



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 281 880**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **05102891 .8**

(86) Fecha de presentación : **13.04.2005**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1586662**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **19.10.2005**

(54) Título: **Procedimiento de detección de ácidos nucleicos que usa múltiples pares de fluoróforos donadores y moléculas inhibidoras de la fluorescencia en la misma sonda.**

(30) Prioridad: **14.04.2004 US 825943**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.10.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.10.2007

(73) Titular/es: **Becton Dickinson and Company**
1 Becton Drive
Franklin Lakes, New Jersey 07417, US

(72) Inventor/es: **Collis, Matthew P.**

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Procedimiento de detección de ácidos nucleicos que usa múltiples pares de fluoróforos donadores y moléculas inhibidoras de la fluorescencia en la misma sonda.

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a procedimientos para detectar secuencias diana de ácidos nucleicos. En particular, la presente invención se refiere a un oligonucleótido detector que comprende múltiples fluoróforos que es útil para la detección altamente sensible de ácidos nucleicos.

Antecedentes de la invención

La identificación de secuencias únicas de ADN o ARN o genes específicos dentro de una muestra biológica puede indicar la presencia de un estado fisiológico o patológico tal como cáncer o una infección patógena. Por ejemplo, los ensayos de hibridación de ácidos nucleicos pueden usarse en la industria agrícola y alimentaria para detectar patógenos vegetales o bacterias dañinas.

Los marcajes luminiscentes, que emiten luz tras la excitación por una fuente de energía externa, han resultado ser útiles para detectar moléculas de ácidos nucleicos y para investigar la interacción entre estas moléculas. Estos marcajes se clasifican por la fuente de la energía de excitación, tal como, por ejemplo: (1) marcajes fotoluminiscentes o fluorescentes, que pueden excitarse mediante unidades de radiación electromagnética de luz infrarroja, visible o ultravioleta; (2) marcajes quimioluminiscentes, que obtienen energía de reacciones químicas; (3) marcajes radioluminiscentes, que pueden excitarse mediante energía de partículas de alta energía; y (4) marcajes bioluminiscentes, que pueden excitarse mediante energía suministrada en un sistema biológico. El uso de marcajes luminiscentes permite técnicas de ensayo "homogéneas" en las que una sonda marcada con un marcaje luminiscente presenta diferentes características luminiscentes cuando se asocia con una diana, obviándose así la necesidad de eliminar la sonda marcada no asociada. Véase, por ejemplo, Morrison y col., *Anal. Biochem.* 183: 231 (1989).

Los marcajes luminiscentes también han resultado ser útiles en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Los cebadores de señal luminiscente (también denominados en lo sucesivo "sondas detectoras"), que hibridan con una secuencia diana en dirección 3' desde el sitio de hibridación de los cebadores de amplificación, se han descrito para uso en la detección de amplificación de ácidos nucleicos. Véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. número 5.547.861. Un cebador de señal se alarga mediante la polimerasa de un modo similar al alargamiento de los cebadores de amplificación. El alargamiento del cebador de amplificación desplaza el producto de alargamiento del cebador de señal de un modo dependiente de la amplificación diana, produciendo un producto de amplificación secundario detectable de cadena doble que indica la amplificación de diana. Los productos de amplificación secundarios generados a partir de cebadores de señal pueden detectarse por diversos medios, como se ilustra en la patente de los EE.UU. número 5.550.025 (incorporación de colorantes lipófilos y sitios de restricción) y la patente de los EE.UU. número 5.593.867 (detección de la polarización de fluorescencia).

Se ha usado ventajosamente la transferencia de energía de fluorescencia para investigar la interacción entre ácidos nucleicos complementarios en diversos procedimientos de hibridación. La transferencia de energía fluorescente se produce entre un fluoróforo donador y una molécula inhibidora de la fluorescencia (que puede o no ser un fluoróforo) cuando el espectro de absorción del inhibidor de la fluorescencia se solapa con el espectro de emisión del donador y los dos están suficientemente próximos. La energía del estado excitado del donador se transfiere mediante una interacción dipolo de resonancia-dipolo inducido al inhibidor de la fluorescencia vecino, dando como resultado la inhibición de la fluorescencia del donador. En algunos casos, si el inhibidor de la fluorescencia también es un fluoróforo, puede mejorarse la intensidad de su fluorescencia. La eficiencia de la transferencia de energía depende de la distancia entre el donador y el inhibidor de la fluorescencia de un modo bien conocido en la técnica.

Recientemente se han empleado sondas o cebadores que comprenden estructuras secundarias de bases intramolecularmente apareadas que pueden presentar cambios en la inhibición de la fluorescencia para detectar secuencias diana de ácidos nucleicos. En estos sistemas, un donador y un fluoróforo que inhibe la fluorescencia, que están muy próximos en la estructura secundaria de bases apareadas de la sonda o cebador, llegan a separarse espacialmente debido al despliegue de la estructura secundaria debido al apareamiento de bases con una diana. La separación dependiente de diana de los dos fluoróforos reduce la inhibición de la fluorescencia del fluoróforo donador, que aumenta la intensidad de fluorescencia del donador. Por ejemplo, un oligonucleótido autocomplementario marcado con fluoróforos en sus extremos 5' y 3' forma una horquilla que sitúa muy próximos los dos fluoróforos de tal manera que puede producirse la transferencia de energía y la inhibición de la fluorescencia. La hibridación del oligonucleótido autocomplementario con su complemento en un oligonucleótido diana afecta a la horquilla y aumenta la distancia entre los dos fluoróforos, reduciéndose así la inhibición de la fluorescencia. Las estructuras de horquilla marcadas de este modo se describen, por ejemplo, por Tyagi y col., *Nature Biotech.* 14: 303-308 (1996).

Una desventaja de la estructura de horquilla es que es muy estable y la conversión a la forma hibridada no inhibidora de la fluorescencia es frecuentemente lenta y sólo está favorecida energéticamente de manera moderada. En el caso de las estructuras descritas, por ejemplo, en Tyagi y col., como arriba, la secuencia diana debe competir por la hibridación con la secuencia complementaria que forma la estructura de horquilla, disminuyendo así el rendimiento.

También se ha descrito un cebador de señal de cadena parcialmente sencilla, de cadena parcialmente doble, marcado con un par donador/inhibidor de la fluorescencia. Por ejemplo, el documento EP0878554 describe un cebador de señal con un par donador/inhibidor de la fluorescencia que flanquea un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de cadena sencilla. En presencia de la diana, el sitio de restricción se vuelve de cadena doble y puede escindirse mediante una endonucleasa de restricción. La escisión separa el par donador/inhibidor de la fluorescencia para disminuir la inhibición de la fluorescencia del donador.

Otros procedimientos han empleado sitios de endonucleasa de restricción para separar un par donador/aceptor. La patente japonesa número 93015439B describe procedimientos para medir polinucleótidos mediante hibridación de una diana de cadena sencilla con una sonda de polinucleótido de cadena sencilla marcada con un par de transferencia de energía. El híbrido de cadena doble se escinde entonces entre los marcajes por una enzima de restricción y se mide la fluorescencia de uno de los marcajes. Una desventaja de este procedimiento es que el sitio de restricción en la sonda también debe estar presente en la secuencia diana que va a detectarse. Ghosh y col., *Nucl. Acids Res.* 22: 3155-3159 (1994) describen la escisión catalizada por enzimas de restricción de un oligonucleótido marcado con fluoróforo, que se analiza usando transferencia de energía por resonancia de fluorescencia. En este ensayo, un oligonucleótido marcado se hibrida con una secuencia complementaria que también está marcada para producir un sitio de restricción de cadena doble que puede escindirse. Una desventaja de este procedimiento es la necesidad de modificar cada una de las dos cadenas con un marcaje fluorescente.

También se ha usado un par donador/aceptor en procedimientos de amplificación, tal como un procedimiento de amplificación por desplazamiento de cadenas (SDA) descrito en las patentes de los EE.UU. números 5.919.630; 5.846.726; y 6.054.729. Estas patentes describen un cebador de señal de cadena sencilla que se modifica mediante unión a un par donador/aceptor. El cebador de señal puede comprender adicionalmente un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción entre el donador y el aceptor. Cuando el cebador de señal forma un dúplex con una secuencia diana complementaria, el sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción resulta de cadena doble y puede escindirse o cortarse por una endonucleasa de restricción. La escisión o corte separa el donador y aceptor y se detecta un cambio en la fluorescencia debido a la disminución de la inhibición de la fluorescencia como una indicación de la amplificación de secuencia diana.

Queda la necesidad de procedimientos mejorados para detectar secuencias de nucleótidos. Específicamente, existe la necesidad de mejorar la relación entre una señal de fluorescencia indicativa de amplificación de diana y una señal de fondo creada por dispersión de la luz y fluorescencia no inhibida. También existe la necesidad de medios más eficaces de detección de la amplificación y mayor sensibilidad de procedimientos de detección fluorescente.

