 μ l de cada una de las dos clases de soluciones de reacción para 3 veces la reacción (14,5 μ l x 3), y cada solución de reacción se introdujo en un tubo de PCR sin realizar fraccionamiento. Posteriormente, mediante la detección de una señal a lo largo del tiempo en condiciones de 60 °C en cada uno de los tubos usando un termociclador (Sistema StepOne® Real-Time PCR System, producto de Applied Biosystems), se midió el tiempo de detección desde el momento de inicio de la reacción hasta el momento de obtener una intensidad de señal designada.

- 30 Los resultados se muestran en las FIG. 2A y 2B. La FIG. 2A es un gráfico que muestra el valor medido del número de copias de ADN molde en el caso en el que el número de copias de ADN molde preparadas es de 375 o 750 copias/reacción en el método de análisis en el Ejemplo 1. La FIG. 2B es un gráfico que muestra el tiempo de detección en el caso en el que el número de copias de ADN molde preparadas es de 375 o 750 en el método de análisis del Ejemplo Comparativo 1. En la FIG. 2A, el eje vertical indica el valor medido del número de copias de ADN molde. En la FIG. 2B, el eje vertical indica el tiempo de detección. En cada una de las FIG. 2A y 2B, las barras indican, desde el lado izquierdo, el resultado del sistema de reacción en el caso en el que el número de copias de ADN molde preparadas sea de 375 copias/reacción y el resultado del sistema de reacción en el caso en el que el número de copias de ADN molde preparadas sea de 750 copias/reacción. Como se muestra en la FIG. 2B, en el método de análisis del Ejemplo Comparativo 1, el tiempo de detección no cambió significativamente ni siquiera duplicando el número de copias de ADN molde preparadas en la solución de reacción. Por otro lado, como se muestra en la FIG. 2A, en el método de análisis del Ejemplo 1, el valor medido del número de copias de ADN molde aumentó 2,13 veces duplicando el número de copias de ADN molde preparadas, que muestra la correlación entre el valor medido del número de copias de ADN molde y el número de copias de ADN molde preparadas. Estos resultados muestran que el método para analizar un ácido nucleico molde de la presente invención permite analizar con precisión un ácido nucleico molde, por ejemplo, incluso en el caso en el que la concentración de un ácido nucleico molde objetivo sea baja, tal como de 1000 copias o menos, y el número de copias no pueda compararse mediante el método de análisis del Ejemplo Comparativo 1 que no tiene ninguna etapa de fraccionamiento.

[Ejemplo 2]

- 50 Se confirmó el hecho de que un ácido nucleico objetivo puede analizarse con precisión mediante el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención usando una pluralidad de sondas.

(1) Muestra de ADN y sonda de detección

El modelo de ácido nucleico de caso y el modelo de ácido nucleico de control que se muestran en la siguiente Tabla 6 se prepararon como muestras de ADN, y la sonda E marcada con naranja de tiazol (sonda TO, del inglés *thiazol orange*) para la detección del modelo de ácido nucleico de caso y la sonda E marcada con rosa de tiazol (sonda TP, del inglés *thiazol pink*) para la detección del modelo de ácido nucleico de control que se muestra en la siguiente Tabla 6 se prepararon como sondas de detección (sondas fluorogénicas).

[Tabla 6]

Nombre	Secuencia de bases	SEQ ID NO.
Modelo de ácido nucleico de caso	5'-CTACGCCACCAGCT-3'	7
Modelo de ácido nucleico de control	5'-GAGAAAGAGAAAGATACACA-3'	8
Sonda E marcada con naranja de tiazol (TO) para la detección de modelo de ácido nucleico de caso	5'-AGCTGGTGGCGnAG-3' (n: timina marcada con naranja de tiazol)	9
Sonda marcada con rosa de tiazol (TP) para la detección de modelo de ácido nucleico de control	5'-TGTGTATCnTTCTCTTTCTC-3' (n: timina marcada con rosa de tiazol)	10

(2) Método experimental

Las sondas se añadieron a Agua Exenta de RNasa de manera de conseguir 0,25 µmol/l de sonda TO y 0,25 µmol/l de sonda TP, preparando de este modo una mezcla de sondas TO/TP. Después, el modelo de ácido nucleico de caso y el modelo de ácido nucleico de control se añadieron a Agua Exenta de RNasa de manera de conseguir las relaciones de concentración de modelo de ácido nucleico de caso/control que se muestran en la siguiente Tabla 7, preparando de este modo seis clases de muestras de modelo. Después, 50 µl de la mezcla de sondas TO/TP y 50 µl de cada una de las muestras de modelo se mezclaron a una temperatura normal (25 °C). Después de la mezcla, usando un espectrómetro de fluorescencia (producto de JASCO), se midieron la intensidad de fluorescencia (intensidad de fluorescencia de TO) a la longitud de onda de 510 nm en el caso en el que la mezcla se excitase con la luz de excitación que tiene una longitud de onda de 488 nm y la intensidad de fluorescencia (intensidad de fluorescencia de TP) a la longitud de onda de 600 nm en el caso en el que la mezcla se excitase con la luz de excitación que tiene una longitud de onda de 570 nm. Para normalizar la intensidad de fluorescencia medida, se prepararon los modelos de ácido nucleico de caso/control, teniendo cada uno una relación entre la concentración final del modelo de ácido nucleico de caso (Ca) y la concentración final del modelo de ácido nucleico de control (Co) (Ca/Co) de 0 µmol/l/0 pmol/l, 0,25 µmol/l/0 pmol/l o 0 pmol/l/0,25 pmol/l, y se midieron la intensidad de fluorescencia de TO y la intensidad de fluorescencia de TP. Con respecto a cada muestra de modelo, la tasa de variación de fluorescencia de TO y la tasa de variación de fluorescencia de TP se calcularon en función de las siguientes ecuaciones (1) y (2).

[Tabla 7]

N.º de muestra de modelo	1	2	3	4	5
Concentración de modelo de ácido nucleico de caso [µmol/l]	0,125	0,063	0,063	0,038	0,188
Concentración de modelo de ácido nucleico de control [µmol/l]	0,125	0,188	0,063	0,113	0,063
Relación de concentración de modelo de ácido nucleico de caso/control	1,000	0,333	1,000	0,333	3,000

$$\text{Tasa de variación de fluorescencia de TO} = (S_{TO} - TO_{\min}) / (TO_{\max} - TO_{\min}) \quad (1)$$

S_{TO}: intensidad de fluorescencia de TO de muestra de modelo

TO_{min}: intensidad de fluorescencia de TO de modelo de ácido nucleico de caso/control que tiene una relación Ca/Co de 0 µmol/l/0 pmol/l

TO_{max}: intensidad de fluorescencia de TO de modelo de ácido nucleico de caso/control que tiene una relación Ca/Co de 0,25 µmol/l/0 pmol/l

$$\text{Tasa de variación de fluorescencia de TP} = (S_{TP} - TP_{\min}) / (TP_{\max} - TP_{\min}) \quad (2)$$

S_{TP}: intensidad de fluorescencia de TP de muestra de modelo

TP_{min}: intensidad de fluorescencia de TP de modelo de ácido nucleico de caso/control que tiene una relación Ca/Co de 0 µmol/l/0 pmol/l

TP_{max}: intensidad de fluorescencia de TP de modelo de ácido nucleico de caso/control que tiene una relación Ca/Co de 0 µmol/l/0,25 pmol/l

(3) Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 8. Además, La FIG. 3 es un gráfico que muestra la comparación entre las relaciones de concentración de modelo de ácido nucleico de caso/control que se muestran en la Tabla 7 y las relaciones de tasa de variación de fluorescencia de TO/TP que se muestran en la Tabla 8. En la FIG. 3, el eje horizontal

indica la relación de concentración de modelo de ácido nucleico de caso/control, el eje vertical indica la relación de tasa de variación de fluorescencia de TO/TP, la línea recta y las ecuaciones indican la ecuación de regresión lineal, y R^2 denota el valor cuadrado de un coeficiente de correlación. Como se muestra en la FIG. 3, la relación de tasa de variación de fluorescencia de TO/TP muestra una correlación significativamente alta con la relación de concentración de modelo de ácido nucleico de caso/control. Estos resultados muestran que el método para analizar una sustancia objetivo de la presente invención permite analizar con precisión un ácido nucleico objetivo.

