



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 326 050**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **97931089 .3**
96 Fecha de presentación : **04.06.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **0912766**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.1999**

54 Título: **Monitorización de la hibridación durante la PCR.**

30 Prioridad: **04.06.1996 US 658993**
17.03.1997 US 818267

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.09.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.09.2009

73 Titular/es: **University of Utah Research Foundation**
615 Arapeen Drive, Suite 310
Salt Lake City, Utah 84108, US

72 Inventor/es: **Wittwer, Carl, T.;**
Ririe, Kirk, M. y
Rasmussen, Randy, P.

74 Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

ES 2 326 050 T3

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

DESCRIPCIÓN

Motorización de la hibridación durante la PCR.

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere, en general, a la observación de señales de fluorescencia que resultan de la hibridación conjuntamente con la reacción en cadena de la polimerasa. Más específicamente, la presente invención se refiere a la observación de la hibridación con fluorescencia durante y/o inmediatamente después de la PCR y la utilización de esta información para la identificación, la detección de alteraciones de secuencias, y la cuantificación del producto.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es fundamental para la biología molecular y es la primera técnica molecular práctica para el laboratorio clínico. A pesar de su utilidad y popularidad, la comprensión actual de la PCR no está muy avanzada. Las condiciones adecuadas para amplificaciones satisfactorias se deben encontrar mediante prueba y error y la optimización es empírica. Incluso los expertos en la materia necesitan utilizar una técnica potente sin una teoría explicativa o predictiva del proceso.

La PCR se consigue mediante el ciclado de temperaturas de la muestra, que provoca la desnaturalización (separación) del ADN, la unión (fijación) de cebadores específicos, y la existencia (extensión) de replicación. Un ciclo de la PCR se realiza habitualmente entre 2 y 8 minutos, requiriendo de 1 a 4 horas para una amplificación de 30 ciclos. La respuesta de la temperatura de la muestra en la mayoría de la instrumentación para PCR es muy lenta en comparación con los tiempos necesarios para la desnaturalización, fijación y extensión. Las reacciones físicas (desnaturalización y fijación) y enzimáticas (extensión) en la PCR tienen lugar muy rápidamente. Los tiempos de amplificación para PCR se pueden reducir desde horas a menos de 15 minutos. En el presente documento se incorpora como referencia en su totalidad el documento N° de Serie de Estados Unidos 08/537.612, solicitado el 2 de octubre de 1995, que da a conocer un sistema de ciclado rápido de este tipo. Las técnicas de ciclado rápido son posibles mediante la respuesta rápida de la temperatura y la homogeneidad de temperatura posibles para muestras en contenedores de muestras con una relación de área superficial-volumen elevada, tales como tubos capilares. Para mayor información, véanse también: C.T. Wittwer, G.B. Reed, y K.M. Ririe, Rapid cycle DNA amplification (Amplificación de ADN por ciclado rápido), en K.B. Mullis, F. Ferre, y R.A. Gibbs, The polymerase chain reaction (La reacción en cadena de la polimerasa), Birkhauser, Boston, 174-181 (1994). Una mejor homogeneidad de la temperatura permite que los requerimientos del tiempo y la temperatura de la PCR estén mejor definidos y se entiendan mejor. Una mejor homogeneidad de la temperatura también incrementa la precisión de cualquier técnica analítica utilizada para monitorizar la PCR durante la amplificación.

La fluorimetría es una técnica sensible y versátil con muchas aplicaciones en biología molecular. Durante muchos años se ha utilizado bromuro de etidio para monitorizar la distribución de tamaños de ácidos nucleicos separados por electroforesis en gel. El gel se transilumina habitualmente con luz ultravioleta y se observa la fluorescencia roja del ácido nucleico de doble cadena. Específicamente, el bromuro de etidio se utiliza normalmente para analizar los productos de la PCR después de completar la amplificación. Además, la patente EPA 0 640 828 A1 de Higuchi y Watson da a conocer la utilización de bromuro de etidio durante la amplificación para monitorizar la cantidad de ADN de doble cadena mediante la medición de la fluorescencia en cada ciclo. Se observó que la intensidad de la fluorescencia aumentaba y disminuía inversamente con la temperatura, era máxima a la temperatura de fijación/extensión (50°C), y mínima a la temperatura de desnaturalización (94°C). En cada ciclo se obtuvo la máxima fluorescencia como una medida de la cantidad de ADN. La aplicación de Higuchi y Watson no enseña la utilización de la fluorescencia para monitorizar las hibridaciones, ni sugiere la medición de fluorescencia a diferentes temperaturas para seguir la extensión de la hibridación. Además, Higuchi y Watson no enseñan ni sugieren la utilización de la dependencia con la temperatura de la hibridación del producto de la PCR para la identificación o cuantificación de productos de la PCR.

