

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 993 457**

51 Int. Cl.:

<b>C12Q 1/68</b>	(2008.01)
<b>C07H 21/04</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/16</b>	(2006.01)
<b>C12P 19/34</b>	(2006.01)
<b>C07H 21/00</b>	(2006.01)
<b>C12Q 1/6818</b>	(2008.01)
<b>C12Q 1/6823</b>	(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2016 PCT/US2016/014753**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016 WO16123029**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2016 E 16743914 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2024 EP 3250715**

54 Título: **Un sustrato para una reacción de mellado y extensión que comprende un dúplex de ácido nucleico**

30 Prioridad:

**30.01.2015 US 201562110237 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.12.2024**

73 Titular/es:

**ENVIROLOGIX INC. (100.00%)  
500 Riverside Industrial Parkway  
Portland, Maine 04103-1418, US**

72 Inventor/es:

**JUDICE, STEPHEN, A.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 993 457 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**

Un sustrato para una reacción de mellado y extensión que comprende un dúplex de ácido nucleico

**Antecedentes de la invención**

5 Las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos pueden fallar porque el ácido nucleico diana esté ausente (negativo verdadero) o porque la amplificación específica esté inhibida (falso negativo). Por lo tanto, entender la razón del fallo de la reacción puede afectar a la interpretación de un resultado negativo. El uso de un control positivo puede aumentar la confianza de que un resultado negativo sea un negativo verdadero al descartar el fallo debido a los componentes de reacción. Cuando se usan reacciones de amplificación nucleica como medio de detección de un agente infeccioso, los controles positivos son particularmente útiles para indicar que las amplificaciones negativas representan especímenes realmente negativos.

10 Los métodos de la técnica anterior que intentan abordar este problema incluyen el documento WO2012021493A2, que describe composiciones y métodos para cuantificar la detección de un oligonucleótido diana en una muestra en tiempo real. Estos métodos son compatibles con oligonucleótidos diana amplificados mediante una reacción NEAR. El documento WO2006088911 A2 describe un método para detectar la presencia de una secuencia nucleotídica diana en una muestra de ADN, en el que una muestra de prueba que comprende ADN monocatenario se expone a una sonda de ADN y a una endonucleasa de mellado en condiciones que permiten la hibridación específica de secuencia de la sonda con una secuencia diana complementaria. El documento WO 2010120853 A2 describe métodos para detectar y diferenciar específicamente uno o más ARN pequeños en la ruta de maduración de un ARNm.

15 Por consiguiente, se requieren urgentemente métodos mejorados para la detección precisa de moléculas de ácidos nucleicos diana.

**Compendio de la invención**

20 La presente invención proporciona composiciones y métodos para comprobar la actividad de una enzima de mellado y una polimerasa en una reacción que implica el uso de una molécula sustrato de ácido nucleico que detecta las actividades de la enzima de mellado y de extensión por la polimerasa mediante la liberación de un indicador detectable (por ejemplo, un fluoróforo).

25 En un aspecto, la invención proporciona un sustrato para una reacción de mellado y extensión que incluye un dúplex de ácido nucleico que tiene (i) una primera hebra de ácido nucleico con un sitio de reconocimiento para la enzima de mellado, un sitio de mella y un marcador detectable fluorescente unido covalentemente al extremo 3'; y (ii) una segunda hebra de ácido nucleico que tiene una secuencia capaz de formar un dúplex con la primera hebra y una fracción extintora unida covalentemente al extremo 5', o (i) una primera hebra de ácido nucleico con un sitio de reconocimiento para la enzima de mellado, un sitio de mella y una fracción extintora unida covalentemente al extremo 3'; y (ii) una segunda hebra de ácido nucleico que tiene una secuencia capaz de formar un dúplex con la primera hebra y un marcador detectable fluorescente unido covalentemente al extremo 5',

30 en donde la primera hebra de ácido nucleico está modificada en uno o más nucleótidos entre el sitio de reconocimiento para la enzima de mellado y el sitio de mella; y/o

35 en donde la primera hebra de ácido nucleico está modificada en una o más posiciones dentro del sitio de reconocimiento para la enzima de mellado.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar la actividad de una enzima de mellado y una polimerasa en una reacción que implica:

40 (a) la puesta en contacto de un dúplex de ácido nucleico con una enzima de mellado, en donde el dúplex tiene: (i) una primera hebra de ácido nucleico que comprende un sitio de reconocimiento para la enzima de mellado, un sitio de mella y un marcador detectable fluorescente unido covalentemente al extremo 3'; y (ii) una segunda hebra de ácido nucleico que tiene una secuencia capaz de formar un dúplex con la primera hebra y una fracción extintora en el extremo 5'; o (i) una primera hebra de ácido nucleico con un sitio de reconocimiento para la enzima de mellado, un sitio de mella y una fracción extintora unida covalentemente al extremo 3'; y (ii) una segunda hebra de ácido nucleico que tiene una secuencia capaz de formar un dúplex con la primera hebra y un marcador detectable fluorescente unido covalentemente al extremo 5'; en donde la primera hebra de ácido nucleico está modificada en uno o más nucleótidos entre el sitio de reconocimiento para la enzima de mellado y el sitio de mella; y/o en donde la primera hebra de ácido nucleico está modificada en una o más posiciones dentro del sitio de reconocimiento para la enzima de mellado;

(b) la puesta en contacto del dúplex mellado con una polimerasa en presencia de dNTP;

(c) la extensión por la polimerasa, con lo que se desplaza la porción de la primera hebra de ácido nucleico 3' del sitio de mella unida covalentemente al marcador detectable fluorescente o a la fracción extintora; y

(d) la detección de una señal del marcador detectable fluorescente separado del extintor, con lo que se detecta la

actividad de la enzima de mellado y la polimerasa en la reacción.

En otro aspecto más, la invención proporciona un método para amplificar un producto específico en una reacción de amplificación por mellado que implica:

- 5 (a) la puesta en contacto de una molécula de ácido nucleico diana, a una única temperatura o a una temperatura que varía solo en 1, 2, 3, 4 o 5 grados, con dos o más cebadores, cada uno de los cuales se une específicamente a una molécula de ácido nucleico diana, en presencia de una polimerasa, dNTP, una enzima de mellado y un dúplex que tiene: (i) una primera hebra de ácido nucleico con un sitio de reconocimiento para la enzima de mellado, un sitio de mella y un marcador detectable fluorescente unido covalentemente al extremo 3'; y (ii) una segunda hebra de ácido nucleico que tiene una secuencia capaz de formar un dúplex con la primera hebra y una fracción extintora en el extremo 5'; o (i) una primera hebra de ácido nucleico con un sitio de reconocimiento para la enzima de mellado, un sitio de mella y una fracción extintora unida covalentemente al extremo 3'; y (ii) una segunda hebra de ácido nucleico que tiene una secuencia capaz de formar un dúplex con la primera hebra y un marcador detectable fluorescente unido covalentemente al extremo 5'; en donde la primera hebra de ácido nucleico está modificada en uno o más nucleótidos entre el sitio de reconocimiento para la enzima de mellado y el sitio de mella; y/o en donde la primera hebra de ácido nucleico está modificada en una o más posiciones dentro del sitio de reconocimiento para la enzima de mellado;
- 10 (b) la generación de amplicones que contengan al menos una porción de dicha molécula de ácido nucleico diana;
- (c) el mellado del dúplex y la extensión por la polimerasa, con lo que se desplaza la porción de la primera hebra de ácido nucleico 3' del sitio de mella unida covalentemente al marcador detectable fluorescente o a la fracción extintora; y
- 20 (d) la detección de una señal del marcador detectable fluorescente separado del extintor, con lo que se detecta la actividad de la enzima de mellado y la polimerasa en la reacción.

En la presente memoria se describe, pero no se reivindica un método para detectar un producto específico en una reacción de amplificación por mellado que implica: la puesta en contacto de una molécula de ácido nucleico diana en condiciones sustancialmente isotérmicas con dos o más cebadores, cada uno de los cuales se une específicamente a una molécula de ácido nucleico diana, en presencia de una polimerasa, dNTP, una enzima de mellado, una sonda polinucleotídica detectable y un dúplex que tiene: una primera hebra de ácido nucleico con un sitio de reconocimiento para la enzima de mellado y un marcador detectable fluorescente unido covalentemente al extremo 3'; y una segunda hebra de ácido nucleico que tiene una secuencia capaz de formar un dúplex con la primera hebra y una fracción extintora en el extremo 5'; o un dúplex que tiene: una primera hebra de ácido nucleico con un sitio de reconocimiento para la enzima de mellado y una fracción extintora unida covalentemente al extremo 3'; y una segunda hebra de ácido nucleico que tiene una secuencia capaz de formar un dúplex con la primera hebra y un marcador detectable fluorescente unido covalentemente al extremo 5'; la generación de amplicones que contengan al menos una porción de dicha molécula de ácido nucleico diana; el mellado del dúplex y la extensión por la polimerasa, con lo que se desplaza la porción de la primera hebra de ácido nucleico 3' del sitio de mella unida covalentemente al marcador detectable fluorescente o a la fracción extintora; la detección de una señal del marcador detectable fluorescente separado del extintor, con lo que se detecta la actividad de la enzima de mellado y la polimerasa en la reacción; y la detección de una señal específica para la hibridación de la sonda oligonucleotídica con la molécula de ácido nucleico diana o un amplicón de la misma, en donde la señal indica la cantidad de la molécula de ácido nucleico diana o de un amplicón de la misma presente en la muestra.

En otro aspecto más, la invención proporciona un kit para detectar la actividad de una enzima de mellado y una polimerasa en una reacción, en donde el kit contiene un sustrato para una reacción de mellado y extensión que incluye un dúplex de ácido nucleico que tiene: una primera hebra de ácido nucleico con un sitio de reconocimiento para la enzima de mellado, un sitio de mella y un marcador detectable fluorescente unido covalentemente al extremo 3'; y una segunda hebra de ácido nucleico que tiene una secuencia capaz de formar un dúplex con la primera hebra y una fracción extintora en el extremo 5'; o un dúplex de ácido nucleico que tiene: una primera hebra de ácido nucleico con un sitio de reconocimiento para la enzima de mellado, un sitio de mella y una fracción extintora unida covalentemente al extremo 3'; y una segunda hebra de ácido nucleico que tiene una secuencia capaz de formar un dúplex con la primera hebra y un marcador detectable fluorescente unido covalentemente al extremo 5', en donde la primera hebra de ácido nucleico está modificada en uno o más nucleótidos entre el sitio de reconocimiento para la enzima de mellado y el sitio de mella; y/o en donde la primera hebra de ácido nucleico está modificada en una o más posiciones dentro del sitio de reconocimiento para la enzima de mellado.

El sustrato o dúplex puede tener entre 30 pb y 2 kb de longitud, entre 100 pb y 1 kb de longitud, entre 100 y 500 pb de longitud, entre 30 y 200 pb de longitud, entre 30 y 60 pb de longitud o entre 35 y 50 pb de longitud. Las hebras de ácido nucleico del sustrato o dúplex pueden tener entre 30 y 2000 nt de longitud, entre 100 y 1000 nt de longitud, entre 100 y 500 nt de longitud, entre 30 y 100 nt de longitud, entre 30 y 60 nt de longitud o entre 35 y 50 nt de longitud. La longitud de la hebra de ácido nucleico 3' del sitio de mella puede ser de 25 nt, 35 nt, 40 nt o más. La longitud de la hebra de ácido nucleico 5' del sitio de mella puede ser de 10 nt, 15 nt, 20 nt o más. La longitud de la hebra de ácido nucleico 5' del sitio de reconocimiento para la enzima de mellado puede ser de 10 nt, 5 nt, 3 nt o menos. La longitud

de la hebra de ácido nucleico 5' del sitio de reconocimiento para la enzima de mellado puede ser de 4, 3, 2 o 1 nt. La primera y la segunda hebra de ácido nucleico pueden estar unidas covalentemente.

El sustrato puede comprender un nucleótido modificado. El extremo 3' del segundo ácido nucleico puede estar modificado mediante un espaciador C3, un didesoxinucleótido, fosforilación, un colorante, un fluoróforo, un extintor, un espaciador o un conector. La primera hebra de ácido nucleico del sustrato o dúplex puede estar modificada en uno o más nucleótidos en la posición 1, 5' del sitio de mella (por ejemplo, mella -1), en la posición 2, 5' del sitio de corte (por ejemplo, mella -2) y en la posición 1, 3' del sitio de mella (por ejemplo, mella +1). La primera hebra de ácido nucleico del sustrato o dúplex puede estar modificada en uno o más nucleótidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5) entre el sitio de reconocimiento para el mellado y el sitio de mella. El sustrato puede estar modificado en una o más posiciones dentro del sitio de reconocimiento para la enzima de mellado. El nucleótido modificado puede ser un nucleótido modificado que comprende un 2'-O-metilo, 2'-metoxietoxi, 2'-flúor, 2'-hidroxilo (ARN), 2'-alilo, 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo], 4'-tio, 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'-puente, 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2'-puente y 2'-O-(N-metilcarbamato), una metilación, una biotilación, un aducto de un nucleótido o un análogo de una base.

El sustrato o dúplex puede tener un marcador detectable fluorescente que forma un par con una fracción extintora. El marcador detectable fluorescente es FAM, TET, HEX, TAMRA, JOE o ROX. La fracción extintora puede ser 5' Iowa Black® RQ (5labRQ), dabciilo, dabsilo o un colorante Black Hole Quencher. El sustrato o dúplex puede contener uno o más pares de marcador detectable fluorescente y fracción extintora unidos covalentemente (por ejemplo, biotilados) en hebras de ácido nucleico opuestas e internamente en el dúplex.

La reacción puede realizarse en condiciones sustancialmente isotérmicas. La reacción puede comprender además cebadores, sonda y/o moléculas de ácido nucleico diana. Las hebras de ácido nucleico del sustrato o dúplex pueden tener secuencias que no se unen a otras moléculas de ácido nucleico presentes en la reacción. El marcador detectable fluorescente del dúplex de ácido nucleico y el marcador detectable fluorescente de la sonda pueden ser diferentes (por ejemplo, FAM y CalRed). La detección de una señal del dúplex puede usarse como control positivo. Cuando la señal del dúplex alcanza una fluorescencia relativa establecida (UFR), esto puede indicar el punto final de la monitorización de la reacción de amplificación por mellado. El método puede implicar el uso de uno o más dúplex de ácido nucleico o sustratos que difieren en sus modificaciones.

La primera hebra de ácido nucleico del sustrato o dúplex puede mellarse mediante una enzima de mellado. La enzima de mellado puede ser Nt.BstNBI, N.Bst9I, N.BstSEI, Nb.BbvCI, Nb.Bpu10I, Nb.BsmI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, Nt.AlwI, Nt.BbvCI, Nt.Bpu10I, Nt.BsmAI, Nt.BspD6I, Nt.BspQI o Nt.CviPII. La primera hebra de ácido nucleico del sustrato o dúplex puede ponerse en contacto con una polimerasa. La polimerasa puede ser ADN polimerasa I Bst, ADN polimerasa Bsu, ADN polimerasa I Gst o ADN polimerasa I Gka. Los ejemplos de polimerasas incluyen, pero no se limitan a BST (fragmento mayor), ADN polimerasa I (*E. coli*), ADN polimerasa I, fragmento mayor (Klenow), fragmento de Klenow (3'-5' exo-), ADN polimerasa T4, ADN polimerasa T7, ADN polimerasa Deep VentR (exo-), ADN polimerasa Deep VentR, DyNAzyme, ADN polimerasa de alta fidelidad Terminator, ADN polimerasa Terminator II, ADN polimerasa AmpliTherm, ADN polimerasa Taq, ADN polimerasa Tth, ADN polimerasa Tfi, ADN polimerasa Tgo, ADN polimerasa SP6, ADN polimerasa Tbr, o fragmentos activos de las mismas.

## Definiciones

Por "amplicón" se entiende un polinucleótido generado durante la amplificación de un polinucleótido de interés. En un ejemplo, un amplicón se genera durante una reacción de amplificación por mellado.

Por "modificador de la tasa de amplificación" se entiende un agente capaz de afectar a la tasa de extensión por la polimerasa.

Por "sustitución de base" se entiende un sustituyente en un polímero de nucleobases que no causa una alteración significativa de la hibridación entre hebras nucleotídicas complementarias.

En esta descripción, "comprende", "que comprende", "que contiene" y "que tiene" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la ley de patentes de EE. UU. y puede significar "incluye", "que incluye" y similares; "que consiste esencialmente en" o "consiste esencialmente" tiene asimismo el significado atribuido en la ley de patentes de EE- UU., y el término es abierto y permite la presencia de más de lo que se menciona, siempre que las características básicas o novedosas de lo que se menciona no cambien por la presencia de más de lo que se menciona, pero excluye las realizaciones de la técnica anterior.

Por "complementario" o "complementariedad" se entiende que un ácido nucleico puede formar enlace(s) de hidrógeno con otra secuencia de ácido nucleico mediante apareamiento de bases tradicional de Watson-Crick o de Hoogsteen. El apareamiento de bases complementarias no solo incluye el apareamiento de bases G-C y A-T, sino que también incluye un apareamiento de bases con bases universales, tales como inosina. Un porcentaje de complementariedad indica el porcentaje de restos contiguos en una molécula de ácido nucleico que pueden formar enlaces de hidrógeno (por ejemplo, un apareamiento de bases de Watson-Crick) con una segunda secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de un total de 10 nucleótidos en el primer oligonucleótido en apareamiento de bases con una segunda secuencia de ácido nucleico que tiene 10 nucleótidos representa una complementariedad del 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y 100 %, respectivamente). Para determinar que un porcentaje de complementariedad es de

al menos un cierto valor, se calcula el porcentaje de restos contiguos en una molécula de ácido nucleico que pueden formar enlaces de hidrógeno (por ejemplo, un apareamiento de bases de Watson-Crick) con una segunda secuencia de ácido nucleico y se redondea al número entero más próximo (por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 nucleótidos de un total de 23 nucleótidos en el primer oligonucleótido en apareamiento de bases con una segunda secuencia de ácido nucleico que tiene 23 nucleótidos representan el 52 %, 57 %, 61 %, 65 %, 70 % y 74 %, respectivamente; y esto corresponde a una complementariedad de al menos el 50 %, 50 %, 60 %, 60 %, 70 % y 70 %, respectivamente). Como se usa en la presente memoria, "sustancialmente complementarias" se refiere a una complementariedad entre las hebras tal que son capaces de hibridar en condiciones biológicas. Las secuencias sustancialmente complementarias tienen una complementariedad del 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o incluso el 100 %. Adicionalmente, las técnicas para determinar si dos hebras son capaces de hibridar en condiciones biológicas examinando sus secuencias nucleotídicas son bien conocidas en la técnica.

Como se usa en la presente memoria, "dúplex" se refiere a una estructura de doble hélice formada por la interacción de dos ácidos nucleicos monocatenarios. Un dúplex se forma normalmente por enlaces de hidrógeno entre pares de bases, es decir, "apareamiento de bases", entre dos ácidos nucleicos monocatenarios que están orientados antiparalelos entre sí. El apareamiento de bases en un dúplex tiene lugar generalmente mediante apareamiento de bases de Watson-Crick, por ejemplo, guanina (G) forma un par de bases con citosina (C) en ADN y ARN, adenina (A) forma un par de bases con timina (T) en ADN y adenina (A) forma un par de bases con uracilo (U) en ARN. Las condiciones en las que pueden formarse pares de bases incluyen condiciones fisiológica o biológicamente relevantes (por ejemplo, intracelular: pH 7,2, ion potasio 140 mM; extracelular: pH 7,4, ion sodio 145 mM). Además, los dúplex se estabilizan mediante interacciones de apilamiento entre nucleótidos adyacentes. Como se usa en la presente memoria, un dúplex puede establecerse o mantenerse por apareamiento de bases o por interacciones de apilamiento. Un dúplex está formado por dos hebras de ácido nucleico complementarias, que pueden ser sustancialmente complementarias o totalmente complementarias. Se dice que los ácidos nucleicos monocatenarios con apareamiento de bases a lo largo de un número de bases "hibridan".

"Detectar" se refiere a identificar la presencia, ausencia o cantidad del analito que ha de detectarse.