Resumen de la invención

La presente invención satisface estas necesidades proporcionando un oligonucleótido detector que comprende múltiples pares de un fluoróforo donador y una molécula inhibidora de la fluorescencia, estando separados los pares por un sitio de escisión que puede escindirse enzimática o químicamente. El oligonucleótido detector de la presente invención puede usarse con amplificación en un sistema de ensayo homogéneo para detectar una secuencia de nucleótidos, o el oligonucleótido detector pueden usarse en un sistema de ensayo heterólogo sin amplificación. El uso de múltiples pares donador/inhibidor de la fluorescencia aumenta la relación entre una señal de fluorescencia indicativa de amplificación de diana y una señal de fondo, aumentando así tanto la sensibilidad como la eficiencia de la detección. Mediante el uso de múltiples fluoróforos en el mismo oligonucleótido detector se consigue un beneficio adicional. Concretamente, la reacción de amplificación es más eficaz debido a que sólo se requiere una molécula adaptadora complementaria para alargar el oligonucleótido detector. Además, se requiere menos oligonucleótido detector para generar la misma señal que otros detectores.

Un donador fluoróforo del presente oligonucleótido detector está suficientemente próximo a una molécula inhibidora de la fluorescencia para que se produzca la transferencia de energía entre el donador y el inhibidor de la fluorescencia. En una realización, el par donador/inhibidor de la fluorescencia puede separarse mediante tan pocas bases de ácido nucleico como sean posibles para alojar el sitio de escisión. Son posibles diversas configuraciones de moléculas donadoras e inhibidoras de la fluorescencia. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, un fluoróforo donador puede configurarse entre dos o más moléculas inhibidoras de la fluorescencia, o una molécula inhibidora de la fluorescencia puede configurarse entre dos o más fluoróforos donadores.

En una realización, el oligonucleótido detector es de cadena sencilla y comprende múltiples pares de un fluoróforo donador y una molécula inhibidora de la fluorescencia, en el que el fluoróforo donador y la molécula inhibidora de la fluorescencia en cada par están separados por un sitio que puede escindirse cuando el oligonucleótido detector forma un dúplex con un segundo oligonucleótido. El segundo oligonucleótido en esta realización puede formarse en presencia de un ácido nucleico diana.

El oligonucleótido detector puede comprender polinucleótidos que tienen una o más modificaciones químicas tales como un resto de unión para permitir la unión de las moléculas donadoras e inhibidoras de la fluorescencia. La estructura principal del oligonucleótido detector puede tener estructuras ramificadas de tal manera que el oligonucleótido detector puede alojar adicionalmente pares donador/inhibidor de la fluorescencia.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para detectar un ácido nucleico diana en una muestra usando un oligonucleótido detector de la presente invención. El procedimiento comprende poner en contacto un oligonucleótido detector (es decir, un “primer oligonucleótido”) con un segundo oligonucleótido para formar un dúplex entre el primer y el segundo oligonucleótido. El primer oligonucleótido comprende múltiples pares de fluoróforos donadores y moléculas inhibidoras de la fluorescencia, en el que los fluoróforos donadores y las moléculas inhibidoras de la fluorescencia en cada par están separados por un sitio de escisión. La presencia del segundo oligonucleótido es indicativa de la presencia del ácido nucleico diana. Los sitios de escisión son de cadena doble en el dúplex formado por el primer y el segundo oligonucleótido, que permite que los sitios de escisión se escindan para generar una señal. La detección de un cambio en un parámetro de fluorescencia de los fluoróforos donadores tras la escisión indica la presencia del ácido nucleico diana. Un experto en la materia apreciaría fácilmente que el ácido nucleico diana puede necesitar disociarse de un dúplex antes de la formación del dúplex con el oligonucleótido detector.

La detección de los fluoróforos donadores puede comprender controlar el grado y/o la velocidad de cambio de fluorescencia. En una realización, el cambio de la emisión de fluorescencia del donador se controla para indicar la presencia o ausencia, o para proporcionar un número estimado, de los ácidos nucleicos diana en la muestra. Asimismo, la etapa de control puede realizarse midiendo, entre otras cosas, un cambio en el grado y/o la velocidad de cambio de la emisión de fluorescencia de una molécula inhibidora de la fluorescencia que también es un fluoróforo.

En otro aspecto más de la presente invención se proporciona un kit que comprende un oligonucleótido detector según la presente invención. El kit también puede comprender componentes adicionales tales como patrones internos, controles, enzimas que pueden amplificar ácidos nucleicos, reactivos químicos, fluoróforos y/o inhibidores de la fluorescencia que pueden unirse a un oligonucleótido detector, además de instrucciones para usar el kit para detectar un ácido nucleico diana. El kit puede comprender adicionalmente, por ejemplo, pero no a modo de limitación, un oligonucleótido adaptador que comprende una primera parte, que puede formar un dúplex con el complemento de un oligonucleótido diana, y una segunda parte, cuyo complemento puede formar un dúplex con la primera parte del oligonucleótido detector.

Otras características y ventajas de la presente invención serán aparentes de los siguientes dibujos y la descripción de las realizaciones preferidas y también de las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra el uso del oligonucleótido detector de la invención en una reacción de amplificación para la detección de una secuencia diana.

Las figuras 2A-2F son gráficas que muestran el resultado de los experimentos realizados en el ejemplo 2, en el que un oligonucleótido detector de la invención se compara con sondas detectoras previamente conocidas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención emplea un oligonucleótido detector para detectar un ácido nucleico diana. Un oligonucleótido detector comprende múltiples pares de fluoróforos donadores y moléculas inhibidoras de la fluorescencia que proporcionan una mejora de la relación señal de la fluorescencia respecto a fondo y detección más eficaz de un ácido nucleico diana. Para el fin de la invención, “múltiples pares de fluoróforos donadores y una molécula inhibidora de la fluorescencia” es sinónimo de “múltiples pares donador/inhibidor de la fluorescencia”. Un fluoróforo donador y una molécula inhibidora de la fluorescencia en un par donador/inhibidor de la fluorescencia están separados por un sitio que puede escindirse. En una realización, el sitio puede escindirse cuando el oligonucleótido detector forma un dúplex con un segundo oligonucleótido, que se forma en presencia de un ácido nucleico diana.

Un par donador/inhibidor de la fluorescencia de la presente invención comprende un “fluoróforo donador” y una “molécula inhibidora de la fluorescencia”. Un fluoróforo donador en un estado excitado es sensible a la presencia de una molécula inhibidora de la fluorescencia muy próxima al donador. Es decir, la molécula inhibidora de la fluorescencia actúa como un aceptor de energía de resonancia que se transfiere del donador, siempre que los dos estén muy próximos. Una molécula inhibidora de la fluorescencia no necesita ser un fluoróforo para ser un aceptor de energía de resonancia. La transferencia de energía puede producirse entre un fluoróforo y una molécula inhibidora de la fluorescencia, siempre que los dos estén separados por una distancia del orden de decenas de Angstroms (por ejemplo, dentro de aproximadamente 60 Å), y siempre que el espectro de emisión de fluorescencia del donador solape significativamente con el espectro de absorción de la molécula inhibidora de la fluorescencia. El término “muy próximo” se define en este documento como la distancia entre las moléculas donadoras yceptoras que es suficiente para un cambio detectable en un parámetro de fluorescencia una vez que el donador y el inhibidor de la fluorescencia están separados.

Se controla un cambio detectable en un parámetro de fluorescencia como una indicación de la presencia de la secuencia diana. Un “parámetro de fluorescencia” incluye, pero no se limita a, un aumento en la intensidad de fluorescencia del donador, una disminución en la intensidad de fluorescencia del inhibidor de la fluorescencia (cuando la molécula inhibidora de la fluorescencia es un fluoróforo), una velocidad de cambio de la intensidad de fluorescencia, una relación de fluorescencia antes y después de la escisión, o una combinación las mismas. Se prefiere controlar un cambio en la intensidad de fluorescencia del donador debido a que este cambio es normalmente mayor que el cambio en la intensidad de fluorescencia del inhibidor de la fluorescencia. Otros parámetros de fluorescencia que pueden

usarse para detectar un cambio en una interacción entre el donador y el inhibidor de la fluorescencia incluyen, pero no se limitan a, un cambio en la anisotropía de polarización (para medir el cambio relativo en la movilidad del fluoróforo antes y después de la escisión) o un desplazamiento de la longitud de onda en un espectro de excitación o emisión. En una realización pueden usarse un algoritmo para analizar el cambio en uno o más parámetros de fluorescencia. Véanse las patentes de los EE.UU. número 6.216.049 y número 5.863.736.