Sin embargo, la aplicación de Higuchi y Watson no menciona la utilización de otros fluoróforos, que incluyen sistemas de sondas doblemente marcadas que generan fluorescencia cuando se hidrolizan mediante la actividad de la 5'-exonucleasa de ciertas polimerasas de ADN, tal como se da a conocer en la Patente de Estados Unidos No. 5.210.015 de Gelfand y otros. La fluorescencia observada a partir de estas sondas depende, principalmente, de la hidrólisis de la sonda entre sus dos fluoróforos. La cantidad de producto de la PCR se estima mediante la medición de la fluorescencia una vez por ciclo. A pesar de que la hibridación de estas sondas parece que es necesaria para que tenga lugar la hidrólisis, la señal de fluorescencia surge, principalmente, de la hidrólisis de las sondas, sin hibridación, en la que una sonda de oligonucleótidos con colorantes fluorescentes en los extremos opuestos del mismo proporciona un sistema de sondas de inhibición útiles para detectar el producto de PCR y la hibridación de ácido nucleico. K.J. Livak y otros, 4 PCR Math. Appl. 357-362 (1995). No se sugiere el seguimiento de la dependencia de la temperatura de la hibridación de la sonda con fluorescencia para identificar las alteraciones de las secuencias en productos de la PCR.

Se ha explotado en muy diferentes formatos la hibridación específica de un ácido nucleico a una cadena complementaria para la identificación. Por ejemplo, después de la digestión de la enzima de restricción, el ADN genómico se puede fraccionar por tamaño e hibridar a sondas mediante una transferencia de Southern. Como ejemplo adicional, se pueden detectar mutaciones de bases únicas mediante "transferencias de puntos" con oligonucleótidos específicos de alelo. Habitualmente, la hibridación se realiza durante minutos a horas a una temperatura única para conseguir la discriminación necesaria. Como alternativa, la extensión de la hibridación se puede monitorizar de forma dinámica mientras cambia la temperatura mediante técnicas de fluorescencia. Por ejemplo, para monitorizar la hibridación se

han utilizado curvas de fusión por fluorescencia. L.E. Morrison y L.M. Stols, Sensitive fluorescence-based thermodynamic and kinetic measurements of DNA hybridization in solution (Mediciones cinéticas y termodinámicas basadas en la sensibilidad a la fluorescencia de la hibridación de ADN en solución), 32 Biochemistry 3095-3104, 1993). Las velocidades de barrido de temperatura son, habitualmente, de 10°C/hora o inferior, en parte debido a la elevada masa

5 térmica de la cubeta del fluorímetro.

Los métodos actuales para monitorizar la hibridación requieren mucho tiempo. Si la hibridación se pudiera seguir en segundos en lugar de horas, la hibridación se podría monitorizar durante la amplificación por la PCR, incluso durante una PCR de ciclado rápido. Entre las muchas utilizaciones de la monitorización de la hibridación durante

10 la PCR, tal como se describirá con detalle en el presente documento, se incluyen la identificación y cuantificación del producto, la detección de alteraciones en las secuencias, y el control automático de los parámetros del ciclado de temperatura mediante retroalimentación de la fluorescencia.

La técnica anterior, tal como se ha explicado anteriormente, lleva a cabo un ciclado de temperaturas de forma lenta y empírica. Cuando se necesita el análisis de los productos de la PCR por hibridación, se requieren etapas adicionales que consumen tiempo. De este modo, sería un gran avance en la técnica proporcionar métodos para monitorizar la hibridación durante la PCR y analizar la reacción mientras tiene lugar, es decir, durante o inmediatamente después del ciclado de temperaturas sin manipular la muestra. Mediante la monitorización de la hibridación durante la PCR, los principios subyacentes que permiten el funcionamiento de la PCR se pueden seguir y utilizar para analizar y optimizar

15 la reacción durante la amplificación.

La Patente EP 0640 828A da a conocer un aparato para monitorizar simultáneamente reacciones múltiples de ácidos nucleicos, que utiliza un ciclador y sensor térmico para detectar la luz emitida en las pausas dentro de un miembro conductor de calor. Los métodos y aparatos para realizar la PCR se describen en la Patente EP 0686699A. La patente EP 0643140A da a conocer métodos de utilización de colorantes fluorescentes en la PCR.

20

Breve resumen de la invención

La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

30

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema para identificar productos amplificados por la PCR mediante curvas de fusión por fluorescencia.

Es también otro objetivo de la presente invención proporcionar un método para mejorar la sensibilidad de la cuantificación de la PCR con colorantes de ADN específicos de doble cadena.

35

Es aún otro objetivo de la presente invención para determinar la cantidad de producto específico amplificado por la PCR mediante curvas de fusión, corregir la amplificación no específica detectada con el colorante de ADN específico de doble cadena.

40

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un método de cuantificación relativa de productos de la PCR diferentes con colorantes de ADN específico de doble cadena. Es aún otro objetivo de la presente invención proporcionar un método de cuantificación del producto mediante la cinética de refijación del producto en presencia de un colorante de ADN específico de doble cadena.

45

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un sistema para la cuantificación relativa de diferentes productos de la PCR mediante curvas de fusión de la sonda.