[Tabla 8]

N.º de muestra de modelo	1	2	3	4	5
Tasa de variación de fluorescencia de TO (488 nm)	0,591	0,550	0,487	0,437	0,827
Tasa de variación de fluorescencia de TP (570 nm)	0,451	0,891	0,289	0,566	0,299
Relación de tasa de variación de fluorescencia de TO/TP	1,313	0,617	1,683	0,771	2,765

10 [Ejemplo 3]

La influencia de la señal de fondo se comprobó usando el cebador fluorogénico o el intercalador como la sustancia generadora de señales.

15 En el caso de detectar una única molécula de sustancia objetivo, para obtener la señal que supera el límite de detección de una única molécula de sustancia objetivo, por ejemplo, la reacción de amplificación se realiza durante más tiempo que en el caso en el que haya presentes muchas moléculas objetivo. Por tanto, usando el cebador fluorogénico o el intercalador y adoptando SmartAmp de transcripción inversa (RT (por sus siglas en inglés)) como el método de amplificación, se comprobó el aumento en la señal de fondo de acuerdo con el aumento en el tiempo de amplificación.

20

[Tabla 9]

(Mezcla de cebadores)				
Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.	Concentración $\mu\text{mol/l}$	Cantidad en la solución de reacción μl
Flu_A_MP1.Tf.183-19.223-14	TTCCATTGCGAATGCACATTGGAAGCAAC	11	100	0,3
Flu_A_MP1.Fr.224-20.n	GCATTGCGGAAATGATAATACCAGATCC	12	100	0,59
Flu_A_MP1.Br.195-15	ACCACTAGATTTCCAG	13	100	0,07
Flu_A_MP1.Of.140-19	ACACTAGTAGAGCCGGGAGA	14	100	0,02
Flu_A_MP1.Of.162-20	CTGGTGTTTATAGCACCCCTT	15	100	0,02
50x ROX (nombre de producto, producto de Roche Ltd)				0,29
Agua destilada				0,22
Cantidad total				1,53
(4 x tampón de reacción n.º 6) dNTP 5,6 mmol/l Tris-HCl 80 mmol/l (pH8) (NH ₄) ₂ SO ₄ 40 mmol/l MgSO ₄ 32 mmol/l Tween 20 al 0,4 % CH ₃ COOK 120 mmol/l				

[Tabla 10]

(Composición de la solución de reacción 1)	
Reactivo	Cantidad en la solución de reacción μ l
4 x tampón de reacción n.º 6	3,63
Aac ADN Polimerasa 23 U/ μ l (producto de Kabushiki Kaisha DNAFORM)	1,21
AMV transcriptasa inversa (RT) 6 U/pl (producto de Fermentus)	0,17
mezcla de cebadores	1,53
cebador E	0,16
Agua destilada	6,80
ARN/Solución de dilución fácil (FluA 0 copias)	1,00
Cantidad total	14,50
(Cebador fluorogénico) Cebador E FluA_MP1.Br.194-16.E10 ACCACnAGATTTCCAG (SEQ ID NO: 16) (n: timina marcada con naranja de tiazol)	

[Tabla 11]

(Composición de la solución de reacción 2)	
Reactivo	Cantidad en la solución de reacción μ l
4 x tampón de reacción n.º 6	3,63
Aac ADN Polimerasa 23 U/ μ l (producto de Kabushiki Kaisha DNAFORM)	1,21
AMV transcriptasa inversa (RT) 6 U/pl (producto de Fermentus)	0,17
Mezcla de cebadores	1,53
SYBR Verde l diluido 1/2000 (producto de TAKARA BIO INC.)	0,29
Agua destilada	6,67
ARN/Solución de dilución fácil (FluA 0 copias)	1,00
Cantidad total	14,50

- 5 Se usó la mezcla de cebadores para la detección de FluA de acuerdo con SmartAmp de transcripción inversa (RT). La solución de reacción se preparó de acuerdo con la composición de solución de reacción 1 o la composición de solución de reacción 2, de manera que cada solución de reacción no tuviera nada de sustancia objetivo (FluA) (n = 3 en cada solución). Después, cada una de las soluciones de reacción se proporcionó a un chip para el fraccionamiento en solución de un sistema de PCR digital 3D QuantStudio (producto de ABI), la solución de reacción se hizo reaccionar a 67 °C durante un tiempo predeterminado (0, 20, 40 o 60 minutos), y después la solución de reacción se enfrió a temperatura normal. Después de enfriar, con respecto a cada chip que contiene la solución de reacción, la señal del cebador fluorogénico o la señal del intercalador (SYBR Verde) se cuantificó usando el sistema descrito anteriormente.
- 10 Los resultados se muestran en las FIG. 4 y 5. La FIG. 4 muestra imágenes de señales en chips (experimentos 1, 2 y 3) a lo largo del tiempo cuantificadas mediante el sistema descrito anteriormente. La FIG. 4A muestra los resultados obtenidos usando el intercalador (SYBR Verde). A1, A2 y A3 en la FIG. 4A indican cada uno los resultados de cada una de las tres soluciones de reacción. La FIG. 4B muestra el resultado obtenido usando el cebador fluorogénico (cebador E). B1, B2 y B3 en la FIG. 4B indican cada uno los resultados de cada una de las tres soluciones de reacción. Obsérvese que cuando el color de la imagen es más oscuro que el tiempo de reacción (0 min), significa que se genera una amplificación independiente y se genera una señal. La FIG. 5 es un gráfico que muestra la concentración medida (pl) calculada a partir de la fluorescencia de la solución de reacción en cada tiempo de reacción. Cada "círculo relleno (●)" indica el resultado obtenido usando el intercalador (SYBR Verde) y cada "cuadrado relleno (■)" indica el resultado obtenido con el cebador fluorogénico (cebador E).
- 15 Como se muestra en la FIG. 4A, en el caso de usar el intercalador, el color de la imagen del tiempo de reacción de 40 minutos y el color de la imagen del tiempo de reacción de 60 minutos fueron más oscuros que el color de la imagen del tiempo de reacción de 0 minutos, mientras que el color de la imagen del tiempo de reacción de 20 minutos fue casi igual al color de la imagen del tiempo de reacción de 0 minutos. También en la FIG. 5 que muestra los resultados medidos de la misma, la concentración medida aumentó cuando el tiempo de reacción superó los 40 minutos, mientras que la concentración medida apenas aumentó en el tiempo de reacción de 20 minutos. Estos resultados muestran
- 20 que, en el caso de usar el intercalador, por ejemplo, estableciendo el tiempo de reacción en aproximadamente 20 minutos, el fondo puede suprimirse suficientemente.
- 25
- 30

En el caso de usar el cebador fluorogénico, como se muestra en la FIG. 4, incluso cuando el tiempo de reacción de amplificación ha transcurrido, las imágenes fueron las mismas que la imagen del tiempo de reacción de 0 minutos, que muestra que la señal de fluorescencia no se generó mediante amplificación no específica. También en el gráfico de la FIG. 5 que muestra los resultados medidos de la misma, incluso cuando el tiempo de reacción de amplificación ha transcurrido, la señal de fluorescencia apenas aumentó y el valor medido nunca superó las 10 copias/pl incluso después de transcurridos 60 minutos. Estos resultados muestran que, en el caso de usar el cebador fluorogénico, por ejemplo, incluso cuando se alarga el tiempo de amplificación para aumentar la señal que ha de generarse, la señal en el fondo puede suprimirse suficientemente.

10 [Ejemplo 4]

Se detectó ARN (FluA) usando el cebador fluorogénico.