Por "fracción detectable" se entiende una composición que cuando está unida a una molécula de interés hace que esta última sea detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen isótopos radiactivos, perlas magnéticas, perlas metálicas, partículas coloidales, colorantes fluorescentes, reactivos densos para electrones, enzimas (por ejemplo, como se usan comúnmente en un ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos.

Por "fragmento" se entiende una porción de una molécula de ácido nucleico. Esta porción contiene, preferiblemente, al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la longitud completa de la molécula de ácido nucleico o polipéptido de referencia. Un fragmento puede contener 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 nucleótidos.

Por "hibridar" se entiende formar una molécula bicatenaria entre secuencias polinucleotídicas complementarias (por ejemplo, un gen descrito en la presente memoria) o porciones de las mismas, en diversas condiciones de rigurosidad. (Véanse, por ejemplo, Wahl, G. M. y S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152: 399; Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152: 507). La hibridación se produce mediante enlaces de hidrógeno, que pueden ser enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, de Hoogsteen o de Hoogsteen invertidos, entre nucleobases complementarias. Por ejemplo, adenina y timina son nucleobases complementarias que se aparean a través de la formación de enlaces de hidrógeno.

Por "polinucleótido aislado" se entiende un ácido nucleico (por ejemplo, un ADN, ARN) exento de los genes que flanquean el gen en el genoma natural del organismo del que se deriva la molécula de ácido nucleico. Por tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que está incorporado en un vector; en un plásmido de replicación autónoma o un virus; o en el ADN genómico de un procarionta o eucariota; o que existe como una molécula individual (por ejemplo, un ADNc o un fragmento genómico o de ADNc producido mediante PCR o digestión con endonucleasas de restricción) independiente de otras secuencias. Además, el término incluye una molécula de ARN que se transcribe a partir de una molécula de ADN, así como un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica una secuencia polipeptídica adicional.

Los términos "aislado", "purificado" o "biológicamente puro" se refieren a un material exento, en grados variables, de los componentes que normalmente lo acompañan tal como se encuentra en su estado nativo. "Aislar" denota un grado de separación de la fuente original o del entorno. "Purificar" denota un grado de separación mayor que el aislamiento. Una proteína "purificada" o "biológicamente pura" está suficientemente exenta de otros materiales de manera que ninguna impureza afecta materialmente a las propiedades biológicas de la proteína ni causa otras consecuencias adversas. Es decir, un ácido nucleico o un péptido está purificado si está sustancialmente exento de material celular, material viral o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La pureza y la homogeneidad se determinan normalmente mediante técnicas de química analítica, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. El término "purificado" puede indicar que un ácido nucleico o una proteína da lugar esencialmente a una banda en un gel electroforético. Para una proteína que puede estar sometida a modificaciones, por ejemplo, fosforilación o glicosilación, diferentes modificaciones pueden dar lugar a diferentes

proteínas aisladas, que pueden purificarse por separado.

5 Por "temperatura de fusión (T<sub>m</sub>)" se entiende la temperatura de un sistema en equilibrio, en donde el 50 % de la población molecular está en un estado y el 50 % de la población está en otro estado. Con respecto a los ácidos nucleicos, la T<sub>m</sub> es la temperatura a la que el 50 % de la población es monocatenaria y el 50 % es bicatenaria (por ejemplo, intramolecular o intermolecularmente).

Por "monitorizar una reacción" se entiende detectar el progreso de una reacción. Monitorizar la progresión de la reacción puede implicar detectar la actividad de mellado, de extensión por la polimerasa y/o detectar la finalización de una reacción de amplificación.

10 Como se usa en la presente memoria, "obtener", como en "obtener un agente", incluye sintetizar, comprar o adquirir de otro modo el agente.

15 Como se usa en la presente memoria, el término "ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o nucleótidos modificados, y a polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o restos estructurales o enlaces modificados, que son sintéticos, de origen natural y de origen no natural, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, nucleótidos modificados en 2' (por ejemplo, 2'-O-metilribonucleótidos, 2'-F-nucleótidos).

20 Como se usa en la presente memoria, "nucleótido modificado" se refiere a un nucleótido que tiene una o más modificaciones en el nucleósido, la nucleobase, el anillo de pentosa o el grupo fosfato. Por ejemplo, los nucleótidos modificados excluyen ribonucleótidos que contienen monofosfato de adenosina, monofosfato de guanosina, monofosfato de uridina y monofosfato de citidina y desoxirribonucleótidos que contienen monofosfato de desoxiadenosina, monofosfato de desoxiguanosina, monofosfato de desoxitimidina y monofosfato de desoxicitidina. Las modificaciones incluyen aquellas que se producen de manera natural y que resultan de la modificación por enzimas que modifican nucleótidos, tales como metiltransferasas. Los nucleótidos modificados también incluyen nucleótidos sintéticos o de origen no natural. Las modificaciones sintéticas o no naturales en nucleótidos incluyen modificaciones en 2', por ejemplo, 2'-O-metilo, 2'-metoxietoxi, 2'-flúor, 2'-hidroxilo (ARN), 2'-alilo, 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo], 4'-tio, 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'-puente, 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2'-puente y 2'-O-(N-metilcarbamato) o aquellas que comprenden análogos de bases.

Por "aducto de un nucleótido" se entiende una fracción que está unida covalentemente o fijada de otro modo a una base nucleotídica convencional.

30 Por "agente de mellado" se entiende una entidad química capaz de reconocer y unirse a una estructura específica en una molécula de ácido nucleico bicatenaria y romper un enlace fosfodiéster entre nucleótidos contiguos en una sola hebra tras la unión a la estructura específica reconocida, con lo que se crea un grupo hidroxilo 3' libre en el nucleótido terminal que precede al sitio de mella. Preferiblemente, el extremo 3' puede extenderse mediante una polimerasa deficiente en exonucleasa. Los ejemplos de agentes de mellado incluyen enzimas de mellado, ARNzimas, ADNzimas y quelantes de metales de transición.

Por "palindrómicas" se entienden secuencias de ácido nucleico que son idénticas o sustancialmente idénticas cuando se leen de 5' a 3' en una hebra o de 5' a 3' en la hebra complementaria. Un palíndromo perfecto se refiere a una secuencia que tiene dos subsecuencias adyacentes, de manera que cuando una subsecuencia se lee en la dirección de 5' a 3', es idéntica a la otra subsecuencia leída en la dirección de 3' a 5'.

40 Por "molécula de detención de la polimerasa" se entiende una fracción asociada con un molde/cebador polinucleotídico que impide o reduce significativamente la progresión de una polimerasa sobre el molde polinucleotídico. Preferiblemente, la fracción está incorporada en el polinucleótido. Preferiblemente, la fracción impide que la polimerasa progrese sobre el molde.

45 Por "extensión por polimerasa" se entiende la progresión hacia delante de una polimerasa que empareja monómeros entrantes con sus parejas de unión en un polinucleótido molde.

Como se usa en la presente memoria, "dímero de cebador" se refiere a un dímero de dos cebadores oligonucleotídicos monoméricos. En los cebadores oligonucleotídicos, se dimerizan las regiones de la cola 5' de los cebadores monoméricos.

Por "semicuantitativo" se entiende proporcionar una estimación de la cantidad relativa a partir de un control interno.

50 Por "producto específico" se entiende un producto polinucleotídico resultante de la hibridación de oligonucleótidos cebadores con una secuencia diana complementaria y la posterior extensión de la secuencia diana mediada por una polimerasa.

Por "condición sustancialmente isotérmica" se entiende una sola temperatura o dentro de un intervalo estrecho de temperaturas que no varían significativamente. Una reacción llevada a cabo en condiciones sustancialmente

isotérmicas puede llevarse a cabo a una temperatura que varía en solo aproximadamente 1-5 °C (por ejemplo, varía en 1, 2, 3, 4 o 5 grados). La reacción puede llevarse a cabo a una sola temperatura dentro de los parámetros de funcionamiento del instrumento utilizado.

5 Por "método de umbral de cantidad" se entiende proporcionar una estimación de la cantidad a partir de la superación o la no superación en cantidad de un estándar comparativo.

Por "referencia" se entiende una condición estándar o de control. Como es evidente para un experto en la técnica, una referencia apropiada es aquella donde se cambia un elemento para determinar el efecto de dicho elemento.

Por "sujeto" se entiende un mamífero, lo que incluye, pero no se limita a un mamífero humano o no humano, tal como un bovino, equino, canino, ovino o felino.

10 Por "molécula de ácido nucleico diana" se entiende un polinucleótido que ha de analizarse. Dicho polinucleótido puede ser una hebra sentido o antisentido de la secuencia diana. El término "molécula de ácido nucleico diana" también se refiere a amplicones de la secuencia diana original.

15 Se entiende que los intervalos proporcionados en la presente memoria son abreviaciones de todos los valores dentro del intervalo. Por ejemplo, se entiende que un intervalo de 1 a 50 incluye cualquier número, combinación de números o subintervalo del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50.

A menos que se indique específicamente o sea obvio a partir del contexto, como se usa en la presente memoria, se entiende que el término "o" es inclusivo. A menos que se indique específicamente o sea obvio a partir del contexto, como se usa en la presente memoria, se entiende que los términos "un", "una" y "el/la" son singulares o plurales.

20 A menos que se indique específicamente o sea obvio a partir del contexto, como se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" se entiende dentro de un intervalo de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo, dentro de 2 desviaciones estándar de la media. Aproximadamente puede entenderse como dentro del 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 % o 0,01 % del valor establecido. A menos que esté claro de otro modo a partir del contexto, todos los valores numéricos proporcionados en la presente memoria están modificados por  
25 el término aproximadamente.

La mención de un listado de grupos químicos en cualquier definición de una variable en la presente memoria incluye definiciones de esa variable como cualquier grupo individual o combinación de los grupos listados. La mención de una realización de una variable o aspecto en la presente memoria incluye esa realización como cualquier realización individual o en combinación con cualquier otra realización o porciones de la misma.

30 Cualquier composición o método proporcionado en la presente memoria puede combinarse con una o más de cualquiera de las otras composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria.

### Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1F representan la estructura y el mecanismo de un sustrato de una reacción de mellado y extensión. La figura 1A representa la estructura de la molécula sustrato de la reacción de mellado y extensión de la invención. La  
35 figura 1B representa un dúplex oligonucleotídico con un sitio de mella en una hebra que está 5' con respecto a una molécula indicadora detectable unida al extremo 3' de la hebra (por ejemplo, unida covalentemente). En el ejemplo mostrado, el indicador detectable es un fluoróforo que está próximo a un extintor situado en el extremo 5' de la hebra opuesta. Cuando las dos hebras hibridan, el fluoróforo en 3' (por ejemplo, FAM, HEX) y el extintor (por ejemplo, 5labRQ, BHQ-1) quedan uno cerca del otro y la señal fluorescente se extingue. La figura 1C muestra que la molécula sustrato de la invención tiene un sitio de reconocimiento para una enzima de mellado y se mella en presencia de una  
40 enzima de mellado que se une al sitio. La figura 1D muestra que la molécula sustrato mellada de la invención tiene un extremo 3' libre en la mella, que puede ponerse en contacto con una polimerasa. La figura 1E muestra la extensión por la polimerasa usando la hebra complementaria como molde. La extensión por la polimerasa desplaza la porción de la hebra 3' del sitio de mella que está unida al indicador detectable. El indicador detectable emite fluorescencia  
45 cuando se separa del extintor. La figura 1F muestra que el producto de la reacción de extensión puede ser mellado de nuevo. Sin embargo, la molécula puede diseñarse para impedir o minimizar ciclos adicionales de mellado y extensión.

Las figuras 2A y 2B muestran que el mellado y la extensión de la molécula sustrato de la invención da como resultado un aumento lineal de la señal. La figura 2A es un esquema que muestra un aumento lineal en la señal de la molécula sustrato de la invención en presencia de una enzima de mellado y una polimerasa a medida que progresa la reacción.  
50 Se espera un aumento lineal cuando la molécula sustrato y/o sus hebras no interactúan con ningún otro componente de la reacción. Por ejemplo, el extremo 3' de cualquier hebra puede estar bloqueado por un fluoróforo o un espaciador C3. La figura 2B es un esquema que muestra el uso de la molécula sustrato de la invención como molécula de control exógeno en una reacción de amplificación por mellado. La molécula sustrato puede usarse como control para mostrar que una enzima de mellado y una polimerasa tienen actividad en una reacción de amplificación por mellado. Los  
55 puntos finales de reacción para una reacción de amplificación por mellado pueden establecerse como el tiempo en el que la molécula de control exógeno alcanza un valor UFR (unidades de fluorescencia relativa) establecido. Por

ejemplo, esto puede usarse para caracterizar una señal de amplificación como positiva o negativa en función de su tiempo de detección.

Las figuras 3A y 3B representan un sustrato oligonucleótido largo o "longmer" de la invención, que en un ejemplo puede usarse para estudiar la procesividad de la polimerasa. La figura 3A representa la estructura de la molécula sustrato de mellado y "longmer" de la invención. La figura 3B representa modificaciones y factores que pueden usarse para estudiar su efecto sobre la procesividad de la polimerasa.

La figura 4 proporciona secuencias usadas para analizar el efecto de nucleótidos modificados sobre las propiedades de la molécula sustrato de la invención. La hebra oligonucleotídica inferior para control exógeno (ExogContBOT) tiene un extintor 5labRQ en 5' (5' Iowa Black RQ) y se apareó con cada una de las hebras oligonucleotídicas con un fluoróforo 36-FAM en 3': vainilla (sin nucleótidos modificados), mella -2 (2'OMe en la posición 2, 5' del sitio de mella), mella +1 (2'OMe en la posición 1, 3' del sitio de mella) y mella -1 (2'OMe en la posición 1, 5' del sitio de mella).

Las figuras 5A-5E representan la actividad de las moléculas sustrato que tienen las hebras oligonucleotídicas descritas en la figura 4 en presencia de una enzima de mellado, en concentración variable, y una polimerasa. Los resultados muestran que la reacción de la molécula sustrato puede ajustarse mediante nucleótidos modificados, la concentración de la molécula sustrato en relación con la cantidad de enzima de mellado (mellasa) y/o las mezclas de moléculas sustrato modificadas de manera diferente. La figura 5A es un gráfico que representa la actividad de las moléculas sustrato que tienen las hebras oligonucleotídicas descritas en la figura 4 en presencia de 0,3 U/μl de enzima de mellado. La figura 5B es un gráfico que representa la actividad de las moléculas sustrato que tienen las hebras oligonucleotídicas descritas en la figura 4 en presencia de 0,015 U/μl de enzima de mellado. La figura 5C es un gráfico que representa la actividad de las moléculas sustrato que tienen las hebras oligonucleotídicas descritas en la figura 4 en presencia de 0,075 U/μl de enzima de mellado. La figura 5D es un gráfico que representa la actividad de las moléculas sustrato que tienen las hebras oligonucleotídicas descritas en la figura 4 en presencia de 0,00375 U/μl de enzima de mellado. La figura 5E es un gráfico que representa la actividad de las moléculas sustrato que tienen las hebras oligonucleotídicas descritas en la figura 4 en presencia de 0,0188 U/μl de enzima de mellado.

Las figuras 6A-6D representan los gráficos mostrados en las figuras 4A-4E organizados por las hebras oligonucleotídicas no modificadas y modificadas que tienen un fluoróforo 36-FAM en 3'. La figura 6A representa las curvas de reacción para una molécula sustrato que comprende la hebra oligonucleotídica ExogContBOT que tiene un extintor 5labRQ en 5' y la hebra oligonucleotídica vainilla que tiene un fluoróforo 36-FAM en 3' y no tiene nucleótidos modificados. La figura 6B representa las curvas de reacción para una molécula sustrato que comprende la hebra oligonucleotídica ExogContBOT que tiene un extintor 5labRQ en 5' y la hebra oligonucleotídica mella -2 que tiene un fluoróforo 36-FAM en 3' y 2'OMe en la posición 2, 5' del sitio de mella. La figura 6C representa las curvas de reacción para una molécula sustrato que comprende la hebra oligonucleotídica ExogContBOT que tiene un extintor 5labRQ en 5' y la hebra oligonucleotídica mella -1 que tiene un fluoróforo 36-FAM en 3' y 2'OMe en la posición 1, 5' del sitio de mella. La figura 6D representa las curvas de reacción para una molécula sustrato que comprende la hebra oligonucleotídica ExogContBOT que tiene un extintor 5labRQ en 5' y la hebra oligonucleotídica mella +1 que tiene un fluoróforo 36-FAM en 3' y 2'OMe en la posición 1, 3' del sitio de mella.

La figura 7 representa los resultados de un estudio para determinar el efecto de la longitud del oligonucleótido 5' del sitio de reconocimiento para el mellado en la molécula sustrato. Se muestra un gráfico de las curvas de reacción para las moléculas de sustrato con los pares oligonucleotídicos especificados. Las secuencias de las hebras oligonucleotídicas de las moléculas sustrato se muestran debajo del gráfico.

La figura 8 representa los resultados de un estudio para determinar el efecto del uso de diferentes proporciones de moléculas de sustrato que comprenden nucleótidos no modificados y modificados. Se muestra un gráfico de las curvas de reacción para reacciones con las proporciones especificadas de moléculas de sustrato. Las secuencias de las hebras oligonucleotídicas de las moléculas sustrato modificadas con 2'OMe y no modificadas se muestran debajo del gráfico. Esto demuestra que la reacción puede ajustarse para alcanzar un umbral deseado en un tiempo predeterminado usando diferentes proporciones de diferentes moléculas de sustrato.

Las figuras 9A y 9B representan los resultados de un estudio para determinar el efecto de situar nucleótidos modificados en diversas posiciones dentro de la molécula sustrato. La figura 9A es un gráfico de las curvas de reacción para reacciones que usan las moléculas sustrato con las secuencias mostradas debajo del gráfico (A-F). La figura 9B es un gráfico de las curvas de reacción para reacciones que usan las moléculas sustrato con las secuencias mostradas debajo del gráfico (A-F).

La figura 10 representa los resultados de un estudio que muestra que la molécula sustrato puede usarse para probar una enzima de mellado y/o una polimerasa.

La figura 11 representa secuencias finalizadas de una molécula de control exógeno/interno para uso con un ensayo para *Salmonella* basado en una reacción de amplificación por mellado.

### Descripción detallada de la invención

La invención presenta una molécula sustrato de ácido nucleico para reacciones de mellado y extensión con un

floróforo extinguido que se libera y puede emitir fluorescencia por la actividad de una enzima de mellado y una polimerasa sobre el sustrato. La molécula sustrato de la invención puede añadirse a reacciones de amplificación por mellado existentes y, de este modo, usarse como molécula de control exógeno en una reacción de amplificación por mellado. A este respecto, la molécula de control exógeno proporciona un control para ambas actividades enzimáticas, de la enzima de mellado y de la polimerasa, presentes en una reacción de amplificación por mellado. Aunque se desarrolla en paralelo, la reacción de control exógeno no interfiere apreciablemente con la reacción de amplificación primaria. Por ejemplo, el control exógeno no consume grandes cantidades de los componentes de reacción, tales como dNTP. El control exógeno puede diseñarse para minimizar la formación de extremos 3', que pueden conducir a una extensión no específica por la polimerasa y a interferencias de fondo. Como se muestra en la presente memoria, la molécula de control exógeno también puede "ajustarse" para su activación en un momento específico. Por sí sola, la molécula sustrato de la invención puede usarse en una prueba de rendimiento enzimático o para comprobar la calidad de una enzima.