Es aún otro objetivo de la presente invención proporcionar métodos para determinar el número de copias de la plantilla inicial mediante el ajuste de las curvas de fluorescencia frente al número de ciclos.

50

Es aún otro objetivo de la presente invención proporcionar un sistema y un método para realizar la PCR, la monitorización de forma rápida y también de forma continua y el ajuste de los parámetros de la reacción mientras tiene lugar la reacción.

55

Estos y otros objetivos y ventajas de la presente invención quedarán completamente claras a partir de la descripción y reivindicaciones que se indican a continuación, o se pueden aprender mediante la práctica de la presente invención.

La presente invención reduce particularmente el tiempo total requerido para la amplificación por PCR y análisis en las técnicas de la técnica anterior mientras que, al mismo tiempo, permite la opción de aumentar significativamente la calidad de la reacción optimizando las condiciones de amplificación.

60

La presente invención proporciona métodos para analizar un ADN diana, en base al análisis de la curva de fusión, como se define en las reivindicaciones. La instrumentación preferida combina componentes ópticos con estructuras para proporcionar un ciclado térmico rápido para monitorizar de forma continua la amplificación de ADN mediante diversas técnicas de fluorescencia diferentes. En un ejemplo ilustrativo, la fluorescencia se adquiere de forma continua a partir de una única muestra o, como alternativa, a partir de múltiples muestras en un soporte giratorio con todas las muestras sometándose simultáneamente a ciclado térmico rápido.

65

ES 2 326 050 T3

En el presente documento se describe un método, con el que, la fluorescencia durante la amplificación de ADN se monitoriza mediante el colorante específico de cadena doble SYBR Green. Los datos de fluorescencia adquiridos una vez por ciclo permiten la cuantificación del número de copias de la plantilla inicial.

Además, al contrario que la medición de la fluorescencia una vez por ciclo, se dan a conocer ejemplos que monitorizan temperatura, tiempo y fluorescencia de forma continua durante la totalidad de cada ciclo produciendo, de este modo, una espiral tridimensional. Esta espiral tridimensional puede reducirse a representaciones de temperatura frente a tiempo, fluorescencia frente a tiempo y fluorescencia frente a temperatura. Las representaciones de fluorescencia frente a temperatura de la fluorescencia de sondas de hibridación pueden utilizarse para detectar alteraciones de secuencia en el producto. Estas alteraciones de secuencia pueden ser naturales, como en mutaciones o polimorfismos, o artificiales, como en una plantilla alternativa diseñada para la PCR cuantitativa.

En los métodos de la presente invención, se utiliza la monitorización de la fluorescencia para adquirir curvas de fusión del producto durante la PCR monitorizando la fluorescencia con colorantes específicos de ADN de cadena doble. La representación de la fluorescencia como una función de la temperatura a medida que el termociclador calienta hasta la temperatura de disociación del producto proporciona una curva de fusión del producto de la PCR. La forma y posición de esta curva de fusión de ADN está en función de la proporción de GCAT, la longitud y la secuencia y puede utilizarse para diferenciar productos de amplificación separados por menos de 2°C de temperatura de fusión. Los productos deseados pueden distinguirse de productos no deseados, incluyendo dímeros de cebadores. El análisis de las curvas de fusión puede utilizarse para extender el intervalo dinámico de PCR cuantitativa y para diferenciar productos en la amplificación multiplex. Utilizando colorantes de cadena doble, puede realizarse un seguimiento de la desnaturalización, re-hibridación y extensión de productos en cada ciclo. La monitorización continua de la fluorescencia permite la adquisición de curvas de fusión y curvas de hibridación de producto durante el ciclado de temperaturas.

La presente invención incluye un método de determinación de una concentración de un producto amplificado en una mezcla de reacción en cadena de la polimerasa seleccionada, que comprende

- a) determinar una constante de velocidad de segundo orden para el producto amplificado a una temperatura y condiciones de reacción seleccionadas mediante la monitorización de la velocidad de hibridación de una concentración conocida del producto amplificado;
- b) determinar la velocidad de fijación para una concentración desconocida del producto amplificado; y
- c) calcular la concentración del producto amplificado a partir de la velocidad de fijación y la constante de velocidad de segundo orden.