15 La concentración se midió en función de la reacción de amplificación a 67 °C durante un tiempo predeterminado (0, 20 o 40 minutos) y la medición de señal de la misma manera que en el Ejemplo 3 excepto por que FluA/ARN (*PLoS ONE* 2012, 7(1), e30236) de un número predeterminado de copias (0, 1500 o 3000 copias) se mezcló en la solución de reacción (composición de solución de reacción 1) del Ejemplo 3 (n = 1). Después, el valor de corrección se obtuvo restando el valor medido de la solución de reacción en la que el número de copias en el momento de iniciar la reacción era 0 del valor medido de cada una de las soluciones de reacción en las que el número de copias en el momento de iniciar la reacción era de 1500 copias y 3000 copias.

20 Los resultados se muestran en la FIG. 6. La FIG. 6 es un gráfico que muestra la concentración medida (/pl) corregida calculada a partir de la fluorescencia de la solución de reacción a cada tiempo de reacción. El valor medido de la solución de reacción en la que el número de copias era de 1500 copias y el valor medido de la solución de reacción en la que el número de copias era de 3000 copias en el momento de iniciar la reacción aumentaron enormemente para alcanzar el valor máximo en el tiempo de reacción de 40 minutos. El valor medido de la solución de reacción en la que el número de copias era de 3000 copias en el momento de iniciar la reacción era 1,7 veces el valor medido de la solución de reacción en la que el número de copias era de 1500 copias en el momento de iniciar la reacción en el tiempo de reacción de 40 minutos.

30

[Ejemplo 5]

Se detectó ARN (FluA) usando el intercalador.

35 La concentración se midió en función de la reacción de amplificación a 67 °C durante un tiempo predeterminado (0 o 40 minutos) y la medición de señal de la misma manera que en el Ejemplo 3 excepto por que FluA/ARN (*PLoS ONE* 2012, 7(1), e30236) de un número predeterminado de copias (0 o 3000 copias) se mezcló en la solución de reacción (composición de solución de reacción 2) del Ejemplo 3 usando el intercalador (n = 1).

40 Los resultados se muestran en la FIG. 7. La FIG. 7 es un gráfico que muestra la concentración medida (/pl) calculada a partir de la fluorescencia de la solución de reacción a cada tiempo de reacción. El valor medido de la solución de reacción en la que el número de copias era de 0 copias en el momento de iniciar la reacción apenas aumentó incluso después de 20 minutos desde el inicio de la reacción, mientras que el valor medido de la solución de reacción en la que el número de copias era de 3000 copias en el momento de iniciar la reacción aumentó enormemente en 20 minutos desde el inicio de la reacción.

45

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención, puede analizarse con precisión un ácido nucleico molde.

50

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> RIKEN
Kabushiki Kaisha DNAFORM

55

<120> Método de análisis de ácido nucleico molde, método de análisis de sustancia objetivo, kit para analizar ácido nucleico molde o sustancia objetivo y dispositivo para analizar ácido nucleico molde o sustancia objetivo

<130> 161535A

60

<150> JP2015-169833
<151> 28/08/2015

<150> JP2016-096998
<151> 13/05/2016

65

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador

<400> 1
cgcgaggagt cagcggtcac actagtgacc c 31

15 <210> 2
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> cebador

<400> 2
acctctata ccctcagaag gtcgggagtt cagggtaaag gt 42

25 <210> 3
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> cebador

<400> 3
tcgcaggtgc ctgtc 15

35 <210> 4
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> cebador

45 <400> 4
ggctgcgggg cc 12

50 <210> 5
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> cebador

<400> 5
caatcccgcc cagactac 18

60 <210> 6
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> cebador

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 5 <223> n es Tiamina marcada con excitón

 <400> 6
 cggggncgcg tgc 13

 10 <210> 7
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 7
 20 ctacgccacc agct 14

 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 8
 30 gagaaagaga aagatacaca 20

 <210> 9
 <211> 14
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda

 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n es timina marcada con naranja de Tiazol

 45 <400> 9
 agctggtggc gnag 14

 <210> 10
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n es timina marcada con rosa de Tiazol
 60
 <400> 10
 tgtgtatcnt tctcttctc 20

 <210> 11
 65 <211> 29
 <212> ADN

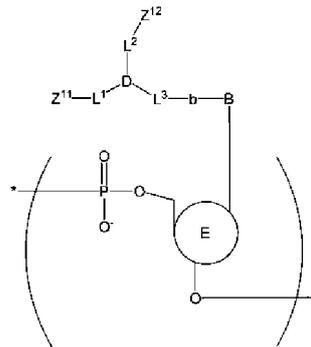
<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 5
 <400> 11
 ttccattgcg aatgcacatt cgaagcaac 29
 <210> 12
 10 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <400> 12
 gcattcgca aatgataata ccagatcc28
 20 <210> 13
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cebador
 <400> 13
 30 accactagat ttccag 16
 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 14
 40 acactagtag agccgggaga 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 50 <400> 15
 ctggtgttta tagcaccctt 20
 <210> 16
 <211> 16
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n es timina marcada con naranja de Tiazol
 65 <400> 16

accacnagat ttccag 16

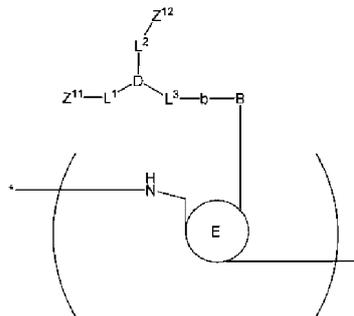
REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar un ácido nucleico molde, que comprende las etapas de:

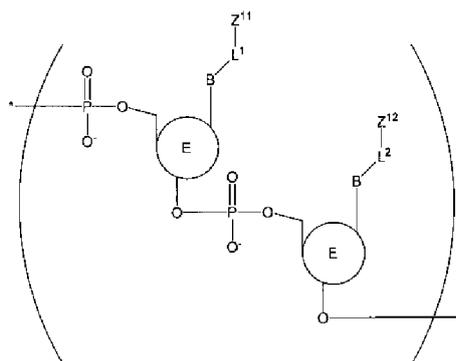
- 5 fraccionar una muestra que comprende un ácido nucleico molde en una pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde;
- amplificar una secuencia objetivo y su secuencia complementaria en el ácido nucleico molde con respecto a cada fracción de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde en presencia de un reactivo de amplificación de ácido nucleico; detectar la generación o interrupción de una señal que muestra una amplificación de la secuencia objetivo o la secuencia complementaria con respecto a cada fracción de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde después de la etapa de amplificación; y
- 10 discriminar una fracción de ácido nucleico molde en la que la generación o interrupción de una señal que muestra la amplificación se ha detectado entre la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde como una fracción amplificada en la que la secuencia objetivo o la secuencia complementaria se ha amplificado, en donde
- 15 el reactivo de amplificación de ácido nucleico comprende un conjunto de cebadores que amplifica la secuencia objetivo y la secuencia complementaria y una sustancia generadora de señales que genera o interrumpe una señal en respuesta a la amplificación, y
- la sustancia generadora de señales genera una señal en un estado en el que se une de manera dependiente de la secuencia e interrumpe una señal en un estado en el que no se une o interrumpe una señal en un estado en el que se une de manera dependiente de la secuencia y genera una señal en un estado en el que no se une, y la generación y la interrupción de una señal son reversibles;
- 20 en donde la sustancia generadora de señales incluye una sonda fluorogénica que comprende al menos dos grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón como la sustancia generadora de señales por molécula y los al menos dos grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón están comprendidos en una base que comprende un par de grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón comprende una
- 25 estructura representada por la siguiente fórmula (16), (16b), (17) o (17b):



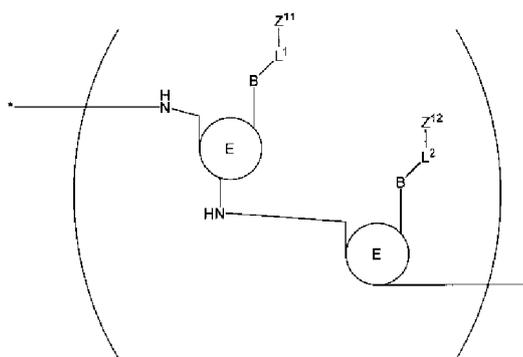
(16)



