(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 302 721**

(51) Int. Cl.:
***C12Q 1/68*** (2006.01)
***G01N 33/533*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA T5

(96) Número de solicitud europea: **01907600 .9**
(96) Fecha de presentación : **13.02.2001**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1255863**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **13.11.2002**

(54) Título: **Procedimiento homogéneo para la detección de un polinucleótido, con por ejemplo un marcador de quelato lantánido escindible.**

(30) Prioridad: **16.02.2000 FI 20000333**

(45) Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.08.2008**

(45) Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **02.09.2011**

(45) Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **02.09.2011**

(73) Titular/es: **OY ARCTIC PARTNERS AB.**
**Ylopistonkatu 2 H 155**
**20100 Turku, FI**

(72) Inventor/es: **Nurmi, Jussi**

(74) Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

**ES 2 302 721 T5**

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento homogéneo para la detección de un polinucleótido, con por ejemplo un marcador de quelato lantánido escindible.

La presente invención se refiere a un procedimiento homogéneo para la detección de un polinucleótido utilizando una sonda oligonucleotídica marcada con un marcador sensible al medio.

**Antecedentes de la invención**

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Saiki *et al*., 1985) es con mucho la herramienta de diagnóstico de ácidos nucleicos más importante. Las primeras pruebas de diagnóstico basadas en PCR resultaron bastante problemáticas y no adecuadas para procedimientos de identificación a gran escala (Isaksson et Landegren, 1999). Se necesitaron varias etapas después de la PCR, tales como el análisis con enzimas de restricción, la electroforesis en gel de agarosa o los ensayos de hibridación heterogénea para confirmar la identidad del producto de PCR (Kricka, 1999). Recientemente, el desarrollo de nuevas técnicas fluorescentes, sin embargo, ha llevado a nuevos formatos de ensayo que simplifican en gran medida los protocolos utilizados para la detección de secuencias específicas de ácido nucleico. Estos procedimientos conllevan la detección de un producto específico de PCR en una disolución homogénea sin necesidad de abrir los tubos de ampliación tras la PCR (Williams *et al*., 1998). Los resultados pueden leerse en tiempo real a medida que se acumula el producto de PCR o al final del protocolo del ciclo térmico directamente en los pocillos de ampliación. La elección entre los modos en tiempo real o de medición puntual depende de si se desea un ensayo cuantitativo o cualitativo.

Actualmente están comercializadas cuatro tecnologías que permiten la detección de la secuencia específica en un tubo cerrado. Se basan en su totalidad (las tecnologías TaqMan, Molecular Beacons, LightCycler y Amplifluor) en la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) (Clegg, 1992; Selvin, 1995). TaqMan (Holland *et al*. 1991; Lee *et al*., 1993) utiliza una sonda lineal que tiene un donante de FRET en su extremo 5' y un grupo receptor en el extremo 3' (Livak *et al*., 1995). Cuando la sonda es monocatenaria, la configuración tridimensional de la sonda presenta los dos marcadores lo suficientemente próximos entre sí para que el receptor extinga la fluorescencia del donante. A medida que la sonda se hibrida con su diana o cuando una ADN polimerasa que presenta actividad de exonucleasa 5' a 3' la escinde, la distancia entre los dos marcadores aumenta lo suficiente para que la intensidad de fluorescencia del donante aumente notablemente. La diferencia entre las sondas TaqMan y las balizas moleculares (Tyagi y Kramer, 1996) consiste en que la estructura tronco-bucle optimizada de las balizas moleculares presenta los dos marcadores tan próximos como es posible cuando la sonda no se hibrida a una secuencia diana. Esto asegura la máxima eficiencia de extinción. Durante la hibridación a una diana (o cuando se escinde mediante una ADN polimerasa), la intensidad de la fluorescencia del donante FRET aumenta a medida que el contacto físico entre los dos marcadores se desestabiliza. La tecnología Amplifluor (Nazarenko *et al*., 1997) utiliza cebadores en forma de horquilla que funcionan básicamente de la misma manera que las balizas moleculares: cuando el cebador se incorpora en un producto de PCR, el donante y los grupos enfriadores se separan y aumenta de este modo la fluorescencia del donante. El formato Sonda de Hibridación (Morrison, 1995) utilizado en el sistema LightCycler (Wittwer *et al*., 1997a: Wittwer *et al*., 1997b) utiliza dos sondas adyacentes que están marcadas de modo que cuando ambas sondas se hibridan a una diana, los marcadores se aproximan entre sí y se produce FRET entre ellos. La emisión de receptor sensibilizado se mide en lugar de la fluorescencia del donante.

Todos estos procedimientos basados en FRET están caracterizados porque presentan relaciones señal a ruido relativamente altas y una buena capacidad para discriminar entre las reacciones positivas y negativas. Sin embargo, están en su totalidad limitados en el sentido de que han de utilizarse una sonda marcadora doble o un cebador o dos sondas independientes por cada diana. Esto complica seriamente el diseño y la síntesis de la sonda. Además, dado que utilizan en su totalidad marcadores con fluorescencia que disminuye rápidamente y picos de emisión amplios, las posibilidades de detección múltiple son limitadas.

Los dos marcadores utilizados en los ensayos homogéneos descritos anteriormente son de diferente tipo, es decir, uno de los marcadores extinguirá al otro marcador para que la sonda a la que están unidos no se hibride.

El documento US nº 5.487.972 da a conocer un procedimiento de detección de un ácido nucleico diana que utiliza oligonucleótidos marcados que utiliza la actividad nucleasa de 5' a 3' de una ácido nucleico polimerasa para escindir el oligonucleótido hibridado marcado procedente de hibridados dobles y que libera de este modo los fragmentos de oligonucleótido marcados para la detección.

El documento WO 98/04738 da a conocer un procedimiento para la realización en tiempo real, ensayo homogéneo de un ácido nucleico diana que comprende la hibridación de una sonda ribo-oligonucleotídica marcada a la secuencia de ADN diana y la degradación de una parte de la sonda con ARNasa H para liberar fragmentos marcados. Los fragmentos liberados se miden sucesivamente para obtener la caracterización cinética de la presencia de la secuencia diana.

El documento US nº 5.827.653 da a conocer un procedimiento para la detección de un analito de ácido nucleico por hibridación de la sonda complementaria y la formación de un quelato complejo lantánido que, en la irradiación mediante luz, produce una emisión de luminiscencia retardada característica.

El documento US nº 5.256.535 da a conocer un procedimiento para la detección de una secuencia nucleotídica de un ácido nucleico en una muestra.

**Objetivos y sumario de la invención**

El objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un nuevo procedimiento homogéneo para la detección de polinucleótidos, en el que la sonda oligonucleotídica puede marcarse con un solo marcador. La señal de dicho propio marcador debería ser muy dependiente de si el producto se hibrida o no, y por consiguiente, debería eliminarse la necesidad de otro marcador que contrarresta en la sonda.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento homogéneo para detectar por lo menos un polinucleótido diana en una muestra que comprende las etapas siguientes:

- poner en contacto una muestra que comprende dicho polinucleótido o el polinucleótido que forma ácidos nucleicos o derivados de los mismos, con la sonda oligonucleotídica marcada con un solo tipo de marcador,
- excitar el marcador, y
- controlar la intensidad de la señal de dicho marcador que indica la presencia o ausencia en una muestra de dicho polinucleótido diana.

Según la invención el marcador es un quelato lantánido fluorescente que contiene un grupo fotoabsorbente, la señal de dicho propio marcador aumenta o disminuye durante la hibridación de la sonda oligonucleotídica cuando se pone en contacto dicha muestra con el polinucleótido diana y dicha sonda oligonucleotídica se hibrida selectivamente con dicho polinucleótido diana, y dicho marcador se mide por fluorometría con resolución temporal y porque el marcador se escinde químicamente de la sonda oligonucleotídica como resultado de la hibridación.

**Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 presenta el principio del ensayo.

A: Cuando el quelato de terbio fluorescente y estable utilizado como marcador está acoplado a un solo tramo monocatenario de ADN, la intensidad de la fluorescencia del quelato es significativamente inferior que cuando el quelato está libre en solución.

B: La hibridación de una sonda marcada en su extremo 5' con el quelato a un amplicón diana complementario durante la etapa de hibridación/ampliación de PCR produce el desprendimiento del marcador de la sonda y un aumento de señal ulterior. Este desprendimiento está catalizado por la actividad de exonucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa que se utiliza para ampliar la secuencia diana.

Las Figuras 2A y 2B demuestran la detección homogénea del punto final de PSA y la ampliación de PSAm.

Figura 2A: Fluorescencia de terbio sustraída del fondo de las reacciones que no contienen plantilla (NTC), 10.000 moléculas de PSA o 10.000 moléculas de plantilla PSAm ADNc antes de la adición de POPO™-3. Las columnas negra y gris indican reacciones que contienen un PSA o una sonda específica de PSAm, respectivamente.

Figura 2B: Relaciones de intensidad de fluorescencia tras la adición de POPO™-3. Cuando se utiliza PSA como plantilla, la sonda específica para PSA (columna negra) se escinde y de este modo la adición de POPO™-3 no afecta a la señal del terbio a 545 nm. Por lo tanto, la emisión sensibilizada de POPO™-3 a 572 nm es menos significativa que en las reacciones negativas. El resultado es el mismo, cuando PSAm se utiliza como plantilla en una reacción de ampliación que contiene una sonda específica para PSAm (columna gris).

Las Figuras 3A y 3B demuestran el seguimiento en tiempo real de las ampliaciones de PSA y PSAm. Las reacciones contenían una sonda marcada con Tb específica para PSA o PSAm y 0 a $10^7$ moléculas de la diana respectiva. La fluorescencia del terbio alcanza aproximadamente el fondo cuando la cantidad de diana sintetizada excede el límite de detección del ensayo. La posición del eje x presenta el valor umbral de cada análisis (1,3 en el análisis de PSA y 1,35 en el de PSAm).

Las Figuras 4A y 4B presentan las curvas patrón de PSA y PSAm. Se determinaron los ciclos umbral en las cantidades iniciales de la plantilla comprendidas entre 10 y $10^7$ moléculas.

La Figura 5 presenta un análisis de punto final doble. Se ampliaron 1.000 copias de PSA, PSAm o de ambos ADNc bicatenarios en presencia de la sonda TaqMan específica de PSA y una sonda Tb específica para PSAm. Las columnas negra y gris representan el FAM sustraído del fondo y las señales de terbio, respectivamente, después de 40 ciclos de PCR. No existe ninguna diafonía entre los dos marcadores: una señal de FAM positiva (>260 recuentos) se detecta solamente en presencia de una diana PSA y una señal de Tb positiva (>46.500 recuentos) en presencia de una diana de PSAm. Todas las reacciones contenían 250 ng de ADN genómico humano.

La Figura 6 presenta el aumento de la señal de Tb dependiente de la hibridación de las sondas oligonucleotídicas marcadas en ambos extremos con un quelato Tb sensible al medio, fluorescente y estable. Se representan las señales de terbio sustraídas del fondo (siendo el fondo la fluorescencia del terbio media de las referencias negativas + 1,96 ¤ desviación estándar). Proporcionan una señal claramente positiva $10^{10}$ moléculas de agua sintéticas. Las columnas negra y gris indican las señales obtenidas a partir de las sondas marcadas con diferentes quelatos; Tb1093 y Tb1093S, respectivamente (véase el apartado experimental, estudio II, para detalles).

La Figura 7 presenta la especificidad del aumento de la señal de lantánido dependiente de la hibridación. A = Tb1093S + diana complementaria; B = Tb1093 + diana complementaria; C = Tb1093 + ADN monocatenario no complementario; D = Tb1093 + ADN bicatenario no relacionado. Únicamente la presencia de un ácido nucleico complementario produce el aumento de fluorescencia de lantánido. Las relaciones señal a ruido para la sonda Tb1093S, cuando se utilizan los parámetros de medición descritos en el apartado experimental, es 2,9 y para la sonda Tb1093 1,8. El ruido se define como la señal de terbio obtenida de una muestra que no contiene otro ácido nucleico aparte de la sonda marcada con Tb. La presencia de ADN monocatenario no complementario o bicatenario no tiene ningún efecto sobre la intensidad de la fluorescencia del terbio.