Preferiblemente, la velocidad de fijación se determina después de múltiples ciclos de amplificación. Un método ilustrativo de determinación de la constante de velocidad de segundo orden comprende las etapas de

Elevar la temperatura de una primera mezcla de reacción en cadena de la polimerasa que comprende una concentración conocida del producto amplificado y una cantidad eficaz de un colorante fluorescente específico de cadena doble, por encima de la temperatura de desnaturalización del producto amplificado para dar como resultado un producto amplificado desnaturalizado;

Reducir rápidamente la temperatura de la primera mezcla de reacción en cadena de la polimerasa que comprende la cantidad conocida de producto amplificado desnaturalizado a una temperatura seleccionada por debajo de la temperatura de desnaturalización del producto amplificado, mientras se monitoriza de forma continua la fluorescencia de la primera mezcla de reacción en cadena de la polimerasa en función del tiempo;

Representar la fluorescencia en función del tiempo para determinar la fluorescencia máxima, la fluorescencia mínima, el tiempo a la fluorescencia mínima y una constante de velocidad de segundo orden para la concentración conocida de producto amplificado a partir de la ecuación

$$F = F_{\max} - \frac{F_{\max} - F_{\min}}{k(t - t_0)[ADN] + 1}$$

donde F es fluorescencia, $F_{\max}$ es fluorescencia máxima, $F_{\min}$ es fluorescencia mínima, k es la constante de velocidad de segundo orden, t_0 es el tiempo a $F_{\min}$ y [ADN] es la concentración conocida del producto amplificado.

Un aspecto preferente de la presente invención proporciona un método de determinación de la concentración de una plantilla de ácido nucleico seleccionada en una reacción en cadena de la polimerasa comprende las etapas de:

a) en una mezcla de reacción que comprende:

i) cantidades eficaces de cada primer par de cebadores de oligonucleótidos configurados para amplificar, en una reacción en cadena de la polimerasa, un primer segmento seleccionado de la plantilla seleccionada para dar como resultado un primer producto amplificado de la misma,

ii) cantidades eficaces de cada segundo par de cebadores de oligonucleótidos configurados para amplificar, en una reacción en cadena de la polimerasa, un segundo fragmento seleccionado de una plantilla de referencia para dar como resultado un segundo producto amplificado de la misma,

iii) una cantidad eficaz de un colorante fluorescente que se une a ácido nucleico, que amplifica, mediante reacción en cadena de la polimerasa, una cantidad desconocida de la plantilla seleccionada para dar como resultado el primer producto amplificado y una cantidad conocida de la plantilla de referencia para dar como resultado el segundo producto amplificado de la misma,

b) iluminar la mezcla de reacción con una longitud de onda de luz seleccionada para provocar fluorescencia mediante el colorante fluorescente que se une a ácido nucleico y monitorizar de forma continua la fluorescencia emitida en función de la temperatura para dar como resultado una curva de fusión de los productos amplificados donde el primer producto y el segundo producto se funden a diferentes temperaturas,

c) convertir las curvas de fusión en picos de fusión y determinar las cantidades relativas de la plantilla seleccionada y la plantilla de referencia a partir de dichos picos de fusión; y

d) calcular la concentración de la plantilla seleccionada en base a la cantidad conocida de la plantilla de referencia y las cantidades relativas de plantilla seleccionada y plantilla de referencia.

Preferiblemente, la presente invención proporciona un método de monitorización de la amplificación de una plantilla seleccionada en una reacción en cadena de la polimerasa que también comprende una plantilla de control positivo, que comprende las etapas de:

a) en una mezcla de reacción que comprende

i) cantidades eficaces de cada uno de un primer par de cebadores de oligonucleótidos configurado para amplificar, en una reacción en cadena de la polimerasa, un primer fragmento seleccionado de la plantilla seleccionada para dar como resultado un primer producto amplificado de la misma,

ii) cantidades eficaces de cada uno de un segundo par de cebadores de oligonucleótidos configurado para amplificar, en una reacción en cadena de la polimerasa, un segundo fragmento seleccionado de la plantilla de control positivo para dar como resultado un segundo producto amplificado de la misma,

iii) una cantidad eficaz de un colorante fluorescente que se une a ácido nucleico; el sometimiento de la plantilla seleccionada y de la plantilla de control positivo a condiciones para la amplificación de la plantilla seleccionada y la plantilla de control positivo mediante reacción en cadena de la polimerasa; y

b) iluminar la mezcla de reacción con una longitud de onda de luz seleccionada para provocar fluorescencia mediante el colorante fluorescente que se une a ácido nucleico y monitorizar de forma continua la fluorescencia emitida en función de la temperatura durante un ciclo de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa para dar como resultado un primer pico de fusión del producto amplificado, si se amplifica la plantilla seleccionada, y un segundo pico de fusión del segundo producto amplificado, si se amplifica la plantilla de control positivo,

donde la obtención de la segunda curva de fusión indica que la reacción en cadena de la polimerasa era operativa, la obtención de la primera curva de fusión indica que el primer fragmento seleccionado era amplificable y la ausencia de la primera curva de fusión indica que el primer segmento seleccionado no era amplificable. Preferiblemente, la entidad fluorescente que se une a ácido nucleico comprende un colorante fluorescente que se une a ácido nucleico de cadena doble, tal como SYBRTM Green I. La fluorescencia dependiente de la temperatura se puede utilizar para identificar los productos amplificados, preferiblemente, mediante el análisis de las curvas de fusión. Se pueden determinar las cantidades relativas de dos o más productos amplificados mediante el análisis de las curvas de fusión. Por ejemplo, las áreas bajo las curvas de fusión se encuentran mediante una regresión mínimo-cuadrática no lineal de la suma de gaussianos múltiples.