Fluoróforos adecuados para la invención incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, sulforrodamina 101, pirenobutanoato, acridina, etenoadenosina, eosina, rodamina y eritrosina. En la técnica se conocen muchos pares donador/inhibidor de la fluorescencia y son útiles en la presente invención. Estos incluyen, pero no se limitan a, isotiocianato de fluoresceína (FITC)/isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), FITC/Texas Red^{MR} (sondas moleculares), FITC/N-hidroxisuccinimidil-1-pirenobutirato (PYB), FITC/isotiocianato de eosina (EITC), N-hidroxisuccinimidil-1-pirenosulfonato (PYS)/FITC, FITC/rodamina X y FITC/tetrametilrodamina (TAMRA), fluoresceína/rodamina X, rodamina X/Cy5, o fluoresceína/ácido P-(dimetil-aminofenilazo)benzoico (DABCYL). Son particularmente útiles moléculas no fluorescentes inhibidoras de la fluorescencia tales como DABCYL, DAMBI, DABSYL o rojo de metilo. DABCYL en un colorante no fluorescente inhibidor de la fluorescencia que inhibe eficazmente la fluorescencia de un fluoróforo adyacente, por ejemplo fluoresceína o 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno (EDANS). En una realización, el donador y el inhibidor de la fluorescencia son el mismo fluoróforo, en el que el fluoróforo tiene espectros de adsorción y emisión que se solapan. En la memoria descriptiva y en los siguientes ejemplos se observan ciertos pares donador/inhibidor de la fluorescencia; sin embargo, aquellos expertos en la materia apreciarán que en la presente invención son útiles otros pares. Es decir, la selección de un par donador/inhibidor de la fluorescencia particular no es crítica para la presente invención. En un par donador/inhibidor de la fluorescencia útil para la presente invención, las longitudes de onda de emisión del fluoróforo donador solapan suficientemente las longitudes de onda de excitación de la molécula inhibidora de la fluorescencia para permitir una transferencia de energía, transferencia de carga o inhibición de la fluorescencia eficaz. El donador y el inhibidor de la fluorescencia pueden unirse en sus sitios respectivos en el oligonucleótido detector usando procedimientos de marcaje terminal e interno rutinarios que son conocidos en la técnica.

Además del uso de fluoróforos donadores como un medio para detectar un polinucleótido diana, dentro de la presente invención también está el uso de otros marcajes luminiscentes, particularmente agentes quimioluminiscentes.

Los términos “diana” o “ácido nucleico diana” se refieren a ácidos nucleicos que van a detectarse que pueden ser ARN o ADN que tiene cualquiera de las configuraciones de estas moléculas que se encuentran, tales como ARNm y ADN genómico. Por ejemplo, el ácido nucleico diana puede ser de cadena sencilla o de cadena doble, o puede tener estructura secundaria. La diana de un ácido nucleico de cadena doble es la cadena para la que se busca la detección. El experto apreciará que, cuando la detección requiere la formación de un dúplex con un ácido nucleico diana de cadena doble o un ácido nucleico diana con estructura secundaria, la detección se facilitará haciendo el ácido nucleico diana de cadena sencilla. Para el fin de la invención, el ácido nucleico diana puede aislarse o ser de procedencia natural, y puede detectarse *in vitro* o *in situ*. En una realización de la invención, un procedimiento para detectar un ácido nucleico diana comprende una reacción de amplificación que está catalizada por una ADN polimerasa. Los moldes para la amplificación englobada por la presente invención incluyen el propio ácido nucleico diana, una cadena complementaria de un ácido nucleico diana y cualquier cadena de una copia de la secuencia original que se produce por replicación o amplificación. El ácido nucleico diana también puede ser un molde para el alargamiento de un molde de un cebador hibridado. En una realización, el ácido nucleico diana se deriva de un patógeno.

“Escisión” de un oligonucleótido se refiere a romper los enlaces fosfodiéster de ambas cadenas de un dúplex de ADN o ARN o romper el enlace fosfodiéster del ADN o ARN de cadena sencilla. Esto difiere de “cortar,” que se refiere a romper el enlace fosfodiéster de sólo una de las dos cadenas en un dúplex de ADN o ARN. El sitio de escisión entre el fluoróforo donador y el inhibidor de la fluorescencia puede escindirse cuando el sitio está en forma de cadena doble. Un “sitio de escisión” es un estiramiento de bases de un ácido nucleico de cadena doble que se escinde específicamente mediante un reactivo de escisión. En una realización, un sitio de escisión es un sitio de reconocimiento para una endonucleasa de restricción. En la técnica se conocen bien diversos sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción. Reactivos de escisión adecuados también incluyen reactivos de escisión químico que cortan ambas cadenas de un sitio de escisión. Podría usarse, por ejemplo, pero no a modo de limitación, un reactivo de escisión fotoactivado específico para un sitio del tipo descrito en las patentes de los EE.UU. números 5.798.491 y 5.607.924.

El cambio en la intensidad de fluorescencia con la escisión del oligonucleótido detector depende de la distancia que separa el fluoróforo donador y la molécula inhibidora de la fluorescencia en el oligonucleótido detector no escindido. Véase la patente de los EE.UU. número 5.919.630. La eficiencia de transferencia de energía está determinada por la siguiente ecuación:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

en la que r es la distancia entre el donador y el inhibidor de la fluorescencia y R_0 es una constante referida a cada par donador/inhibidor de la fluorescencia que puede calcularse a partir de ciertos parámetros de los espectros de adsorción y emisión de cada uno, según procedimientos bien conocidos. Véase BIOPHYSICAL CHEMISTRY, D. Freifelder, ed., W.H. Freeman and Company, San Francisco (1976) en las páginas 426-28.

En general, la magnitud del cambio en la emisión del donador tras la escisión de cadena doble aumenta con la disminución de la distancia entre el donador y el inhibidor de la fluorescencia en el oligonucleótido detector intacto. Sin embargo, la distancia entre el donador y el inhibidor de la fluorescencia puede ajustarse para proporcionar una mayor eficiencia de la escisión. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, si un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción se usa como el sitio de escisión, la separación entre el donador y el inhibidor de la fluorescencia puede ajustarse para alojar la unión de la endonucleasa de restricción a su sitio de reconocimiento, evitándose o limitándose así el impedimento estérico que, de otra manera, puede interferir con la escisión completo. En una realización, el fluoróforo donador y la molécula inhibidora de la fluorescencia están separados por aproximadamente 5-20 nucleótidos, o preferentemente por aproximadamente 6-8 nucleótidos.

El experto se dará cuenta de que las ventajas del presente oligonucleótido detector pueden conservarse mientras se modifican diversos aspectos de su estructura. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, puede modificarse el número de pares donador/inhibidor de la fluorescencia. Se espera que la adición de más pares donador/inhibidor de la fluorescencia al oligonucleótido detector aumente la cantidad de fluorescencia total que puede observarse después de la escisión del sitio de escisión de cadena doble. No existe límite superior para el número de pares donador/inhibidor de la fluorescencia que pueden añadirse al oligonucleótido detector. En una realización, el número de pares donador/inhibidor de la fluorescencia es al menos dos. En otras realizaciones, el oligonucleótido detector contiene al menos tres o más pares donador/inhibidor de la fluorescencia. En otras realizaciones, el oligonucleótido detector puede contener al menos 10, 20, 30 ó 50 pares, o puede contener cientos de pares donador/inhibidor de la fluorescencia, como se necesitan para producir una relación señal a ruido y sensibilidad del ensayo óptima.

En algunas realizaciones, la longitud del oligonucleótido necesaria para alojar los pares donador/inhibidor de la fluorescencia excederá de 200, o incluso de 500 o más bases. Además, la estructura principal del oligonucleótido del detector puede contener ramificaciones para proporcionar secuencias de oligonucleótidos adicionales que pueden contener pares donador/inhibidor de la fluorescencia. En la técnica se conocen bien procedimientos para crear oligonucleótidos ramificados o de múltiples ramificaciones. Por consiguiente, un “oligonucleótido” como se usa en este documento no se limita a un ácido nucleico lineal de aproximadamente 2-20 nucleótidos de longitud.

Además, el modo u orden en el que los pares donador/inhibidor de la fluorescencia se disponen no es crítico para la invención. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, el fluoróforo donador (“D”) y la molécula inhibidora de la fluorescencia (“Q”) pueden ordenarse como D/Q, D/Q o pueden ordenarse como Q/D, D/Q, D/Q/D, Q/D/Q, siempre que el fluoróforo donador esté muy próximo a la molécula inhibidora de la fluorescencia. En una realización, los donadores y los inhibidores de la fluorescencia pueden configurarse en la secuencia D/QQQ/D o Q/DDD/Q. En estas realizaciones, el sitio de escisión entre el donador y el inhibidor de la fluorescencia se indica por la marca cortada. Por consiguiente, para el fin de la invención, un “par donador/inhibidor de la fluorescencia” comprende un fluoróforo donador muy próximo a una molécula inhibidora de la fluorescencia, en el que el donador y el inhibidor de la fluorescencia están separados por un sitio de escisión, y puede incluir fluoróforos donadores adicionales o moléculas inhibidoras de la fluorescencia muy próximas a o el donador o el inhibidor de la fluorescencia que están adyacentes al sitio de escisión. Una configuración que tiene tres donadores e inhibidores de la fluorescencia y dos sitios de escisión, tales como D/Q/D o Q/D/Q, se define como dos “pares donador/inhibidor de la fluorescencia,” aún cuando cada par comparta o un fluoróforo donador o una molécula inhibidora de la fluorescencia.