Molécula sustrato para mellado y extensión

La invención proporciona una molécula sustrato para mellado y extensión que puede usarse para comprobar o confirmar las actividades de una enzima de mellado y una polimerasa en una reacción. Con referencia a las figuras 1A-1E, la molécula sustrato comprende un dúplex oligonucleotídico marcado en un extremo con un indicador detectable (por ejemplo, pares fluoróforo-extintor; par donador-aceptor para transferencia de energía de fluorescencia (FRET)). Las dos hebras oligonucleotídicas pueden estar unidas covalentemente. El dúplex oligonucleotídico contiene un sitio de reconocimiento para la enzima de mellado, de manera que cuando la molécula se mella, el extremo 3' expuesto por la mella puede dirigir la extensión por la polimerasa que da como resultado la activación del indicador detectable. El indicador detectable puede ser un indicador fluorescente (por ejemplo, FAM) que forma un par con una molécula extintora (por ejemplo, cualquier par interactivo de fluoróforo e extintor o par donador-aceptor FRET conocido en la técnica). El indicador fluorescente se activa por la actividad de desplazamiento de la hebra por la polimerasa y la separación del fluoróforo del extintor. El indicador fluorescente está unido covalentemente a uno de los extremos 3' o 5' del dúplex oligonucleotídico y el extintor está unido covalentemente al extremo 5' o 3', respectivamente, de la hebra opuesta. El fluoróforo puede ser uno o más de FAM, TET, HEX, TAMRA, JOE o ROX. El extintor puede ser uno o más de dabciilo, dabsiilo, un colorante Black Hole Quencher, que incluye 5' Iowa Black® RQ (5labRQ). En general, el colorante extintor es un colorante extintor para excitación. Los pares fluoróforo-extintor y su selección se describen, por ejemplo, en Marras, *Selection of Fluorophore and Quencher Pairs for Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes*, en *Methods in Molecular Biology: Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes: Designs and Protocols*, editado por: V.V. Didenko © Humana Press Inc., Totowa, NJ, EE. UU. Cuando el sustrato para mellado y extensión se usa como control exógeno, el marcador fluorescente detectable se selecciona para proporcionar una señal fluorescente detectable diferente de la usada en la sonda para detectar la amplificación del ácido nucleico diana (por ejemplo, FAM y CalRed). Preferiblemente, el extremo 3' libre (es decir, sin indicador fluorescente ni extintor) se bloquea para evitar su uso en reacciones de extensión por la polimerasa. El 3' libre puede bloquearse mediante un espaciador de 3 carbonos (espaciador C3) o un didesoxinucleótido. Es posible añadir varias modificaciones al extremo 3' libre durante la síntesis que impidan la extensión, por ejemplo, fosforilación, un colorante, fluoróforo, extintor, espaciador o conector.

El sustrato para mellado y extensión puede contener el sitio de reconocimiento para una enzima de mellado de cualquier enzima de mellado. El sitio de reconocimiento para la enzima de mellado se sitúa de manera que la extensión desde el extremo 3' expuesto por la mella de lugar a la extensión por la polimerasa y la activación del indicador detectable. Cuando se usa como molécula de control exógeno, el sitio de reconocimiento para la enzima de mellado será el de la enzima de mellado usada en la reacción de amplificación por mellado. Los ejemplos de enzimas de mellado incluyen, pero no se limitan a N.Bst9I, N.BstSEI, Nb.BbvCI (NEB), Nb.Bpu10I (Fermentas), Nb.BsmI (NEB), Nb.BsrDI (NEB), Nb.BtsI (NEB), Nt.AlwI (NEB), Nt.BbvCI (NEB), Nt.Bpu10I (Fermentas), Nt.BsmAI, Nt.BspD6I, Nt.BspQI (NEB), Nt.BstNBI (NEB), y Nt.CviPII (NEB). Las secuencias de sitios de reconocimiento para enzimas de mellado se proporcionan en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de reconocimiento para enzimas de mellado

N.Bst9I	5' -GAGTCNNNNN↓NN-3'                         3' -CTCAGNNNNN•NN-5'
N.BstSEI	5' -GAGTCNNNNN↓NN-3'                         3' -CTCAGNNNNN•NN-5'
Nb.BbvCI (NEB)	5' -CCTCA•GC-3'                 3' -GGAGT↑CG-5'

Nb.Bpu10I (Fermentas)	5' - CCTNA • GC - 3'             3' - GGANT ↑ CG - 5'
Nb.BsmI (NEB)	5' - GAATG • CN - 3'             3' - CTTAC ↑ GN - 5'
Nb.BsrDI (NEB)	5' - GCAATG • NN - 3'             3' - CGTTAC ↑ NN - 5'
Nb.BtsI (NEB)	5' - GCAGTG • NN - 3'             3' - CGTCAC ↑ NN - 5'
Nt.AlwI (NEB)	5' - GGATC N N N N ↓ N - 3'                   3' - CCTAG N N N N • N - 5'
Nt.BbvCI (NEB)	5' - CC ↓ TCAGC - 3'             3' - GG • AGTCG - 5'
Nt.Bpu10I (Fermentas)	5' - CC ↓ TNAGC - 3'             3' - GG • ANTCG - 5'
Nt.BsmAI	5' - GTCTCN ↓ N - 3'             3' - CAGAGN • N - 5'
Nt.BspD6I	5' - GAGTC N N N N ↓ N - 3'                   3' - CTCAG N N N N • N - 5'
Nt.BspQI (NEB)	5' - GCTCTTCN ↓ - 3'               3' - CGAGAAGN - 5'
Nt.BstNBI (NEB)	5' - GAGTC N N N N ↓ N - 3'                   3' - CTCAG N N N N • N - 5'
Nt.CviPII (NEB)	5' - ↓ CCD - 3'       3' - GGH - 5'

El sitio de reconocimiento para la enzima de mellado puede ser Nt.BstNBI para usar con la enzima de mellado Nt.BstNBI que se usa comúnmente en reacciones de amplificación por mellado.

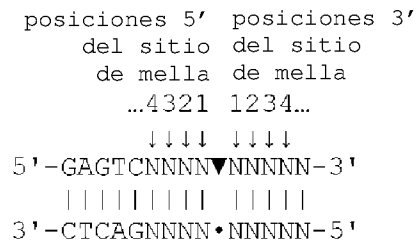
- 5 La longitud y secuencia nucleotídica de la molécula sustrato para mellado y extensión puede depender de diversos factores, incluido su uso previsto. La longitud de la molécula sustrato está limitada únicamente por la longitud de los polinucleótidos que pueden sintetizarse mediante las tecnologías actuales. Sin embargo, para algunas aplicaciones como el uso como control de reacción exógeno, la longitud del sustrato puede minimizarse para hacer disponibles dNTP libres u otros componentes de reacción para la amplificación del ácido nucleico. En otras aplicaciones como el uso en el estudio de la procesividad de la polimerasa, puede usarse un sustrato de mayor longitud.
- 10 La longitud del dúplex nucleotídico puede ser de entre 30 pb y 2 kb de longitud, entre 100 pb y 1 kb de longitud, entre 100 y 500 pb de longitud. La longitud de los polinucleótidos del dúplex puede ser de entre 30 y 2000 nt de longitud, entre 100 y 1000 nt de longitud, entre 100 y 500 nt de longitud. La longitud del dúplex oligonucleotídico puede ser de entre 30 y 100 pb de longitud, entre 30 y 60 pb de longitud, entre 35 y 50 pb de longitud. La longitud de los oligonucleótidos del dúplex puede ser de entre 30 y 100 nt de longitud, entre 30 y 60 nt de longitud, entre 35 y 50 nt de longitud. Asimismo,
- 15 las secuencias de la molécula sustrato se seleccionan para minimizar la interferencia con las secuencias de otras

moléculas de ácido nucleico que pueda haber en la reacción, incluidas secuencias de ácido nucleico diana, secuencias de cebadores, secuencias de sondas y/o secuencias inespecíficas de fondo (por ejemplo, secuencias genómicas en una muestra biológica).

5 La situación del sitio de reconocimiento para la enzima de mellado y/o el sitio para la enzima de mellado en la molécula sustrato depende de diversos factores, incluida la propia enzima de mellado. Por ejemplo, cuando se usa la enzima de mellado Nt.BstNBI, que genera una mella en dirección 3' con respecto a su sitio de reconocimiento enzimático, la porción de la hebra oligonucleotídica 3' de la mella tiene una temperatura de fusión del dúplex superior a la temperatura de reacción más alta. La longitud de la porción de la hebra oligonucleotídica 3' de la mella es de 25 nt, 35 nt, 40 nt o más. Por tanto, la generación de la señal se acopla al desplazamiento de la hebra por la polimerasa.

10 La longitud de la porción de la hebra oligonucleotídica 5' de la mella es de 10 nt, 15 nt, 20 nt o más. Cuando la longitud de la porción de la hebra oligonucleotídica 5' de la mella tiene una temperatura de fusión del dúplex inferior a la temperatura de reacción, se minimiza la extensión por la polimerasa a partir del extremo 3' libre. Por ejemplo, la secuencia de la región 5' del sitio de mella puede diseñarse para que sea inestable a la temperatura de reacción de manera que se disocie y así se impida la extensión desde el extremo 3' libre. Alternativamente, tales oligonucleótidos cortos o "shortmer" pueden diseñarse para unirse a sí mismos y "cancelar" una reacción. También se ha encontrado que la molécula sustrato tiene actividad cuando hay uno o más nucleótidos presentes 5' con respecto al sitio de reconocimiento para la enzima Nt.BstNBI. Puede haber de uno a 10 nucleótidos o de dos a 5 nucleótidos presentes 5' con respecto al sitio de reconocimiento para la enzima Nt.BstNBI. El acortamiento de la hebra oligonucleotídica 5' del sitio de reconocimiento para la enzima de mellado modifica la tasa de reacción y proporciona capacidad para el ajuste de la reacción.

25 La situación de nucleótidos modificados con 2'OMe en la molécula de sustrato entre el sitio de reconocimiento para la enzima de mellado y el sitio de mella puede alterar la tasa de reacción de la reacción del sustrato. La primera hebra de ácido nucleico puede estar modificada en uno o más nucleótidos en las posiciones 1 o 2, 5' del sitio de mella, y en la posición 1, 3' del sitio de mella. Con referencia a un dúplex que comprende un sitio de reconocimiento y mella para Nt.BstNBI, la descripción de las posiciones corresponde a la numeración (posición 1, 2, 3, 4, etc.) y la direccionalidad (5' o 3') que se muestran a continuación:



30 La situación de nucleótidos modificados con 2'OMe en la molécula sustrato puede usarse para "ajustar" la reacción (es decir, la tasa de reacción). Uno o más de los nucleótidos entre el sitio de reconocimiento para la enzima de mellado y el sitio de mella para Nt.BstNBI puede ser un nucleótido modificado con 2'OMe. El uno o más nucleótidos modificados con 2'OMe pueden situarse en una o más de las posiciones 1 y 2, 5' del sitio de mella y/o en la posición 1, 3' del sitio de mella.

35 La capacidad de ajuste de la reacción también puede lograrse mediante nucleótidos modificados, nucleótidos ramificados (es decir, T-fam) o cualquier nucleótido que afecte a la cinética de la reacción, incluida la situación de nucleótidos modificados en la hebra de la secuencia de mellado; o la situación de nucleótidos modificados opuestos a la hebra de la secuencia de mellado. La capacidad de ajuste de la reacción también puede lograrse mezclando una o más moléculas sustrato no modificadas o modificadas (por ejemplo, ajuste con relaciones de oligonucleótidos superior/inferior) y/o mediante la molaridad de la enzima de mellado con respecto a la concentración de la molécula sustrato.

Métodos de utilización de la molécula sustrato

45 La molécula sustrato para una enzima de mellado puede usarse para determinar la actividad de una enzima de mellado y una polimerasa en una reacción. Por sí misma, la molécula sustrato puede usarse para evaluar combinaciones de enzimas de mellado y polimerasas, usarse para identificar condiciones de trabajo óptimas de enzimas de mellado y polimerasas o comprobar la calidad de enzimas de mellado y polimerasas. Las polimerasas para uso en los métodos descritos en la presente memoria son capaces de catalizar la incorporación de nucleótidos para extender un extremo hidroxilo 3' de un oligonucleótido (por ejemplo, un cebador) unido a una molécula de ácido nucleico diana y/o un extremo hidroxilo 3' en un sitio de mella en una molécula de ADN bicatenario, en combinación con una actividad de desplazamiento de hebra. Los ejemplos de polimerasas incluyen, pero no se limitan a derivados y variantes de la ADN polimerasa I aislada de *Bacillus stearothermophilus*, también clasificado como *Geobacillus stearothermophilus*, y de cepas bacterianas, aislamientos y especies estrechamente relacionados que comprenden el género *Geobacillus*, que carecen o tienen actividad exonucleasa 5'-3' sustancialmente reducida y tienen actividad de desplazamiento de hebra,

y los fragmentos mayores de la ADN polimerasa I Bst, ADN polimerasa Bsu, ADN polimerasa I Gst y ADN polimerasa I Gka y la ADN polimerasa phi29. Dichas polimerasas también carecen o tienen actividad exonucleasa 5'-3' sustancialmente reducida y pueden incluir aquellas que son termófilas (por ejemplo, Taq, Vent). A este respecto, también se proporciona un medio para cuantificar la actividad unitaria de combinaciones de enzimas de mellado y polimerasas. Adicionalmente, la molécula sustrato puede usarse para estudiar la procesividad de una polimerasa en diversas condiciones, que incluyen, por ejemplo, la metilación de ADN o la presencia de productos que causan aductos/daños en el ADN (por ejemplo, acetaldehído, cisplatino, 7,12-dimetilbenzantraceno, malondialdehído, productos de reparación por escisión de bases, productos de daño oxidativo, benzopireno, aflatoxina, u otros compuestos reactivos con ADN) y/o proteínas de unión a ADN (figuras 3A y 3B). Adicionalmente, para estudiar la procesividad, puede haber un o más pares fluoróforo-extintor, incluidos múltiples fluoróforos diferentes, unidos covalentemente (por ejemplo, biotinilados) e internamente en el dúplex (figura 3A). Por ejemplo, pueden usarse 1-5 fluoróforos, uno por canal, biotinilados o unidos mediante marcaje directo (por ejemplo, ésteres de succinimidilo). Estos pueden formar un par con uno o más extintores solapantes en la hebra opuesta. En algunos casos, un extintor solapante cubre un área amplia del espectro y puede emparejarse con múltiples fluoróforos diferentes. De este modo, la molécula sustrato puede modificarse y puede examinarse el efecto de las modificaciones sobre la extensión y/o procesividad de la polimerasa.

La molécula sustrato también puede añadirse a reacciones de amplificación por mellado existentes, y por tanto usarse como molécula de control exógeno en una reacción de amplificación por mellado, por ejemplo, para verificar una reacción negativa verdadera. Por consiguiente, la molécula de control exógeno se usa a las mismas temperaturas de reacción que para la reacción de amplificación por mellado. La mera presencia o ausencia de señal puede usarse como control de la reacción. Adicionalmente, el tiempo en que la reacción de control exógeno alcanza un valor UFR establecido puede señalar el punto final de una reacción. La molécula de control exógeno también puede "ajustarse" a una tasa de reacción específica, con lo que se altera el tiempo para alcanzar un valor UFR establecido. Cuando la reacción de control exógeno se realiza en la misma reacción que una reacción de amplificación por mellado, no interfiere apreciablemente con la reacción de amplificación primaria. El control exógeno no consume cantidades apreciables de los componentes de reacción, tales como dNTP u otros reactivos. Además, el control exógeno puede diseñarse para minimizar la formación de extremos 3', que pueden conducir a una extensión no específica por la polimerasa y a interferencias de fondo.

#### Métodos de amplificación de ácidos nucleicos

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una tecnología común de amplificación de ácidos nucleicos dependiente de ciclos térmicos utilizada para amplificar el ADN, que consiste en ciclos de calentamiento y enfriamiento repetido de la reacción para la fusión del ADN y su replicación enzimática mediante una ADN polimerasa. La PCR cuantitativa en tiempo real (PCRq) es una técnica usada para cuantificar el número de copias de una secuencia de ácido nucleico dada en una muestra biológica. Actualmente, la PCRq utiliza la detección de productos de reacción en tiempo real a lo largo de la reacción y compara el perfil de amplificación con la amplificación de controles que contienen una cantidad de ácidos nucleicos conocida al comienzo de cada reacción (o una proporción relativa de ácidos nucleicos conocida en relación con el ácido nucleico de prueba desconocido). Los resultados de los controles se usan para construir curvas estándar, basadas normalmente en la porción logarítmica de las curvas de amplificación de reacción estándar. Estos valores se usan para interpolar la cantidad de las incógnitas a partir de la comparación de sus curvas de amplificación con las cantidades de control estándar.

Además de PCR, existen sistemas de amplificación dependientes de ciclos no térmicos o tecnologías de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que incluyen, sin limitación: reacción de amplificación por mellado, amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación dependiente de helicasa (HDA), amplificación mediada por bucle (LAMP), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA), replicación de secuencias autosostenida (3 SR), amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación isotérmica de cebador único (SPIA), sistema de la replicasa Q-β y amplificación por recombinasa y polimerasa (RPA).

Las reacciones isotérmicas de amplificación por mellado tienen similitudes con el termociclado de la PCR. Al igual que la PCR, las reacciones de amplificación por mellado emplean secuencias oligonucleotídicas complementarias a secuencias diana denominadas cebadores. Además, las reacciones de amplificación de secuencias diana por mellado dan lugar a un aumento logarítmico de la secuencia diana, al igual que en la PCR estándar. A diferencia de la PCR estándar, las reacciones de amplificación por mellado progresan isotérmicamente. En la PCR estándar, la temperatura se aumenta para permitir la separación de las dos hebras de ADN. En las reacciones de amplificación por mellado, la secuencia de ácido nucleico diana se mella en sitios de mellado específicos presentes en una muestra de prueba. La polimerasa penetra en el sitio de mella y comienza la síntesis de la hebra complementaria a la secuencia nucleotídica diana mellada (el ADN exógeno añadido) junto con el desplazamiento de la hebra de ADN complementaria existente. El proceso de replicación por desplazamiento de la hebra evita la necesidad de aumento de la temperatura. En este punto, las moléculas de cebador hibridan con la secuencia complementaria desplazada del ADN exógeno añadido. La polimerasa se extiende ahora desde el extremo 3' del molde para crear una hebra complementaria a la hebra desplazada previamente. El segundo cebador oligonucleotídico hibrida entonces con la hebra complementaria recién sintetizada y se extiende para formar un dúplex de ADN que incluye la secuencia de reconocimiento para la enzima de mellado. Esta hebra puede mellarse entonces con la subsiguiente extensión del desplazamiento de hebra por la polimerasa, lo que conduce a la producción de un dúplex de ADN que tiene sitios de mella a cada lado del ADN diana

original. Una vez sintetizada, la molécula continúa amplificándose exponencialmente a través de la replicación de las hebras desplazadas con nuevas moléculas molde. Además, la amplificación también procede linealmente a partir de cada molécula de producto a través de la acción repetida de la síntesis por desplazamiento de mella en los sitios de mella introducidos en el molde. El resultado es un aumento muy rápido en la amplificación de la señal diana; mucho más rápido que en el termociclado por PCR, con resultados de amplificación en menos de diez minutos.

#### Ensayos de amplificación por mellado

También se proporciona aquí una molécula sustrato para uso en la detección de moléculas de ácido nucleico diana amplificadas en un ensayo isotérmico de amplificación por mellado. Tales ensayos son conocidos en la técnica y se describen en la presente memoria. Véanse, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. 2009/0081670, la solicitud PCT 2009/012246 y las patentes de los EE. UU n.ºs 7.112.423 y 7.282.328.

Las polimerasas útiles en los métodos descritos en la presente memoria son capaces de catalizar la incorporación de nucleótidos para extender un extremo hidroxilo 3' de un oligonucleótido (por ejemplo, un cebador) unido a una molécula de ácido nucleico diana y/o un extremo hidroxilo 3' en un sitio de mella en una molécula de ADN bicatenario, en combinación con una actividad de desplazamiento de hebra. Dichas polimerasas también carecen o tienen actividad exonucleasa 5'-3' sustancialmente reducida y pueden incluir aquellas que son termófilas. Las ADN polimerasas útiles en métodos en los que intervienen cebadores con nucleótidos modificados en 2' en la región del cebador que comprende los seis nucleótidos del extremo 3' incluyen derivados y variantes de la ADN polimerasa I aislada de *Bacillus stearothermophilus*, también clasificado como *Geobacillus stearothermophilus*, y de cepas bacterianas, aislamientos y especies estrechamente relacionados que comprenden el género *Geobacillus*, que carecen o tienen actividad exonucleasa 5'-3' sustancialmente reducida y tienen actividad de desplazamiento de hebra. Los ejemplos de polimerasas incluyen, pero no se limitan a los fragmentos mayores de ADN polimerasa I Bst, ADN polimerasa Bsu, ADN polimerasa phi29, ADN polimerasa I Gst y ADN polimerasa I Gka. Los ejemplos de polimerasas incluyen, pero no se limitan a BST (fragmento mayor), ADN polimerasa I (*E. coli*), ADN polimerasa I, fragmento mayor (Klenow), fragmento de Klenow (3'-5' exo-), ADN polimerasa T4, ADN polimerasa T7, ADN polimerasa Deep VentR (exo-), ADN polimerasa Deep VentR, DyNAzime, ADN polimerasa de alta fidelidad Thermo Terminator, ADN polimerasa Thermo Terminator II, ADN polimerasa AmpliTherm, ADN polimerasa Taq, ADN polimerasa Tth, ADN polimerasa Tfi, ADN polimerasa Tgo, ADN polimerasa SP6 y ADN polimerasa Tbr.