Las Figuras 8A a 8D presentan cómo dos sondas, una de las cuales está marcada con un terbio sensible al medio y la otra con un quelato de europio, pueden utilizarse en la detección de dos secuencias diana diferentes de ácido nucleico en un único tubo. Las Figuras 8A, 8B, 8C y 8D presentan las relaciones señal a ruido del terbio y europio en las reacciones que no contienen plantilla (A), $5\times10^5$ moléculas de ADNc bicatenario de PSA (B), $5\times10^5$ moléculas de PSAm (C) o $5\times10^5$ moléculas de PSA y $5\times10^5$ moléculas de PSAm (D). Las señales de europio se han corregido para el fondo del terbio sustrayendo las señales medidas a 615 nm la señal del terbio del mismo ciclo * 0,24. Las señales han sido transformadas en relaciones señal a ruido dividiendo cada señal de fluorescencia por la fluorescencia media a la misma longitud de onda en los ciclos 6 al 10. La señal del terbio aumenta por encima del fondo solamente en presencia del PSA diana complementario y la señal del europio en presencia de un PSAm diana complementario.

**Descripción detallada de la invención**

En fluorometría con resolución temporal, la intensidad de la emisión de una muestra se mide después de pulsaciones individuales y consecutivas de excitación. La duración del impulso de excitación es típicamente 1 a 10 µs. La emisión se mide con un tubo fotomultiplicador mediante recuento de fotones. Después de un determinado retardo de excitación, el recuento de fotones se inicia por control electrónico. La frecuencia del impulso, el tiempo de medición total así como los tiempos de retardo y de recuento pueden variarse, pero normalmente el tiempo de medición total es de 1 ó 2 s que comprende 1.000 ciclos individuales durante los cuales se recuenta la cantidad de fotones total. La fluorometría con resolución temporal se utiliza ampliamente en ensayo de bioafinidad junto con marcadores que tienen un tiempo de descomposición prolongado (Lövgren y Pettersson, 1990).

En la presente invención la fluorometría con resolución temporal se utiliza para medir las intensidades de emisión de marcadores sensibles al medio con un tiempo de descomposición prolongado. Estos marcadores no necesitan marcadores que contrarresten con el fin de distinguir las señales de una sonda hibridada y una no hibridada. Dichos marcadores son típicamente quelatos lantánidos fluorescentes y estables con un tiempo de descomposición prolongado. Estos quelatos contienen un grupo absorbente de luz que es sensible a su medio químico inmediato. El lantánido es más preferentemente terbio o europio. Dichos quelatos están descritos en la bibliografía (Latva *et al*., 1997; Mukkala *et al*., 1993; Takalo *et al*., 1997). Marcadores especialmente preferidos son, por ejemplo, quelatos de terbio o europio de un derivado de (ácido acético) 2,2',2'',2'''-{[6,6'-(pirazol-1'',3'',diil)bis(piridina)-2,2'-diil]bis(metilennitrilo)}tetrakis (Latva *et al*., 1997; Takalo *et al*., 1997), y 2,2':6',2''-terpiridina (Mukkala *et al*., 1993; Takalo *et al*., 1997).

La sensibilidad del medio de un quelato lantánido luminiscente puede detectarse como un cambio mensurable en las propiedades luminiscentes del quelato cuando cambia el medio químico inmediato del quelato. Cuando se controla la intensidad de fluorescencia con resolución temporal utilizando parámetros de medición constantes (tal como las longitudes de onda de excitación y emisión, el nivel de energía de excitación, el tiempo de descomposición, el tiempo de intervalo de medición y el tiempo del ciclo), entonces, dependiendo de la situación, el cambio consiste en un aumento o una disminución de la señal. Si, por ejemplo, los enlazadores entre el grupo marcador y la sonda oligonucleotídica exponen el marcador a menos moléculas de agua cuando la sonda no está hibridada que cuando la sonda está hibridada, entonces la intensidad de la señal puede disminuir durante la hibridación. Viceversa, en una situación diferente, la estructura de la sonda puede ser tal que la señal del marcador aumente durante la hibridación,

porque el marcador está mejor protegido de los agentes de enfriamiento cuando la sonda está hibridada a una secuencia diana complementaria.

Si el marcador se escinde de la sonda como resultado de la hibridación, la diferencia de la intensidad de señal (comparada con la señal de la sonda no hibridada) aumenta todavía. La escisión puede realizarse químicamente, por ejemplo mediante una reacción enzimática.

Según una forma de realización, la muestra se pone en contacto con varias sondas oligonucleotídica que presentan diferentes secuencias de bases, en la que dichas sondas están marcadas de manera que todos los marcadores presentan longitudes de ondas de señal distinguibles. Las diferentes sondas oligonucleotídicas presentan diferentes secuencias de base con el fin de hibridar diferentes polinucleótidos diana en la muestra.

La sonda oligonucleotídica puede también, aunque no es necesario, incluir una molécula extintora que extingue la señal del marcador con tal de que dicha sonda no esté hibridada.

El procedimiento puede llevarse a cabo en el control en tiempo real de las reacciones de síntesis de ácido nucleico midiendo la intensidad de la señal del marcador a intervalos regulares durante una reacción de síntesis de ácido nucleico y comparando las intensidades de la señal de una reacción que contiene una muestra de ácidos nucleicos y de una reacción de referencia negativa que no contiene dicho polinucleótido diana. Una diferencia en las intensidades de la señal de estas dos indica la presencia del polinucleótido diana en la muestra. Se detecta el punto temporal cuando la intensidad de la señal de una reacción que contiene el polinucleótido diana comienza claramente a diferenciarse de la intensidad de la señal de la reacción de referencia negativa. El punto temporal detectado indica la cantidad inicial de polinucleótido diana en la muestra.

Según otra alternativa, el procedimiento puede realizarse en la detección del punto final de los productos de reacción de síntesis de ácido nucleico midiendo la intensidad de la señal del marcador después de la reacción de síntesis del ácido nucleico y comparando la intensidad de la señal de una reacción que contiene la muestra de ácidos nucleicos y la intensidad de la señal de una reacción de referencia negativa que no contiene el polinucleótido diana. Una diferencia en las intensidades de la señal de estas reacciones indica la presencia del polinucleótido diana en la muestra de ácidos nucleicos.

La sonda oligonucleotídica puede, por ejemplo, ser de ADN, ARN o de cualquier derivado de ácido nucleico tal como el ácido peptidonucleico (APN) o la sonda oligonucleotídica es una quimera de cualquiera de dos o más tipos diferentes de ácidos nucleicos o derivados de los mismos.

El polinucleótido diana puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico monocatenario, ADN o ARN o un derivado de los mismos, o un tramo de doble cadena del ADN o ARN o un derivado de los mismos o un híbrido de ADN y ARN o de ADN o ARN y un derivado de ácido nucleico tal como APN.

El procedimiento puede ser, por ejemplo, un ensayo en el que el marcador se libere de la sonda oligonucleotídica mediante la actividad de exonucleasa 5' a 3' de una ácido nucleico polimerasa.

Según otra alternativa, el procedimiento puede ser un ensayo en el que la sonda oligonucleotídica comprende bases de ARN y se escinde mediante la ribonucleasa H cuando se hibrida con un ADN diana monocatenario.

El marcador puede estar unido, por ejemplo, al terminal 5' del nucleótido, al terminal 3' del nucleótido, al terminal 5' y 3' de los nucleótidos de la sonda del oligonucleótido, o a cualquier nucleótido de la sonda oligonucleotídica entre los nucleótidos con terminales 5' y 3'.

En el apartado experimental siguiente del Estudio I, se presenta un nuevo procedimiento para la detección cualitativa y cuantitativa de una secuencia específica de ácido nucleico en una disolución homogénea que se basa en la actividad de exonucleasa 5' de una ácido nucleico polimerasa y en la utilización de un quelato de terbio fluorescente y estable (figura 1). La intensidad de la fluorescencia de este quelato está muy afectada por el medio químico inmediato del marcador. El quelato en el Estudio I y en el Estudio III se acopla al extremo 5' de una sonda oligonucleotídica que se utiliza para seguir la ampliación por PCR de una diana complementaria en un tubo cerrado. Se aprecia un aumento en la fluorescencia del lantánido a medida que la ADN polimerasa desprende el marcador de la sonda hibridada corriente abajo de un oligonucleótido cebador. Existen dos diferencias principales entre este ensayo y los ensayos con exonucleasa TaqMan 5' convencionales. En primer lugar, no existe la necesidad de un grupo extintor en la sonda. En segundo lugar, debido a la posibilidad de hacer las mediciones con resolución temporal, esta tecnología del marcador puede fácilmente combinarse con marcadores convencionales instantáneos con el fin de realizar un ensayo múltiple sin necesidad de basarse en ningún programa informático de resolución espectral. En el Estudio I se describen las propiedades fluorescentes dependientes del medio de un quelato Tb sensible al medio y se demuestra la aplicación de esta tecnología a la detección cualitativa y cuantitativa de secuencias diana específicas. Se muestra también aquí la viabilidad de los análisis multianalito que combinan quelatos de lantánido sensibles al medio con la detección convencional de TaqMan.

Se demuestra también la utilización de estos quelatos en hibridaciones homogéneas en las que el aumento de la señal no depende de la escisión de la sonda (Estudio II). Además, se presenta un estudio de detección múltiple de dos ácidos nucleicos diana diferentes utilizando sondas marcadas con europio y terbio (Estudio III).

**Sección experimental**

**Estudio I**

Oligonucleótidos y plantillas para PCR: Se sintetizaron cebadores y sondas oligonucleotídicas (tabla 1) en un sintetizador ABI392 de ADN/ARN (PE Applied Biosystems, US) utilizando la química convencional de fosforamidita, excepto para la sonda TaqMan específica del ADNc del antígeno específico de la próstata (PSA) convencional que se adquirió en SGS DNA, Suecia. Se introdujeron grupos amino primarios en los extremos 5' de las sondas utilizando una citosina fosforamidita modificada con amino (modC. Perkin Elmer Life Sciences, anteriormente EG&G Wallac. Finlandia). Dos bases que no se hibridan con la secuencia diana se añadieron a los extremos 3' de las sondas para asegurar que las sondas no pueden actuar como cebadores durante la PCR.

Se marcaron las sondas específicas para el PSA y el PSA mutante (PSAm) con un exceso molar de 100 veces de un quelato de terbio fluorescente, estable, modificado con isotiocianato (2,2',2'',2'''-{{6,6'-{4''-[2-(4-isotiocianatofenil)etil]-1H-pirazol-1'',3''-diil}bis(piridina)-2,2'-diil}bis(metilennitrilo)}tetrakis(acetato) de terbio (III); Perkin Elmer Life Sciences) disolviendo el quelato y el ADN en un tampón de carbonato sódico 50 mM (pH 9,8). Se ajustó la concentración de ADN a aproximadamente 2 $\mu g \mu l^{-1}$ y las reacciones se incubaron a 37ºC durante la noche. El quelato en exceso se eliminó utilizando una columna de filtración Nick gel (Pharmacia Biotech, Suecia). Las sondas se purificaron por HPLC utilizando una columna Sephasil Peptide C8 4.6/100 (Pharmacia Biotech) y un gradiente lineal de 16,5 min. de 2 a 70% de acetonitrilo en tampón de acetato de trietilamonio 50 mM (pH 6,8). Las sondas se secaron al vacío (Hetovac, Heto Holten, Dinamarca), disuelto en Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), cuantificado por espectrofotometría y almacenado en pequeñas alícuotas a -20ºC.

Los ADNc bicatenarios de PSA y PSAm escindidos de los plásmidos pGEM3-PSA y pGEM3-IS (Lundwall y Lilja, 1987; Ylikoski *et al*., 1999) se utilizaron como plantillas durante el desarrollo de la tecnología. Se utiliza PSA mutante como patrón interno en el ensayo de PCR de transcripción inversa de PSA cuantitativo (Ylikoski *et al*., 1999). Se diferencia del PSA en una deleción de dos pares de bases que está situada en medio del amplicón. Por lo tanto, el PSA y el PSAm son buenos analitos modelo para un sistema de detección que debe aplicarse a análisis secuencial cuantitativo y cualitativo. Las concentraciones de la plantilla de las soluciones madre se determinaron por espectrofotometría a 260 nm. En el ensayo de punto final doble se mezclaron las plantillas con un exceso de $10^8$ veces de ADN genómico humano de un donante sano.