En una realización de la invención, el oligonucleótido detector se usa en un procedimiento para detectar un ácido nucleico diana que comprende el uso del oligonucleótido detector en una reacción de amplificación. En la técnica se conocen diversos procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos y pueden aplicarse a la presente invención incluyendo, pero no limitándose a, amplificación por desplazamiento de cadenas (SDA), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa, replicación de secuencia autosostenida (3SR), amplificación basada en la Q-beta replicasa, amplificación en fase sólida, amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación por círculo rodante y amplificación mediada por transcripción (TMA).

Un “cebador de amplificación” es un cebador para la amplificación de una secuencia diana mediante alargamiento del cebador. Por ejemplo, en SDA, el extremo 3’ de un cebador de amplificación híbrida en el extremo 3’ del ácido nucleico diana. El cebador de amplificación comprende un sitio de reconocimiento próximo a su extremo 5’ para una endonucleasa de restricción que permitirá que un dúplex de ADN o uno de ARN se corte cuando el sitio de reconocimiento esté semimodificado, como se describe en la patente de los EE.UU. número 5.455.166; la patente de los EE.UU. número 5.270.184; y el documento EP0684315, con respecto al uso de los sitios de restricción semimodificados en una reacción de SDA. El cebador de amplificación también puede alargarse desde su extremo 3’ mediante ADN polimerasa cuando la secuencia de unión diana del cebador de amplificación se hibrida con el ácido nucleico diana. El cebador de amplificación puede usarse en una reacción que da como resultado una amplificación exponencial del ácido nucleico diana.

Los cebadores de amplificación para PCR pueden estar solamente constituidos por las secuencias de unión diana debido a que no se requieren secuencias o estructuras especiales para conducir la reacción de amplificación. En comparación, los cebadores de amplificación útiles para otros procedimientos de amplificación, tales como 3SR y NASBA, comprenden un promotor de la ARN polimerasa próximo al extremo 5’. El promotor se añade al ácido nucleico diana mediante la formación de dúplex entre el cebador y el ácido nucleico diana y sirve para conducir la reacción de amplificación dirigiendo la transcripción de múltiples copias de ARN de la diana. También pueden ser útiles para la invención otros cebadores de amplificación conocidos en la técnica.

“Productos de alargamiento” son ácidos nucleicos que comprenden un cebador, o una parte de un cebador, y una cadena recién sintetizada que es el complemento del ácido nucleico diana en dirección 3’ desde el sitio de unión del cebador. Los productos de alargamiento resultan de la hibridación de un cebador con una secuencia diana y alargamiento del cebador por polimerasa usando el ácido nucleico diana como molde.

Un experto en la materia entenderá que “hibridación” y “formación de dúplex” como se usa en este documento no requiere una complementariedad de bases precisa. Es decir, puede formarse un dúplex entre dos ácidos nucleicos que contenían pares de bases desapareadas. Las condiciones en las que los ácidos nucleicos que son perfectamente complementarios o que contienen pares de bases desapareadas hibridarán para formar un dúplex son bien conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3ª edición, Sambrook y col., eds., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor (2001) en el capítulo 10.

La figura 1 ilustra la reacción que implica un oligonucleótido detector de la invención. Un cebador, P₁, se hibrida con un ácido nucleico diana, T. La ADN polimerasa (presente en etapa a) alarga una cadena complementaria de P₁ para formar la cadena 1. Un oligonucleótido “amortiguador” B₁ se une en dirección 5’ desde P₁. El cebador P₁ y el amortiguador B₁ se añaden normalmente juntos, pero pueden añadirse por separado. Cuando una polimerasa alarga una cadena complementaria de B₁, la cadena 1 se elimina de la cadena diana, T (etapa b). El cebador P₂ se hibrida entonces con la cadena 1, un oligonucleótido adaptador hibrida en dirección 3’ desde P₂ y ambos se alargan mediante una polimerasa (etapa c). La cadena alargada de P₂, cadena 2, amortigua la cadena alargada del oligonucleótido adaptador (etapa d). P₁ se hibrida ahora con la cadena 2 y la cadena se alarga de nuevo (etapa e). La cadena alargada por P₁ se corta en un sitio de endonucleasa de restricción localizado en su extremo 5’ y la cadena se amplifica mediante SDA para formar la cadena 3 (etapa f). Las etapas (a) a (f) dan como resultado múltiples copias de la cadena 3 a partir de un evento de hibridación específico para una diana sencilla iniciado por P₁.

La hibridación de la cadena 3 con el oligonucleótido detector múltiple forma un molde de iniciación para el alargamiento de polimerasa que convierte el oligonucleótido detector en una forma de cadena doble que puede escindir. Específicamente, la cadena 3 forma un dúplex en su extremo 3’ con una secuencia complementaria en el oligonucleótido detector múltiple (etapa g). Una vez alargado por la polimerasa (etapa h), el oligonucleótido detector múltiple se escindirá con una endonucleasa de restricción (etapa i). Los sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción están localizados entre el fluoróforo donador y la molécula inhibidora de la fluorescencia en el oligonucleótido detector, tal que la digestión con una endonucleasa de restricción da como resultado la separación física del donador y el inhibidor de la fluorescencia. La separación del donador y el inhibidor de la fluorescencia da como resultado el aumento de la fluorescencia del donador, indicando así la presencia de la diana, T.

La señal puede detectarse en un punto final seleccionado en la reacción o en tiempo real. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, la señal puede detectarse amplificando la cadena 3 simultáneamente con una reacción de alargamiento del híbrido entre la cadena 3 y el oligonucleótido detector múltiple. Tales ensayos homogéneos en tiempo real pueden usarse para proporcionar información semicuantitativa o cuantitativa sobre la cantidad inicial de diana presente. Es decir, cuantas más copias iniciales estén presentes de la secuencia diana, menos series de amplificación se requieren para producir una señal de fluorescencia por encima de un nivel de señal umbral. La cantidad inicial de ácido nucleico diana en este tipo de ensayo se determina comparando los resultados experimentales con resultados para una cantidad conocida de ácido nucleico diana purificado. Los procedimientos para analizar lecturas de ensayos también se encuentran en las patentes de los EE.UU. números 6.216.049; 6.066.458; y 5.863.736; la solicitud de patente de los EE.UU. número de serie 10/626.582; y la solicitud de patente de los EE.UU. número de serie 09/574.031, que se corresponde con la solicitud europea número EP1158449, publicada el 28 de noviembre de 2001.

Como se describe anteriormente, la señal puede amplificarse generando múltiples copias de cadena 3 mediante una reacción de amplificación dependiente de la diana usando el cebador 1, el cebador 2 y un cebador adaptador. Los procedimientos de amplificación alternativos que son conocidos en la técnica, tales como aquellos expuestos anteriormente, pueden usarse para producir un equivalente de cadena 3 que puede usarse en la presente invención.

El oligonucleótido detector puede usarse alternativamente para detectar un ácido nucleico diana sin una reacción de amplificación. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, el oligonucleótido detector puede comprender una región que se hibrida directamente con el ácido nucleico diana. En esta realización, el oligonucleótido detector puede ser de cadena parcialmente doble, siempre que comprenda una parte de cadena sencilla que pueda formar un dúplex con un ácido nucleico diana. En otra realización, el oligonucleótido detector puede ser completa o sustancialmente de cadena sencilla, y el oligonucleótido detector se hace de cadena doble mediante una reacción de alargamiento de la polimerasa que se inicia en el dúplex formado entre el oligonucleótido detector y el ácido nucleico diana. Este dúplex puede formarse, por ejemplo, pero no a modo de limitación, entre una parte 5’ del detector y una parte 3’ de un fragmento del ácido nucleico diana que se ha generado mediante una digestión de la restricción o similar. En todavía otra realización, el fragmento de la secuencia diana se amplifica y el oligonucleótido detector se pone en contacto con o el propio ácido nucleico diana amplificado o la cadena complementaria amplificada del ácido nucleico diana. En estas realizaciones, el oligonucleótido detector se usa preferentemente en un formato heterólogo. Es decir, el oligonucleótido detector se hace reaccionar con un ácido nucleico diana y el oligonucleótido detector que no forma un dúplex con el ácido nucleico diana se lava antes de que los sitios de escisión se sometan a escisión.

En todavía otra realización, el oligonucleótido detector interactúa con el ácido nucleico diana mediante un oligonucleótido adaptador. El oligonucleótido adaptador comprende una secuencia que se hibrida con el ácido nucleico diana

y comprende una parte separada que se hibrida con el oligonucleótido detector. El híbrido formado entre el oligonucleótido adaptador y el oligonucleótido detector crea un molde para el alargamiento de polimerasa del oligonucleótido detector que hace el oligonucleótido de cadena doble.