Un agente de mellado útil en los métodos descritos en la presente memoria es una entidad química capaz de reconocer y unirse a una estructura específica en moléculas de ácido nucleico bicatenarias y romper un enlace fosfodiéster entre nucleótidos contiguos en la hebra superior con una tasa sustancialmente mayor que la rotura del enlace fosfodiéster entre nucleótidos contiguos en la hebra inferior tras su unión a la estructura específica reconocida, con lo que se crea un grupo hidroxilo 3' libre en el nucleótido terminal que precede al sitio de mella y que puede extenderse mediante una polimerasa de desplazamiento de hebra deficiente en exonucleasa 5'-3'. Preferiblemente, la tasa de escisión del enlace fosfodiéster de la hebra superior para el "agente de mellado" se aproxima al 100 %, mientras que la tasa de escisión del enlace fosfodiéster de la hebra inferior se aproxima al 0 %. Los agentes de mellado útiles en los métodos descritos en la presente memoria pueden ser enzimas, es decir, catalizadores autorregenerantes que actúan sobre múltiples moléculas sustrato o catalizadores no regenerantes que actúan sobre una sola molécula de sustrato en una proporción equimolar.

Una enzima de mellado se une a un ADN bicatenario y escinde una hebra de un dúplex bicatenario. En los métodos descritos en la presente memoria, la enzima de mellado escinde la hebra superior (la hebra que comprende la secuencia 5'-3' del sitio de reconocimiento para el agente de mellado). La enzima de mellado puede escindir la hebra superior solamente y en dirección 3' con respecto al sitio de reconocimiento. La reacción puede comprender el uso de una enzima de mellado que escinde o mella en dirección 3' del sitio de unión, de manera que la secuencia del producto no contiene el sitio de mellado. El uso de una enzima que escinde en dirección 3' del sitio de unión permite una extensión más fácil por la polimerasa, sin tener que desplazar la enzima de mellado. Idealmente, la enzima de mellado es funcional en las mismas condiciones de reacción que la polimerasa. Los ejemplos de enzimas de mellado incluyen, pero no se limitan a N.Bst9I, N.BstSEI, Nb.BbvCI (NEB), Nb.Bpu10I (Fermentas), Nb.BsmI (NEB), Nb.BsrDI (NEB), Nb.BtsI (NEB), Nt.AlwI (NEB), Nt.BbvCI (NEB), Nt.Bpu10I (Fermentas), Nt.BsmAI, Nt.BspD6I, Nt.BspQI (NEB), Nt.BstNBI (NEB), y Nt.CviPII (NEB). Las secuencias de los sitios de reconocimiento para las enzimas de mellado se proporcionan en la tabla 1.

Las enzimas de mellado también incluyen enzimas de mellado diseñadas, creadas por modificación de la actividad de escisión de endonucleasas de restricción (*NEB Expressions*, julio de 2006, vol. 1.2). Cuando las endonucleasas de restricción se unen a sus secuencias de reconocimiento en el ADN, dos sitios catalíticos dentro de cada enzima para hidrolizar cada hebra dirigen dos reacciones hidrolíticas independientes que proceden en paralelo. Es posible diseñar enzimas de restricción alteradas que hidrolicen solo una hebra del dúplex para producir moléculas de ADN "melladas" (hidroxilo 3', fosfato 5'), en lugar de escindidas. Las enzimas de mellado también pueden incluir proteínas CRISPR/Cas modificadas, nucleasas efectoras de tipo activadores de transcripción (TALEN) y nucleasas con dedos de zinc que tienen actividad mellasa.

Una reacción de amplificación por mellado comprende típicamente nucleótidos, tales como, por ejemplo, trifosfatos de didesoxirribonucleósidos (dNTP). La reacción también puede llevarse a cabo en presencia de dNTP que comprenden

una fracción detectable que incluye, pero no se limita a un radiomarcador (por ejemplo,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ), una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina), un marcador fluorescente (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC)), biotina, avidina, digoxigenina, antígenos, haptenos o fluorocromos. La reacción comprende además ciertas sales y tampones que hacen posible la actividad de la enzima de mellado y la polimerasa.

- 5 Ventajosamente, la reacción de amplificación por mellado se lleva a cabo en condiciones sustancialmente isotérmicas en las que la temperatura de la reacción es más o menos constante durante el transcurso de la reacción de amplificación. Debido a que no se necesitan ciclos de temperatura entre una temperatura superior y una temperatura inferior, la reacción de amplificación por mellado puede llevarse a cabo en condiciones en las que sería difícil llevar a cabo una PCR convencional. Normalmente, la reacción se lleva a cabo a aproximadamente entre 35 °C y 90 °C (por ejemplo, a aproximadamente 35, 37, 42, 55, 60, 65, 70, 75, 80 u 85 °C). Ventajosamente, no es esencial mantener la temperatura con un alto grado de precisión. Es aceptable cierta variabilidad de temperatura.

- 10 Los conjuntos de cebadores para reacciones de amplificación se seleccionan por tener un  $\Delta\Delta G \leq -15, -16, 17, -18, -19, -20, -25, -30$  kcal/mol o más. Las características de rendimiento de las reacciones de amplificación pueden alterarse aumentando la concentración de uno o más oligonucleótidos (por ejemplo, uno o más cebadores y/o sondas) y/o sus proporciones. Las altas concentraciones de cebadores también favorecen la formación de dímeros de cebadores. La concentración de un cebador puede ser de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 nM o más. También es posible utilizar modificadores de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) y de la tasa de reacción, tales como (pero sin limitarse a) etilenglicol y glicerol, para disminuir la temperatura de fusión de los oligonucleótidos. Además, pueden usarse modificadores de la tasa de reacción de la ADN polimerasa (tales como dNTP y la concentración de magnesio) para alterar la tasa de reacción y obtener una mayor precisión en la cuantificación. Las secuencias de la cola 5' de los cebadores directo e inverso pueden tener la misma secuencia de ácido nucleico.

- 15 En la presente memoria se describen métodos para monitorizar una reacción de amplificación por mellado en tiempo real. La amplificación cuantitativa de un ácido nucleico puede utilizar la amplificación de un ácido nucleico diana junto con una amplificación control de una cantidad conocida. La cantidad del ácido nucleico diana puede calcularse como una cuantificación absoluta o una cuantificación relativa (semicuantitativa) a partir de la fuente de control (control exógeno o endógeno).

- 20 La cuantificación de la secuencia nucleotídica desconocida puede lograrse mediante la comparación del umbral de amplificación logarítmica de la incógnita con una serie de secuencias diana conocidas en un conjunto de reacciones separado o en la misma reacción; o como producto de una coamplificación interna endógena o exógena que produce un valor umbral, indicativo de un resultado positivo (si la incógnita supera el umbral) o un resultado negativo (si la incógnita no supera el umbral).

- 25 En la presente memoria se describe un método para diseñar un ensayo de amplificación isotérmica por desplazamiento de hebra dependiente de un agente de mellado sin cribado experimental de una multitud de combinaciones de candidatos de cebadores directos y/o cebadores inversos. Se identifica una región de 35 a 70 pb de longitud dentro de la secuencia diana que tiene una secuencia de 12 a 20 pb en la porción central con una  $T_m \geq$  la temperatura del ensayo (por ejemplo,  $\sim 55$  °C). Se identifican secuencias adyacentes de 12 pb a 20 pb de longitud inmediatamente en dirección 3' y en dirección 5' de la región central de 15 a 20 pb de longitud, según los criterios anteriores. Las  $T_m$  de las secuencias bicatenarias adyacentes elegidas en dirección 3' y en dirección 5' difieren entre sí en menos de  $\pm 3$  °C. Se crea un par de cebadores directo e inverso específico de la diana uniendo una región de cola 5' para obtener un cebador formador de dímeros estable al extremo 5' de la secuencia adyacente de 12-20 bases en dirección 5' y al extremo 5' de la hebra complementaria a la secuencia adyacente de 12-20 bases en dirección 3'. Al combinar el cebador directo, el cebador inverso y una sonda, el cebador que dirige la síntesis de la hebra complementaria a la sonda está en exceso sobre el otro cebador en una proporción molar de aproximadamente 1,1:1 a 10:1. La concentración combinada de un cebador en el ensayo no es superior a 1000 nM. El método de diseño del ensayo también puede usarse para convertir un ensayo de PCR prevalidado para un amplicón  $\leq 70$  pb en un ensayo de amplificación isotérmico por desplazamiento de hebra dependiente de un agente de mellado.

#### Diseño de cebadores

- 30 Los métodos convencionales para el diseño de cebadores se han centrado en la temperatura de fusión del cebador, la temperatura de hibridación del cebador, el contenido de GC (guanina y citosina), la longitud del cebador y la minimización de las interacciones del cebador con todo lo que no sea el ácido nucleico diana (véase, por ejemplo, [www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/PCR\\_Primer\\_Design.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html)). Al contrario de estos métodos, se ha encontrado que los cebadores que forman dímeros de cebador estables, lo que se expresa en términos de energía libre de formación ( $\Delta G$ ), funcionan predeciblemente en reacciones de amplificación de ácidos nucleicos. Mientras que la energía libre ( $\Delta G$ ) y la temperatura de fusión ( $T_m$ ) comparten componentes primarios, entalpía ( $\Delta H$ ) y entropía ( $\Delta S$ ), los valores de  $\Delta G$  y  $T_m$  se derivan de manera diferente y no tienen una relación correlativa, y la única manera de relacionar un valor de  $\Delta G$  dado con un valor de  $T_m$  dado es conocer explícitamente los valores de  $\Delta H$  y  $\Delta S$  de los que derivan (Manthey, "mFold, Delta G, and Melting Temperature" ©2005 y 2011 *Integrated DNA Technologies*). Las figuras 1-11 se refieren al diseño de cebadores óptimos.

La energía libre de formación ( $\Delta G$ ) para estructuras de cebadores intermoleculares puede calcularse mediante

fórmulas conocidas en la técnica. Se dispone de varios programas para determinar la formación de diversas estructuras de cebadores intramoleculares e intermoleculares y calcular sus  $\Delta G$ , incluidos, por ejemplo, los algoritmos de predicción mfold y UNAFold (véase, por ejemplo, Markham y Zuker, *UNAFold: Software for Nucleic Acid Folding and Hybridization, Bioinformatics*: volumen 2, capítulo 1, págs. 3-31, Humana Press Inc., 2008; Zuker *et al.*, *Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide*, en *RNA Biochemistry and Biotechnology*, 11-43, NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, 1999; M. Zuker, *Prediction of RNA Secondary Structure by Energy Minimization, Methods in Molecular Biology*, 267-294, 1994; Jaeger *et al.*, *Predicting Optimal and Suboptimal Secondary Structure for RNA*, en *Molecular Evolution: Computer Analysis of Protein and Nucleic Acid Sequences, Methods in Enzymology* 183, 281-306, 1990; Zuker, *On Finding All Suboptimal Foldings of an RNA Molecule*, *Science* 244, 48-52, 1989). OligoAnalyzer 3.1 es una implementación de este tipo de mfold para el diseño de cebadores ([www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/](http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/)). Por ejemplo, con referencia a OligoAnalyzer 3.1, los cálculos de  $\Delta G$  pueden realizarse con los siguientes parámetros: tipo de diana: ADN; concentración de oligonucleótido 0,25  $\mu\text{M}$ ; concentración de  $\text{Na}^+$ : 60 mM; concentración de  $\text{Mg}^{++}$ : 15 mM; y concentración de NTP: 0,3 mM.

### Región de reconocimiento 3'

En la presente memoria se describe un cebador con una secuencia de reconocimiento 3' cuya formación del par cebador-diana es estable ( $\Delta G \leq$  aproximadamente -20 kcal/mol o más) y tiene el potencial de aumentar el rendimiento de la reacción de amplificación de un ácido nucleico. La región de reconocimiento 3' se une específicamente a una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, una secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico. La región de reconocimiento 3' tiene una secuencia que es complementaria a 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases o más de la secuencia de un ácido nucleico. La región de reconocimiento 3' puede comprender una o más bases de inosina. La región de reconocimiento 3' puede comprender no más de 2/12 inosinas. La temperatura de fusión del par cebador-diana puede ser igual o superior a 8 °C o 6 °C por debajo de la temperatura de reacción o extensión del ensayo ( $T_m \geq$  temperatura de ensayo - 8°). La secuencia de reconocimiento 3' puede comprender 12-20, 12-17 o 12-14 bases. La formación del par cebador-diana puede ser más estable que la formación del autodímero (por ejemplo,  $\Delta\Delta G \leq$  aproximadamente -15, -16, -17, -18, -19, -20 kcal/mol o más). Preferiblemente, la secuencia de reconocimiento 3' no contiene secuencias autocomplementarias, pequeñas repeticiones invertidas (por ejemplo, >4 bases/repetición), o secuencias que de otro modo promuevan interacciones intramoleculares, con potencial de interferir con la hibridación cebador-diana.

Puede diseñarse un cebador con una  $T_m$  de 56 °C con 4 bases específicas de la secuencia al final del cebador que pueden no contribuir a la hibridación. El cebador puede ser un 16, 17, 18, 19, 20 o 21-mero.

En la presente memoria se describe un cebador con una secuencia de reconocimiento 3' que es útil en ensayos de amplificación por mellado. Adicionalmente, la región de reconocimiento 3' específica de la diana comprende uno o más nucleótidos modificados en 2' (por ejemplo, 2'-O-metilo, 2'-metoxietoxi, 2'-flúor, 2'-alquilo, 2'-alilo, 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo], 2'-hidroxilo (ARN), 4'-tio, 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'-puente, 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2'-puente y 2'-O-(N-metilcarbamato)). Sin limitarse a teoría alguna, se supone que la incorporación de uno o más nucleótidos modificados en 2' en las regiones de reconocimiento reduce o elimina las interacciones intermoleculares y/o intramoleculares de cebadores/moldes (por ejemplo, la formación de dímeros de cebador) y, de este modo, se reduce o elimina la señal de fondo en la amplificación isotérmica. El nucleótido modificado en 2' tiene preferiblemente una base que aparee con la secuencia diana. Puede haber dos o más nucleótidos modificados en 2' (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más nucleótidos modificados en 2') en la región de reconocimiento específico de la diana (por ejemplo, un bloque de nucleótidos modificados). El bloque de nucleótidos modificados en 2' puede situarse en el extremo 3' de la región de reconocimiento específico de la diana. El bloque de nucleótidos modificados en 2' puede situarse en el extremo 5' de la región de reconocimiento específico de la diana. Cuando el bloque de nucleótidos modificados en 2' se sitúa en el extremo 5' de la región de reconocimiento específico de la diana, los nucleótidos modificados en 2' pueden estar separados del sitio de mella por uno o más nucleótidos no modificados (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más nucleótidos no modificados en 2'). Los solicitantes han encontrado que la situación de uno o más nucleótidos modificados en 2' o de un bloque de nucleótidos modificados en 2' altera la cinética de la amplificación. Cuando el uno o más nucleótidos modificados en 2' o el bloque de nucleótidos modificados en 2' se posicionan en o cerca del extremo 5' de la región de reconocimiento o próximos al sitio de mella, las reacciones de amplificación en tiempo real muestran una disminución del tiempo hasta la detección. Adicionalmente, la curva de la señal se contrae y la pendiente de la curva se desplaza.

Las proporciones de un cebador con uno o más nucleótidos modificados en 2' pueden usarse para alterar el tiempo hasta la detección y/o la eficiencia de la reacción para "ajustar" las reacciones, con el resultado de un control predecible sobre la cinética de la reacción. El aumento de la proporción de un cebador con uno o más nucleótidos modificados en 2' en el extremo 3' de la secuencia de reconocimiento con respecto a un cebador con uno o más nucleótidos modificados en 2' en el extremo 5' de la secuencia de reconocimiento contrae la curva de la señal y desplaza la pendiente de la curva. Es ventajoso poder "ajustar" una reacción para proporcionar un medio para manipular tanto el tiempo hasta la detección como la eficiencia de la reacción. La cuantificación relativa mediante un control interno requiere que se cumplan dos condiciones importantes. En primer lugar, es beneficioso poder modificar el tiempo hasta la detección de una reacción creando una condición de reacción no competitiva. Por lo tanto, al hacer que la reacción del control sea detectable en un punto temporal posterior (en relación con la diana de interés), la reacción del control no compete con la diana específica de interés ni siquiera cuando la diana de interés es poco abundante inicialmente. En segundo lugar, para asegurar un cálculo de la abundancia relativa verdadera, se requiere que las reacciones del

control y la diana específica tengan eficiencias equivalentes. Al controlar la eficiencia de cada reacción mediante una condición de "ajuste" se hace posible que las reacciones sean equivalentes, lo que permite cálculos de cuantificación relativa satisfactorios. El ajuste de las reacciones puede usarse para hacer que las eficiencias de amplificación del ácido nucleico diana y de amplificación del ácido nucleico de referencia (por ejemplo, estándar interno) sean equivalentes en PCR cuantitativa (PCRq). Adicionalmente, las curvas de amplificación del ácido nucleico diana y el estándar interno pueden alterarse de modo que el tiempo de detección de sus productos de amplificación se separe, a la vez que se proporciona la misma eficiencia para la amplificación del ácido nucleico diana y la amplificación del estándar interno. Mediante el uso de combinaciones y proporciones específicas de las estructuras oligonucleotídicas dentro de una reacción es posible crear condiciones que permitan un rendimiento de la reacción ajustado.

#### 10 Región de dimerización de la cola 5'

En la presente memoria se describe un cebador con una región de cola 5' capaz de autodimerización que aumenta el rendimiento de la reacción de amplificación de un ácido nucleico. Sin limitarse a teoría alguna, en una reacción de amplificación de un ácido nucleico, el cebador hibrida con el ácido nucleico diana como dímero de cebador. Por ejemplo, los cebadores de amplificación por mellado tienen un sitio de reconocimiento para el agente de mellado presente en el extremo 5' que no está relacionado con la especificidad de unión del cebador para la secuencia de reconocimiento diana. Los productos inespecíficos de fondo por interacciones inespecíficas de los cebadores tienen el potencial de secuestrar componentes de reacción que de otro modo se habrían utilizado para la amplificación del producto específico. La formación del homodímero puede ser estable (por ejemplo,  $\Delta G \leq$  aproximadamente -30, -35, -40, -45, -50, -55, -60 kcal/mol o más). El homodímero puede tener una temperatura de fusión superior a la temperatura de la reacción de extensión. La región de la cola 5' puede tener una secuencia palindrómica. La región de la cola 5' puede tener al menos 20 bases (por ejemplo, 20, 21, 22, 23, 24 bases) de longitud. La región de la cola 5' puede tener un contenido de GC del 80-90 %. La formación del homodímero puede ser más estable que la formación de otras conformaciones de dímeros de cebador menos estables (por ejemplo,  $\Delta\Delta G \leq$  aproximadamente -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20, -25, -30, -35, -40 kcal/mol o más).