**TABLA 1. Oligonucleótidos utilizados en este estudio**

| Oligonucleótido | Secuencia desde el extremo 5' al 3'[a] | Marcador/posición | Posición del nucleótido |
|---|---|---|---|
| Cebador 5' | TGA ACC AGA GGA GTT CTT GAC | ninguna | 523-543 |
| Cebador 3' | MCCC AGA ATC ACC CGA GCA G | ninguna | 667-685 |
| Sonda Tb específica de PSA | MCCT TCT GAG GGT GAA CTT GCG CTG[b] | Tb/5' | 596-617 |
| Sonda Tb específica de PSAm | MCCT TCT GAG GGT GAT TGC GCA CTG[b] | Tb/5' | 594-601, 604-617 |
| Sonda TaqMan específica para PSA | CCT TCT GAG GGT GAA CTT GCG C | FAM[c]/5' y TAMRA[d]/3' | 596-617 |

[a]M, citosina modificada por amino
[b]las letras en negrita indican bases que no son complementarias con la diana
[c]FAM, carboxifluoresceína
[d]TAMRA, tetrametil-rodamina



ES 2 302 721 T5

Caracterización de las propiedades fluorescentes de las sondas

Con el fin de investigar el efecto de la escisión de la sonda en la intensidad de la señal del terbio, se escindieron $10^{12}$ moléculas de sondas de PSA o PSAm marcadas con Tb con 25 U de nucleasa de Benzon (Merck, Alemania). Se incubaron las sondas con la enzima en 50 µl de Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía $MgCl_2$ 1 mM a 37ºC durante 30 min. midiéndose a continuación las señales de terbio utilizando un Victor™ 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer Life Sciences) y se compararon con las señales obtenidas de sondas intactas. Se utilizaron las series siguientes en todas las mediciones de terbio en este estudio: filtro de excitación 340 nm; filtro de emisión 545 nm; retardo 500 µs; tiempo de intervalo 1.400 µs y ciclo de 2.000 µs.

Para confirmar que las sondas se escinden de hecho durante la PCR, se ampliaron los ADNc de doble cadena de PSA y PSAm en Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM; $MgCl_2$ 3,5 mM; dNTP 0,1 mM (Pharmacia Biotech); cebador 3' 0,1 µM; cebador 5' 0,2 µM; sonda de terbio PSA o PSAm 33 nm y 1,25 U de AmpliTaq Gold DNA Polymerase (PE Applied Biosystems). Cada 50 µl de reacción contenía 10.000 copias de plantilla de PSA o de PSAm o ninguna plantilla en absoluto. El ciclo térmico constaba de una desnaturalización inicial de 10 min. y una etapa de activación de polimerasa a 95ºC seguido de 40 ciclos de 15 s a 95ºC y 1 min. a 61,5ºC. Las reacciones se realizaron en un PTC-200 DNA Engine (MJ Research Inc., US) en pocillos negros de polipropileno (cat. nº 6885, Corning Costar, Gran Bretaña) y se pesaron con Cycleseal® PCR Plate Sealer (Robbins Scientific Corporation, US). Las señales del terbio se midieron directamente a partir de los pocillos de ampliación después del ciclado térmico a temperatura ambiente. Para confirmar que el aumento de la señal de terbio detectado en las reacciones positivas era debido a la escisión de la sonda, se añadió colorante de fijación de ADN yoduro de POPO™-3 (Molecular Probes, US) a cada pocillo a una concentración de 100 nM. Se midieron las emisiones de Tb y de yoduro de POPO™-3 de resolución temporal a 545 nm y 572 nm. En las mediciones a 572 nm, se utilizaron los ajustes siguientes: filtro de excitación 340 nm; filtro de emisión 572 nm; retardo 60 µs; tiempo de intervalo 100 µs y ciclo de 1.000 µs. El yoduro de POPO™-3 se excita a una longitud de onda de emisión máxima del terbio (545 nm) y emite a 570 nm. La unión del yoduro de POPO™-3 a una sonda marcada con terbio producirá por lo tanto una transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre Tb y el colorante (Morrison, 1995). Esto puede apreciarse como una disminución en la emisión del Tb a 545 nm y, por otra parte, como un aumento de la emisión sensibilizada de POPO™-3', que puede registrarse a 572 nm. Si la sonda se ha escindido, sin embargo, no existirá transferencia de energía detectable entre los dos fluoróforos.

PCR cuantitativa en tiempo real

Para demostrar la naturaleza cuantitativa de la generación de la señal del terbio durante el ciclo térmico, se ampliaron el PSA y el PSAm con el fin de que la cantidad de plantilla de partida estuviera comprendida entre 0 y $10^7$ moléculas. Los parámetros del ciclo térmico fueron los descritos anteriormente. Se llevó a cabo la PCR cuantitativa en tiempo real en un instrumento prototipo que consistía en una unidad de medición Victor™ 1420 Multilabel Counter acoplada a un ciclador térmico PTC-100 (MJ Research Inc.) mediante una tapa caliente interna que se mantuvo a 105ºC. Se midieron las señales del terbio al final de cada etapa de hibridación/ampliación para determinar los ciclos umbral ($C_t$) de las reacciones individuales. El ciclo umbral se define como el ciclo de PCR en el que la relación señal a ruido (S/N) de fluorescencia de una reacción de ampliación dada supera el valor umbral S/N. Este valor umbral es fijado por el usuario. En este estudio, se utilizaron los valores umbral de 1,3 para el PSA y de 1,35 para el ensayo de PSAm. Se realizaron las curvas patrón de PSA y PSAm representando el ciclo umbral en función del número de copias de partida del PSA o del PSAm iniciales.

Ensayo doble utilizando fluorescencia con resolución temporal e instantánea

Se ampliaron 1.000 moléculas de ADNc bicatenario de PSA y/o PSAm en presencia de 250 ng de ADN genómico humano. El ADN genómico humano no se amplía en este ensayo ya que las secuencias del cebador representan uniones exón-intrón (Ylikoski *et al.*, 1999). Las condiciones de reacción fueron idénticas a las utilizadas en la PCR cuantitativa en tiempo real, esta vez se utilizaron solamente dos sondas, la sonda TaqMan específica de PSA y la sonda del terbio específica de PSAm, ambas a una concentración de 33 nM. Las señales de FAM y del terbio se midieron directamente en los pocillos de ampliación después del ciclo térmico con un Victor™ 1420 Multilabel Counter a temperatura ambiente. En la medición de FAM se utilizaron los filtros de excitación a 485 nm y de emisión a 535 nm. La energía de excitación se fijó en 24.064 y el tiempo de medición fue de 1,0 s. Se analizaron los resultados calculando las señales media (M) y la desviación estándar (SD) de las reacciones que contienen únicamente ADN genómico y plantilla no específica. Se fijó un valor umbral a M + 2×SD. Todas las reacciones con una señal de terbio o de FAM superiores al umbral se consideraron positivas para la plantilla correspondiente.

RESULTADOS

Propiedades fluorescentes del quelato de terbio

Se ha observado en el laboratorio que la intensidad de fluorescencia del quelato de terbio fluorescente 2,2',2'',2'''-{{6,6'-{4''-[2-(4-isotiocianatofenil)etil]-1H-pirazol-1'',3''-diil}bis(piridina)-2,2'-diil}bis(metilennitrilo)}tetrakis(acetato) de terbio (III) es muy sensible al medio químico inmediato del grupo marcador. Por consiguiente, estaba previsto que el

desprendimiento del quelato de una sonda de ADN produciría un cambio detectable en la fluorescencia del terbio. Al colocar el marcador en el extremo 5' de una sonda, la actividad de exonucleasa 5' a 3' de una ADN polimerasa termoestable pudo utilizarse para desprender el quelato de una sonda hibridada corriente abajo de un cebador durante la etapa de hibridación/ampliación de PCR. El cambio de señal resultante pudo utilizarse para seguir la ampliación del ácido nucleico. La idea se probó en primer lugar digiriendo la sonda con una nucleasa. La escisión enzimática de las sondas marcadas con terbio produjo un aumento de la señal del terbio de aproximadamente 3 a 4 veces (2,9 para la sonda específica para el PSA y 3,8 para la del PSAm) cuando se compara con una sonda intacta.

La Figura 2A ilustra cómo la ampliación de una secuencia diana en presencia de una sonda complementaria produce un aumento claro de la señal del terbio. Después de 40 ciclos, la fluorescencia del terbio es claramente mayor en las reacciones que contienen una sonda específica para PSA y 10.000 copias iniciales de ADNc del PSA que en las reacciones que no contienen plantilla o una plantilla no específica para PSAm. Por lo tanto, en las reacciones que contienen una sonda específica para PSAm, solamente la ampliación del PSAm produce un aumento de señal significativo.

La Figura 2B demuestra que este aumento de señal es de hecho debido a la escisión de la sonda. La adición de un colorante que se une al ADN que se excita a la longitud de emisión máxima del terbio produce una disminución clara de la fluorescencia del terbio en las reacciones que no contienen una diana complementaria con la sonda. Asimismo, en las reacciones negativas, la emisión de larga duración sensibilizada del colorante que se une al ADN es detectable a 572 nm. El desplazamiento en las intensidades de emisión puede ilustrarse dividiendo la señal de emisión a 545 nm por la señal a 572 nm. La relación es aproximadamente unas diez veces mayor en las reacciones que no contenían una diana complementaria con la sonda lo que indica el desprendimiento del marcador de la sonda en estas reacciones.

PCR cuantitativa en tiempo real

En la figura 3 se presentan los diagramas de ampliación para diferentes cantidades de ADNc de PSA y PSAm. Las señales se han convertido en relaciones señal a ruido. El valor del ruido se determinó individualmente para cada reacción calculando la señal media del terbio de los ciclos 6 a 10. El valor umbral para indicar la diferencia entre las reacciones positiva y negativa fue fijado en S/N 1,3 para el ensayo del PSA y 1,35 para el del PSAm. Debe utilizarse un valor umbral superior en el ensayo del PSAm debido a que una ligera reactividad cruzada entre la sonda de PSAm y el PSA diana a la temperatura de hibridación que se utilizó. Las $C_t$:s se representaron en función del número de copias de la diana inicial para preparar las curvas patrón de cada ensayo (figura 4). Existe una relación log-lineal inversa precisa entre la cantidad del número de copias de partida y el ciclo umbral en ambos ensayos. El coeficiente medio de variación en las mediciones por replicado fue de 2,3 (±2,5)%.

Ensayo de punto final doble

Se combinó la fluorometría con resolución temporal y marcadores con fluorescencia instantánea en un ensayo modelo que detecta PSA y PSAm por separado en un tubo. La Figura 5 presenta las señales de fluorescencia de FAM sustraído del fondo y de terbio (específicas para PSA y PSAm, respectivamente) de las reacciones que contenían 1.000 copias iniciales de PSA, PSAm o de ambas juntas. Se midieron las señales después de 40 ciclos de PCR. Los valores umbral (media de las referencias negativas + 2×SD) para FAM y terbio fueron de 260 y 46.500 recuentos, respectivamente. El ensayo proporciona resultados correctos (una señal de FAM positiva en presencia de PSA y una señal de terbio positiva en presencia de PSAm) aun cuando se mezclan moléculas diana con un gran exceso de ADN no específico.

**Exposición**

Existen múltiples técnicas que permiten la ampliación y la detección simultáneas del ácido nucleico en un tubo cerrado (Tyagi y Kramer, 1996; Nazarenko *et al.*, 1997; Morrison, 1995; Whitcombe *et al.*, 1999). Todas estas técnicas necesitan una sonda marcadora doble o cebador o dos sondas por separado marcadas con un par de transferencia de energía. A pesar de la posibilidad de acoplar varios tipos diferentes de grupos marcadores en una sonda durante la síntesis de oligonucleótidos automatizada, la síntesis de dichas sondas marcadoras dobles es todavía algo difícil. Dado que cualquier sonda impurifica fácilmente el plomo a un fondo alto de fluorescencia y rendimiento reducido del ensayo, existe la necesidad de un método más sencillo. Aunque se pueden evitar los problemas asociados a las sondas dobles marcadoras diseñando dos sondas como en el formato de sonda de hibridación, ésta no es una solución ideal. Cuantas más sondas se deban utilizar para cada diana, más compleja resulta la reacción de ampliación y los productos artificiales no deseados, tales como los dímeros sonda-cebador, etc. pueden acumularse (Kreuzer *et al.*, 1999). Teóricamente, se tendría que diseñar únicamente una sonda lineal con un marcador y sin más estructuras secundarias que puedan interferir con la eficacia de hibridación de la sonda. El límite de detección de tal procedimiento no debería, sin embargo, ser superior al de los procedimientos existentes donde se puede alcanzar fácilmente un intervalo lineal de por lo menos 10 a $10^7$ moléculas de plantilla inicial, cuando se utiliza detección en tiempo real junto con la ampliación de la diana.