(16b)



(17)



(17b)

5 en las fórmulas (16), (16b), (17), (17b),

B es un grupo atómico que tiene una cadena principal de nucleobases naturales (adenina, guanina, citosina, timina o uracilo) o una cadena principal de nucleobases artificiales,
E es:

10

- (i) un grupo atómico que tiene una cadena principal de desoxirribosa, una cadena principal de ribosa o una estructura derivada de cualquiera de ellas, o
- (ii) un grupo atómico que tiene una estructura peptídica o una estructura peptoide,

15

Z¹¹ y Z¹² son cada uno un grupo atómico que presenta fluorescencia, y pueden ser idénticos o diferentes entre sí,

20

L¹, L² y L³ son cada uno un enlazador (un átomo de unión o un grupo atómico), la longitud de la cadena principal (el número de átomos de la cadena principal) de los mismos es arbitraria, L¹, L² y L³ cada uno puede o no contener cada uno de entre C, N, O, S, P y Si en la cadena principal, L¹, L² y L³ cada uno puede o no contener cada uno de entre un enlace simple, un doble enlace, un triple enlace, un enlace amida, un enlace éster, un enlace disulfuro, un grupo imino, un enlace éter, un enlace tioéter y un enlace tioéster en la cadena principal, y L¹, L² y L³ pueden ser idénticos o diferentes entre sí,

25

D es CR, N, P, P=O, B o SiR donde R es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo o un sustituyente arbitrario, y b es un enlace simple, un doble enlace o un triple enlace,

o como alternativa,
en las fórmulas (16) y (16b), L¹ y L² son cada uno un enlazador, L³, D y b pueden no estar presentes, y L¹ y L² pueden unirse directamente a B, a condición de que:

30

- en las fórmulas (16) y (17), E sea un grupo atómico descrito en el punto (i) y al menos un átomo O en un enlace de ácido fosfórico puede estar sustituido con un átomo de S;
- en las fórmulas (16b) y (17b), E sea un grupo atómico descrito en el punto (ii); y
- en las fórmulas (17) y (17b), los respectivos B pueden ser idénticos o diferentes entre sí, y los respectivos E pueden ser idénticos o diferentes entre sí.

35

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el conjunto de cebadores comprende un cebador fluorogénico que comprende la sustancia generadora de señales, y el cebador fluorogénico es un cebador que genera la señal en un estado en el que se une a un objetivo e interrumpe la señal en un estado en el que se disocia del objetivo o un cebador que interrumpe la señal en un estado en el que se une a un objetivo y genera la señal en un

estado en el que se disocia del objetivo.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde

- 5 (a) un método de amplificación adoptado en la etapa de amplificación es al menos uno de entre un método de amplificación isotérmica y un método de PCR;
- (b) el método comprende adicionalmente la etapa de:
recuperar la fracción amplificada de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde después de la etapa de discriminación; y opcionalmente que comprende adicionalmente la etapa de:
- 10 amplificar la secuencia objetivo y la secuencia complementaria en el ácido nucleico molde con respecto a la fracción amplificada después de la etapa de discriminación, en donde la amplificación es una segunda etapa de amplificación; y/o
- (c) la etapa de detección se realiza mediante un análisis de curva de fusión; y/o
- (d) el método comprende adicionalmente la etapa de:
- 15 realizar un análisis mediante un análisis de curva de fusión después de la etapa de detección.

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde

- (a) la muestra que comprende el ácido nucleico molde comprende el reactivo de amplificación de ácido nucleico, y
- 20 en la etapa de fraccionamiento, la muestra que comprende el ácido nucleico molde y el reactivo de amplificación de ácido nucleico se fracciona en una pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde;
- (b) la etapa de fraccionamiento provoca que cada fracción de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde contenga el reactivo de amplificación de ácido nucleico; y/o
- 25 (c) la etapa de fraccionamiento comprende una etapa de formación de una emulsión a partir de la muestra, la fracción de ácido nucleico molde es una gota de la muestra dispersada en la emulsión, y la etapa de detección es una etapa de detectar la generación o interrupción de una señal con respecto a la gota en la emulsión, opcionalmente en donde
- se provoca que la emulsión pase a través de un canal de flujo, y
- 30 la generación o interrupción de una señal se detecta con respecto a la gota en un sitio predeterminado del canal de flujo cuando la gota en la emulsión pasa a través del canal de flujo; y/o
- la emulsión es una emulsión de agua en aceite (de tipo W/O); y/o
- (d) la etapa de fraccionamiento es una etapa de fraccionar la muestra en una pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde dispensando la muestra a un chip provisto de una pluralidad de porciones de formación de
- 35 fracciones de ácido nucleico molde sobre su superficie.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde

- (A)
- 40 (a) en el chip, una superficie de la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es hidrófila, y una superficie de una región que excluye la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es hidrófoba, y
- 45 la etapa de fraccionamiento es una etapa de fraccionar la muestra en una pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde mediante la aplicación de la muestra a la superficie del chip para separar la muestra en las porciones de formación de fracciones de ácido nucleico molde;
- (b) en el chip, la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es una muesca de la superficie del chip, y la región que excluye la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde no es una muesca, y la etapa de fraccionamiento es una etapa de fraccionar la muestra mediante la introducción de la muestra en
- 50 las muescas sobre la superficie del chip; o
- (c) en el chip, la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es una muesca de la superficie del chip, y la superficie interna de la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es hidrófila, la región que excluye la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde no es una muesca y una superficie de la región que excluye la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde es hidrófoba; y/o
- 55 (B)
- (a) el reactivo de amplificación de ácido nucleico se dispone en la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde del chip, y
- 60 la etapa de fraccionamiento provoca que la fracción de ácido nucleico molde contenga el reactivo de amplificación de ácido nucleico en la porción de formación de fracción de ácido nucleico molde del chip; o
- (b) la etapa de detección es una etapa de obtener una imagen de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde sobre al menos un chip, y
- 65 la etapa de discriminación es una etapa de discriminar la fracción de ácido nucleico molde sobre el chip en la que la generación o interrupción de una señal se ha detectado en la imagen como la fracción amplificada.

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde

(a) la etapa de fraccionamiento es una etapa de fraccionar la muestra en la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde haciendo gotear la muestra.

5 (b) en la etapa de fraccionamiento, un volumen promedio de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde es de 0,0001 a 5000 nl.

(c) la muestra comprende al menos dos clases de ácidos nucleicos molde, el reactivo de amplificación de ácido nucleico comprende al menos dos conjuntos de cebadores y al menos dos sustancias generadoras de señales,

10 los al menos dos conjuntos de cebadores amplifican cada uno la secuencia objetivo y la secuencia complementaria en cada uno de los diferentes ácidos nucleicos molde, y

las al menos dos sustancias generadoras de señales tienen cada una la misma propiedad de fluorescencia y generan o interrumpen una señal en respuesta a una amplificación de la secuencia objetivo y la secuencia complementaria en cada uno de los diferentes ácidos nucleicos molde;

15 (d) la muestra comprende al menos dos ácidos nucleicos molde, el reactivo de amplificación de ácido nucleico comprende al menos dos conjuntos de cebadores y al menos dos sustancias generadoras de señales,

los al menos dos conjuntos de cebadores amplifican cada uno la secuencia objetivo y la secuencia complementaria en cada uno de los diferentes ácidos nucleicos molde, y

20 las al menos dos sustancias generadoras de señales tienen cada una diferente propiedad de fluorescencia entre sí y generan o interrumpen una señal en respuesta a una amplificación de la secuencia objetivo y la secuencia complementaria en cada uno de los diferentes ácidos nucleicos molde;

(e) la muestra comprende al menos dos ácidos nucleicos molde, el reactivo de amplificación de ácido nucleico comprende al menos dos conjuntos de cebadores y una sonda no fluorogénica,