En la presente memoria se describe un cebador con una secuencia de cola 5' que es útil en reacciones de amplificación por mellado. Para uso en reacciones de amplificación por mellado, la región de la cola 5' comprende uno o más sitios de reconocimiento para agentes de mellado y la región de la cola 5' tiene una secuencia invertida simétricamente. La región de la cola 5' puede contener un número par de nucleótidos (por ejemplo, 22, 24 nucleótidos). El sitio de mella está diseñado para estar posicionado entre el nucleótido en el extremo 3' de la región de la cola 5' y el nucleótido en el extremo 5' de la región de reconocimiento 3'. Sin limitarse a teoría alguna, la enzima de mellado no escinde el sitio de mella cuando el reconocimiento 3' es monocatenario. Sin embargo, la escisión en el sitio de mella se produce cuando la región de reconocimiento 3' es bicatenaria (por ejemplo, cuando el cebador se incorpora en una molécula de ácido nucleico diana bicatenaria durante el transcurso de la reacción de amplificación del ácido nucleico). Pueden generarse ejemplos de secuencias de la región de la cola 5' de 24 nucleótidos de longitud con una secuencia de reconocimiento para Nt.BstNBI a partir del siguiente molde 5'-NNNGACTCNNNNNGAGTCNNNNN-3'. Basándose en este molde, hay 537.824 secuencias de cola 5' con las siguientes propiedades:  $\Delta G =$  -48 Kcal/mol a -62 kcal/mol;  $\Delta\Delta G <$  -40 kcal/mol; y contenido de GC del 68 % al 84 %. De estas, se proporcionan 1050 secuencias seleccionadas, que representan el 0,2 % del todo el espacio de secuencias (248.832). Ejemplos de secuencias de la región de la cola 5' de 22 nucleótidos de longitud con una secuencia de reconocimiento para Nt.BstNBI a partir del siguiente molde 5'-NNNGACTCNNNNNGAGTCNNNNN-3'. Basándose en este molde, hay 248.832 secuencias de cola 5' con las siguientes propiedades:  $\Delta G =$  -47 kcal/mol a -55 kcal/mol;  $\Delta\Delta G <$  -40 kcal/mol; y contenido de GC del 72 % al 82 %. De estas, se proporcionan 200 secuencias seleccionadas, que representan el 0,08 % del todo el espacio de secuencias (248,832).

#### Moléculas de ácido nucleico diana

Los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son útiles para la amplificación y/o identificación de una molécula de ácido nucleico en una muestra de prueba. Las secuencias diana se amplifican a partir de prácticamente cualquier muestra que comprenda una molécula de ácido nucleico.

Los ejemplos de muestras de prueba incluyen fluidos corporales (por ejemplo, saliva, sudor, lágrimas, fluidos que se acumulan en una cavidad corporal, orina, eyaculado, secreción vaginal, líquido cefalorraquídeo, linfa, heces, esputo, fluido de descomposición, vómitos, sudor, leche materna, sangre, suero y plasma), extractos de tejidos, medios de cultivo (por ejemplo, un líquido en el que se ha cultivado una célula, tal como una célula patógena), muestras ambientales, productos agrícolas u otros productos alimenticios, y sus extractos, y etiquetas de identificación de ADN. Si se desea, la muestra se purifica antes de su inclusión en una reacción de amplificación por mellado mediante cualquier método convencional usado normalmente para aislar una molécula de ácido nucleico de una muestra biológica.

Los cebadores pueden amplificar un ácido nucleico diana de un patógeno para detectar la presencia del patógeno en una muestra. Para aplicaciones ambientales, las muestras de prueba pueden incluir agua, extractos líquidos de materiales de construcción (por ejemplo, paneles de yeso, placas de techo, tableros de pared, telas, papel de pared y revestimientos de suelo) que pueden haber estado expuestos a un sujeto infectado con un patógeno, hisopos ambientales o cualquier otra muestra.

## Aplicaciones

La amplificación de ácidos nucleicos diana mediante cebadores descrita en la presente memoria tiene características útiles para la detección rápida de moléculas de ácidos nucleicos diana. Las composiciones y métodos descritos en la presente memoria son útiles en el diagnóstico humano, donde se desea una respuesta diagnóstica rápida (por ejemplo, una amplificación detectable en menos de 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5 minutos o menos). En la presente memoria se describe el uso de un ensayo de reacción de amplificación por mellado para diagnóstico humano o veterinario en entornos clínicos o en el campo. También se describe el uso de ensayos de reacción de amplificación por mellado en trabajos de diagnóstico de campo, donde no hay acceso a equipos de termociclado o sería prohibitivamente costoso. También se describe el uso de ensayos de reacción de amplificación por mellado en un entorno clínico, donde se desean respuestas cuantitativas rápidas.

### Sondas oligonucleotídicas detectables

La descripción incluye la detección cuantitativa de moléculas de ácido nucleico diana o amplicones de las mismas en una reacción de amplificación por mellado mediante sondas polinucleotídicas detectables no amplificables que comprenden al menos una molécula de detención de la polimerasa (por ejemplo, una modificación nucleotídica u otra fracción que hace que el oligonucleótido sea capaz de unirse a una molécula de ácido nucleico diana, pero sea incapaz de soportar la extensión del molde utilizando la sonda oligonucleotídica detectable como diana). Sin limitarse a teoría alguna, la presencia de una o más fracciones que no permiten la progresión de la polimerasa probablemente provoca la detención de la polimerasa por adiciones de estructuras que no son de ácido nucleico al oligonucleótido o a través del estancamiento de una polimerasa replicativa (es decir, un espaciador C3, bases de ADN dañadas, otra fracción espaciadora, bases 2'-OMe). Estas construcciones impiden o reducen así la amplificación ilegítima de la sonda durante el transcurso de una reacción de amplificación por mellado. Esto las distingue de las sondas de detección convencionales, que deben añadirse al final de la reacción de amplificación por mellado para evitar su amplificación.

Las sondas de detección convencionales han demostrado ser poco prácticas para cuantificar una reacción de amplificación por mellado en tiempo real. Si se incorporan sondas de detección convencionales en la reacción de amplificación por mellado, estas sondas de detección convencionales se amplifican simultáneamente con la diana. La amplificación de estas moléculas de detección enmascara la detección de los amplicones diana legítimos debido al número de moléculas iniciales de la sonda de detección al comienzo de la reacción.

La descripción incluye una sonda polinucleotídica detectable no amplificable que comprende al menos una molécula de detención de polimerasa. Una molécula de detención de polimerasa de la invención incluye, pero no se limita a, una modificación nucleotídica u otra fracción que bloquea la extensión del molde mediante ADN polimerasas replicativas, con lo que se impide la amplificación de las moléculas de detección; pero puede permitir la hibridación adecuada o el espaciado de nucleótidos con la molécula diana o copias amplificadas de la molécula diana. Una sonda oligonucleotídica detectable puede comprender un espaciador de 3 carbonos (espaciador C3) que impide o reduce la amplificación ilegítima de una molécula de detección.

Una sonda oligonucleotídica detectable puede comprender una o más bases nucleotídicas modificadas con mayor afinidad de unión a un nucleótido complementario. Los ejemplos de bases modificadas incluyen, pero no se limitan a 2'-fluoroamiditos y 2'OMe-ARN-amiditos (que también funcionan como moléculas de detención de la polimerasa). Las sondas oligonucleotídicas detectables pueden sintetizarse con fluoróforos de diferentes colores y pueden diseñarse para hibridar prácticamente con cualquier secuencia diana. En vista de su notable especificidad, se usa una sonda polinucleotídica detectable no amplificable para detectar una molécula de ácido nucleico diana individual en una muestra, o se usa en combinación con sondas oligonucleotídicas detectables, cada una de las cuales se une a una molécula de ácido nucleico diana diferente. Por consiguiente, las sondas polinucleotídicas detectables no amplificables pueden usarse para detectar una o más moléculas de ácido nucleico diana en la misma reacción, lo que permite cuantificar estas dianas simultáneamente. La descripción abarca el uso de tales fluoróforos junto con las sondas oligonucleotídicas detectables descritas en la presente memoria.

### Implementación en hardware y/o software

Los métodos descritos en la presente memoria pueden implementarse en un hardware o software de propósito general o programado especialmente. Por ejemplo, los métodos pueden implementarse mediante un medio legible por ordenador. Por consiguiente, en la presente memoria se describe un producto de software y/o programa informático configurado para realizar los algoritmos y/o métodos descritos en la presente memoria. Es bien conocido por un experto en la técnica cómo configurar un software que puede realizar los algoritmos y/o métodos proporcionados en la presente memoria. El medio legible por ordenador puede ser no transitorio y/o tangible. Por ejemplo, el medio legible por ordenador puede ser una memoria volátil (por ejemplo, una memoria de acceso aleatorio y similares) o una memoria no volátil (por ejemplo, una memoria de solo lectura, discos duros, disquetes, cinta magnética, discos ópticos, tabletas de papel, tarjetas perforadas y similares). Las instrucciones ejecutables por ordenador pueden escribirse en un lenguaje informático adecuado o una combinación de varios lenguajes. Los métodos básicos de biología computacional se describen, por ejemplo, en Setubal y Meidanis *et al.*, *Introduction to Computational Biology Methods* (PWS Publishing Company, Boston, 1997); Salzberg, Searles, Kasif, (ed.), *Computational Methods in Molecular Biology*, (Elsevier, Ámsterdam, 1998); Rashidi y Buehler, *Bioinformatics Basics: Application in Biological Science and*

*Medicine* (CRC Press, Londres, 2000) y Ouelette y Bzevanis, *Bioinformatics: A Practical Guide for Analysis of Gene and Proteins* (Wiley & Sons, Inc., 2.<sup>a</sup> ed., 2001).

La presente invención también puede hacer uso de diversos productos de programas informáticos y software para una variedad de propósitos, tales como diseño de sondas, gestión de datos, análisis, y operación de instrumentos. (Véanse, las patentes de los EE. UU. n<sup>os</sup> 5.593.839, 5.795.716, 5.733.729, 5.974.164, 6.066.454, 6.090.555, 6.185.561, 6.188.783, 6.223.127, 6.229.911 y 6.308.170). En la presente memoria se describen métodos para proporcionar información genética a través de redes tales como internet, como se muestra en los documentos de EE. UU. con los números de serie 10/197.621, 10/063.559 (publicación de patente de los EE. UU. n.º 20020183936), 10/065.856, 10/065.868, 10/328.818, 10/328.872, 10/423.403 y 60/482.389.

## 10 Kits

En la presente memoria se describen kits para ensayar la actividad de una enzima de mellado y una polimerasa. Los kits pueden incluir la molécula sustrato de la invención. En la presente memoria se describen kits para la amplificación de una molécula de ácido nucleico, incluida la molécula sustrato para su uso como control exógeno. Dichos kits son útiles para la detección o cuantificación de un ácido nucleico en una muestra biológica obtenida de un sujeto. Los kits descritos en la presente memoria pueden comprender, por ejemplo, ADN polimerasas, cebadores directos e inversos, y una o más enzimas de mellado, como se describen en la presente memoria, y una sonda detectable. Cuando han de amplificarse secuencias de patógenos múltiples y los moldes diseñados para esas secuencias diana comprenden los sitios de mellado enzimático para la misma enzima de mellado, pueden incluirse entonces una o dos enzimas de mellado. Cuando los moldes son reconocidos por diferentes enzimas de mellado, pueden incluirse más enzimas de mellado en el kit como, por ejemplo, 3 o más.

En la presente memoria se describe un kit para la amplificación de un ácido nucleico que comprende una ADN polimerasa; un cebador primario, un cebador secundario, una enzima de mellado con especificidad para un sitio de unión a la enzima de mellado dentro de los cebadores, y desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) (por ejemplo, en una solución tamponada que contiene componentes suficientes para la amplificación). El cebador primario y el cebador secundario pueden tener cada uno una región de reconocimiento específico en el extremo 3' de secuencia complementaria o sustancialmente complementaria a la secuencia diana, en donde la región de reconocimiento específico en el extremo comprende uno o más nucleótidos modificados en 2'; una región de cola en el extremo 5' que contiene un sitio de unión a la enzima de mellado en dirección 5' con respecto a las secuencias de la región de reconocimiento específico en el extremo 3' que puede dimerizarse consigo misma (por ejemplo, es autocomplementaria). Uno o más cebadores pueden estar en una configuración de dímero de cebador (por ejemplo, producida calentando aproximadamente a la T<sub>m</sub> y enfriando lentamente).

Los kits descritos en la presente memoria también pueden comprender uno o más de los componentes en cualquier número de recipientes, paquetes, tubos (por ejemplo, de <0,2 ml, 0,2 ml, 0,6 ml, 1,5 ml, 5,0 ml, >5,0 ml), viales, placas de microtitulación (por ejemplo, de <96 pocillos, 96 pocillos, 384 pocillos, 1536 pocillos, >1536 pocillos), ArrayTape, y similares, individuales, o los componentes pueden combinarse en diversas combinaciones en tales recipientes. El kit puede comprender además un par de cebadores capaces de unirse a una secuencia de referencia y amplificarla. El kit puede comprender uno o más cebadores en una configuración de dímero de cebador (por ejemplo, producida calentando aproximadamente a la T<sub>m</sub> y enfriando lentamente). El kit puede comprender un recipiente estéril que contiene los cebadores; tales recipientes pueden ser cajas, ampollas, botellas, viales, tubos, bolsas, saquitos, envases de tipo blister u otra forma de recipiente adecuada conocida en la técnica. Dichos recipientes pueden estar hechos de plástico, vidrio, papel laminado, lámina metálica u otros materiales adecuados para contener ácidos nucleicos.

Los componentes del kit pueden estar presentes, por ejemplo, en uno o más recipientes, por ejemplo, todos los componentes pueden estar en un recipiente o, por ejemplo, las enzimas pueden estar en un recipiente separado de los cebadores. Los componentes pueden, por ejemplo, estar secos (por ejemplo, en polvo) o en un tampón estable (por ejemplo, estabilizado químicamente, estabilizado térmicamente). Los componentes secos pueden prepararse, por ejemplo, mediante liofilización, vacío y secado asistido por centrifugación y/o secado a temperatura ambiente. La polimerasa y las enzimas de mellado pueden estar en forma liofilizada en un único recipiente, y los cebadores, liofilizados, criodesecados, o en un tampón, en un recipiente diferente. La polimerasa, las enzimas de mellado y los cebadores pueden estar, en forma liofilizada, en un único recipiente. La polimerasa y la enzima de mellado pueden estar separadas en diferentes recipientes.

Los kits pueden comprender además, por ejemplo, los dNTP usados en la reacción o nucleótidos modificados, cubetas u otros recipientes usados para la reacción, o un vial de agua o tampón para rehidratar los componentes liofilizados. El tampón usado puede ser apropiado, por ejemplo, tanto para la actividad de polimerasa como de la enzima de mellado.

Los kits también pueden comprender instrucciones para realizar uno o más métodos descritos en la presente memoria y/o una descripción de una o más composiciones o reactivos descritos en la presente memoria. Las instrucciones y/o descripciones pueden estar en forma impresa y pueden incluirse en un manual del kit. Un kit también puede incluir una descripción escrita de un sitio de Internet que proporciona tales instrucciones o descripciones.

A menos que se indique lo contrario, la práctica de la presente invención emplea técnicas convencionales de biología

molecular (incluidas técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que entran dentro del ámbito del experto en la materia. Tales técnicas se explican detalladamente en la bibliografía, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller y Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991). Estas técnicas son aplicables a la producción de los polinucleótidos y polipéptidos de la invención, y, como tales, pueden considerarse en la preparación y práctica de la invención. Las técnicas particularmente útiles para realizaciones particulares se analizarán en las secciones que siguen.

## 10 Ejemplos

Ejemplo 1. Un sustrato para una reacción de mellado y extensión con un indicador detectable que puede usarse como molécula de control exógeno/interno.

La presente invención proporciona un sustrato para una reacción de mellado y extensión que es un dúplex oligonucleotídico con un sitio de mella en una hebra que está 5' con respecto a una molécula indicadora fluorescente detectable unida covalentemente al extremo 3' de la hebra (figuras 1A y 1B). Un extintor en el extremo 5' de la hebra opuesta impide que la molécula indicadora emita fluorescencia (figuras 1A y 1B). Cuando la molécula sustrato se mella, la polimerasa puede extender el extremo 3' interno resultante usando la hebra opuesta como molde (figuras 1C-1E). La extensión por la polimerasa da lugar al desplazamiento de la porción de la hebra unida al indicador fluorescente (figura 1E). Cuando el indicador fluorescente se separa del extintor, genera una señal fluorescente (figura 1E). Pueden realizarse mejoras adicionales en la molécula sustrato para impedir o minimizar ciclos adicionales de mellado y extensión (figura 1F).

La reacción de la molécula sustrato en presencia de una enzima de mellado y una polimerasa genera una señal lineal, particularmente cuando los extremos 3' de los oligonucleótidos están bloqueados frente a interacciones adicionales (figura 2A). La molécula sustrato puede añadirse a reacciones de amplificación por mellado como control exógeno/interno para demostrar la actividad de una enzima de mellado y una polimerasa en la reacción. La reacción de control y la reacción de amplificación por mellado comienzan cuando la enzima de mellado y la polimerasa están activas y se desarrollan en paralelo. La reacción de control está diseñada para minimizar el uso de los componentes de reacción, con lo que se minimiza cualquier efecto sobre la reacción de amplificación. Ventajosamente, los puntos finales de reacción en una reacción de amplificación por mellado pueden establecerse como el tiempo en que la molécula de control exógena alcanza un valor UFR establecido (figura 2B). Por ejemplo, esto puede usarse para caracterizar una señal de amplificación como positiva o negativa a partir su tiempo de detección.

Se realizaron estudios con varias moléculas sustrato que tenían nucleótidos modificados en diversas posiciones alrededor del sitio de mella (figura 4). Para estos estudios, el extremo 3' del oligonucleótido con el extintor no estaba bloqueado. Las moléculas sustrato mostraron el perfil de reacción esperado. Se observó una respuesta lineal rápida a concentraciones relativamente altas de la enzima de mellado, en la mayoría de los casos con un valor UFR máximo alcanzado rápidamente en menos de 5 minutos (figuras 5A-5E y 6A-6D). En particular, la molécula sustrato mella -1 que tiene un 2'OMe en la primera posición 5' del sitio de mella mostró una respuesta retardada en comparación con las otras moléculas sustrato (figura 6C). A concentraciones relativamente más bajas de la enzima de mellado, el tiempo hasta el valor UFR máximo pudo alargarse (figuras 5D y 5E).

Se hicieron cambios en la longitud de la porción del oligonucleótido 5' del sitio de reconocimiento GAGTC para la enzima de mellado (figura 7). Las hebras superiores A, B, C tienen todas actividades equivalentes según la pendiente. La curva de reacción de la hebra superior D, que tiene dos nucleótidos 5' del sitio de reconocimiento para la enzima de mellado, muestra una ligera diferencia. Se observa una disminución adicional en la respuesta de reacción en la hebra superior E, que tiene un nucleótido 5' del sitio de reconocimiento para la enzima de mellado. No se observa reacción para la hebra superior F, que no tiene nucleótidos 5' del sitio de reconocimiento para la enzima de mellado. Por tanto, estos datos muestran plena actividad de la enzima de mellado, cuando hay tres o más nucleótidos en el lado 5' del sitio de reconocimiento GAGTC para el mellado. La diferencia en las actividades permite la elección de las tasas de reacción de manera que el control exógeno sea compatible con diferentes ensayos.

Ejemplo 2. Capacidad de ajuste de la reacción de control exógeno.

En un aspecto de la invención, la reacción de control exógeno puede ajustarse, lo que permite la personalización de la reacción de control exógeno para llevarla a cabo con un conjunto dado de condiciones de reacción de amplificación por mellado. Usando diferentes proporciones de moléculas sustrato que comprenden nucleótidos no modificados y modificados, puede controlarse la tasa de reacción (figura 8). La hebra superior no modificada (A) se tituló con el oligonucleótido modificado doblemente con metoxi (G). La tasa de reacción (pendiente) se controló con las cantidades añadidas del oligonucleótido modificado, y pudo ajustarse para alcanzar un umbral deseado en un tiempo predeterminado. Estos resultados demuestran que pueden usarse mezclas de la molécula de control exógeno como "temporizador de la reacción" además de como control de reacción positivo.

En otro aspecto, la reacción de control exógeno puede ajustarse situando nucleótidos modificados con 2'OMe en

diversas posiciones dentro de la molécula de sustrato en proximidad del sitio de mella y del sitio de reconocimiento para la enzima de mellado (figuras 9A y 9B). Se usaron hebras superiores modificadas (A-K y DE) en combinación con una hebra inferior bloqueada con un espaciador C3. Los resultados fueron relativamente equivalentes en todos los casos, menos con la hebra superior D, con la modificación en la posición 'mella -1' (última base 5' antes del sitio de mella para Nt.BstNBI). Los resultados previos también demostraron un pequeño efecto de la hebra superior B al usar menos enzima de mellado. Se observaron resultados relativamente equivalentes con todos los nucleótidos modificados con 2'OMe situados en el sitio de reconocimiento para el mellado (GAGTC). El efecto más notable se observó cuando los nucleótidos modificados con 2'OMe se situaron a cada lado del sitio de mella.