El oligonucleótido detector puede detectarse en una variedad de formas conocidas en la técnica o directamente o después de resultar de cadena doble. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, puede detectarse mediante electroforesis en gel de poliacrilamida partiendo de una base de peso molecular aparente, mediante hibridación con una sonda marcada, mediante captura de fase sólida usando una sonda específica para oligonucleótidos detectores o mediante escisión con una endonucleasa de restricción.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son representativos de las realizaciones englobadas por la presente invención y no pretenden limitar el contenido abarcado por la presente invención.

Ejemplo 1

Las reacciones de SDA pueden realizarse usando cebadores de amplificación y el oligonucleótido detector de la presente invención. En este ejemplo, el detector está diseñado para detectar una región del gen pol del VIH-1. La SDA puede llevarse a cabo a aproximadamente 52°C en presencia de al menos una, preferentemente 250, copias de un ácido nucleico diana de ADN de cadena doble clonado usando cebadores de amplificación 500 nM, cebadores amortiguadores 50 nM y oligonucleótido detector 200 nM. Las reacciones de control se llevan a cabo en ausencia del ácido nucleico diana de cadena doble. Los detectores están marcados de manera fluorescente con múltiples pares fluoróforo donador/fluoróforo inhibidor de la fluorescencia (o rodamina/DABCYL o fluoresceína/DABCYL), que están separados por una secuencia de reconocimiento BsoBI y están configurados muy próximos. La fluorescencia del donador se controla durante el transcurso de la reacción.

La fluorescencia del donador aumenta significativamente durante el transcurso de la reacción cuando el ADN diana está presente, que indica que el sitio de la endonucleasa de restricción BsoBI está escindido. A diferencia, en ausencia de ADN diana, la fluorescencia permanece constantemente baja durante la reacción.

Ejemplo 2

Las reacciones de SDA se realizaron usando cebadores de amplificación y oligonucleótidos detectores de la presente invención para detectar el transcrito de ARN de VIH. La SDA se llevó a cabo del siguiente modo: se preparó tampón diana a 50 mM de KOB, bicina 120 mM y se pinchó con el ácido nucleico diana de ARN a 0 o 2000 copias por reacción. Se colocaron 65 µl de tampón diana preparado con las concentraciones de reactivo indicadas en pocillos de blanco. Se aplicaron 150 µl de muestra tampón en los pocillos de tampón diana, la disolución se mezcló y los pocillos se colocaron a 50°C durante 20 minutos. El reactivo en TR se preparó como se indica a continuación.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 281 880 T3

Reactivo	[Canti- dad]	Unidades	CONC. EN TR	AJ. CONC.	$\mu\text{l}/\text{rx}$	24	AJUSTADO
			DESEADO				VOLUMEN

RoDiH ₂ O					29,35	704,40	810,1
BSA	5000	c	23,24	102,49	1,33	31,98	36,8
DMSO	100	%	8,04	35,46	23,05	553,12	636,1
PAB CONC.	20	X	0,12	0,51	1,67	40,00	46,0
MG	194	mM	6,50	28,67	9,60	230,50	265,1

MEZCLA DE PAB:ARALT.2 120 μM , 40 μM AL.1AV, amortiguadores 11,2 μM			
---	--	--	--

Total					65,00	1560,00	1794,0
--------------	--	--	--	--	-------	---------	--------

SIN TR

Reactivo	[Canti- dad]	Unidades	CONC. EN TR	AJ. CONC.	$\mu\text{l}/\text{rx}$	24	AJUSTADO
			DESEADO				VOLUMEN

RoDiH ₂ O					18,58	446,04	512,9
BSA	5000	ng/ μl	32,89	131,54	1,32	31,57	36,3
GLICERINA	70	%	8,00	32,00	22,86	548,57	630,9
AMV-RT	20	Unidades/ μl	0,1	0,40	1,00	24,00	27,6
KP	476,22	mM	5	20,00	2,10	50,40	58,0
DTAG	33,3	mM	0,50	2,02	3,03	72,65	83,5
DCsTP	96,8	mM	0,54	2,16	1,12	26,78	30,8

Total					50,00	1200,00	1380,0
--------------	--	--	--	--	-------	---------	--------

ES 2 281 880 T3

Se transfirieron 150 μ l de la disolución en los pocillos pinchados con calefacción a los pocillos en TR durante 5 minutos. La mezcla de amplificación se preparó como se indica a continuación:

Reactivo	[Canti- dad]	Unidades	CONC. EN TR	AJ.	μ l/rx	24	AJUSTADO
			DESEADO	CON.			VOLUMEN
RoDiH ₂ O					11,35	317,84	572,1
KiPO ₄	476,22	mM	55,00	232,4 19	30,26	847,25	1525,1
DMSO	100	%	4,50	19,01 61	11,79	330,12	594,2
BSA	5000	ng/ μ l	25,37	107,217 6	1,33	37,23	67,0
ADAPTADOR	20	X	0,09	0,38877 4	1,21	33,75	60,7
Detector	200	μ M BD10	0,55	2,324 19	0,72	20,17	36,3
Bst	17,25	BDU	0,18	0,76064 4	2,73	76,55	137,8
BsoB1	22,08	BDU	0,22	0,92967 6	2,61	73,09	131,6
Total					62,00	1736,00	3124,8

La mezcla de amplificación se puso en pocillos de blanco a 100 μ l y los pocillos se colocaron en un bloque térmico a 60°C durante 10 minutos antes de completarse la incubación a 54°C. En la etapa en TR se transfirieron 62 μ l de la mezcla de amplificación a los pocillos, los pocillos se cubrieron y la placa se leyó usando un fluorómetro PROBETEC.

El oligonucleótido detector de la presente invención se comparó con sondas de horquilla. Los resultados se muestran a continuación y en las figuras 2A-2F. CTCGVnv3 es una sonda de horquilla; D = dabaño; R = rodamina; la sonda RDRD2.6B tiene 6 bases entre el DABCYL y la rodamina; la sonda RDRD2.7B tiene 7 bases entre el DABCYL y la rodamina; y la sonda RDRD2.8B tiene 8 bases entre el DABCYL y la rodamina.

ES 2 281 880 T3

Resultados

DETECTOR	COPIAS/RXN	RESULTADOS	MEDIA
6B ENTRE RDRD	0 COPIAS/RXN	316	574
		831	
	2.000 COPIAS/RXN	75305	73498
		71691	
7B ENTRE RDRD	0 COPIAS/RXN	1678	2087
		2495	
	2.000 COPIAS/RXN	77977	83393
		88808	
8B ENTRE RDRDR	0 COPIAS/RXN	590	1003
		1416	
	2.000 COPIAS/RXN	69174	72455
		75736	
RDRDR	0 COPIAS/RXN	4145	3799
		3452	
	2.000 COPIAS/RXN.	53353	68919
		84484	
DRDRD	0 COPIAS/RXN	3752	3213
		2673	
	2.000 COPIAS/RXN	6263	5419
		4575	
CONTROL	0 COPIAS/RXN	106	478
		850	
	2.000 COPIAS/RXN	88644	94851
		101058	

ES 2 281 880 T3

Sonda	CTGCUnv3	DR	RDR	DRDRD	RDRDR	RDRD2.6B	RDRD2.7B	RDRD2.8B	RDDR.2	DIMER
[Sonda]/ rx	200	400	400	400	400	400	400	400	400	400/ca- da uno
GC	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Diana/rx										
Óptica	Rox	Rox	Rox	Rox	Rox	Rox	Rox	Rox	Rox	Rox
	61590	49930	58250	4550	75870	29100	96390	62630	71330	1080
	88050	70720	67890	3900	98700	45430	64280	98700	64250	180
	60550	64190	66770	2760	97260	28950	108420	77870	52510	250
	79580	77340	62470	4110	80320	36350	84510	95260	77470	10
	76110	59680	58430	4350	82140	21580	66160	74770	56750	120
Media	73176	64372	62762	3934	86858	32282	83952	81846	64462	328
% de CV	16	16	7	18	12	28	23	18	16	131

Sonda	CTGCUnv3	DR	RDR	DRDRD	RDRDR	RDRD2.6B	RDRD2.7B	RDRD2.8B	RDDR.2	DIMER
[Sonda]/ rx	200	400	400	400	400	400	400	400	400	400/cada uno
GC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diana/rx										
Óptica	Rox	Rox	Rox	Rox	Rox	Rox	Rox	Rox	Rox	Rox
	70	940	1450	740	2630	1400	1350	1500	4120	110
	80	470	20	1300	3090	1030	1500	2320	5800	220
	460	930	2230	1660	1070	2070	460	620	8400	580
Media	203	780	1233	1233	2263	1500	1103	1480	6107	303
% de CV	109	34	91	38	47	35	51	57	35	81

Los resultados demuestran que un oligonucleótido detector de la presente invención funcionó mejor que otras sondas, por ejemplo, la sonda CTGCUnv3. Los diversos diseños de sondas de oligonucleótido detector empleados en el ejemplo 2 varían según el número bases entre la rodamina y el DABCYL. Los resultados también demuestran que se observa una mejora cuando se añade una base adicional base o dos entre la rodamina y los restos de DABCYL (véase RDRD2.7B y RDRD2.8B).