25 los al menos dos conjuntos de cebadores amplifican cada uno la secuencia objetivo y la secuencia complementaria en cada uno de los diferentes ácidos nucleicos molde, y

cada una de entre la sustancia generadora de señales y la sonda no fluorogénica genera o interrumpe una señal en respuesta a una amplificación de la secuencia objetivo y la secuencia complementaria en cada uno de los diferentes ácidos nucleicos molde;

30 (f) la generación o interrupción de una señal que muestra una amplificación de la secuencia objetivo o la secuencia complementaria se detecta con respecto a cada fracción de la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde antes de la etapa de amplificación, y

en la etapa de discriminación, mediante la comparación de una señal detectada antes de la etapa de amplificación y una señal detectada después de la etapa de amplificación, una fracción de ácido nucleico molde en la que la generación o interrupción de una señal que muestra la amplificación se ha detectado entre la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde se discrimina como una fracción amplificada en la que la secuencia objetivo o la secuencia complementaria se ha amplificado; y/o

35 (g) la generación o interrupción de una señal que muestra una amplificación de la secuencia objetivo o la secuencia complementaria se detecta con respecto a la muestra que comprende el ácido nucleico molde antes de la etapa de fraccionamiento, y

en la etapa de discriminación, mediante la comparación de una señal detectada antes de la etapa de fraccionamiento y una señal detectada después de la etapa de amplificación, una fracción de ácido nucleico molde en la que la generación o interrupción de una señal que muestra la amplificación se ha detectado entre la pluralidad de fracciones de ácido nucleico molde se discrimina como una fracción amplificada en la que la secuencia objetivo o la secuencia complementaria se ha amplificado.

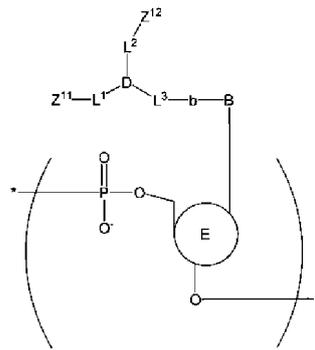
7. Un método para analizar una sustancia objetivo, que comprende las etapas de:

50 poner en contacto una muestra que comprende al menos una sustancia objetivo con al menos una sonda fluorogénica que comprende una sustancia generadora de señales que genera una señal en un estado en el que se une específicamente a la sustancia objetivo e interrumpe una señal en un estado en el que no se une a la sustancia objetivo o interrumpe una señal en un estado en el que se une específicamente a la sustancia objetivo y genera una señal en un estado en el que no se une en una solución de reacción para poner al menos una sustancia objetivo en contacto con cada sonda fluorogénica; y

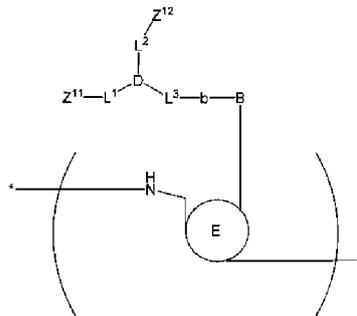
55 detectar la generación o interrupción de una señal de la sonda fluorogénica en respuesta a la unión entre la sustancia objetivo y la sonda;

en donde la sonda fluorogénica comprende al menos dos grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón como la sustancia generadora de señales por molécula y los al menos dos grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón están comprendidos en una base que comprende un par de grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón comprende una estructura representada por la siguiente fórmula (16), (16b), (17) o (17b):

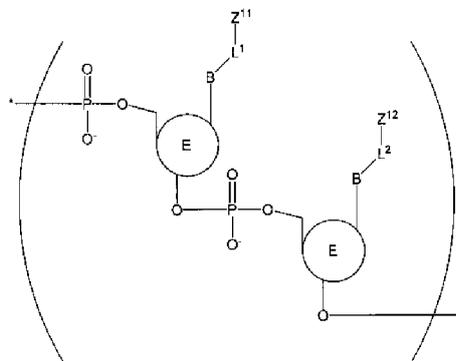
60



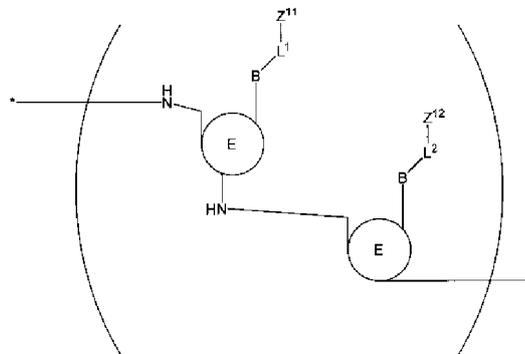
(16)



(16b)



(17)



(17b)

5

en las fórmulas (16), (16b), (17), (17b),

10

B es un grupo atómico que tiene una cadena principal de nucleobases naturales (adenina, guanina, citosina, timina o uracilo) o una cadena principal de nucleobases artificiales,

E es:

- (i) un grupo atómico que tiene una cadena principal de desoxirribosa, una cadena principal de ribosa o una estructura derivada de cualquiera de ellas, o
 5 (ii) un grupo atómico que tiene una estructura peptídica o una estructura peptoide,

Z^{11} y Z^{12} son cada uno un grupo atómico que presenta fluorescencia, y pueden ser idénticos o diferentes entre sí,

L^1 , L^2 y L^3 son cada uno un enlazador (un átomo de unión o un grupo atómico), la longitud de la cadena principal (el número de átomos de la cadena principal) de los mismos es arbitraria, L^1 , L^2 y L^3 cada uno puede o no contener cada uno de entre C, N, O, S, P y Si en la cadena principal, L^1 , L^2 y L^3 cada uno puede o no contener cada uno de entre un enlace simple, un doble enlace, un triple enlace, un enlace amida, un enlace éster, un enlace disulfuro, un grupo imino, un enlace éter, un enlace tioéter y un enlace tioéster en la cadena principal, y L^1 , L^2 y L^3 pueden ser idénticos o diferentes entre sí,

D es CR, N, P, P=O, B o SiR donde R es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo o un sustituyente arbitrario, y b es un enlace simple, un doble enlace o un triple enlace, o como alternativa,

en las fórmulas (16) y (16b), L^1 y L^2 son cada uno un enlazador, L^3 , D y b pueden no estar presentes, y L^1 y L^2 pueden unirse directamente a B, a condición de que:

en las fórmulas (16) y (17), E sea un grupo atómico descrito en el punto (i) y al menos un átomo O en un enlace de ácido fosfórico puede estar sustituido con un átomo de S;

en las fórmulas (16b) y (17b), E sea un grupo atómico descrito en el punto (ii); y

en las fórmulas (17) y (17b), los respectivos B pueden ser idénticos o diferentes entre sí, y

los respectivos E pueden ser idénticos o diferentes entre sí.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la sustancia objetivo es un ácido nucleico o una secuencia de ácido nucleico; y/o

es una sustancia objetivo en un estado en el que se une a una sustancia que se une específicamente a la sustancia objetivo.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde

(a) la etapa de detección es una etapa de detectar el brillo o la intensidad de al menos un tipo de la señal en la solución de reacción;

(b) la etapa de detección es una etapa de detectar al menos un tipo de la señal en la solución de reacción mediante el recuento a nivel molecular de la sonda fluorogénica;

(c) se analizan al menos dos tipos de sustancias objetivo,

se usan al menos dos tipos de sondas fluorogénicas para las sustancias objeto de la investigación, y el método comprende la etapa de:

calcular una relación de concentración o una relación de abundancia de cada sustancia objetivo a partir de un valor de señal detectado de los al menos dos tipos de sondas fluorogénicas detectadas en la etapa de detección;

(d) se analizan al menos dos sustancias objetivo y al menos dos tipos de sustancias objetivo son adyacentes entre sí, y

se usan al menos dos sondas fluorogénicas para las sustancias objetivo, y

y las sondas fluorogénicas comprenden, cada una, una sustancia generadora de señales que tiene una propiedad de fluorescencia diferente entre sí y genera o interrumpe una señal en respuesta a la unión a diferentes sustancias objetivo con una transferencia de energía de resonancia de fluorescencia;