Ejemplo 3. Uso del sustrato para la reacción de mellado y extensión para ensayar la actividad de una enzima de mellado y una polimerasa.

En un aspecto de la invención, la molécula sustrato puede usarse para analizar las condiciones de reacción para determinar las actividades de combinaciones de enzimas de mellado y polimerasas y caracterizar su actividad combinada. Debido a las diferencias de propiedades (por ejemplo, propiedades térmicas) de las enzimas de mellado y las polimerasas, existe potencial de optimización de las condiciones de reacción para maximizar la actividad general de la reacción de mellado y extensión. Anteriormente a la presente invención, no se disponía de un análisis semejante. La hebra superior modificada se usa junto con una hebra inferior no bloqueada (extremo 3' no bloqueado). La enzima de mellado y/o la polimerasa pueden analizarse en cuanto a su actividad con estos oligonucleótidos para proporcionar una reacción muy controlada de alta replicabilidad, que todavía mimetiza una reacción de amplificación verdadera en términos de la función enzimática. Pueden utilizarse extremos 3' bloqueados o no bloqueados dependiendo de la información deseada. Se realizó un estudio que demuestra el efecto de la concentración de la enzima de mellado sobre la reacción de la molécula sustrato (figura 10).

Ejemplo 4. Kit de ensayo para la detección cualitativa de ADN de *Salmonella* que incluye un control exógeno/interno

La detección rápida de *Salmonella* en el momento necesario es un requisito para efectuar intervenciones que impidan su propagación. Se generó un kit de prueba para la detección cualitativa de ADN de *Salmonella*. El ensayo de detección se basa en un método isotérmico de amplificación de un ácido nucleico. El kit también incluye un control exógeno/interno para confirmar la actividad de la enzima de mellado y la polimerasa en cada reacción. Para optimizar el ensayo, se probó primero una lista de cebadores y secuencias baliza. Para la amplificación de la molécula de ácido nucleico diana se usaron los siguientes cebadores.

Cebadores directos

5'-TGA<sup>m</sup>CTCCATATGGAGTCACATCAC<sup>m</sup>CGAAATAC<sup>m</sup>C<sup>m</sup>G<sup>m</sup>C<sup>m</sup>C<sup>m</sup>A-3'  
 5'-GACTCGATATCGAGTCTTTCC AC<sup>m</sup>CGAAATAC<sup>m</sup>C<sup>m</sup>G<sup>m</sup>C<sup>m</sup>C<sup>m</sup>A-3' \*  
 5'-GAAAGACTCGCGAGTCTTTCCAC<sup>m</sup>CGAAATAC<sup>m</sup>C<sup>m</sup>G<sup>m</sup>C<sup>m</sup>C<sup>m</sup>A-3'

Cebadores inversos

5'-TGA<sup>m</sup>CTCCATATGGAGTCACATCGG<sup>m</sup>CATCATTATTATCTTTG<sup>m</sup>U<sup>m</sup>G<sup>m</sup>AmAmC-3'  
 5'-GACTCGATATCGAGTCTTTCCG<sup>m</sup>CATCATTATTATCTTTG<sup>m</sup>U<sup>m</sup>G<sup>m</sup>AmAmC-3' \*  
 5'-GAAAGACTCGCGAGTCTTTCCG<sup>m</sup>CATCATTATTATCTTTG<sup>m</sup>U<sup>m</sup>G<sup>m</sup>AmAmC-3'

Las bases marcadas con el prefijo "m" indican la posición de 2'-O-metilribonucleótidos.

Para la detección de la molécula de ácido nucleico diana se usó la siguiente sonda:

Sonda de detección de tipo "baliza molecular"

5'-CalRed<sub>610nm</sub>-CGCCTGTGGA<sup>m</sup>ACTTTATTGGCG-BHQ2-3'

Como control exógeno e interno se utilizó el dúplex de los siguientes oligonucleótidos (figura 11):

Oligonucleótido inferior para control exógeno (BOT) con espaciador de 3 carbonos (espaciador C3):

5' Black Hole Qhencher (BHQ)-1 GGCCCGCGGATGCACTCCGTGGCAGTACTCTG TAAT-espaciador C3 3'  
 purificado por HPLC

Oligonucleótido superior para control exógeno (Topn)

5' CAGAGTCACTGCCACGGAGTGCATCGCGGGCC/36-FAM/ 3'  
 purificado por HPLC

5 Los cebadores y sondas anteriores se probaron en reacciones isotérmicas de amplificación de un ácido nucleico. Las muestras de prueba se prepararon a partir de un alimento para mascotas simulado o un cultivo enriquecido. Las reacciones de amplificación y detección presentaron una alta relación entre señal y ruido, un inicio temprano de la amplificación exponencial, una pendiente de amplificación pronunciada, tiempo rápido hasta la detección y baja varianza de la señal entre las reacciones de ensayo replicadas. Todas las muestras de control diana mostraron una señal robusta. El control exógeno/interno proporcionó un medio para detectar la actividad de la enzima de mellado y la polimerasa a la vez que se minimizaba la interferencia con las reacciones isotérmicas de amplificación del ácido nucleico. El ensayo se sometió a pruebas adicionales y se detectó una lista de más de 100 serotipos de *Salmonella*.  
10 Estos resultados indican que la reacción y los reactivos anteriores pueden usarse para la detección rápida y precisa de *Salmonella*.

REIVINDICACIONES

1. Un sustrato para una reacción de mellado y extensión que comprende un dúplex de ácido nucleico, en donde el dúplex comprende:
- 5 i) una primera hebra de ácido nucleico que comprende un sitio de reconocimiento para una enzima de mellado, un sitio de mella y un marcador detectable fluorescente unido covalentemente al extremo 3'; y
- ii) una segunda hebra de ácido nucleico que tiene una secuencia capaz de formar un dúplex con la primera hebra y una fracción extintora unida covalentemente al extremo 5';
- o
- 10 i) una primera hebra de ácido nucleico que comprende un sitio de reconocimiento para una enzima de mellado, un sitio de mella y una fracción extintora unida covalentemente al extremo 3'; y
- ii) una segunda hebra de ácido nucleico que tiene una secuencia capaz de formar un dúplex con la primera hebra y un marcador detectable fluorescente unido covalentemente al extremo 5';
- en donde la primera hebra de ácido nucleico está modificada en uno o más nucleótidos entre el sitio de reconocimiento para la enzima de mellado y el sitio de mella; y/o
- 15 en donde la primera hebra de ácido nucleico está modificada en una o más posiciones dentro del sitio de reconocimiento para la enzima de mellado.
2. El sustrato de la reivindicación 1,
- en donde el marcador detectable fluorescente es FAM, TET, HEX, TAMRA, JOE o ROX; y/o
- en donde la fracción extintora es 5' Iowa Black® RQ (5labRQ), dabciilo, dabsilo, o un colorante Black Hole Quencher; y/o
- 20 en donde el extremo 3' del segundo ácido nucleico está modificado mediante un espaciador C3, un didesoxinucleótido, fosforilación, un colorante, un fluoróforo, un extintor, un espaciador o un conector; y/o
- en donde la primera hebra de ácido nucleico está modificada en uno o más nucleótidos en las posiciones 1 o 2, 5' del sitio de mella y en la posición 1, 3' del sitio de corte; y/o
- 25 en donde el uno o más nucleótidos modificados comprenden un 2'-O-metilo, 2'-metoxietoxi, 2'-flúor, 2'-hidroxilo (ARN), 2'-alilo, 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo], 4'-tio, 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'-puente, 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2'-puente y 2'-O-(N-metilcarbamato), una metilación, una biotilación, un aducto de un nucleótido o un análogo de una base; y/o
- en donde la enzima de mellado es Nt.BstNBI, N.Bst9I, N.BstSEI, Nb.BbvCI, Nb.Bpu10I, Nb.BsmI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, Nt.AlwI, Nt.BbvCI, Nt.Bpu10I, Nt.BsmAI, Nt.BspD6I, Nt.BspQI o Nt.CviPII; y/o
- 30 que tiene entre 30 pb y 2 kb de longitud, entre 100 pb y 1 kb de longitud, entre 100 y 500 pb de longitud, entre 30 y 200 pb de longitud, entre 30 y 60 pb de longitud o entre 35 y 50 pb de longitud; y/o
- en donde las hebras de ácido nucleico tienen entre 30 y 2000 nt de longitud, entre 100 y 1000 nt de longitud, entre 100 y 500 nt de longitud, entre 30 y 100 nt de longitud, entre 30 y 60 nt de longitud o entre 35 y 50 nt de longitud; y/o
- 35 en donde la longitud de la hebra de ácido nucleico 3' del sitio de mella es de 25 nt, 35 nt, 40 nt o más; y/o
- en donde la longitud de la hebra de ácido nucleico 5' del sitio de mella es de 10 nt, 15 nt, 20 nt o más.
3. El sustrato de la reivindicación 1 o 2, en donde la longitud de la hebra de ácido nucleico 5' del sitio de reconocimiento para la enzima de mellado es de 10 nt, 5 nt, 3 nt o menos.
4. El sustrato de la reivindicación 3, en donde la longitud de la hebra de ácido nucleico 5' del sitio de reconocimiento para la enzima de mellado es de 4, 3, 2 o 1 nt.
- 40 5. El sustrato de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende uno o más pares de un marcador detectable fluorescente y una fracción extintora unidos covalentemente a hebras de ácido nucleico opuestas e internamente en el dúplex; y/o en donde la primera y la segunda hebra de ácido nucleico están unidas covalentemente.
6. Un método para detectar la actividad de una enzima de mellado y una polimerasa en una reacción que comprende:
- 45 a) la puesta en contacto de un dúplex de ácido nucleico con una enzima de mellado, en donde el dúplex comprende:

- i) una primera hebra de ácido nucleico que comprende un sitio de reconocimiento para la enzima de mellado, un sitio de mella y un marcador detectable fluorescente unido covalentemente al extremo 3'; y
- ii) una segunda hebra de ácido nucleico que tiene una secuencia capaz de formar un dúplex con la primera hebra y una fracción extintora en el extremo 5';
- 5 o
- i) una primera hebra de ácido nucleico que comprende un sitio de reconocimiento para la enzima de mellado, un sitio de mella y una fracción extintora unida covalentemente al extremo 3'; y
- ii) una segunda hebra de ácido nucleico que tiene una secuencia capaz de formar un dúplex con la primera hebra y un marcador detectable fluorescente unido covalentemente al extremo 5';
- 10 en donde la primera hebra de ácido nucleico está modificada en uno o más nucleótidos entre el sitio de reconocimiento para la enzima de mellado y el sitio de mella; y/o
- en donde la primera hebra de ácido nucleico está modificada en una o más posiciones dentro del sitio de reconocimiento para la enzima de mellado;
- b) la puesta en contacto del dúplex mellado con una polimerasa en presencia de dNTP;
- 15 c) la extensión por la polimerasa, con lo que se desplaza la porción de la primera hebra de ácido nucleico 3' del sitio de mella unida covalentemente al marcador detectable fluorescente o a la fracción extintora; y
- d) la detección de una señal del marcador detectable fluorescente separado del extintor, con lo que se detecta la actividad de la enzima de mellado y la polimerasa en la reacción.
7. Un método para amplificar un producto específico en una reacción de amplificación por mellado, en donde el método comprende:
- 20 a) la puesta en contacto de una molécula de ácido nucleico diana, a una única temperatura o a una temperatura que varía solo en 1, 2, 3, 4 o 5 grados, con dos o más cebadores, cada uno de los cuales se une específicamente a una molécula de ácido nucleico diana, en presencia de una polimerasa, dNTP, una enzima de mellado y un dúplex que comprende:
- 25 i) una primera hebra de ácido nucleico que comprende un sitio de reconocimiento para la enzima de mellado, un sitio de mella y un marcador detectable fluorescente unido covalentemente al extremo 3'; y
- ii) una segunda hebra de ácido nucleico que tiene una secuencia capaz de formar un dúplex con la primera hebra y una fracción extintora en el extremo 5';
- o
- 30 i) una primera hebra de ácido nucleico que comprende un sitio de reconocimiento para la enzima de mellado, un sitio de mella y una fracción extintora unida covalentemente al extremo 3'; y
- ii) una segunda hebra de ácido nucleico que tiene una secuencia capaz de formar un dúplex con la primera hebra y un marcador detectable fluorescente unido covalentemente en el extremo 5';
- 35 en donde la primera hebra de ácido nucleico está modificada en uno o más nucleótidos entre el sitio de reconocimiento para la enzima de mellado y el sitio de mella; y/o
- en donde la primera hebra de ácido nucleico está modificada en una o más posiciones dentro del sitio de reconocimiento de la enzima de mellado;
- b) la generación de amplicones que comprenden al menos una porción de dicha molécula de ácido nucleico diana;
- 40 c) el mellado del dúplex y la extensión por la polimerasa, con lo que se desplaza la porción de la primera hebra de ácido nucleico 3' del sitio de mella unida covalentemente al marcador detectable fluorescente o a la fracción extintora; y
- d) la detección de una señal del marcador detectable fluorescente separado del extintor, con lo que se detecta la actividad de la enzima de mellado y la polimerasa en la reacción.
8. El método de la reivindicación 7, que comprende además la puesta en contacto de la molécula de ácido nucleico con dos o más cebadores en presencia de una sonda polinucleotídica detectable; y
- 45 e) la detección de una señal específica de la hibridación de la sonda oligonucleotídica con la molécula de ácido nucleico diana o un amplicón de la misma, en donde la señal indica la cantidad de la molécula de ácido nucleico

diana o un amplicón de la misma presente en la muestra; y/o

en donde la detección de una señal del dúplex se usa como control positivo.

- 5 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en donde cuando la señal del dúplex alcanza una fluorescencia relativa establecida (UFR) indica el punto final de la monitorización de la reacción de amplificación por mellado.
10. El método de la reivindicación 9, en donde la reacción se realiza a una única temperatura o a una temperatura que varía solo en 1, 2, 3, 4 o 5 grados.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde la reacción comprende además cebadores, sondas y/o moléculas de ácido nucleico diana; y/o
- 10 en donde las hebras de ácido nucleico tienen secuencias que no se unen a otras moléculas de ácido nucleico presentes en la reacción; y/o
- en donde el marcador detectable fluorescente del dúplex de ácido nucleico y el marcador detectable fluorescente de la sonda son diferentes; y/o
- 15 en donde el marcador detectable fluorescente unido covalentemente a la primera hebra de ácido nucleico es FAM, TET, HEX, TAMRA, JOE o ROX; y/o
- en donde la fracción extintora unida covalentemente a la segunda hebra de ácido nucleico es 5' Iowa Black® RQ (5labRQ), dabculo, dabsilo, o un colorante Black Hole Quencher; y/o
- en donde el extremo 3' del segundo ácido nucleico está modificado mediante un espaciador C3, un didesoxinucleótido, fosforilación, un colorante, un fluoróforo, un extintor, un espaciador o un conector; y/o
- 20 en donde la primera hebra de ácido nucleico está modificada en uno o más nucleótidos en las posiciones 1 o 2, 5' del sitio de mella y en la posición 1, 3' del sitio de mella; y/o
- en donde el uno o más nucleótidos modificados comprenden un 2'-O-metilo, 2'-metoxietoxi, 2'-flúor, 2'-hidroxilo (ARN), 2'-alilo, 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo], 4'-tio, 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'-puente, 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2'-puente y 2'-O-(N-metilcarbamato), una metilación, una biotilación, un aducto de un nucleótido o un análogo de una base; y/o
- 25 en donde la enzima de mellado es Nt.BstNBI, N.Bst9I, N.BstSEI, Nb.BbvCI, Nb.Bpu10I, Nb.BsmI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, Nt.AlwI, Nt.BbvCI, Nt.Bpu10I, Nt.BsmAI, Nt.BspD6I, Nt.BspQI o Nt.CviPII; y/o
- en donde la polimerasa es ADN polimerasa I Bst, ADN polimerasa Bsu, ADN polimerasa I Gst o ADN polimerasa I Gka; en otras realizaciones, las polimerasas ejemplares incluyen, pero no se limitan a BST (fragmento mayor), ADN polimerasa I (*E. coli*), ADN polimerasa I, fragmento mayor (Klenow), fragmento de Klenow (3'-5' exo-), ADN polimerasa T4, ADN polimerasa T7, ADN polimerasa Deep VentR (exo-), ADN polimerasa Deep VentR, DyNAzima, ADN polimerasa de alta fidelidad Thermo, ADN polimerasa Thermo II, ADN polimerasa AmpliTherm, ADN polimerasa Taq, ADN polimerasa Tth, ADN polimerasa Tfl, ADN polimerasa Tgo, ADN polimerasa SP6, ADN polimerasa Tbr, o fragmentos activos de las mismas; y/o
- 30 en donde el dúplex de ácido nucleico tiene entre 30 pb y 2 kb de longitud, entre 100 pb y 1 kb de longitud, entre 100 y 500 pb de longitud, entre 30 y 200 pb de longitud, entre 30 y 60 pb de longitud o entre 35 y 50 pb de longitud; y/o
- en donde las hebras de ácido nucleico tienen entre 30 y 2000 nt de longitud, entre 100 y 1000 nt de longitud, entre 100 y 500 nt de longitud, entre 30 y 100 nt de longitud, entre 30 y 60 nt de longitud o entre 35 y 50 nt de longitud; y/o
- 40 en donde la longitud de la hebra de ácido nucleico 3' del sitio de corte es de 25 nt, 35 nt, 40 nt o más; y/o
- en donde la longitud de la hebra de ácido nucleico 5' del sitio de corte es de 10 nt, 15 nt, 20 nt o más.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en donde la longitud de la hebra de ácido nucleico 5' del sitio de reconocimiento para la enzima de mellado es de 10 nt, 5 nt, 3 nt o menos.
13. El método de la reivindicación 12, en donde la longitud de la hebra de ácido nucleico 5' del sitio de reconocimiento para la enzima de mellado es de 4, 3, 2 o 1 nt.
- 45 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7-13, en donde la primera y la segunda hebra de ácido nucleico están unidas covalentemente; y/o que comprende el uso de uno o más dúplex de ácido nucleico que difieren en su modificación.
15. Un kit para detectar la actividad de una enzima de mellado y una polimerasa en una reacción, en donde el kit

comprende un sustrato para una reacción de mellado y extensión que comprende un dúplex de ácido nucleico, en donde el dúplex comprende:

- a) una primera hebra de ácido nucleico que comprende un sitio de reconocimiento para la enzima de mellado, un sitio de mella y un marcador detectable fluorescente unido covalentemente al extremo 3'; y
  - 5 b) una segunda hebra de ácido nucleico que tiene una secuencia capaz de formar un dúplex con la primera hebra y una fracción extintora en el extremo 5';
  - o
  - i) una primera hebra de ácido nucleico que comprende un sitio de reconocimiento para la enzima de mellado, un sitio de mella y una fracción extintora unida covalentemente al extremo 3'; y
  - 10 ii) una segunda hebra de ácido nucleico que tiene una secuencia capaz de formar un dúplex con la primera hebra y un marcador detectable fluorescente unido covalentemente al extremo 5',
- en donde la primera hebra de ácido nucleico está modificada en uno o más nucleótidos entre el sitio de reconocimiento para la enzima de mellado y el sitio de mella; y/o
- 15 en donde la primera hebra de ácido nucleico está modificada en una o más posiciones dentro del sitio de reconocimiento para la enzima de mellado.