Se ha descrito un sistema marcador que no requiere un grupo extintor independiente ya que la mera proximidad del ADN monocatenario extingue la fluorescencia con resolución temporal del marcador indicador. La sonda presenta el diseño más sencillo posible ya que no se necesitan más estructuras secundarias. La generación de la señal se basa en la escisión de la sonda dependiente de la plantilla, enzimática. La escisión de la sonda produce un aumento de la señal que puede utilizarse para la detección cualitativa y cuantitativa de un ácido nucleico diana en una disolución homogénea. Una relación señal a ruido máxima de 4 se obtuvo digiriendo una sonda marcadora de terbio con una nucleasa. Aunque este aumento de la señal es muy modesto cuando se compara con los resultados obtenidos por ejemplo con sondas moleculares de baliza (Tyagi *et al*., 1998), es suficiente sin embargo: se obtuvo un intervalo dinámico grande (por lo menos 10 a $10^7$ moléculas de plantilla inicial). Esto se debe probablemente al hecho de que en la medición de la fluorescencia con resolución temporal la fluorescencia de fondo no específico es casi insignificante (Soini y Lövgren, 1987) y por lo tanto pueden detectarse cambios muy sutiles en la señal específica. El límite de detección existente de un ensayo de PCR en tiempo real se refiere al número de amplicones diana sintetizados cuando se produce una señal detectable de fluorescencia. Una estimación de este límite de detección puede obtenerse extrapolando una curva patrón al punto en el que $C_t$=0. Con la tecnología de detección utilizada este límite de detección es de aproximadamente $10^{12}$ amplicones diana sintetizados, que es muy similar a los resultados obtenidos con otras técnicas (Nitsche *et al*., 1999; Vet *et al*., 1999). Es posible que este límite de detección pueda mejorarse más aumentando el grado de marcado de la sonda y/o optimizando la posición del grupo marcador en la sonda. Se necesitan además más estudios para determinar el efecto de la secuencia de la sonda en la eficacia de la extinción.

Se debieron marcar sus sondas después de la síntesis porque no existe una fosforamidita que pueda acoplarse directamente del quelato a la sonda durante la síntesis. Sin embargo se han modificado diferentes quelatos en fosforamiditas (Kwiatkowski *et al*., 1994). Por consiguiente, se asume que un reactivo de fosforamidita que contuviera el quelato que se utilizó en este estudio es factible. Una vez dicho reactivo está disponible, la síntesis de la sonda se simplificará aún más.

Las ventajas de la PCR cuantitativa en tiempo real (Higuchi *et al*., 1992) se han descrito ampliamente (Orlando *et al*., 1998; Freeman *et al*., 1999). Éstas incluyen mejor reproductibilidad, riesgos de contaminación reducidos y mayor rendimiento del ensayo cuando se compara con los ensayos de PCR cuantitativos tradicionales que incluyen varias etapas después de la PCR. Los ensayos cuantitativos de PCR basados en la determinación del punto final de la cantidad de producto de PCR no son solamente laboriosos pero la fiabilidad de los resultados es con frecuencia cuestionable debido a la cantidad de producto de PCR y al final del ciclo térmico está solamente poco correlacionado con la cantidad de plantilla inicial (figura 3). Sin embargo, la determinación del ciclo umbral (punto temporal cuando se ha sintetizado suficiente producto de PCR para producir una señal detectable de fluorescencia) permite una cuantificación muy precisa y reproducible, porque la detección se hace antes de que la reacción de ampliación alcance una fase estacionaria.

Actualmente, todos los métodos de detección de ácido nucleico homogéneos disponibles utilizan marcadores con fluorescencia que disminuye rápidamente o es instantánea. Debido a su amplitud, los picos de emisión solapantes de los marcadores utilizados, las mediciones multiparamétricas siempre requieren la utilización del programa informático con poderosa resolución espectral, es decir, los resultados no pueden leerse directamente a partir de los recuentos de fluorescencia a diferentes longitudes de onda. Pero incluso con el mejor programa informático a veces es imposible distinguir las emisiones de dos marcadores uno del otro, lo que puede producir resultados positivos falsos (Vet *et al*., 1999). Un método mejor consistiría en la utilización de marcadores fluorescentes con duraciones prolongadas del estado excitado (tal como quelatos de lantánido fluorescentes y estables) y la fluorometría con resolución temporal (Soini y Lövgren, 1987) junto con marcadores instantáneos. En una medición de fluorescencia con resolución temporal la señal no se registra directamente después de la pulsación de excitación sino después de un determinado periodo de tiempo. Durante este periodo de tiempo la fluorescencia del fondo no especificada y la fluorescencia de cualquiera de los marcadores instantáneos, tal como la fluoresceína, desaparece. La medición se repite varias veces durante un corto periodo de tiempo, lo que produce una amplificación de la señal. Dado que los lantánidos son excitados por la luz en el espectro UV, no producen ninguna señal de fondo para los marcadores instantáneos que son excitados por la luz en el espectro visible. Por lo tanto, combinando estas tecnologías de marcadores en un ensayo puede discriminarse totalmente entre las señales que proceden de diferentes marcadores y maximizar la especificidad de un ensayo homogéneo multianalito. En este estudio se detectaron dos analitos muy similares por separado en un tubo. Esto se realizó para demostrar que combinando los marcadores con diferentes duraciones de fluorescencia se puede conseguir sistemas múltiple-analito que no adolecen de ninguna diafonía entre los marcadores. Los espectros de emisión de los marcadores que fueron utilizados (Tb y FAM) se solapan considerablemente. Sin embargo, sus señales se resolvieron completamente entre sí. Se espera que resulte bastante sencillo aumentar el número de analitos en un tubo sin comprometer además la especificidad del ensayo seleccionando marcadores con diferentes duraciones de la fluorescencia y diferentes longitudes de onda de excitación y utilizando una fuente de luz de excitación de longitud de onda variable en las mediciones.

Además de la discriminación del alelo y de otros ensayos cualitativos, la posibilidad de realizar la detección múltiple es de importancia también para los ensayos cuantitativos. A pesar del hecho de que no se necesita un patrón interno para compensar los cambios en la eficacia de la ampliación cuando se basa en la cuantificación en la detección en tiempo real (McBride *et al*., 1998), se necesita todavía un patrón interno para compensar los errores que proceden

del tratamiento de la muestra y de posibles etapas de transcripción inversa (Freeman *et al*., 1999). La mejor manera de cuantificar el patrón interno, desde el punto de vista del rendimiento, sencillez y fiabilidad del ensayo, es en el mismo tubo con la diana existente. Se ha presentado este método que es factible detectando PSA y PSAm, un patrón interno que es ampliado por los mismos cebadores que PSA, en un tubo sellado.

Se ha demostrado la aplicación de este nuevo principio de generación de la señal en los análisis de ácido nucleico tanto cuantitativos como cualitativos. Aunque no se necesita un análisis cualitativo para los analitos del presente modelo, el ADNc del PSA y una forma mutante de PSA producida *in vitro*, su detección en la presencia de un gran exceso de ADN no relacionado demuestra que la tecnología de marcador utilizada puede aplicarse a varios tipos de mutación o sistemas de detección de patógenos. Se concluye que utilizando una sonda marcada en su extremo 5' con un quelato de terbio fluorescente y estable se puede preparar fácilmente un análisis para ácidos nucleicos que sea tan apropiado y fiable para el usuario como otros procedimientos correspondientes con los atributos adicionales de diseño de la sonda más sencillo y una estabilidad mucho mejor para los análisis múltiples.

**Estudio II**

Hibridación dependiente del aumento de la señal del terbio

Descripción de los experimentos

Una sonda oligonucleotídica con la secuencia de bases 5'-CCT TCT GAG GGT GAA CTT GCG C-C7-3' se modificó con un modificador de 5'-amino C6-TFA y un modificador 3'-amino C7 (Glen Research Corporation, Sterling, US). la sonda se marcó con 2,2',2'',2'''-{{6,6'-{4''-{2-{4-{[2-(4-isotiocianatofenil)-1-oxo-etil]amino}fenil}etil}-1H-pirazol-1'',3''-diil}bis(piridina)-2,2'-diil}bis(metilennitrilo)}tetrakis(acetato) de terbio (III) y por separado con 2,2',2'',2'''-{{6,6'-{4''-[2-(4-isotiocianatofenil)etil]-1H-pirazol-1'',3''-diil}bis(piridina)-2,2'-diil}bis(metilennitrilo)}tetrakis(acetato) de terbio (III). Las sondas (Tb1093 y Tb1093S, respectivamente) que contienen un marcador de Tb en ambos extremos se purificaron por HPLC a partir del marcador desacoplado y de la sonda.

Se probaron las sondas Tb1093 y Tb1093S en una hibridación homogénea con un oligonucleótido diana sintético que presenta la secuencia 5'-G CGC AAG TTC ACC CTC AGA AGG-3'. Se mezclaron $10^{10}$ moléculas de la sonda marcada con Tb con $10^{8}$, $10^{9}$, $10^{10}$, $10^{11}$ y $10^{12}$ moléculas del oligonucleótido diana en 50 µl de un tampón de hibridación que contiene Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; EDTA 250 µM; NaCl 1 M; Tween 20 al 0,1%; PEG 8000 al 10%; 250 $\mu g ml^{-1}$ de albúmina de suero bovino. Las señales del terbio se registraron inmediatamente después de mezclar a 545 nm (longitud de onda de excitación 340 nm, nivel de energía instantáneo 173, tiempo de retraso 500 µs, tiempo de intervalo 1.400 µs, tiempo del ciclo 2.000 µs) utilizando un Victor™ 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer Life Sciences, Turku, Finlandia). Las señales de las reacciones de hibridación que contienen la diana sintética se compararon con las referencias negativas que no contienen la diana.

La dependencia de la hibridación del aumento de la señal del terbio se demostró mezclando $10^{10}$ moléculas de sondas marcadas con terbio con un exceso molar de diez veces de la secuencia diana específica. La sonda Tb1093 se mezcló también con un exceso diez veces molar de ADN monocatenario no complementario o 1 µg de ADN plásmido bicatenario no relacionado. Estas señales del terbio y todas las mezclas se registraron como se describió anteriormente y las señales se compararon con las referencias negativas que contienen solamente la sonda marcada con Tb.

La sonda Tb1093 se probó también en la detección de un producto específico de reacción en cadena de polimerasa. Se amplió un segmento de 163 bp del ADNc del antígeno específico de la próstata en presencia de la sonda que utiliza una ADN polimerasa con 5'-exonucleasa insuficiente. Los 50 µl de las reacciones estaban constituidos por 1 × tampón de PCR AdvanTaq (Clontech Laboratories, Palo Alto, US); $MgCl_2$ 3,5 mM; dNTP:s 0,2 mM; cebador transcrito 0,5 µM (secuencia 5'- TGA ACC AGA GGA GTT CTT GAC-3'); cebador complementario 60 nm (5'- CCC AGA ATC ACC CGA GCA G-3'); $10^{10}$ moléculas de la sonda marcada con terbio y 1 × AdvanTaq ADN polimerasa (Clontech Laboratories). Se llevó a cabo el ciclo térmico en un PTC200 DNA Engine (MJ Research, US) de la forma siguiente: desnaturalización inicial a 94ºC durante 2 min. 30 s. y 40 ciclos de desnaturalización a 94ºC (30 s.), hibridación a 61,5ºC (30 s.) y ampliación a 68ºC (45 s.) tras lo cual se enfriaron las reacciones a 25ºC y se registraron las señales de terbio de cada pocillo de ampliación como se describió anteriormente. Las señales de las reacciones que contenían $5 \times 10^{6}$ moléculas de ADN bicatenario de PSA se compararon con las señales obtenidas de las reacciones de referencia negativa. La sonda de terbio es complementaria con el producto de la ampliación del cebador transcrito. La ampliación se hizo asimétrica (un exceso aproximadamente de ocho veces de cebador transcrito se utilizó cuando se comparaba la cantidad del cebador complementario) para asegurar que en la medición de la temperatura (temperatura ambiente) habría suficiente producto monocatenario disponible para la hibridación.

Resultados

La hibridación de las sondas marcadas con Tb con una secuencia diana complementaria produjo un aumento claro de la señal del terbio. La figura 6 presenta las señales de terbio sustraídas del fondo de las reacciones de

hibridación que contienen $10^{10}$ moléculas de la sonda marcada con terbio y diferentes cantidades de un oligonucleótido diana complementario. Se necesitan $10^{10}$ moléculas de diana para generar una señal que está significativamente por encima del fondo.