Breve descripción de las diferentes vistas de los dibujos

Las figuras 1A y B son gráficos que representan un paradigma de la PCR de equilibrio (A) y un paradigma de la PCR cinética (B).

ES 2 326 050 T3

La figura 2 muestra fragmentos útiles de temperatura frente a tiempo para la monitorización de la hibridación por fluorescencia.

La figura 3 es una tabla de temperatura frente a tiempo ejemplificante del ciclado rápido de temperaturas para la PCR.

La figura 4 muestra los resultados de cuatro perfiles diferentes temperatura/tiempo (A-D) y sus productos de amplificación resultantes después de treinta ciclos (inserción).

Las figuras 5A, B y C muestran el mecanismo de generación de fluorescencia para tres métodos diferentes de monitorización de la fluorescencia de la PCR: (A) colorante de ADN de doble cadena, (B) sonda de hidrólisis y (C) sondas de hibridación.

La figura 6 muestra la estructura química del éster de N-hidroxisuccinimida monovalente de Cy5TM.

La figura 7 muestra la estructura química del éster de N-hidroxisuccinimida monovalente de Cy5.5TM.

La figura 8 muestra el espectro de emisión de fluorescencia (línea continua) y el espectro de excitación de Cy5 (línea discontinua).

La figura 9 muestra transferencia de energía de resonancia que se produce entre sondas de hibridación adyacentes marcadas con fluoresceína y Cy5 en cada ciclo durante la PCR.

La figura 10 muestra el efecto de la modificación de la proporción de la sonda de Cy5 con respecto a la sonda de fluoresceína sobre la señal de transferencia de energía de resonancia generada durante la PCR.

La figura 11 muestra el efecto de la modificación de la concentración de la sonda a una proporción de sonda dada, sobre la señal de transferencia de energía de resonancia generada durante la PCR.

La figura 12 muestra el efecto de la separación entre los oligonucleótidos marcados sobre la señal de transferencia de energía de resonancia generada durante la PCR.

La figura 13 muestra la evolución temporal de la hibridación de sondas adyacentes mediante transferencia de energía por fluorescencia inmediatamente después de 30 ciclos de amplificación con Taq ADN polimerasa (exo⁻; línea continua) y el fragmento Stoffel de Taq ADN polimerasa (exo⁻; línea de puntos) del ciclado de temperaturas y el tipo de polimerasa sobre el desarrollo de fluorescencia durante la PCR con sondas de hibridación adyacentes: la temperatura se muestra con una línea en negrita.

La figura 14 es una representación de la proporción de fluorescencia frente a número de ciclo para amplificación con Taq ADN polimerasa (exo⁻; línea continua), fragmento Stoffel de Taq ADN polimerasa (exo⁻; línea discontinua), y Klen Taq ADN polimerasa (exo⁻; línea de puntos): panel superior - el ciclado es entre 94°C y 60°C con un periodo de mantenimiento de 20 segundos a 60°C; panel medio - el ciclado es entre 94°C y 60°C con un periodo de mantenimiento de 120 segundos a 60°C; panel inferior - el ciclado es entre 94°C y 60°C con un lento incremento de 60°C a 75°C.

La figura 15 es una representación de la fluorescencia frente al número de ciclos para un número diferente de reacciones de copia de la plantilla inicial monitorizadas con SYBRTM Green I: 0, (Δ); 1, (■); 10, (-); 10² (-); 10³, (+); 10⁴, (●); 10⁵, (◇); 10⁶, (x); 10⁷, (▲); 10⁸, (□); 10⁹, (◆).

La figura 16 es una representación de la proporción de fluorescencia frente a número de ciclo para un número diferente de reacciones de copia de la plantilla inicial monitorizadas con una sonda de hidrólisis doblemente marcada: 0, (-); 1, (▲); 10, (○); 10², (*); 10³, (●); 10⁴, (□); 10⁵, (+); 10⁶, (■); 10⁷, (◇); 10⁸, (X); 10⁹, (◆).

La figura 17 es una representación de la proporción de fluorescencia frente a número de ciclo para un número diferente de reacciones de copia de la plantilla inicial monitorizadas con sondas de hibridación adyacentes: 0, (-); 1, (▲); 10, (○); 10², (*); 10³, (●); 10⁴, (□); 10⁵, (+); 10⁶, (■); 10⁷, (◇); 10⁸, (X); 10⁹, (◆).

La figura 18 es una representación de la proporción de fluorescencia frente a número de ciclo que distingue entre dos diseños de sonda de hibridación monitorizados mediante transferencia de energía de resonancia: (◇) dos sondas de hibridación marcadas respectivamente con fluoresceína y Cy5; y (◆) un cebador marcado con Cy5 y una sonda marcada con fluoresceína.