FIGURA 1A

Control generalizado de la reacción de doble actividad enzimática

■ ≙ GAGTC  
 ▨ ≙ Sitio de mella

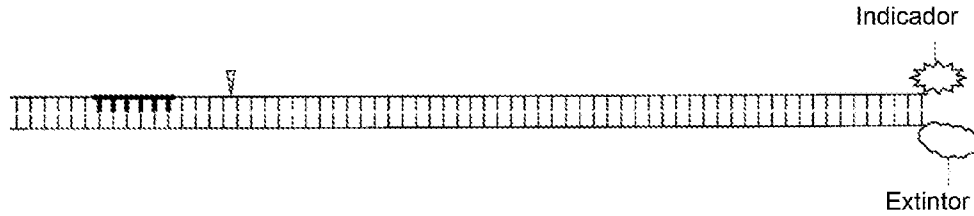


FIGURA 1B

Dúplex oligonucleotídico con un oligonucleótido marcado con un fluoróforo en un extremo y el otro oligonucleótido con un extintor en el extremo opuesto que conduce a la extinción de la señal fluorescente cuando hibridan. Es decir, un marcador FAM en 3' y un extintor (o una molécula FRET como HEX) en 5'.

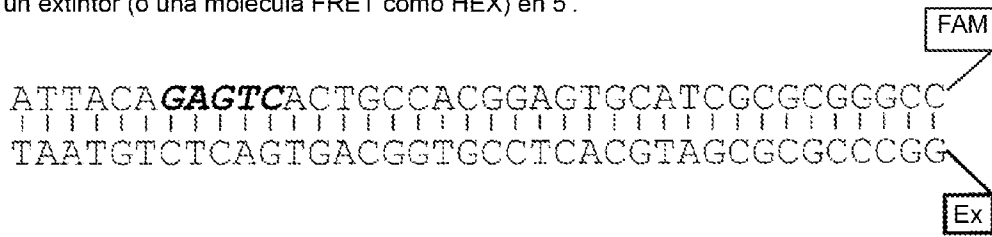


FIGURA 1C

La enzima de mellado produce una mella el dúplex oligonucleotídico

▨ Sitio de mella

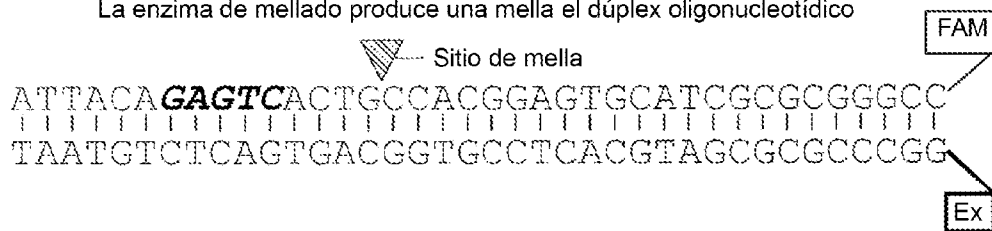


FIGURA 1D

La polimerasa se pone en contacto en el sitio de mella

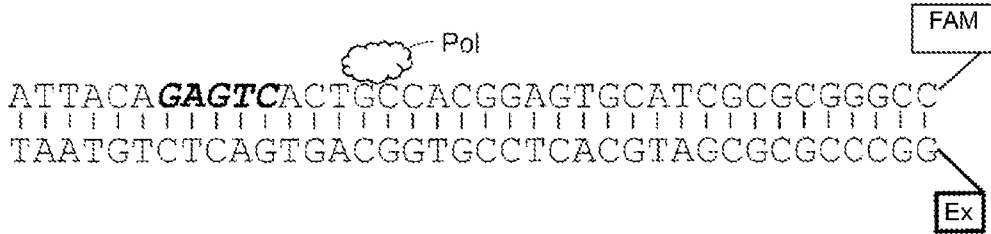


FIGURA 1E

La polimerasa extiende el extremo 3' desplazando la hebra superior 3' del sitio de mella, lo que permite que el colorante indicador emita fluorescencia.

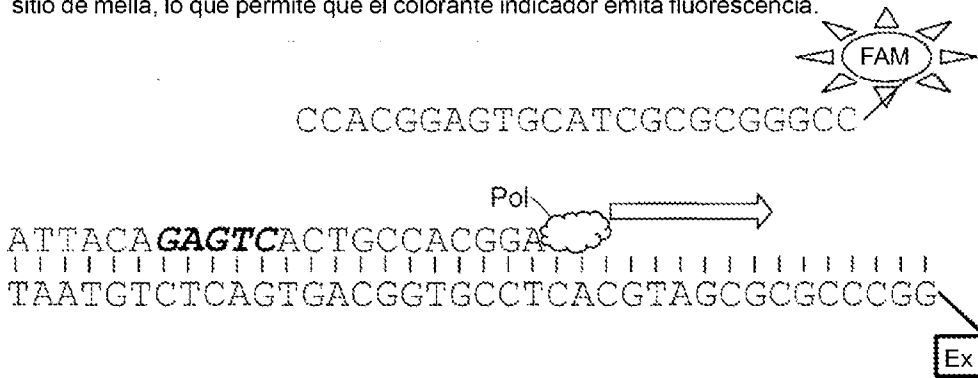


FIGURA 1F

La molécula puede mellarse de nuevo. Esto puede dar lugar a la generación de "shortmer" adicionales, cuyo diseño puede hacer que se unan a sí mismos para "cancelar" la reacción. Adicionalmente, la secuencia de la región 5' del sitio de mella puede diseñarse para ser inestable a la temperatura de reacción, de modo que pueda disociarse y así se impida la extensión a partir del extremo 3' libre.

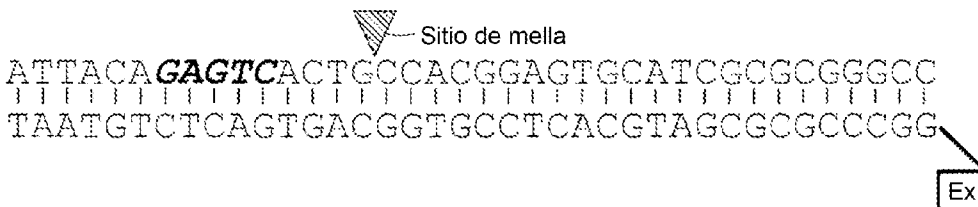


FIGURA 2A

- La reacción crea un aumento lineal de la señal con oligonucleótidos bloqueados en 3' (bloqueados por un fluoróforo u otra molécula bloqueante como un espaciador C3).

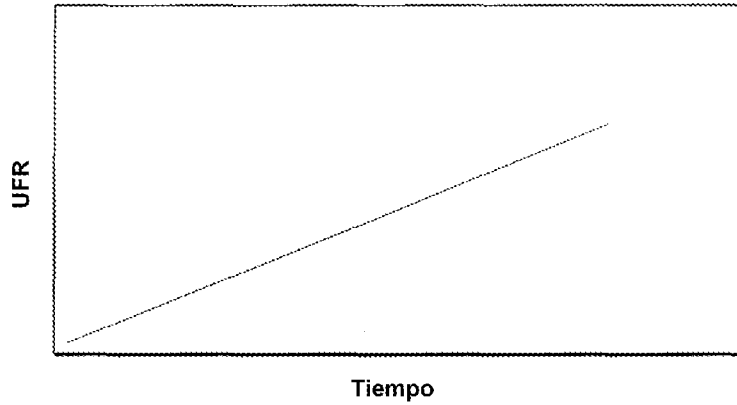
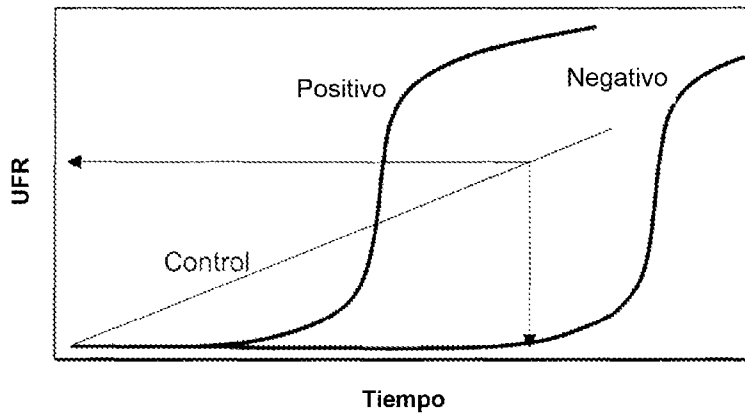


FIGURA 2B

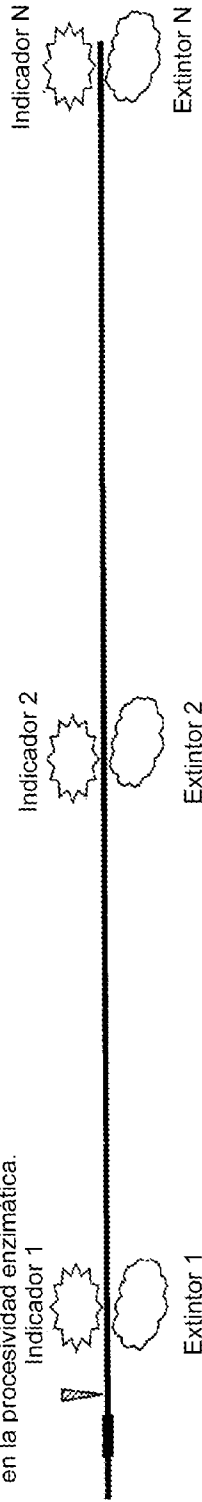
Los puntos finales de la reacción pueden quedar determinados por el tiempo en que el control exógeno alcanza un valor UFR establecido



**FIGURA 3A**

“Longmer” generalizado de doble actividad enzimática

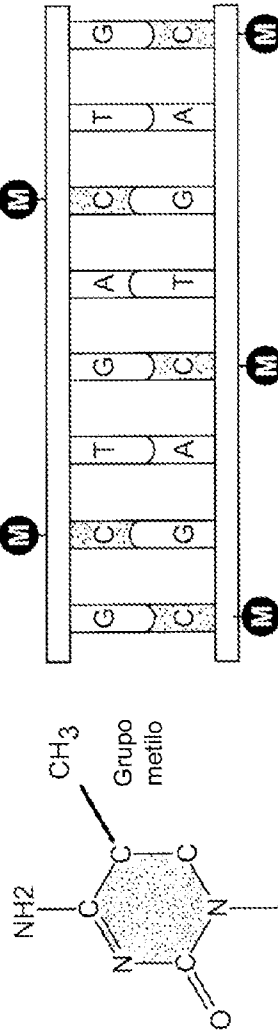
- Múltiples indicadores (pueden ser colores diferentes para indicar la procesividad de la polimerasa).
- Un extintor por cada indicador.
- Molécula de ADNbc de hasta 2000 pb.
- Puede contener bases modificadas, aductos, etc., para investigar el efecto de estas modificaciones en la procesividad enzimática.



**FIGURA 3B**

La utilidad de la versión “longmer” incluye, pero no se limita a la investigación de:

- La procesividad de la polimerasa sobre un molde de ADN para evaluar la actividad de la polimerasa (es decir, para el control de calidad en la fabricación).
- La metilación del ADN: los sitios de metilación de ADN son normalmente la citosina de los sitios CpG en la posición C5 (5-metilcitosina).



- Productos que causan aductos/daños en el ADN. Los ejemplos incluyen acetaldehído, cisplatino, 7,12-dimetilbenzantraceno, malondialdehído, productos de reparación por escisión de bases, productos de daño oxidativo, benzopireno, aflatoxina u otros compuestos reactivos con ADN.
- Proteínas de unión a ADN.

FIGURA 4

ExogContBOT	38	/5IAbRQ/GGCCCGCGCGATGCCACTCCGTTGGCAGTGCACCTGTGTAAT
Vainilla	38	ATTACA <b>GAGTCACT</b> GCCACGGAGTGCATCGCGGGGCC/36-FAM/
Mella -2	38	ATTACA <b>GAGTCACT</b> mUGCCACGGAGTGCATCGCGGGGCC/36-FAM/
Mella +1	38	ATTACA <b>GAGTCACT</b> mCCACGGAGTGCATCGCGGGGCC/36-FAM/
Mella -1	38	ATTACA <b>GAGTCACT</b> mGCCACGGAGTGCATCGCGGGGCC/36-FAM/