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido detector, que comprende muy próximos al menos dos pares de un fluoróforo donador y una molécula inhibidora de la fluorescencia, en el que dicho fluoróforo donador y dichas moléculas inhibidoras de la fluorescencia en cada par dicho están separados por un sitio de escisión que puede escindirse en forma de cadena doble, y en el que la escisión en dicho sitio de escisión puede crear una señal detectable que indica la presencia de un ácido nucleico diana.
2. El oligonucleótido de la reivindicación 1, en el que dichos fluoróforos donadores y dichas moléculas inhibidoras de la fluorescencia están separados por aproximadamente de 5 a 20 nucleótidos.
3. El oligonucleótido de la reivindicación 1, en el que dicho sitio de escisión puede escindirse por una endonucleasa.
4. El oligonucleótido detector de la reivindicación 2, en el que al menos un fluoróforo donador dicho se selecciona del grupo constituido por fluoresceína, sulforrodamina 101, pirenobutanoato, acridina, etenoadenosina, eosina, rodamina y eritrosina.
5. Un procedimiento para detectar un ácido nucleico diana, que comprende:
 - a. Poner en contacto (i) un primer oligonucleótido detector que comprende una parte de cadena sencilla que comprende muy próximos al menos dos pares de un fluoróforo donador y una molécula inhibidora de la fluorescencia, en el que dicho fluoróforo donador y dicha molécula inhibidora de la fluorescencia en cada par dicho están separados por un sitio de escisión, con (ii) un segundo oligonucleótido de cadena sencilla, siendo su presencia indicativa de la presencia del ácido nucleico diana, para formar un dúplex entre dichos primer y segundo oligonucleótidos;
 - b. Alargar el dúplex para hacer de cadena doble dicha parte de cadena sencilla del primer oligonucleótido detector;
 - c. Escindir al menos uno de dichos sitios de escisión; y
 - d. Detectar dichos fluoróforos donadores,en el que un cambio detectable en un parámetro de fluorescencia de dichos fluoróforos donadores es indicativo de la presencia de dicho ácido nucleico diana.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, que comprende además amplificar el segundo oligonucleótido.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la amplificación es mediante un procedimiento seleccionado del grupo constituido por amplificación por desplazamiento de cadenas (SDA), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa, replicación de secuencia autosostenida (3SR), amplificación basada en la Q-beta replicasa, amplificación en fase sólida, amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación por círculo rodante y amplificación mediada por transcripción (TMA).
8. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que al menos uno de dichos pares se selecciona del grupo de moléculas donadoras e inhibidoras de la fluorescencia que está constituido por fluoresceína/rodamina X, rodamina X/Cy5 o fluoresceína/DABCYL.
9. Un procedimiento para detectar un ácido nucleico diana, que comprende:
 - a. (i) Hibridar un cebador P₁ con dicho ácido nucleico diana y (ii) alargar P₁ mediante el uso de una polimerasa para formar una cadena 1, en el que el cebador P₁ comprende un sitio de reconocimiento de endonucleasa en una parte 5' de dicho cebador P₁ que no se hibrida con el ácido nucleico diana;
 - b. (i) hibridar un amortiguador B₁ con dicho ácido nucleico diana en dirección 5' desde dicho cebador P₁ y (ii) alargar el amortiguador B₁ y eliminar la cadena 1 de dicho ácido nucleico diana;
 - c. hibridar un adaptador con la cadena 1 y un cebador P₂ con la cadena 1, en el que el cebador P₂ hibrida en dirección 5' desde el adaptador;
 - d. (i) alargar el adaptador para formar una cadena 2 y (ii) alargar el cebador P₂ para eliminar la cadena 2 de la cadena 1;
 - e. (i) hibridar el cebador P₁ con la cadena 2 y (ii) alargar el cebador P₁ para formar una cadena alargada del cebador P₁;
 - f. (i) cortar la cadena alargada del cebador P₁ en el sitio de reconocimiento de endonucleasa incorporado en la cadena alargada del cebador P₁ y (ii) alargar desde el sitio de corte para formar una cadena 3 y para amortiguar la cadena alargada del cebador P₁ que está en dirección 3' desde el sitio de corte;

ES 2 281 880 T3

g. hibridar la cadena 3 con una parte de un oligonucleótido, en el que el oligonucleótido comprende múltiples pares de fluoróforos donadores e inhibidores de la fluorescencia, en el que el fluoróforo donador y el inhibidor de la fluorescencia en cada par dicho están separados por un sitio que puede escindirse cuando dicho sitio de escisión es de cadena doble;

h. (i) alargar la cadena 3 para hacer de cadena doble los sitios de escisión y (ii) escindir al menos uno de los sitios de escisión; y

i. detectar dichos fluoróforos donadores,

en el que un cambio detectable en un parámetro de fluorescencia de dichos fluoróforos es indicativo de la presencia de dicho ácido nucleico diana.

10. Un kit, que comprende un primer oligonucleótido detector de cadena sencilla, que comprende muy próximos al menos dos pares de un fluoróforo donador y una molécula inhibidora de la fluorescencia, en el que dicho fluoróforo donador y dicha molécula inhibidora de la fluorescencia en cada par dicho están separados por un sitio de escisión que puede escindirse en forma de una cadena doble, y en el que el sitio de escisión es de cadena doble cuando el primer oligonucleótido detector forma un dúplex con un segundo oligonucleótido que puede formarse en presencia de un ácido nucleico diana.