El hecho de que esta señal aumente se debe realmente a la hibridación y no a algún otro producto artificial tal como se muestra en un experimento, en el que la sonda de terbio se mezcló con su diana complementaria y ADN monocatenario o bicatenario no específicos. Los resultados se presentan en la figura 7. Únicamente la presencia de una diana complementaria produce un aumento de la señal del terbio.

Se utilizó la sonda Tb1093 en la detección de un producto de la reacción en cadena de polimerasa específico. La reacción de ampliación se hizo asimétrica utilizando un exceso de ocho veces de cebador cuyo producto de ampliación es complementario con la sonda marcada con Tb. La ADN polimerasa que se utilizó es una enzima con 5'-exonucleasa insuficiente, de modo que la sonda no es degradada por la polimerasa durante la PCR. Cualquier aumento de señal del terbio debe ser por consiguiente resultado de la hibridación y no de la escisión de la sonda. Las reacciones positivas que contenían una plantilla de ADNc de PSA dieron, cuando se registraron las señales del terbio tras la ampliación, una señal de fluorescencia que fue 472 recuentos superior a un valor umbral que era la fluorescencia media de las reacciones de referencia negativa + 1,96 × desviación estándar de las referencias negativas. Esto indica claramente que las sondas oligonucleotídicas marcadas con un quelato de lantánido sensible al medio pueden utilizarse en la detección de un polinucleótido específico en un tubo cerrado.

**Estudio III**

Detección múltiple de dos ácidos nucleicos diana diferentes utilizando sondas marcadas con europio y terbio

Descripción del experimento

La sonda específica para PSAm (tabla 1, Estudio I) se marcó con 2,2',2'',2'''-{{6,6'-{4''-[2-(4-isotiocianatofenil)etil]-1H-pirazol-1'',3''-diil}bis(piridina)-2,2'-diil}bis(metilennitrilo)}-tetrakis(acetato) de europio (III). La sonda se utilizó junto con una sonda específica para PSA marcada con terbio (tabla 1) en la detección en tiempo real de la ampliación de PSA o/y PSAm. Las ampliaciones se realizaron en condiciones que eran iguales a las descritas en el Estudio I bajo el encabezamiento "PCR cuantitativa en tiempo real" con la excepción de que esta vez tanto la sonda específica para PSA marcada con terbio como la sonda específica para PSAm marcada con europio se incluyeron en la reacción, ambas a una concentración de 33 nM. Se midieron las señales del terbio y del europio al final de cada etapa de hibridación. Los parámetros de medición del terbio fueron los descritos anteriormente. En la medición del europio, la longitud de onda de excitación fue de 340 nM. La luz de emisión con resolución temporal se recogió a 615 nm utilizando un tiempo de retraso de 200 µs y un intervalo de tiempo de 1.800 µs. El tiempo del ciclo fue de 2.100 µs. Se corrigieron las señales del europio para el fondo del terbio, debido a que uno de los máximos de emisión del terbio es a 615 nm. Se realizó la corrección espectral sustrayendo la señal del europio medida la señal del terbio medida a 545 nm multiplicada por 0,24. Todas las señales se dividieron por la fluorescencia media de los ciclos 6 a 10 para generar la señal a las relaciones de ruido. Las reacciones de ampliación individuales no contenían plantilla, contenían $5\times10^5$ moléculas de ADN bicatenario de PSA o PSAm o cantidades iguales de ambas plantillas.

Resultados

La señal de europio y terbio para las relaciones de ruido obtenida de las reacciones que contienen una sonda de PSAm marcada con europio, una sonda de PSA marcada con terbio y ninguna plantilla o plantilla de PSA o/y PSAm se presentan en la figura 8. La ampliación del ADNc bicatenario de PSA produce un aumento de la señal del terbio, mientras que la ampliación del PSAm produce un aumento de la señal del europio. Estos resultados demuestran que pueden utilizarse dos marcadores de lantánido en un ensayo con ácido nucleico homogéneo múltiple, indicando la intensidad de la señal de cada marcador la presencia o ausencia del polinucleótido diana respectivo.

**Referencias**

Clegg, R.M. (1992) *Meth Enzymol*., 211, 353-388

Freeman, W.M., Walker, S.J. y Vrana, K.E. (1999) *Biotechniques* 26, 112-122; 124-125

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. y Griffith, R. (1992) *Bio/Technology* 10, 413-417

Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R. y Gelfand, D.H. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA*. 88, 7276-7280

Isaksson, A. y Landegren, U. (1999) *Curr Opin Biotechnol*. 10, 11-15

Kreuzer, K.A., Lass, U., Bohn, A., Landt, O. y Schmidt, C.A. (1999) *Cancer Res*. 59, 3171-3174

Kricka, L.J. (1999) *Clin Chem*. 45, 453-458

Kwiatkowski, M., Samiotaki, M., Lamminmaki, U., Mukkala, V.M. y Landegren, U. (1994) *Nucl Acids Res*. 22, 2604-2611

Latva, M., Takalo, H., Mukkala, V.-M., Matachescu, C., Rodriguez-Ubis, J.C. y Kankare, J. (1997) Correlation between the lowest triplet state energy level of the ligand and lanthanide(III) luminescence quantum yield. en Latva, M., Studies on the solution structure, energy transfer and enhanced luminescence of Eu(III) and Tb(III) aminopolycarboxylate chelates, Academic dissertation. Department of Chemistry, University of Turku, Finlandia.

Lee, G.L., Connell. C.R. y Bloch, W. (1993) *Nucleic Acids Res*. 21, 3761-3766

Livak, K., Flood, S., Marmaro, J., Giusti, W. y Deetz, K. (1995) *PCR Meth Appl*. 4.357-362

Lundwall, Å. y Lilja. H. (1987) *FEBS Lett*. 214, 317-322

Lövgren, T. y Pettersson, K. (1990) Time-resolved fluoroimmunoassay, advantages and limitations. en Van Dyke, K. (ed.), *Luminescence immunoassay and molecular applications*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 233-250

McBride, L., Livak, K., Lucero. M., Goodsaid, F., Carlson, D., Stevens. J., Allen. T., Wyatt, P., Thiel, D., Honebein, P. *et al*. (1998) en Ferré, F. (ed.), *Gene quantification*. Birkhäuser, Boston. 97-110

Morrison, L.E. (1995) y Kricka, L.J. (ed.), *Nonisotopic probing, blotting, and sequencing*. Academic Press. Inc., San Diego. 430-471

Mukkala, V.-M., Helenius, M., Hemmilä, I., Kankare, J. y Takalo, H. (1993) Development of luminescent europium (III) and terbium(III) chelates of 2,2':6',2"-terpyridine derivatives for protein labelling. *Helv. Chim. Acta* 76

Nazarenko, I.A., Bhatnagar, S.K. y Hohman, R.J. (1997) *Nucleic Acids Res*. 25, 2516-2521

Nitsche, A., Steuer, N., Schmidt. C.A., Landt. O. y Siegert, W. (1999) *Clin Chem*. 45. 1932-1937

Orlando, C., Pinzani, P. y Pazzagli, M. (1998) *Clin Chem Lab Med*. 36, 255-269

Saiki. R.K., Scharf. S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn. G.T., Erlich. H.A. y Arnheim, N. (1985) *Science* 230, 1350-1354

Selvin, P.R. (1995) *Meth Enzymol*. 246, 300-334

Soini. E. y Lövgren. T. (1987) *CRC Crit Rev Anal Chem*. 18, 105-154

Takalo, H., Mukkala, V.-M., Meriö, L., Rodriguez-Ubis, J.C., Sedano, R., Juanes, O. y Brunet, E. (1997) Development of luminescent terbium(III) chelates for protein labelling: effect of triplet-state energy level. *Helv Chim Acta* 80, 372-387

Tyagi, S. y Kramer, F.R. (1996) *Nature Biotechnology* 14, 303-308

Tyagi, S., Bratu, D.P. y Kramer, F.R. (1998) *Nature Biotechnology* 16. 49-53

Vet, J.A.M., Majithia, A.R., Marras, S.A.E., Tyagi, S., Dube, S., Poiesz. B.J. y Kramer. F.R. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA*. 96, 6394-6399

Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S.P., Brown, T. y Little, S. (1999) *Nat Biotechnol*. 17, 804-807

Williams, P.M., Giles, T., Tucker, A., Winer, A. y Heid, C. (1998) en Ferré, F. (ed.), *Gene quantification*. Birkhäuser, Boston, 313-325

Wittwer. C.T., Herrman, M.G., Moss, A.A. y Rasmussen, R.P (1997a) *Biotechniques* 22, 130-131; 134-138

Wittwer, C.T., Ririe, K., Andrew, R., David. D., Gundry, R, y Balls, U. (1997b) *BioTechniques* 22, 176-181

Ylikoski, A., Sjöroos, M., Lundwall, Å., Karp, M., Lövgren, T., Lilja, H. y Iitiä, A. (1999) *Clin Chem*. 45, 1397-1407

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento homogéneo para detectar por lo menos un polinucleótido diana en una muestra que comprende las etapas siguientes:

- poner en contacto una muestra que comprende dicho polinucleótido o el polinucleótido que forma ácidos nucleicos o derivados de los mismos con una sonda oligonucleotídica marcada con un solo tipo de marcador,

- excitar el marcador, y

- controlar la intensidad de la señal de dicho marcador para indicar la presencia o ausencia en una muestra de dicho polinucleótido diana, caracterizado porque el marcador es un quelato lantánido fluorescente que contiene un grupo fotoabsorbente, la señal de dicho marcador aumenta o disminuye bajo la hibridación de la sonda oligonucleotídica cuando dicha muestra se pone en contacto con el polinucleótido diana y dicha sonda oligonucleotídica se hibrida selectivamente a dicho polinucleótido diana y se mide dicho marcador por fluorometría con resolución temporal y porque el marcador se escinde químicamente de la sonda oligonucleotídica tras la hibridación, y porque dicho procedimiento es un ensayo en el que dicho marcador es liberado de dicha sonda oligonucleotídica por la actividad de exonucleasa 5' a 3' de una ácido nucleico polimerasa.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra se pone en contacto con sondas oligonucleotídicas adicionales que presentan diferentes secuencias de base, estando dichas sondas marcadas con diferentes marcadores de manera que todos los marcadores presentan longitudes de onda de señal distinguibles, pudiendo así dichas sondas oligonucleotídicas adicionales hibridar a diferentes polinucleótidos diana en la muestra.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el procedimiento se realiza en el control en tiempo real de las reacciones de síntesis de ácido nucleico midiendo la intensidad de la señal de dicho marcador a intervalos regulares durante una reacción de síntesis de ácido nucleico y comparando las intensidades de la señal de una reacción que contiene una muestra de ácidos nucleicos y de una reacción de referencia negativa que no contiene dicho polinucleótido diana, indicando una diferencia en las intensidades de la señal de estas dos la presencia de dicho polinucleótido diana en dicha muestra; y detectando el punto temporal cuando la intensidad de la señal de una reacción que contiene dicho polinucleótido diana comienza claramente a diferenciarse de la intensidad de la señal de dicha reacción de referencia negativa, indicando el punto temporal detectado la cantidad inicial de polinucleótido diana en dicha muestra.

4. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el procedimiento se realiza en la detección del punto final de los productos de la reacción de síntesis del ácido nucleico midiendo la intensidad de la señal de dicho marcador después de dicha reacción de síntesis del ácido nucleico y comparando la intensidad de la señal de una reacción que contiene dicha muestra de ácidos nucleicos y la intensidad de la señal de una reacción de referencia negativa que no contiene dicho polinucleótido diana, indicando una diferencia en las intensidades de la señal de estas reacciones la presencia de dicho polinucleótido diana en dicha muestra de ácidos nucleicos.

5. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque dicha sonda oligonucleotídica es de ADN, ARN o en el que dicha sonda oligonucleotídica es una quimera de cualesquiera de dos o más tipos diferentes de ácidos nucleicos o derivados de los mismos.

6. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque dicho polinucleótido diana es un ácido nucleico monocatenario, ADN o ARN o un derivado de los mismos, o un tramo de doble cadena de ADN o ARN o un derivado de los mismos o un híbrido de ADN y ARN o de ADN o ARN y un derivado de ácido nucleico tal como APN.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque dicho marcador está unido al nucleótido 5' terminal de dicha sonda oligonucleotídica.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque dicho marcador está unido al nucleótido 3' terminal de dicha sonda oligonucleotídica.

9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque dicho marcador está unido a cualquier nucleótido de dicha sonda oligonucleotídica entre los nucleótidos 5' y 3' terminales.