Las figuras 19A-C proporcionan una comparación de tres técnicas de monitorización de la fluorescencia para la PCR, que incluyen el colorante de ADN específico de doble cadena, SYBRTM Green I (A), una sonda de hidrólisis de fluoresceína/rodamina doblemente marcada (B), y una sonda de hibridación marcada con fluoresceína con un cebador marcado con Cy5 (C); la figura 19D muestra el coeficiente de variación para las tres técnicas de monitorización representadas en las figuras 19A-C.

ES 2 326 050 T3

La figura 20 muestra una representación habitual del logaritmo de la fluorescencia frente al número de ciclos de una amplificación estándar monitorizada con SYBRTM Green I.

La figura 21 muestra el ajuste a una curva exponencial para los ciclos 20-27 de los datos de la figura 20.

La figura 22 muestra un ajuste exponencial en una muestra desconocida para determinar el número de copias iniciales a partir de los datos de la amplificación.

La figura 23 muestra una representación habitual de la fluorescencia frente al número de ciclos de cinco estándares monitorizados en cada ciclo con sondas de hibridación adyacentes, en la que los números de copias iniciales se representan tal como se indica a continuación: 10^3 , (●); 10^4 , (◇); 10^5 , (▲); 10^6 , (□); 10^7 (◆).

La figura 24 muestra el ajuste a una curva de los datos estándares de la figura 23.

La figura 25 muestra una representación habitual de la fluorescencia frente al número de ciclos de cinco estándares monitorizados en cada ciclo con una sonda de hidrólisis, en la que los números de copias iniciales se representan tal como se indica a continuación: 1, 5, (●); 15, (◇); 150, (▲); 1500, (□); 15.000, (◆).

La figura 26 muestra el ajuste a una curva de los datos estándares de la figura 25.

La figura 27 muestra una representación habitual del logaritmo de la fluorescencia frente al número de ciclos de tres amplificaciones estándares monitorizadas con SYBR Green I, en la que: (■); (●); (▲).

La figura 28 muestra un diferente ajuste a una curva de los datos estándares de la figura 27.

Las figuras 29A y B muestran representaciones de (A) el tiempo frente a la fluorescencia y (B) el tiempo frente a la temperatura demostrando la relación inversa entre la temperatura y la fluorescencia.

La figura 30 es una tabla que muestra representaciones en 2 dimensiones de la temperatura frente al tiempo, la fluorescencia frente al tiempo, y la fluorescencia frente a la temperatura, también mostradas como una representación en 3 dimensiones, para la amplificación de un fragmento de 180 pares de bases del genoma de la hepatitis B en presencia de SYBR Green I.

La figura 31 es una proyección de la fluorescencia frente a la temperatura para la amplificación de un fragmento de 536 pares de bases del gen de la beta-globina humana en presencia de SYBR Green I.

Las figuras 32A y B proporcionan una representación que muestra (A) un cambio lineal en la proporción de la fluorescencia con la temperatura para sondas de hidrólisis, y (B) un cambio radical con la temperatura para sondas de hibridación.

La figura 33 muestra una representación de la proporción de fluorescencia frente a temperatura, de amplificación con una polimerasa exo^- en presencia de sondas de hibridación adyacentes.

La figura 34 muestra una representación de la proporción de fluorescencia frente a temperatura, de amplificación con una polimerasa exo^- en presencia de sondas de hibridación adyacentes.

La figura 35 muestra una representación tridimensional de temperatura, tiempo y fluorescencia durante la amplificación con una polimerasa exo^- en presencia de sondas de hibridación adyacentes.

La figura 36 muestra una representación tridimensional de temperatura, tiempo y fluorescencia durante la amplificación con una polimerasa exo^- en presencia de sondas de hibridación adyacentes.

La figura 37 muestra curvas de fusión para productos amplificados por PCR del virus de la hepatitis B (●; 50% GC, 180 pares de bases); beta-globina (▲; 53,2% GC, 536 pares de bases); y antígeno específico de próstata (X; 60,3% GC, 292 pares de bases).

La figura 38 muestra curvas de fusión para el producto amplificado por PCR del virus de la hepatitis B a velocidades de calentamiento de 0,1°C a 5,0°C.

La figura 39 muestra curvas de fusión para el producto amplificado por PCR del virus de la hepatitis B a varias concentraciones de SYBRTM Green I.

Las figuras 40A y B muestran (A) curvas de fusión y (B) bandas fraccionadas electroforéticamente de productos de un fragmento de beta-globina amplificado con (a) sin plantilla añadida, (b) 10^6 copias de la plantilla añadida bajo condiciones poco estrictas, y (c) 10^6 copias de la plantilla añadida bajo condiciones más estrictas.

Las figuras 41A y B muestran (A) curvas de fusión y (B) picos de la fusión del fragmento del virus de la hepatitis B (HBV), β -globina, y una mezcla de los mismos.

ES 2 326 050 T3

Las figuras 42A-D muestran (A) una representación de la fluorescencia relativa frente al número de ciclos para productos amplificados por PCR de varias cantidades de plantilla de β -globina, (B) picos de fusión y (C) bandas electroforéticas de los diversos productos, y (D) la fluorescencia corregida de los datos de (A).