(e) se analizan al menos dos sustancias objetivo y al menos dos tipos de sustancias objetivo son adyacentes entre sí, y

se usan al menos dos sondas fluorogénicas para las sustancias objetivo, y

las sondas fluorogénicas comprenden, cada una, una sustancia generadora de señales que tiene una propiedad de fluorescencia diferente entre sí, generan o interrumpen una señal en respuesta a la unión a diferentes sustancias objetivo y se detecta la presencia o ausencia de una superposición espacial de una pluralidad de tipos de las señales; y/o

(c) en la etapa de contacto y la etapa de detección, se controla una temperatura de la solución de reacción.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde

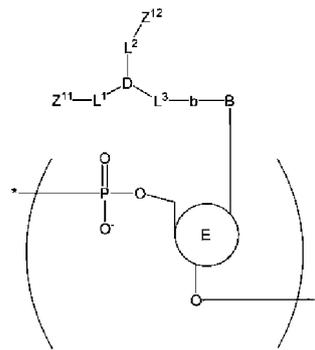
un análisis de la sustancia objetivo es un análisis de una modificación de la sustancia objetivo, y

el método comprende adicionalmente la etapa de:

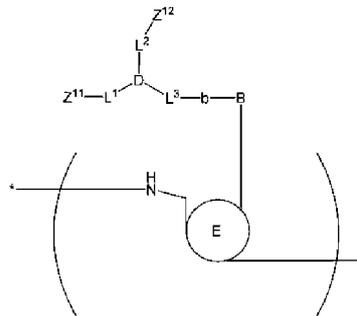
pretratar la sustancia objetivo antes de la etapa de detección y, opcionalmente, comprende adicionalmente la etapa de:

amplificar una sustancia objetivo pretratada después de la etapa de pretratamiento y antes de la etapa de detección, en donde un producto amplificado obtenido en la etapa de amplificación se usa como la sustancia objetivo en la etapa de detección.

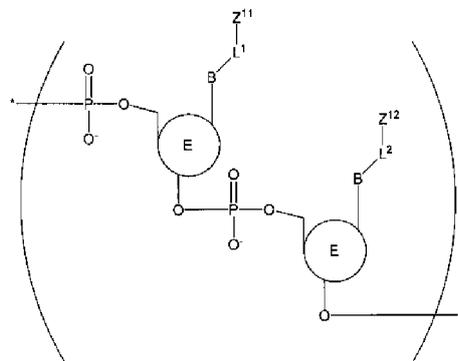
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde un análisis del ácido nucleico molde es un análisis de una modificación del ácido nucleico molde, y el método comprende adicionalmente la etapa de: pretratar el ácido nucleico molde antes de la etapa de fraccionamiento.
- 5
12. El método de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en donde
- (a) un análisis de la sustancia objetivo o ácido nucleico molde es un análisis de metilación de la sustancia objetivo o ácido nucleico molde, y
- 10 la etapa de pretratamiento es una etapa de convertir un resto de citosina no metilada de la sustancia objetivo o ácido nucleico molde en un resto de uracilo o un resto de derivado de uracilo, opcionalmente en donde en la etapa de pretratamiento, la conversión se realiza usando bisulfito;
- (b) un análisis de la sustancia objetivo o ácido nucleico molde es un análisis de metilación de la sustancia objetivo, y
- 15 la etapa de pretratamiento es una etapa de escindir una región no metilada o una región metilada de la sustancia objetivo o ácido nucleico molde, opcionalmente en donde en la etapa de pretratamiento, la escisión se realiza usando una enzima de restricción;
- (c) un análisis de la sustancia objetivo o ácido nucleico molde es un análisis de metilación de la sustancia objetivo o ácido nucleico molde, y
- 20 la etapa de pretratamiento es una etapa de enriquecer una sustancia objetivo metilada o ácido nucleico molde metilado, opcionalmente en donde en la etapa de pretratamiento, usando al menos uno de entre una proteína de unión a ADN metilado y un anticuerpo antimetilcitosina, la sustancia objetivo metilada o ácido nucleico molde metilado se enriquece mediante la unión de al menos uno de entre la proteína de unión a ADN metilado y el anticuerpo antimetilcitosina a la sustancia objetivo
- 25 metilada o ácido nucleico molde metilado;
- (d) un análisis de la sustancia objetivo o ácido nucleico molde es un análisis de hidroximetilación de la sustancia objetivo o ácido nucleico molde, y
- la etapa de pretratamiento es una etapa de convertir un resto de hidroximetilcitosina de la sustancia objetivo o ácido nucleico molde en un resto de base no hidroximetilado, opcionalmente en donde
- 30 en la etapa de pretratamiento, (i) un resto de hidroximetilcitosina se convierte en un resto de timina o un resto de derivado de timina usando un agente oxidante de wolframio; o (ii) un resto de hidroximetilcitosina se convierte en un resto de uracilo o un resto de derivado de uracilo usando perrutenato de potasio (KRuO₄) y bisulfito;
- (e) un análisis de la sustancia objetivo es un análisis de hidroximetilación de la sustancia objetivo o ácido nucleico molde, y
- 35 la etapa de pretratamiento comprende las etapas de: glicosilar una región hidroximetilada de una sustancia objetivo hidroximetilada o un ácido nucleico molde hidroximetilado; y
- (i) escindir la región glicosilada de la sustancia objetivo hidroximetilada o ácido nucleico molde hidroximetilado, opcionalmente en donde la escisión se realiza usando una enzima de restricción sensible a la glicosilación; o enriquecer la sustancia objetivo hidroximetilada glicosilada o ácido nucleico molde hidroximetilado, opcionalmente en donde la sustancia objetivo hidroximetilada glicosilada se enriquece mediante la unión de un anticuerpo hidroximetilado de glicosilación, a la sustancia objetivo hidroximetilada glicosilada o ácido nucleico
- 40 molde hidroximetilado.
- 45
13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en donde el cebador fluorogénico comprende al menos dos grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón como la sustancia generadora de señales por molécula.
- 50
14. El método de acuerdo con la reivindicación 2 o 13, en donde los al menos dos grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón están comprendidos en una base que comprende un par de grupos atómicos fluorescentes que presentan un efecto de excitón comprende una estructura representada por la siguiente fórmula (16), (16b), (17) o (17b).



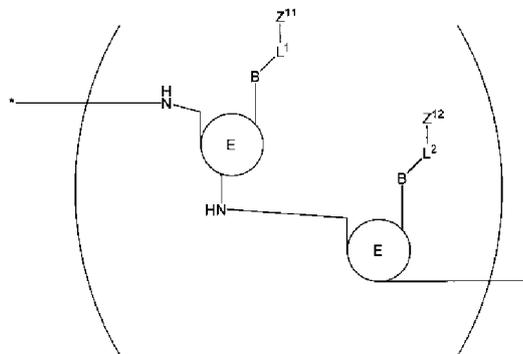
(16)



(16b)



(17)



(17b)

5

en las fórmulas (16), (16b), (17), (17b),

10

B es un grupo atómico que tiene una cadena principal de nucleobases naturales (adenina, guanina, citosina, timina o uracilo) o una cadena principal de nucleobases artificiales,

E es:

- 5 (i) un grupo atómico que tiene una cadena principal de desoxirribosa, una cadena principal de ribosa o una estructura derivada de cualquiera de ellas, o
 (ii) un grupo atómico que tiene una estructura peptídica o una estructura peptoide,

10 Z^{11} y Z^{12} son cada uno un grupo atómico que presenta fluorescencia, y pueden ser idénticos o diferentes entre sí, L^1 , L^2 y L^3 son cada uno un enlazador (un átomo de unión o un grupo atómico), la longitud de la cadena principal (el número de átomos de la cadena principal) de los mismos es arbitraria, L^1 , L^2 y L^3 cada uno puede o no contener cada uno de entre C, N, O, S, P y Si en la cadena principal, L^1 , L^2 y L^3 cada uno puede o no contener cada uno de entre un enlace simple, un doble enlace, un triple enlace, un enlace amida, un enlace éster, un enlace disulfuro, un grupo imino, un enlace éter, un enlace tioéter y un enlace tioéster en la cadena principal, y L^1 , L^2 y L^3 pueden ser idénticos o diferentes entre sí,

15 D es CR, N, P, P=O, B o SiR donde R es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo o un sustituyente arbitrario, y b es un enlace simple, un doble enlace o un triple enlace, o como alternativa, en las fórmulas (16) y (16b), L^1 y L^2 son cada uno un enlazador, L^3 , D y b pueden no estar presentes, y L^1 y L^2 pueden unirse directamente a B, a condición de que:

- 20 en las fórmulas (16) y (17), E sea un grupo atómico descrito en el punto (i) y al menos un átomo O en un enlace de ácido fosfórico puede estar sustituido con un átomo de S;
 en las fórmulas (16b) y (17b), E sea un grupo atómico descrito en el punto (ii); y
 en las fórmulas (17) y (17b), los respectivos B pueden ser idénticos o diferentes entre sí, y los respectivos E pueden ser idénticos o diferentes entre sí.