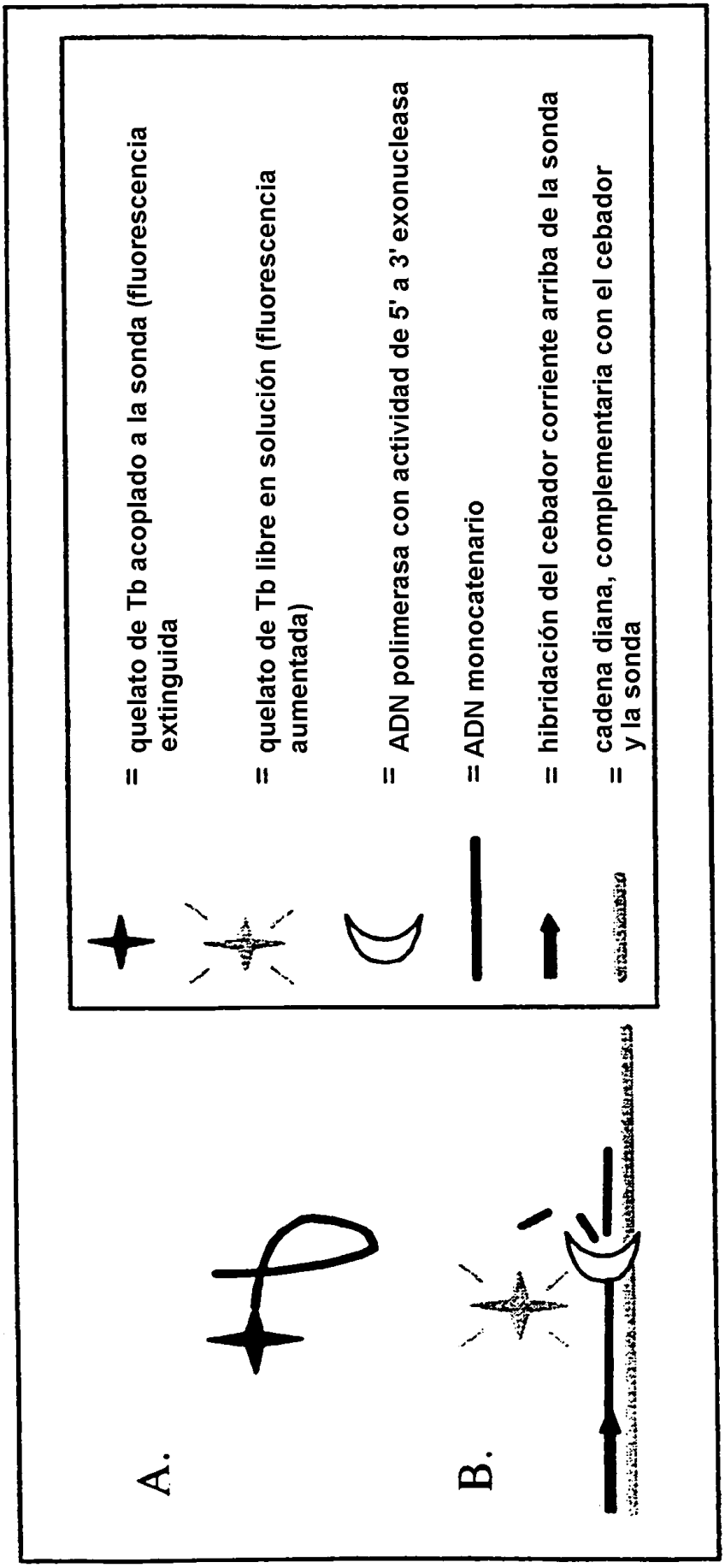

= quelato de Tb acoplado a la sonda (fluorescencia extinguida
= quelato de Tb libre en solución (fluorescencia aumentada)
= ADN polimerasa con actividad de 5' a 3' exonucleasa
= ADN monocatenario
= hibridación del cebador corriente arriba de la sonda
= cadena diana, complementaria con el cebador y la sonda
A.
B.

FIG.1

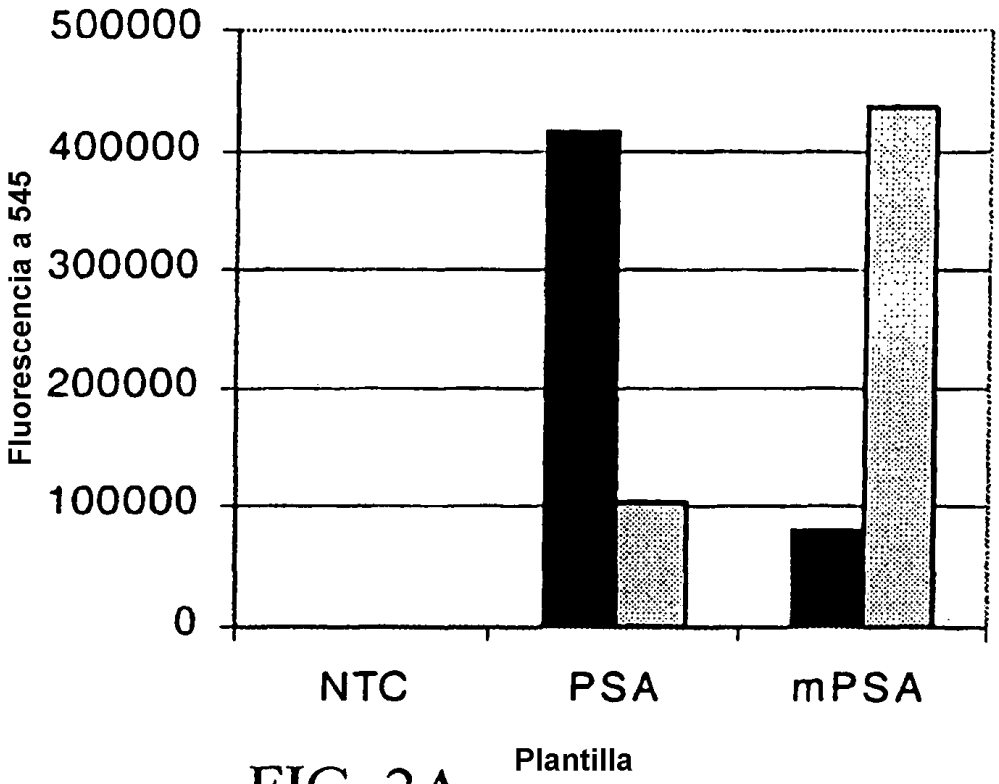

500000
400000
300000
200000
100000
0
Fluorescencia a 545
NTC
PSA
mPSA
Plantilla

FIG. 2A

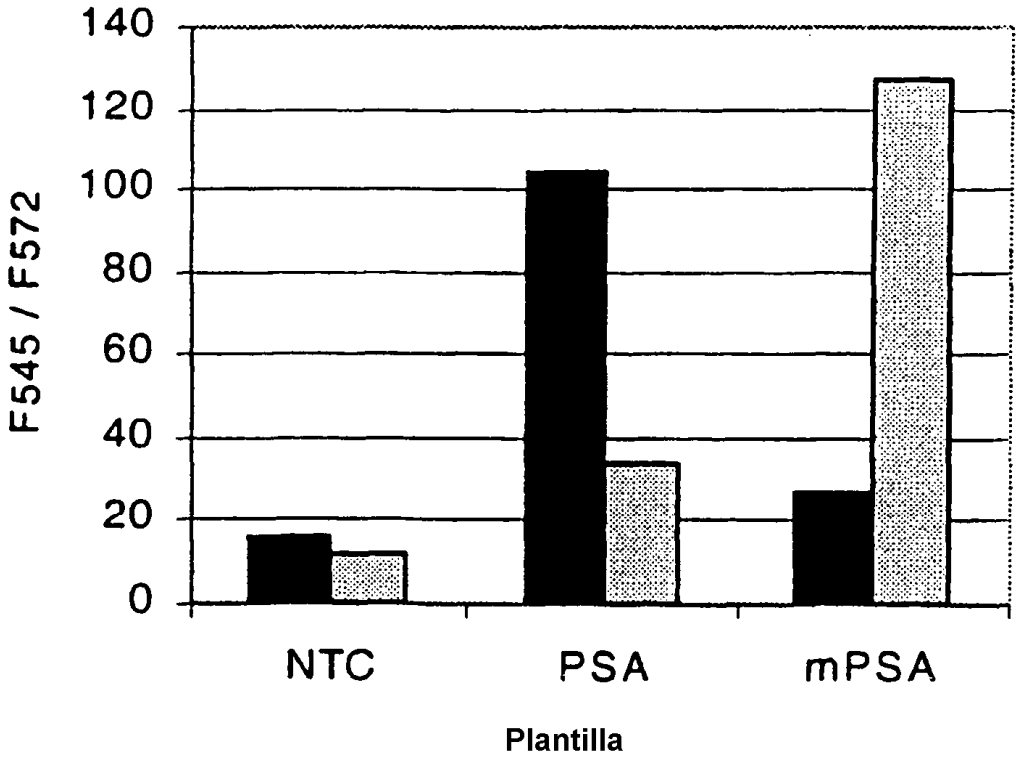

140
120
100
80
60
40
20
0
F545 / F572
NTC
PSA
mPSA
Plantilla

FIG. 2B

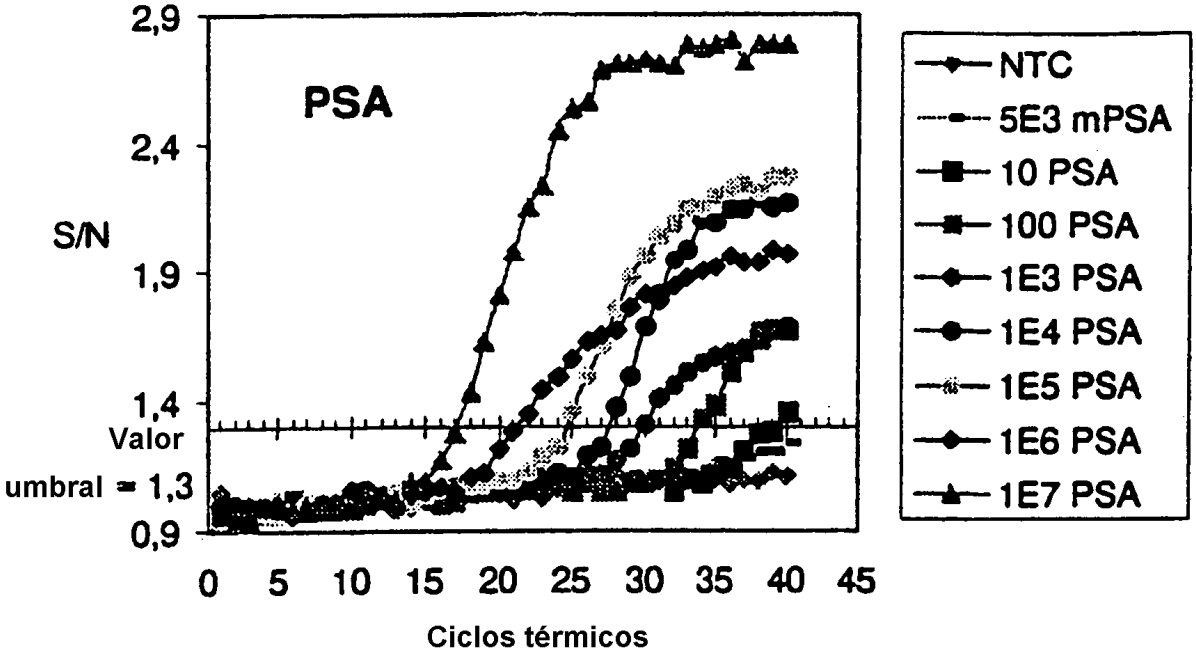

PSA
S/N
2,9
2,4
1,9
1,4
Valor
umbral = 1,3
0,9
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45
Ciclos térmicos
NTC
5E3 mPSA
10 PSA
100 PSA
1E3 PSA
1E4 PSA
1E5 PSA
1E6 PSA
1E7 PSA