5 Las figuras 43A y B muestran (A) curvas de fusión y (B) picos de fusión de productos amplificados por PCR de una mezcla del gen de la fibrosis quística y el oncogén c-erbB-2.

La figura 44 muestra los picos de fusión en varios números de ciclos para el gen de la fibrosis quística (CFTR) y el c-erbB-2 (neu).

10 La figura 45 muestra un gráfico de picos de fusión integrados de productos de la PCR de CFTR y neu.

15 Las figuras 46 A y B muestran (A) curvas de fusión y (B) picos de fusión para productos de la PCR de una persona heterocigótica para la mutación del factor V de Leiden (línea continua), homocigótica para la mutación del factor V de Leiden (línea de puntos), homocigótico no modificado (línea discontinua) y sin control de ADN (puntos y rayas alternas).

20 La figura 47 muestra un diagrama de proporción de fluorescencia frente a la temperatura de monitorización continua durante el ciclo 40 de productos de la PCR de una muestra homocigótica para la mutación del factor V de Leiden (línea continua), heterocigótica para la mutación del factor V de Leiden (línea de puntos) y homocigótico no modificado (puntos y rayas alternas).

25 La figura 48 muestra picos de fusión de un mutante homocigótico del gen de metilentetrahidrofolato (línea continua), homocigótico no modificado (línea discontinua), mutante heterocigótico (línea de puntos) y sin control de ADN (puntos y rayas alternas).

La figura 49 muestra la forma de las curvas de refijación de productos amplificados de la PCR de R-globina de varias cantidades iniciales de plantilla.

30 La figura 50 muestra la determinación de una constante de velocidad de segundo orden para determinar la concentración inicial de plantilla.

La figura 51 muestra un diagrama de bloques para controlar el ciclado térmico a partir de los datos de fluorescencia.

35 Las figuras 52A y B muestran (A) una representación de la temperatura frente al tiempo obtenida después de 20 ciclos y (B) una representación de la fluorescencia frente al tiempo obtenida después de 25 ciclos en la que el ciclado térmico se controló a partir de los datos de fluorescencia.

Las figuras 53-105 son diagramas de programación utilizados en los ejemplos.

40 Descripción detallada

45 Antes de que los presentes métodos para monitorizar la hibridación durante la PCR se den conocer y describan, debe entenderse que la presente invención no se limita a las configuraciones, etapas de proceso, y materiales particulares que se dan a conocer en el presente documento, puesto que dichas configuraciones, etapas de proceso, y materiales pueden variar en cierta medida. También debe entenderse que la terminología empleada en el presente documento se utiliza con el fin de describir realizaciones particulares solamente y no pretende ser limitante, puesto que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

50 Debe observarse que, como se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un/a”, “uno/a” y “el/la” incluyen referencias plurales a no ser que el contexto dicte claramente lo contrario.

En la descripción y las reivindicaciones de la presente invención, se utilizará la siguiente terminología según las definiciones establecidas posteriormente.

55 Tal como se utiliza en el presente documento, “ácido nucleico”, “ADN”, y términos similares que también incluyen análogos de ácidos nucleicos, es decir, análogos que tienen un esqueleto diferente a un esqueleto fosfodiéster. Por ejemplo, los denominados “ácidos nucleicos peptídicos”, que son conocidos en la técnica y que tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en el esqueleto, se consideran dentro del alcance de la presente invención.

60 Tal como se utiliza en el presente documento, la “monitorización continua” y términos similares se refieren a la monitorización en repetidas veces durante un ciclo de la PCR, preferiblemente durante las transiciones de temperatura, y más preferiblemente, obteniendo, como mínimo, un punto en cada transición de la temperatura.

65 Tal como se utiliza en el presente documento, la monitorización “ciclo por ciclo” significa la monitorización de la reacción de la PCR una vez por ciclo, preferiblemente, durante la fase de fijación de la PCR.

Tal como se utiliza en el presente documento, “relación de transferencia de energía de resonancia por fluorescencia” y términos similares se refieren a la hibridación adyacente de un oligonucleótido marcado con un fluoróforo donador y otro oligonucleótido marcado con un fluoróforo aceptor para un ácido nucleico diana de modo que el fluoróforo donador puede transferir energía de resonancia al fluoróforo aceptor de modo que el fluoróforo aceptor produce una emisión de fluorescencia medible. Si el fluoróforo donador y el fluoróforo aceptor están separados por una distancia demasiado grande, entonces el fluoróforo donador no puede transferir energía de resonancia al fluoróforo aceptor de modo que el fluoróforo aceptor emita fluorescencia medible, y por lo tanto el fluoróforo donador y el fluoróforo aceptor no están en relación de transferencia de energía de resonancia. Preferiblemente, cuando dos oligonucleótidos marcados son ambas sondas y ninguno funciona como cebador de la PCR (“sonda-sonda”), entonces los fluoróforos donador y aceptor están en un tramo de aproximadamente 0-25 nucleótidos, más preferiblemente de aproximadamente 0-5 nucleótidos y lo más preferiblemente de aproximadamente 0-2 nucleótidos. Una separación particularmente preferente es 1 nucleótido. Cuando uno de los oligonucleótidos marcados también funciona como cebador de la PCR (“sonda-cebador”), entonces los fluoróforos donador y aceptor están preferiblemente en un tramo de aproximadamente 0-15 nucleótidos y más preferiblemente de aproximadamente 4-6 nucleótidos.