FIG. 1

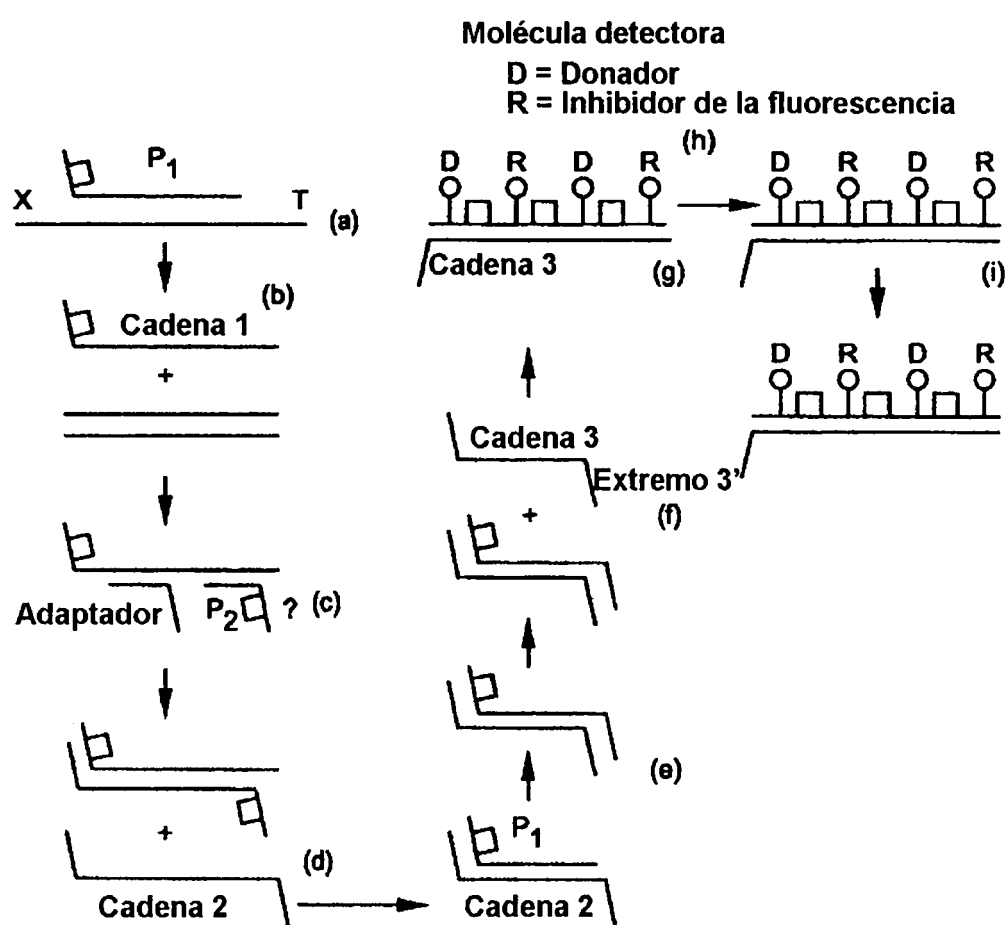


FIG. 2A

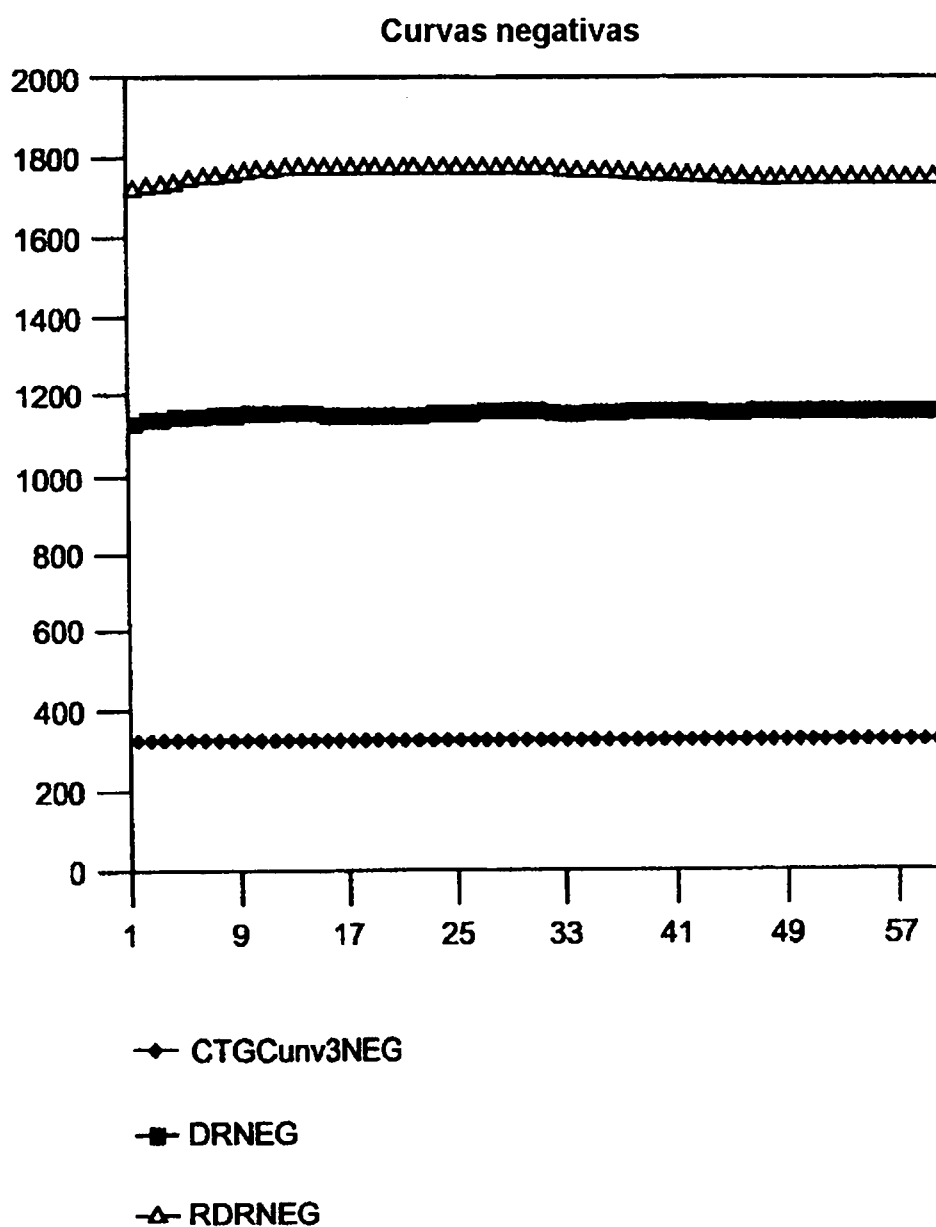


FIG. 2B

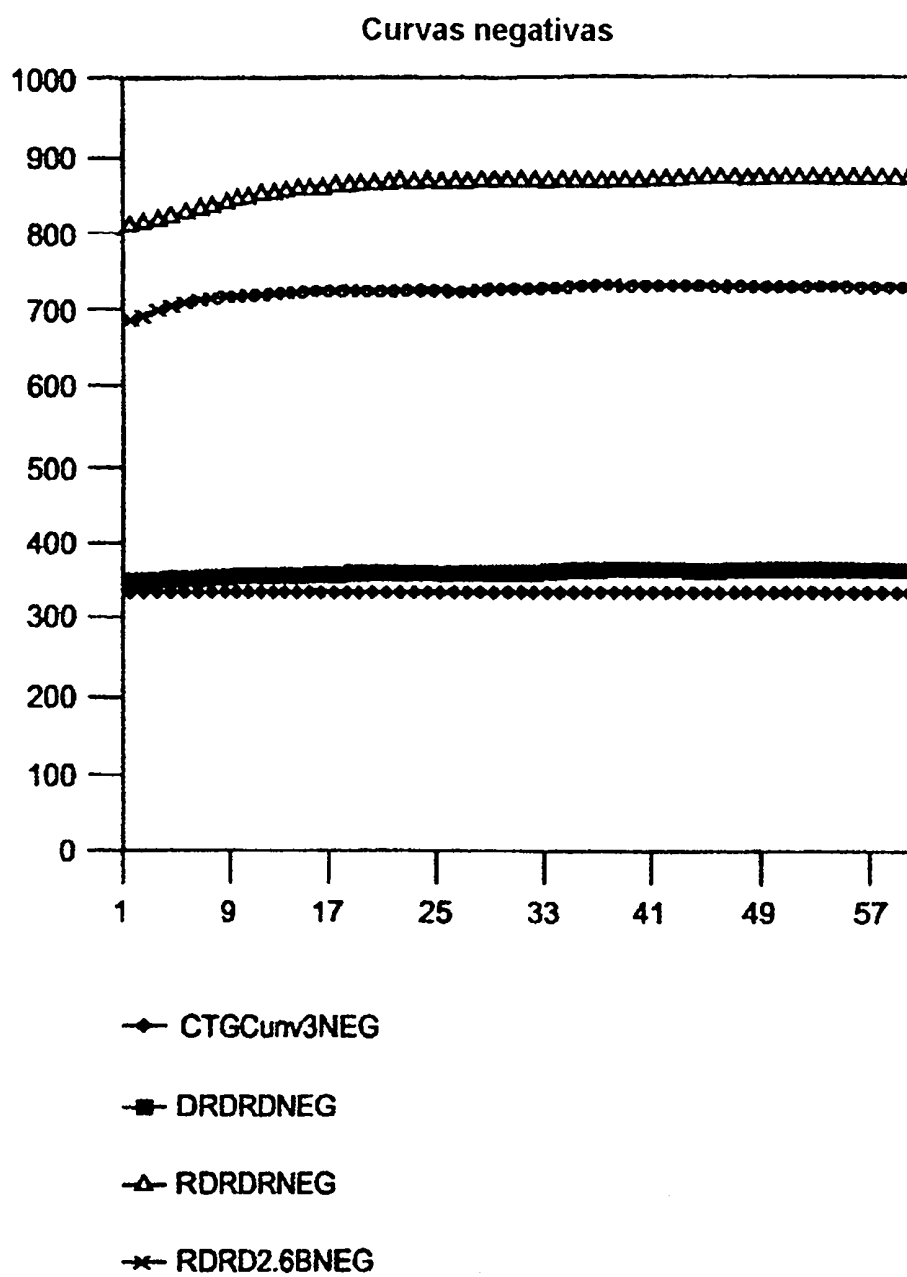


FIG. 2C