FIG. 3A

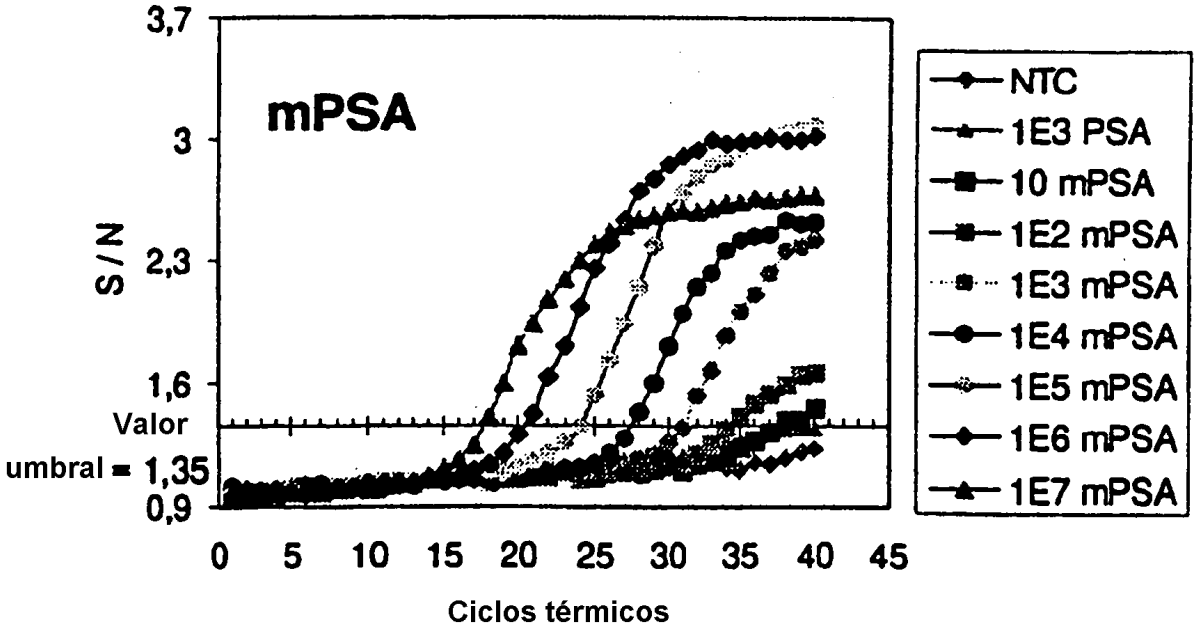

mPSA
S / N
3,7
3
2,3
1,6
Valor
umbral = 1,35
0,9
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45
Ciclos térmicos
NTC
1E3 PSA
10 mPSA
1E2 mPSA
1E3 mPSA
1E4 mPSA
1E5 mPSA
1E6 mPSA
1E7 mPSA

FIG. 3B

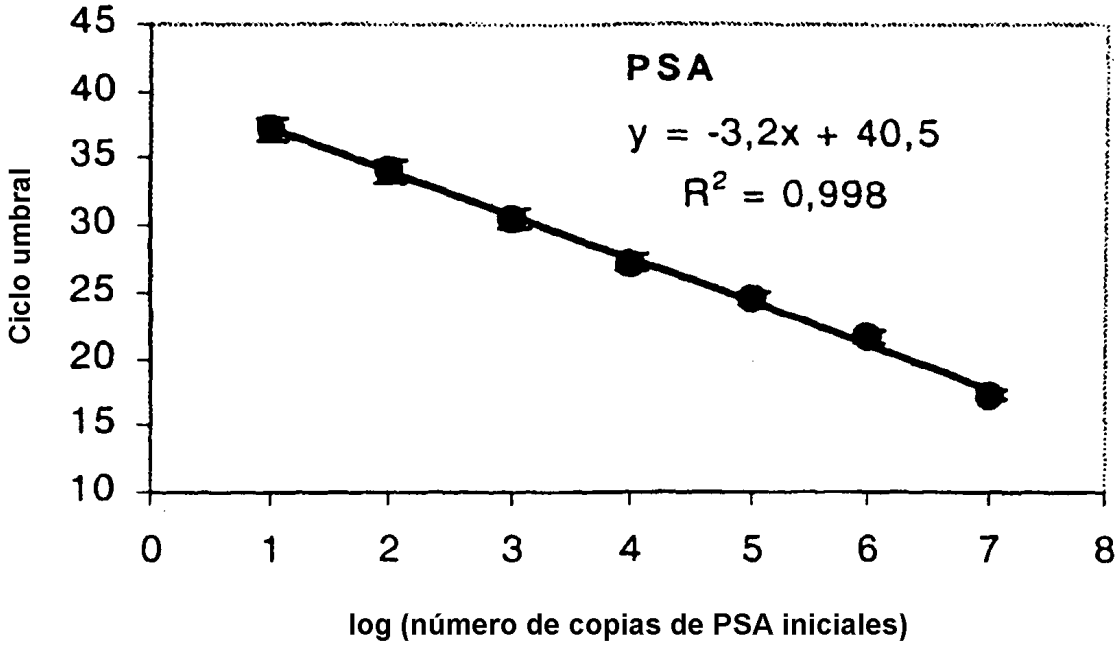

PSA
y = -3,2x + 40,5
R2 = 0,998
Ciclo umbral
log (número de copias de PSA iniciales)

FIG. 4A

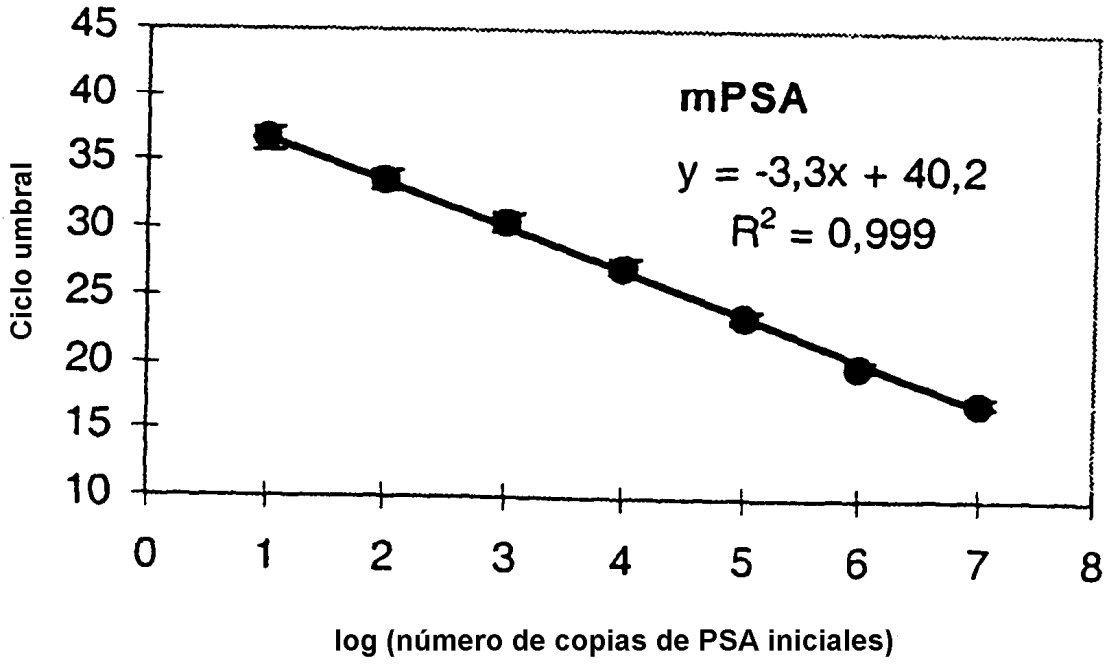

mPSA
y = -3,3x + 40,2
R2 = 0,999
Ciclo umbral
log (número de copias de PSA iniciales)

FIG. 4B

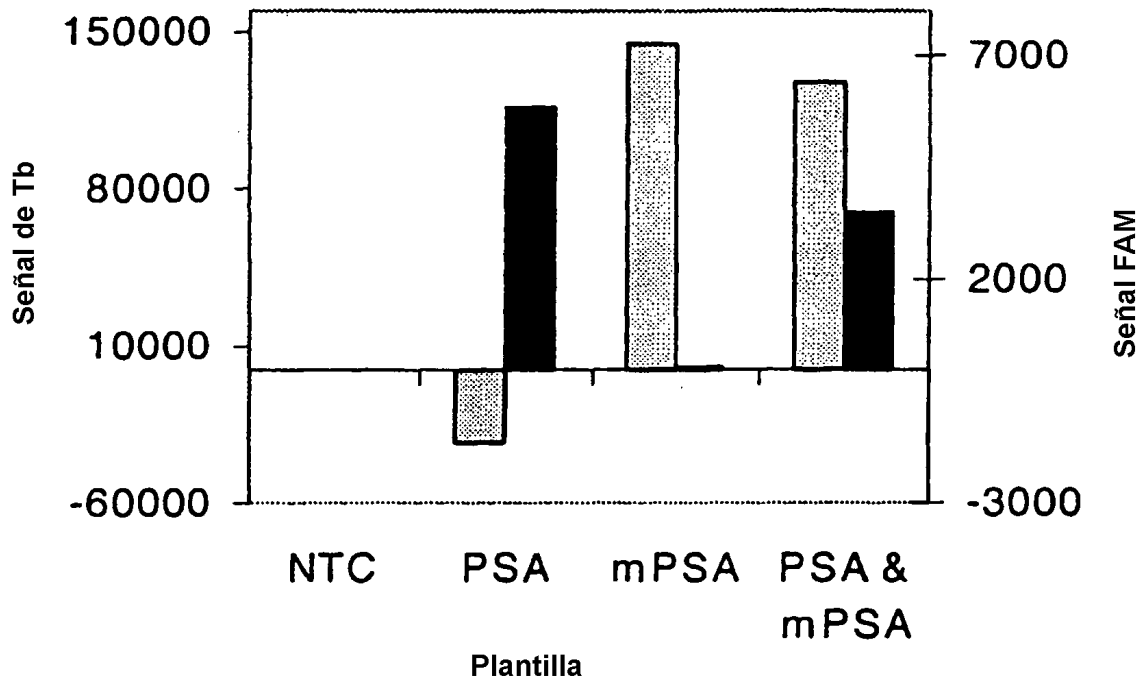

150000
80000
10000
-60000
Señal de Tb
7000
2000
-3000
Señal FAM
NTC
PSA
mPSA
PSA & mPSA
Plantilla

FIG. 5

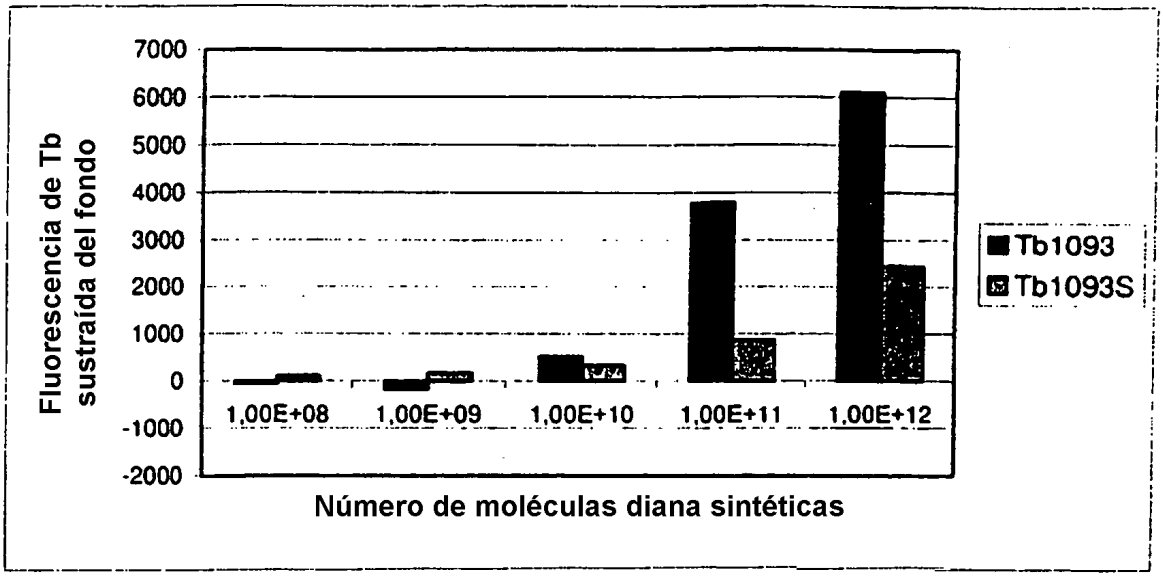

Fluorescencia de Tb sustraída del fondo
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
-1000
-2000
1,00E+08
1,00E+09
1,00E+10
1,00E+11
1,00E+12
Número de moléculas diana sintéticas
Tb1093
Tb1093S