25 15. Uso de un kit de análisis o analizador para una sustancia objetivo para ejecutar los métodos de análisis de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

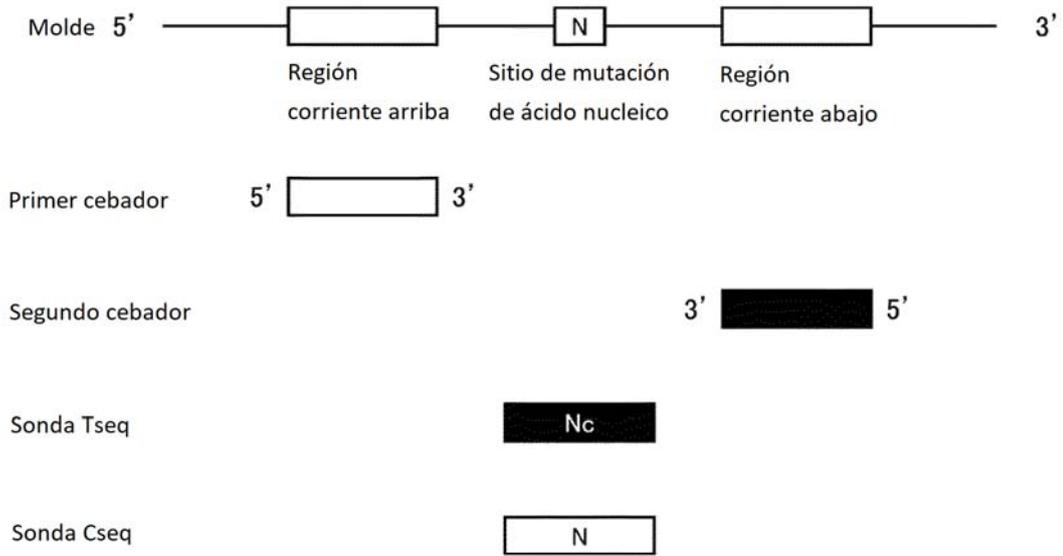


FIG. 1

(A) Método de análisis del Ejemplo 1

(B) Método de análisis del Ejemplo Comparativo 1