FIGURA 5A

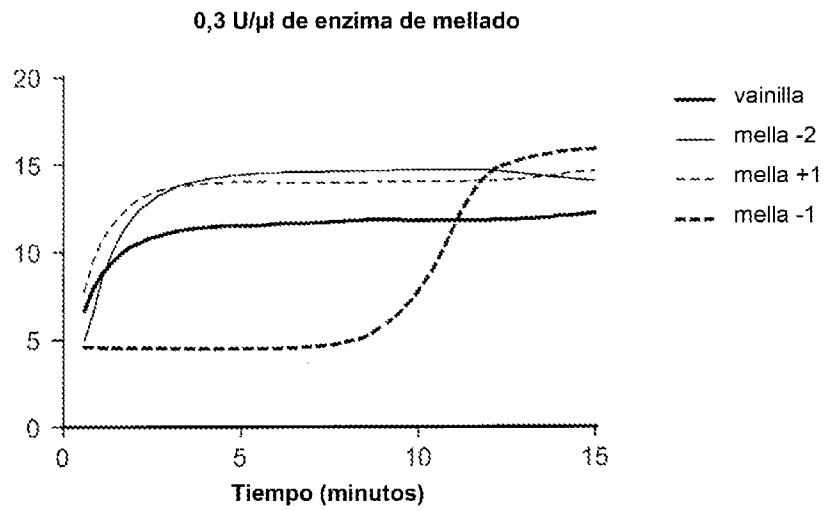


FIGURA 5B

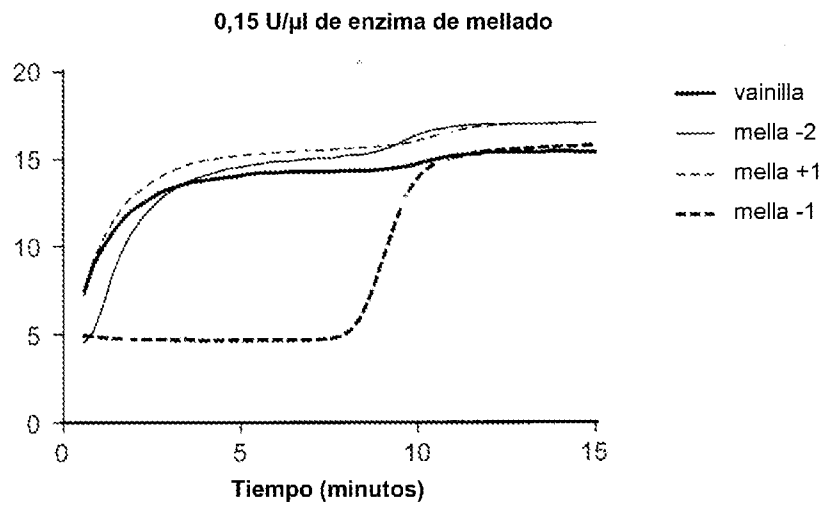


FIGURA 5C 0,75 U/ $\mu$ l de enzima de mellaado

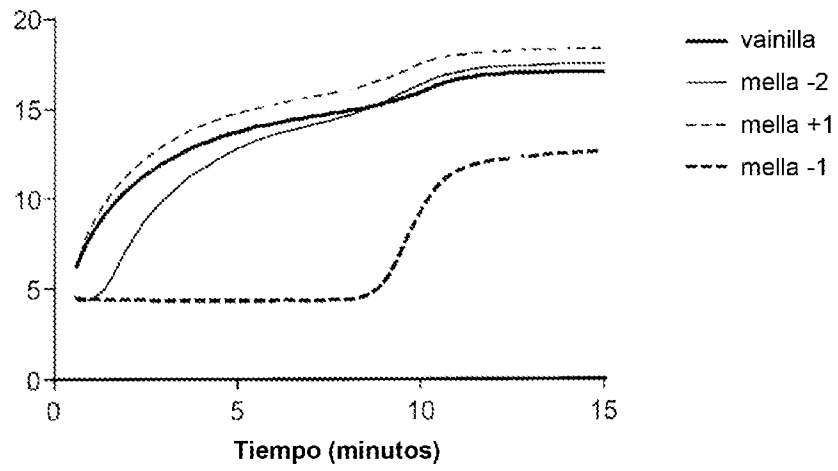


FIGURA 5D 0,0375 U/ $\mu$ l de enzima de mellaado

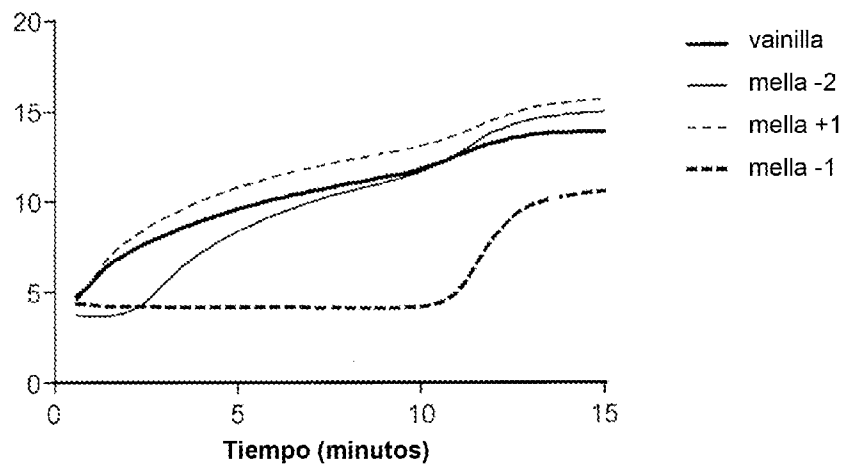


FIGURA 5E

0,0188 U/ $\mu$ l de enzima de melado

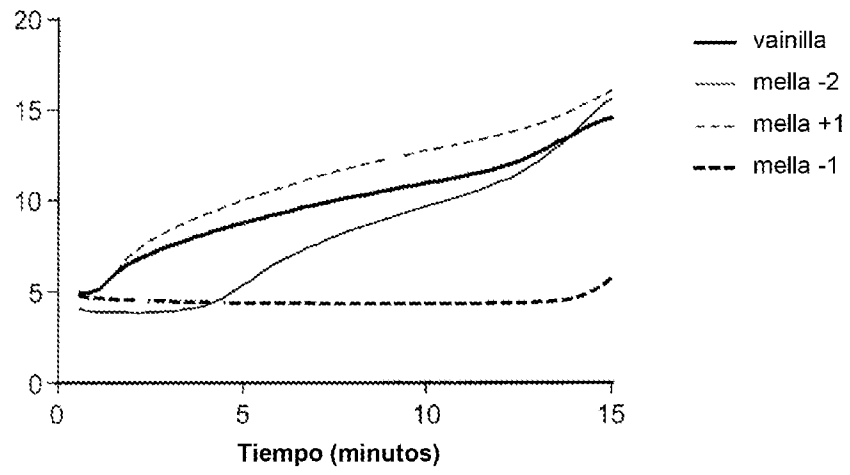


FIGURA 6A

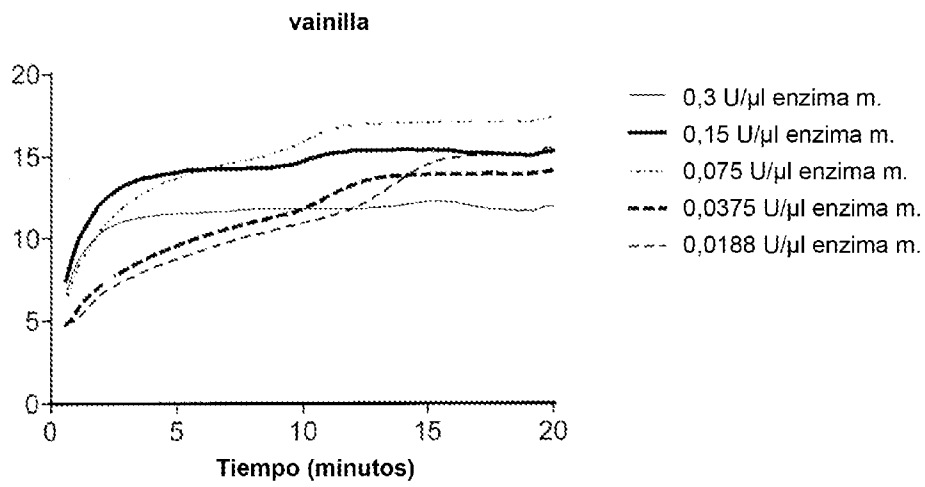


FIGURA 6B

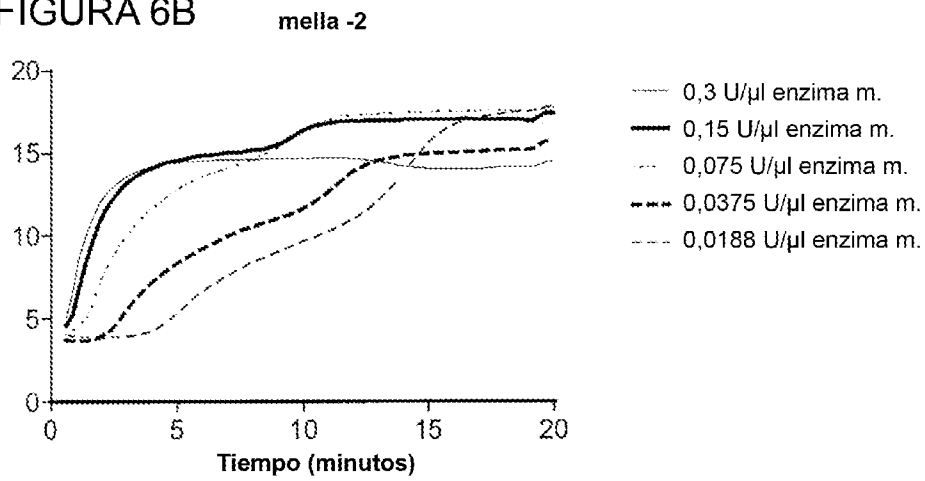


FIGURA 6C

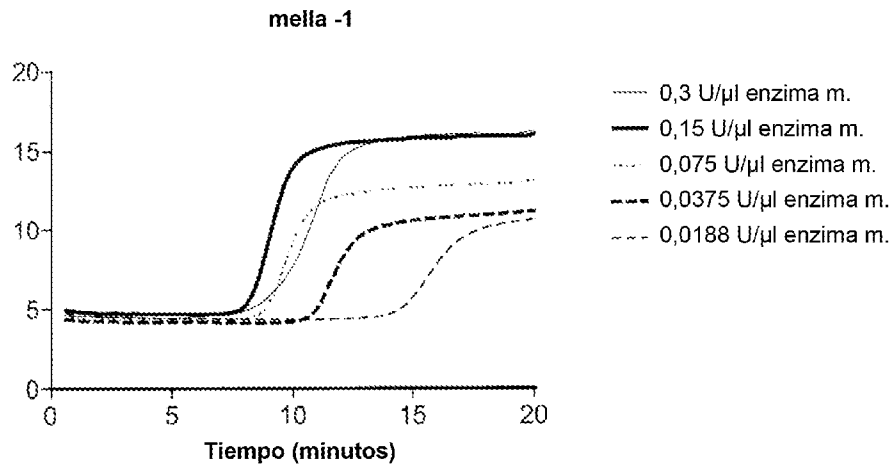


FIGURA 6D

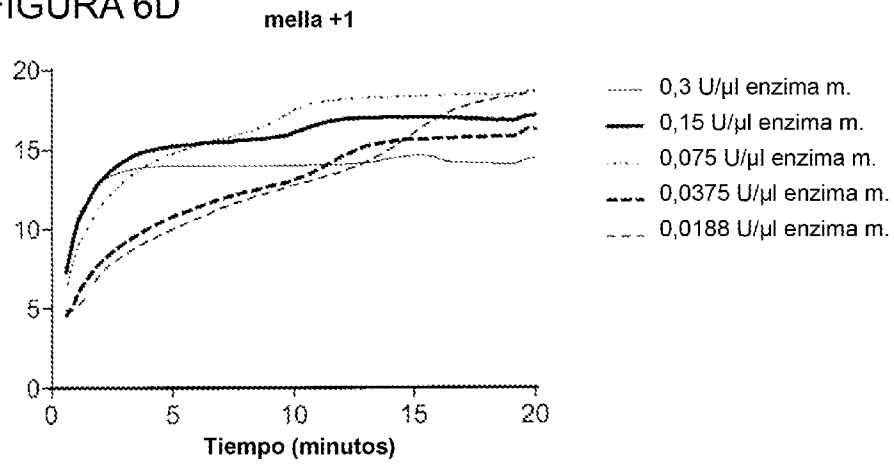
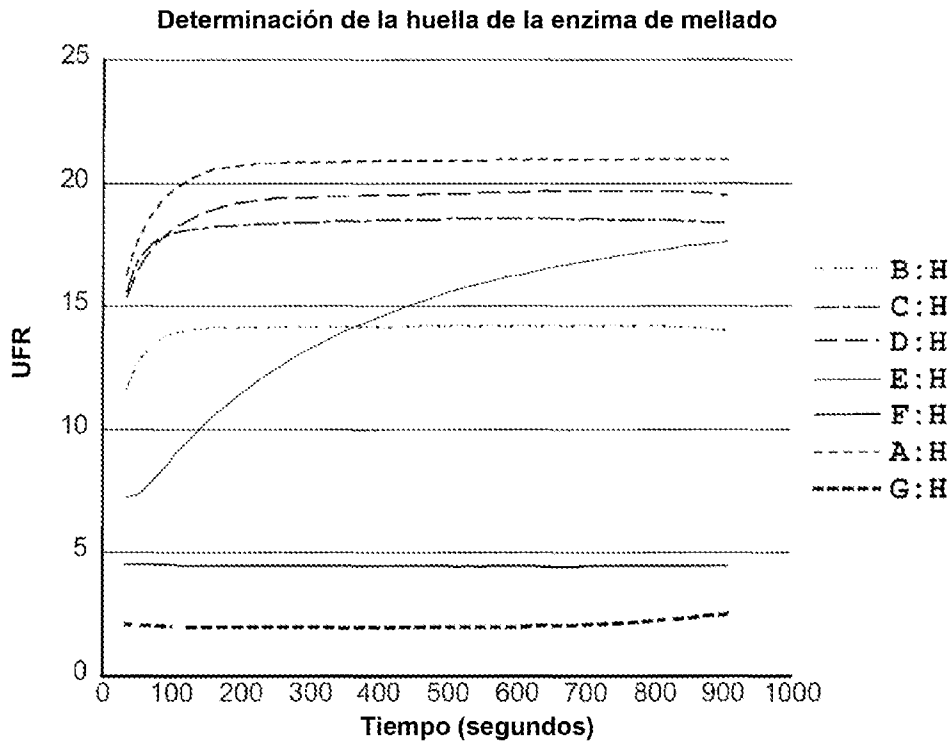


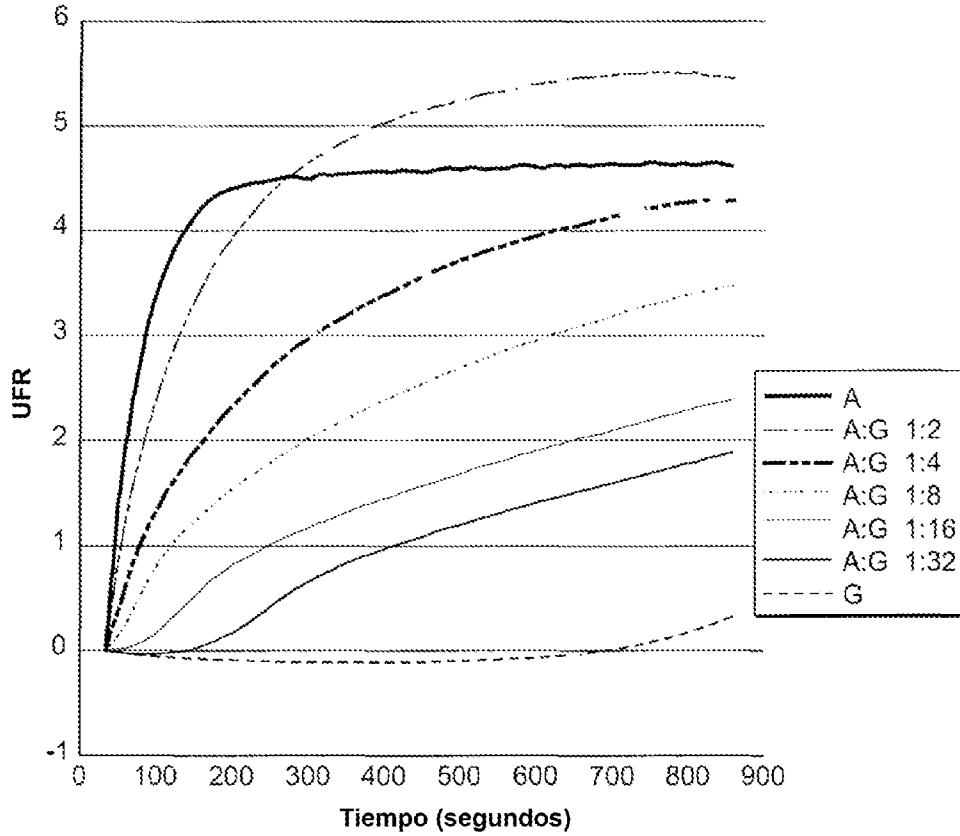
FIGURA 7



- A     ATTACAGAGTCACTGCCACGGAGTGCATCGCGCGGGCC/36-FAM/  
 B     TACAGAGTCACTGCCACGGAGTGCATCGCGCGGGCC/36-FAM/  
 C     ACAGAGTCACTGCCACGGAGTGCATCGCGCGGGCC/36-FAM/  
 D     CAGAGTCACTGCCACGGAGTGCATCGCGCGGGCC/36-FAM/  
 E     AGAGTCACTGCCACGGAGTGCATCGCGCGGGCC/36-FAM/  
 F     GAGTCACTGCCACGGAGTGCATCGCGCGGGCC/36-FAM/  
 G     ATTACAGAGTCACTmGmCCACGGAGTGCATCGCGCGGGCC/36-FAM/  
 H     /5IAbRQ/GCCCCGCGGATGCACTCCGTGGCAGTGACTCTGTAAT-C3sp

FIGURA 8

Ajuste de la reacción para la hebra superior con hebra inferior constante "H"



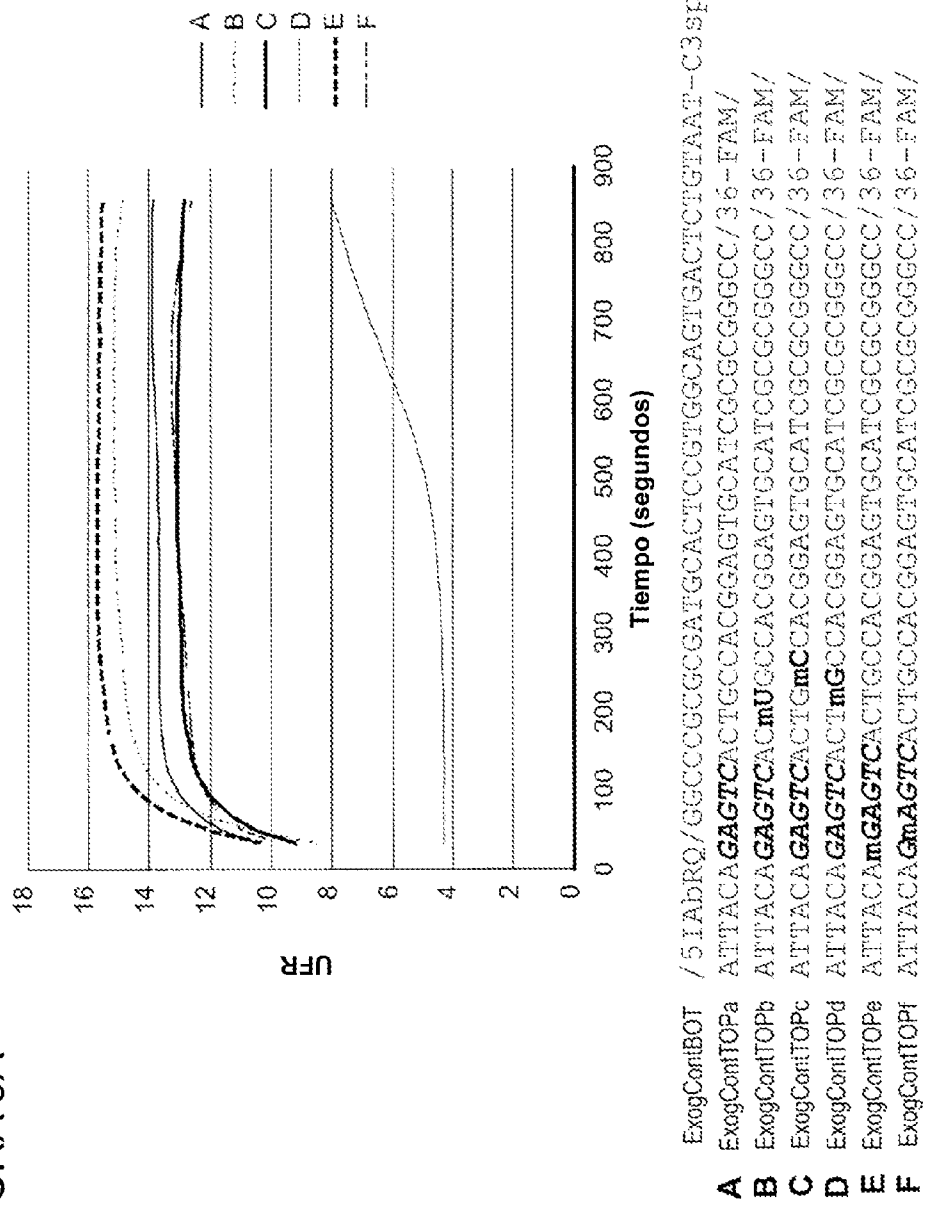
A ATTACAGAGTCACT G CCACGGAGTGCATCGCGGGCC/36-FAM/

G ATTACAGAGTCACTmGmCCACGGAGTGCATCGCGGGCC/36-FAM/

H /5IAbRQ/GGCCC GCGGATGCACTCCGTGGCAGTGACTCTGTAAT-C3sp

FIGURA 9A

Ajustabilidad del control exógeno con sustituciones por bases con MeO



Ajustabilidad del control exógeno con sustituciones por bases con MeO

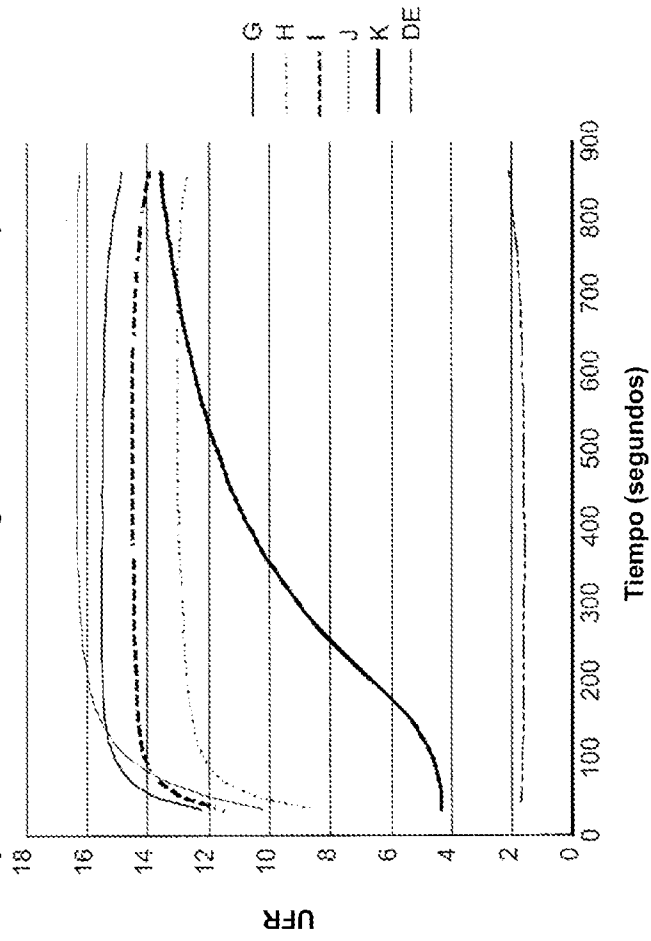
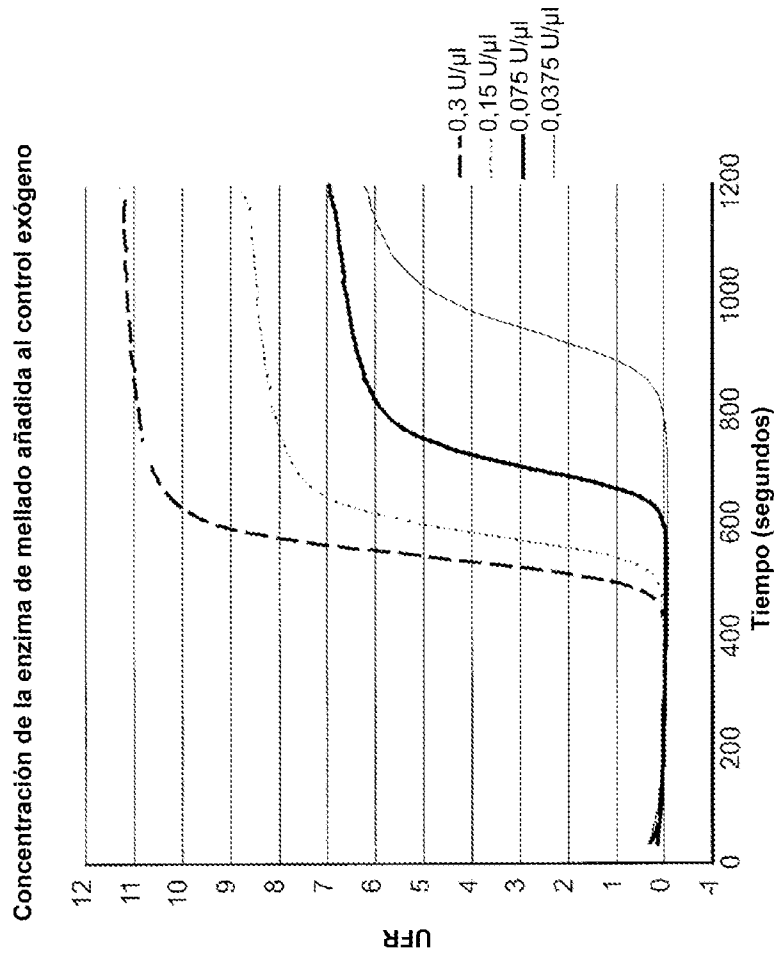


FIGURA 9B

Label	Sequence
G	ExogContBOI / 51AbRQ/ GGCCCGCGGGATGCACCTCGGTGGSDAGTGACTCTGTAAAT--C3SP
H	ExogContTOPg ATTACAGAmGTCACCTGCCACGGAGTGCATCGCCCGGGCC/36-FAM/
I	ExogContTOPh ATTACAGAGmUCACTGCCACGGAGTGCATCGCCCGGGCC/36-FAM/
J	ExogContTOPi ATTACAGAGImCACTGCCACGGAGTGCATCGCCCGGGCC/36-FAM/
K	ExogContTOPj ATTACAmGAGTCmACTGCCACGGAGTGCATCGCCCGGGCC/36-FAM/
DE	ExogContTOPk ATTACAmGAGTCmCTGCCACGGAGTGCATCGCCCGGGCC/36-FAM/
	ExogContTOPde ATTACAGAGTCACTmGmCCACGGAGTGCATCGCCCGGGCC/36-FAM/

FIGURA 10



/ 51AbBQ / GGCCGGGGGATGCACTCCGGTGGCAGTGACTCTGTAAAT  
ATTACA**GACTCACTm**GCCACGGAGTGCATCGGCGGGCC / 36-FAM/

**FIGURA 11** Control exógeno/interno final

Nombre del oligonucleótido	Secuencia y modificaciones	Conc. final en la reacción
Exog Cont BOTC3	BHQ-1 -GGCCGGCCGATGCACCTCCGTGGCAGTGACTCTGTAAAT-esp. C3 purificado por HPLC	125nM
ExogContIQPn	CAGAGTCACTGCCACGGAGTGTCATCGCGGGGCC/36-FAM/ purificado por HPLC	125nM