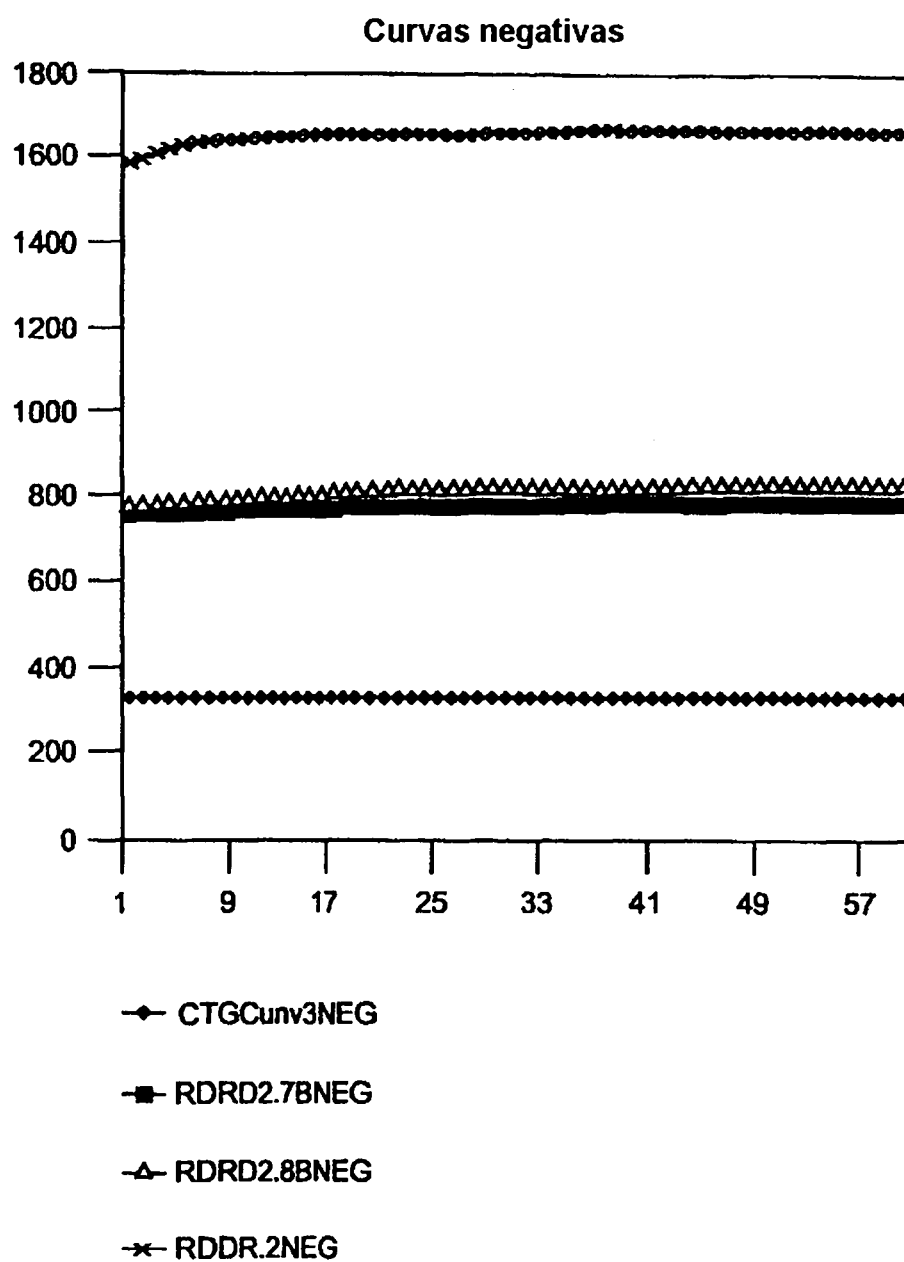


FIG. 2D

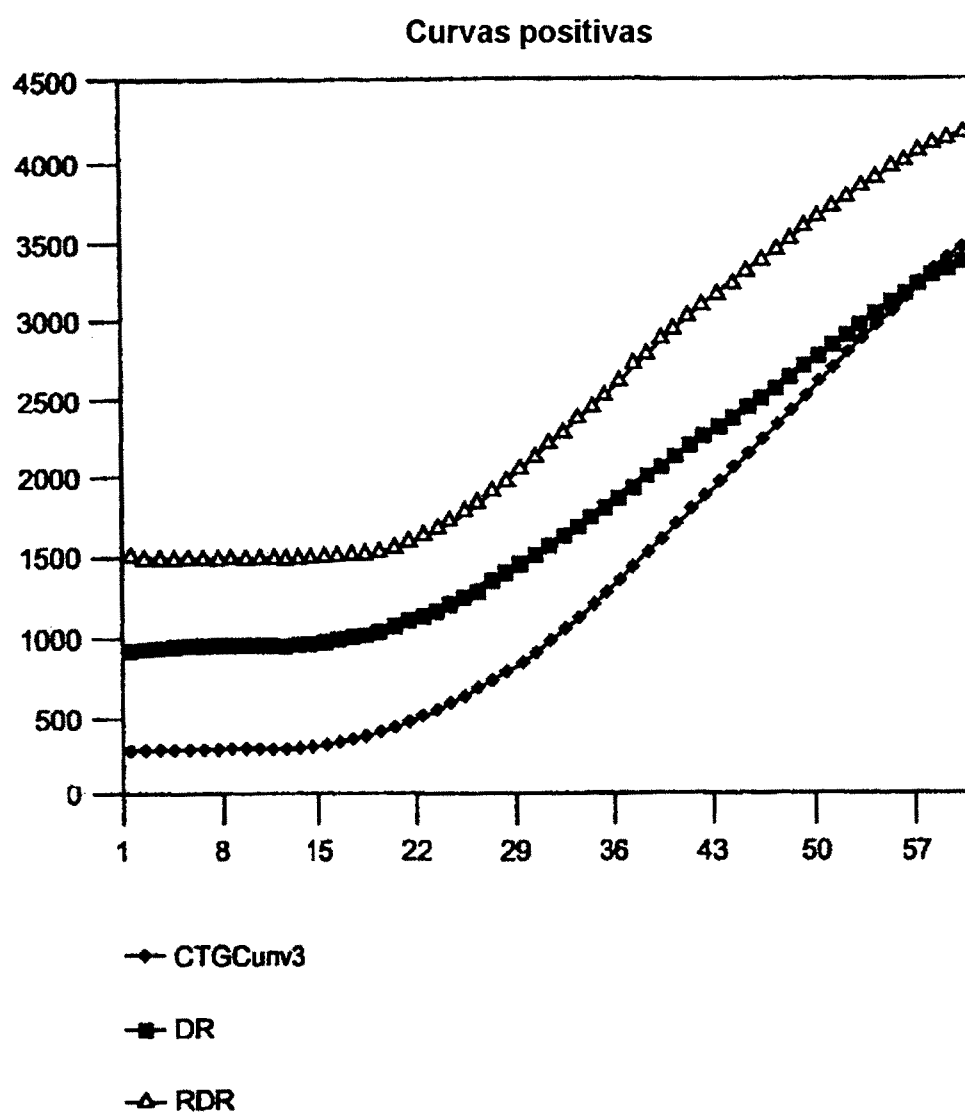


FIG. 2E

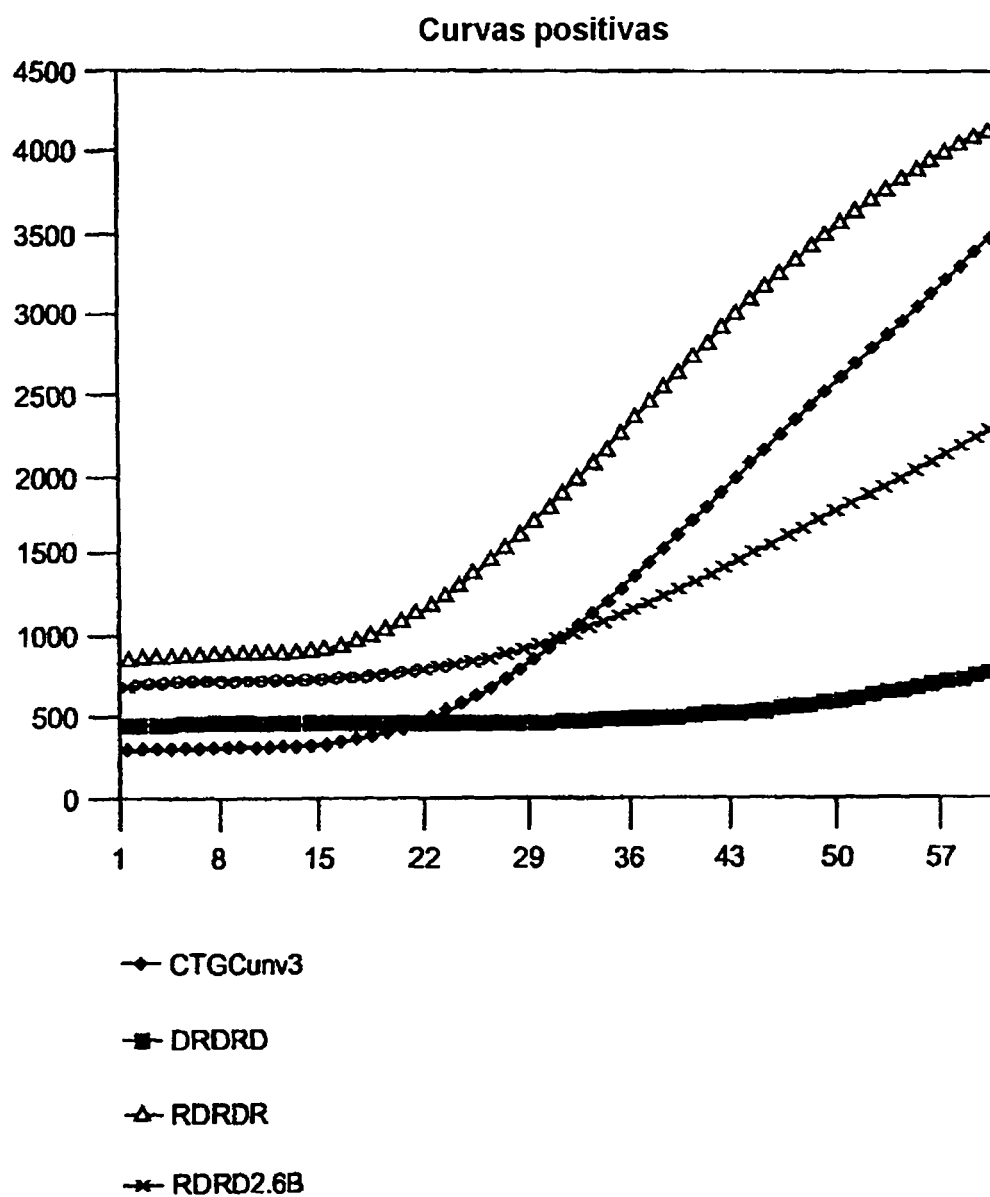


FIG. 2F