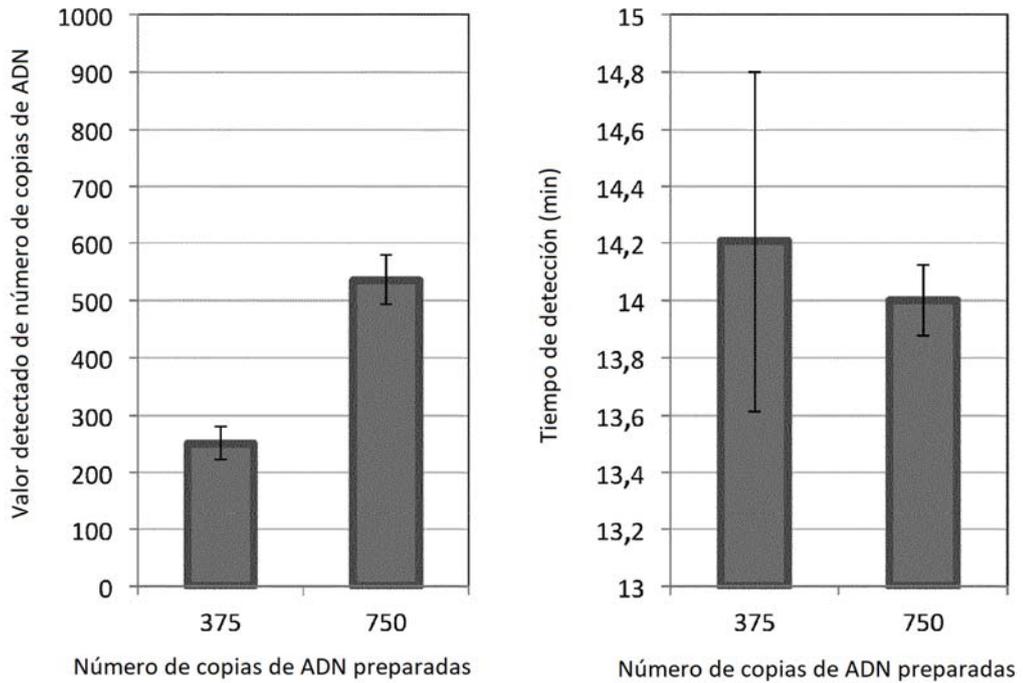


FIG. 2

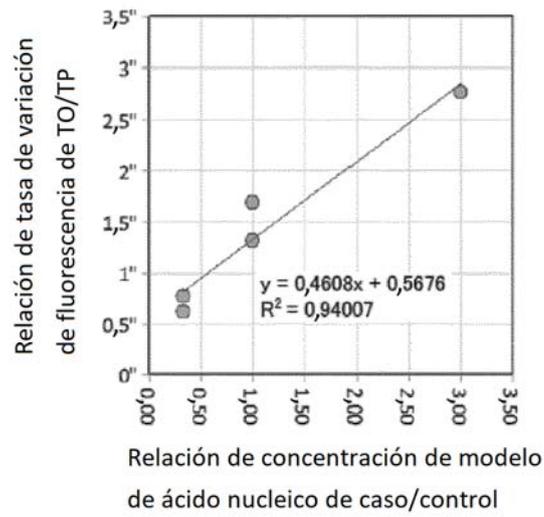


FIG. 3

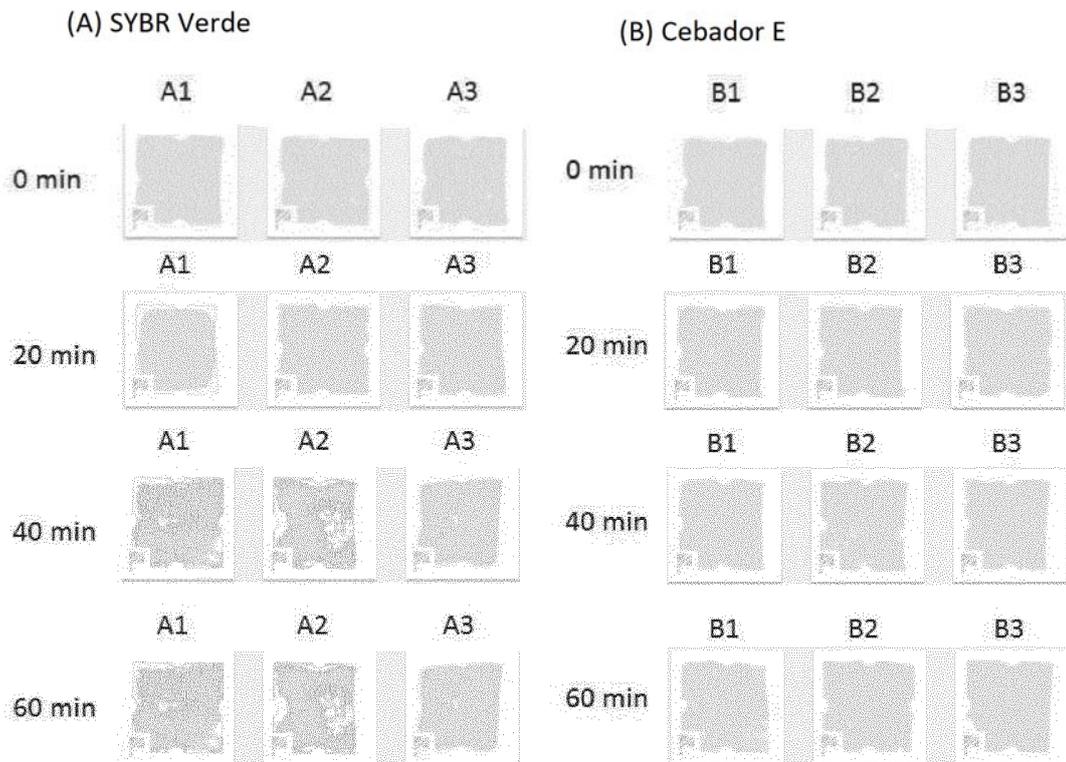


FIG. 4

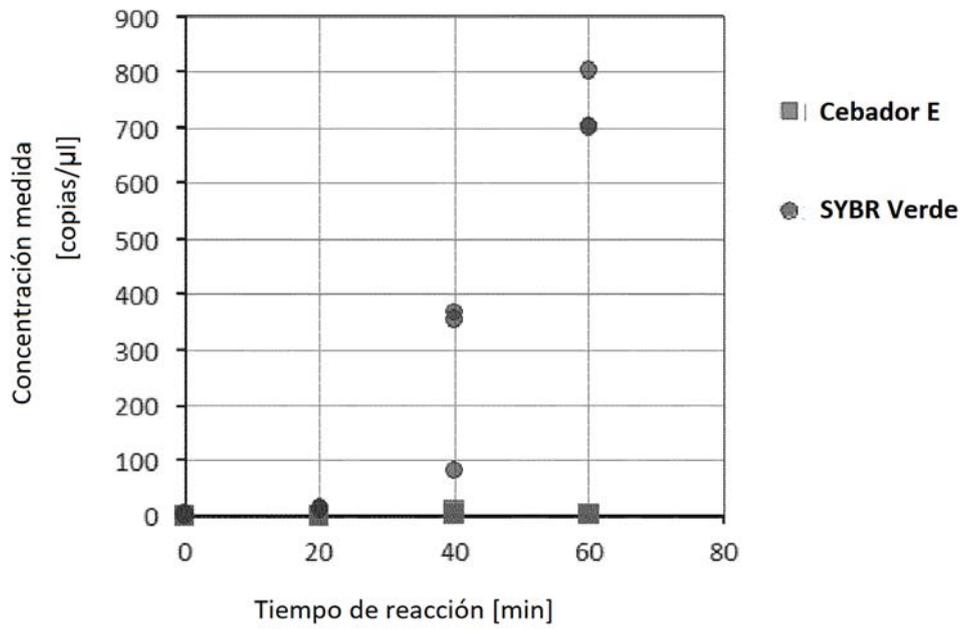


FIG. 5

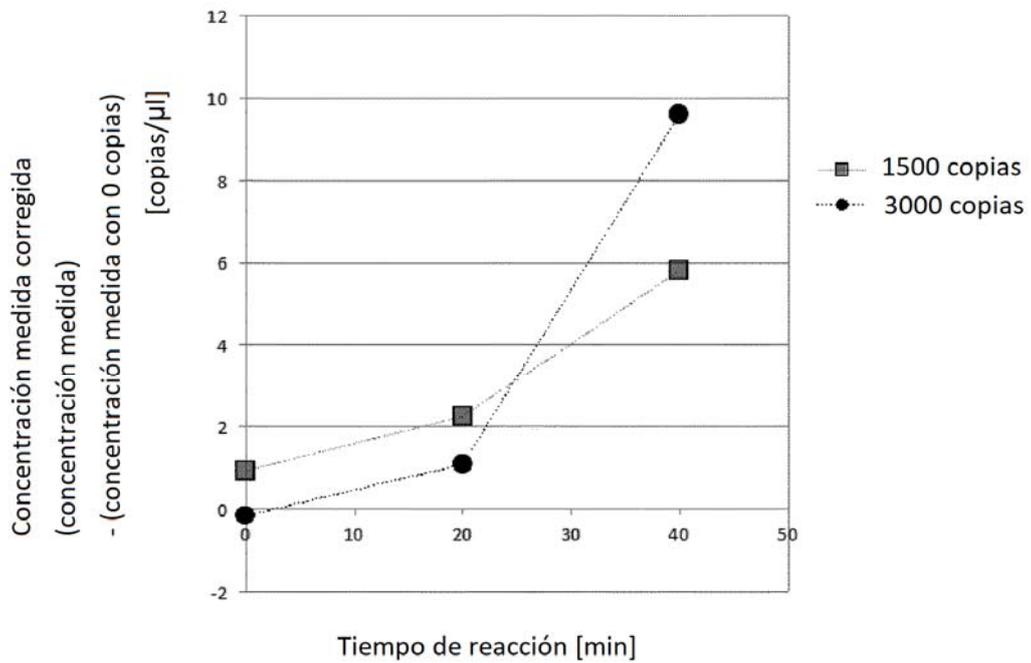


FIG. 6

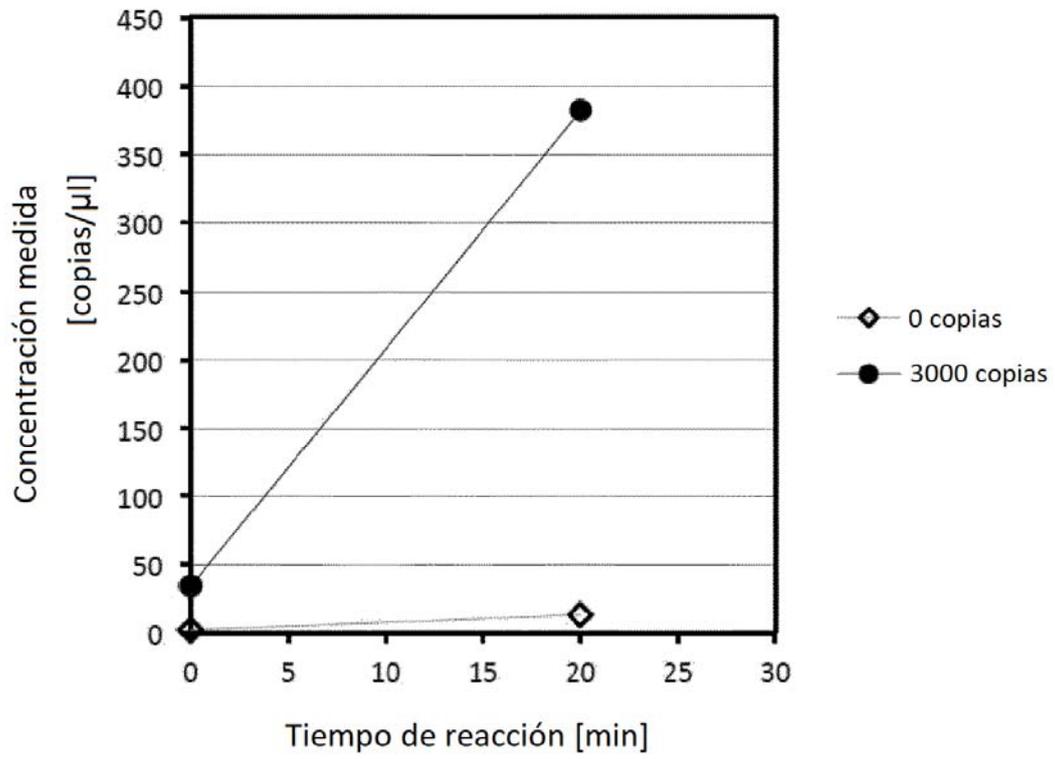


FIG. 7