FIG. 6

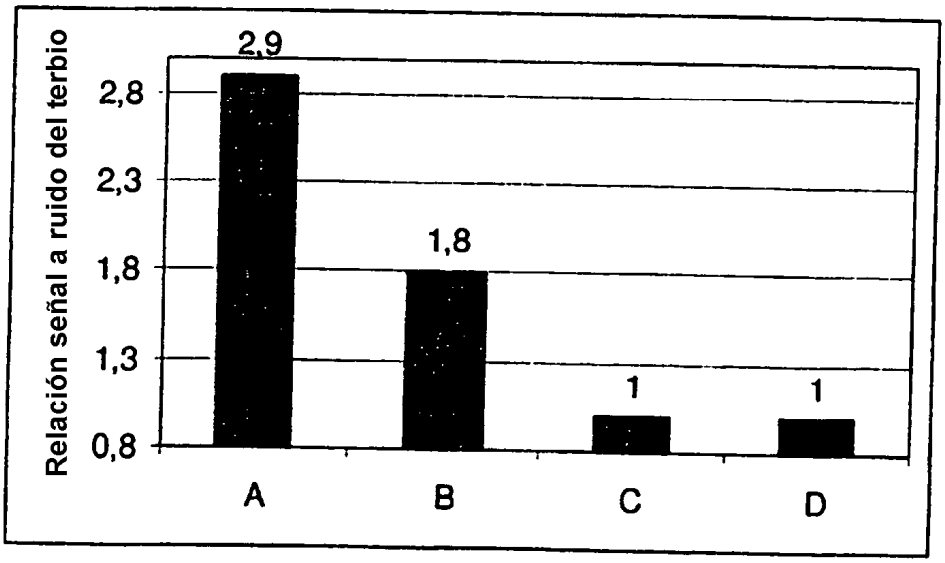

Relación señal a ruido del terbio
2,9
2,8
2,3
1,8
1,3
0,8
1,8
1
1
A
B
C
D

FIG. 7

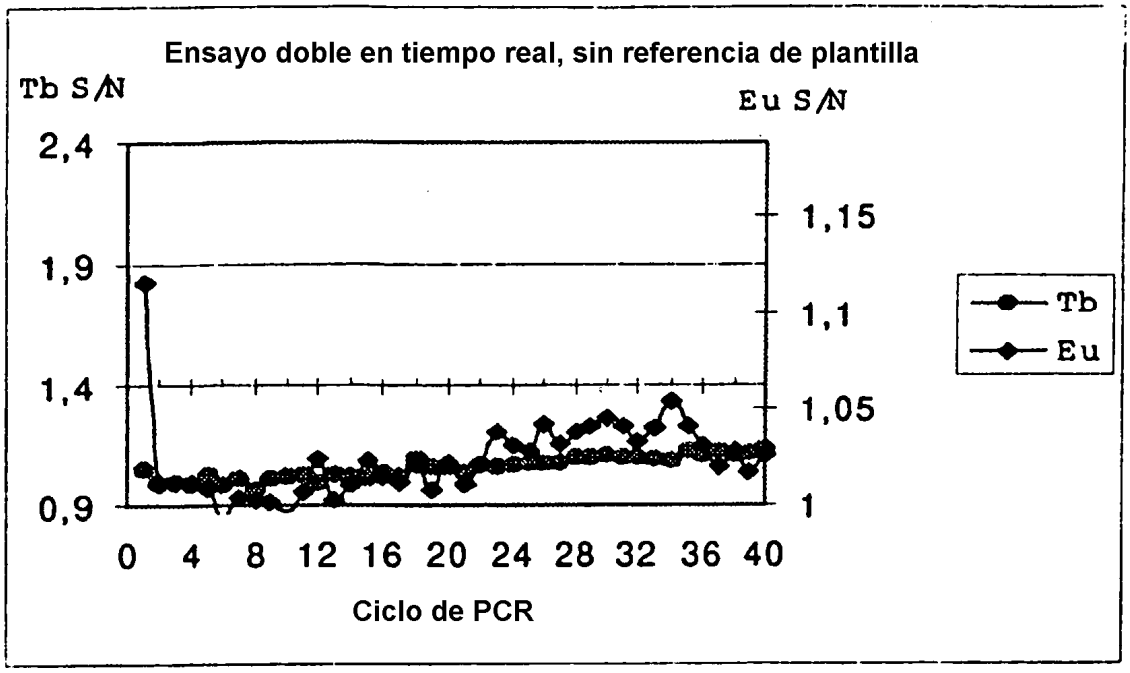

Ensayo doble en tiempo real, sin referencia de plantilla
Tb S/N
Eu S/N
2,4
1,9
1,4
0,9
1,15
1,1
1,05
1
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40
Ciclo de PCR
Tb
Eu

FIG. 8A

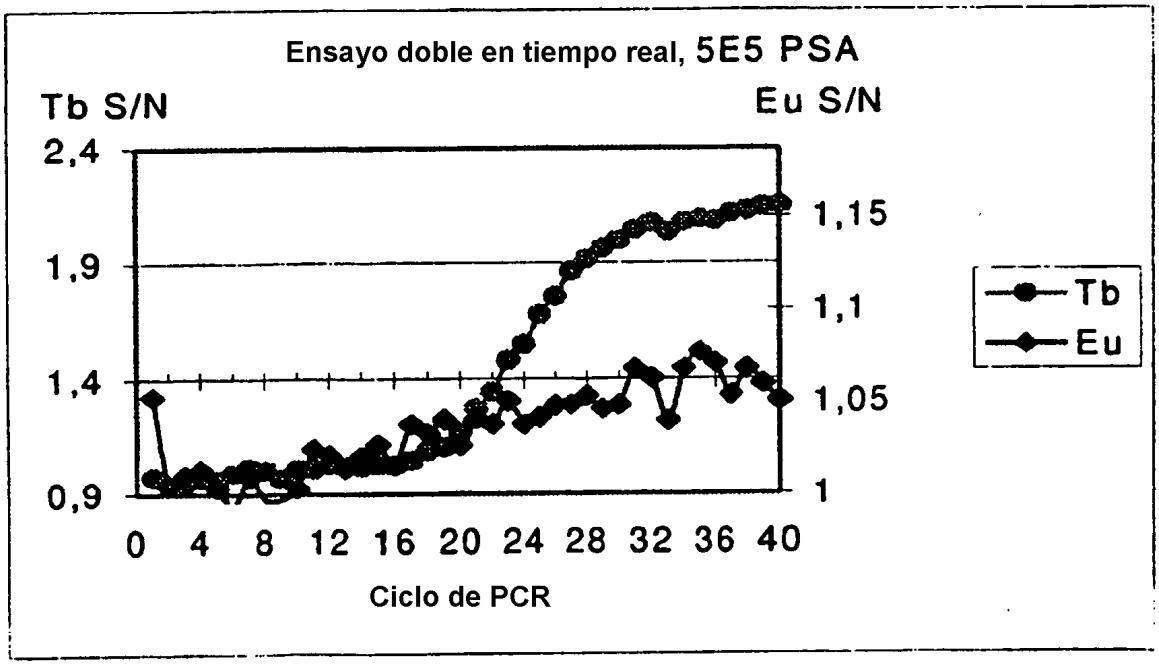

Ensayo doble en tiempo real, 5E5 PSA
Tb S/N
Eu S/N
2,4
1,9
1,4
0,9
1,15
1,1
1,05
1
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40
Ciclo de PCR
Tb
Eu

FIG. 8B

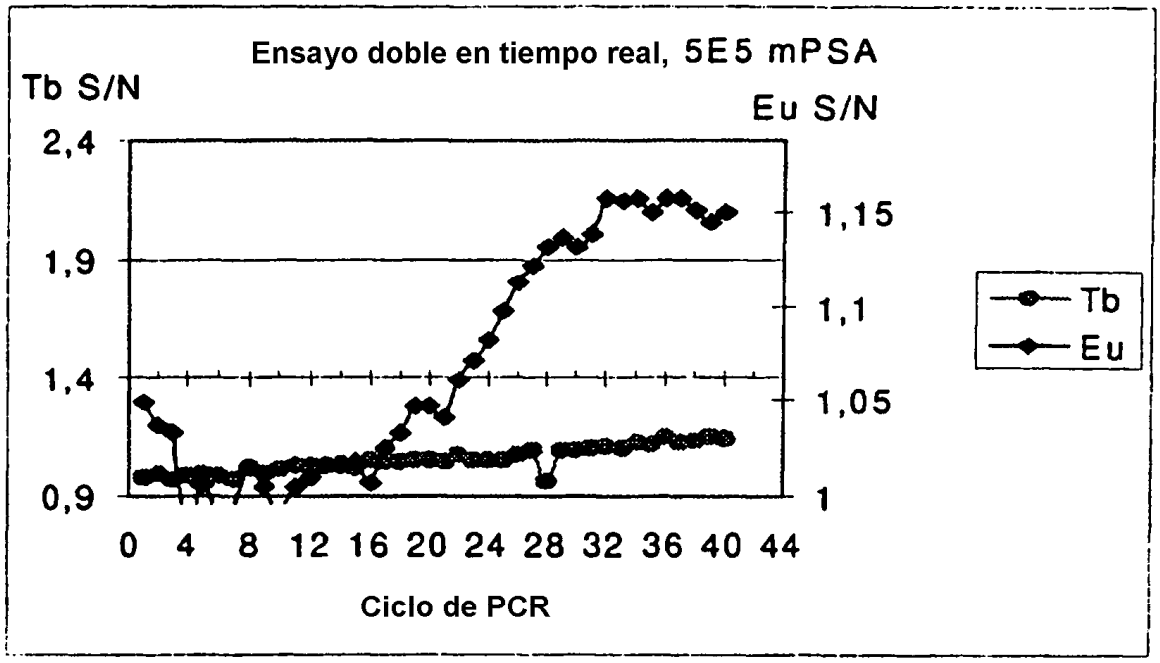

Ensayo doble en tiempo real, 5E5 mPSA
Tb S/N
Eu S/N
2,4
1,9
1,4
0,9
1,15
1,1
1,05
1
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44
Ciclo de PCR
Tb
Eu

FIG. 8C

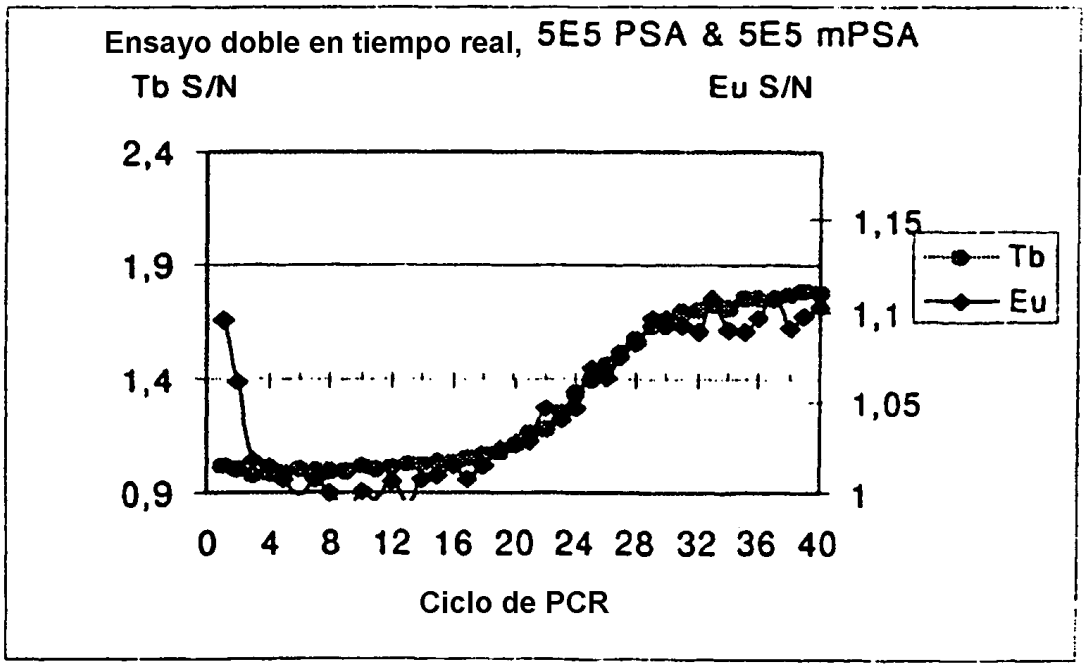

Ensayo doble en tiempo real, 5E5 PSA & 5E5 mPSA
Tb S/N
Eu S/N
2,4
1,9
1,4
0,9
1,15
1,1
1,05
1
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40
Ciclo de PCR
Tb
Eu

FIG. 8D