Tal como se utiliza en el presente documento, una “cantidad eficaz” significa una cantidad suficiente para producir un efecto seleccionado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de cebadores de la PCR es una cantidad suficiente para amplificar un segmento de ácido nucleico mediante la PCR siempre que también se proporcionen una ADN polimerasa, una disolución tampón, una plantilla, y otras condiciones, incluyendo condiciones de temperatura, conocidas en la técnica y que sean necesarias para realizar la PCR.

La PCR requiere la desnaturalización de la plantilla repetitiva y la fijación de cebadores. Estas transiciones de hibridación dependen de la temperatura. Los ciclos de temperatura de la PCR que rigen la amplificación desnaturalizan de forma alternativa el producto acumulado a una temperatura elevada y fijan cebadores al producto a una temperatura inferior. Las temperaturas de transición de la desnaturalización del producto y la fijación de los cebadores dependen, principalmente, del contenido y la longitud de GC. Si se diseña una sonda para hibridarse de forma interna al producto de la PCR, la temperatura de fusión de la sonda también depende del contenido de GC, la longitud, y el grado de complementariedad a la diana. Las sondas de fluorescencia compatibles con la PCR pueden monitorizar la hibridación durante la amplificación.

Según la presente invención, que se utiliza preferiblemente junto con el ciclado rápido (descrito completamente en el No. de Serie de Estados Unidos 08/658.993, archivado el 4 de junio de 1996, titulado “System and Method For Monitoring PCR Processes” (“Sistema y Método para la Monitorización de Procesos de la PCR”), y el No. de Serie de Estados Unidos 08/537.612, archivado el 2 de octubre de 1995, titulada “Method For Rapid Thermal Cycling of Biological Samples” (“Método Para el Ciclado Térmico Rápido en Muestras Biológicas”), mencionados anteriormente), un paradigma cinético es apropiado para la PCR. En lugar de pensar en la PCR como tres reacciones (desnaturalización, fijación, extensión) que tienen lugar a tres temperaturas diferentes durante tres períodos de tiempo (figura 1A), es más útil un paradigma cinético para la PCR (figura 1B). Con un paradigma cinético, la curva de la temperatura frente al tiempo consiste en transiciones continuas entre reacciones solapadas. La desnaturalización y la fijación son tan rápidas que no es necesario mantener una temperatura particular durante un cierto tiempo. La extensión tiene lugar siempre en un intervalo de temperaturas a velocidades variantes. Un análisis completo necesitaría el conocimiento de todas las constantes de velocidad pertinentes sobre todas las temperaturas. Si se conocieran las constantes de velocidad de todas las reacciones, se podría desarrollar una “descripción físico-química de la PCR”. La determinación de estas velocidades necesitaría un control preciso de la temperatura de la muestra y se simplifica ampliamente mediante la monitorización de la reacción durante el ciclado de temperaturas.

La figura 2 muestra fragmentos útiles de la temperatura frente al tiempo para la monitorización de la hibridación por fluorescencia. Las curvas de fusión de los productos se obtienen durante un incremento lento de la temperatura hasta la desnaturalización. Mediante el descenso rápido de la temperatura tras la desnaturalización hasta una temperatura constante, se puede seguir, opcionalmente, la fijación del producto, la sonda, o el cebador. Las curvas de fusión de la sonda se obtienen mediante el calentamiento lento a lo largo de temperaturas alrededor de la temperatura de fusión de la sonda. La realización representada en la figura 2 proporciona todos los análisis durante el ciclado de temperaturas con una exposición inmediata en tiempo real. Las sondas fluorescentes se incluyen como parte de la solución de amplificación para la monitorización continua del cebador, la sonda, o la hibridación del producto durante el ciclado de temperaturas.

Las técnicas de hibridación por fluorescencia contenidas en el presente documento se basan en el ciclado rápido, con ventajas en la velocidad y la especificidad.

En la figura 3 se muestra un perfil de temperatura de la muestra durante la PCR de ciclo rápido. En estas figuras, la desnaturalización y la fijación aparecen como “picos” de temperatura, en oposición al plateau amplio del ciclado de temperaturas convencionales para PCR, por ejemplo, la figura 1A. En la figura 4, el ciclado rápido de temperaturas se compara con el ciclado convencional de temperaturas, y en la que se muestra que en 15 minutos se pueden completar 30 ciclos de la amplificación y que los productos resultantes de la PCR contienen muchos menos productos secundarios. De este modo, con el ciclado rápido, los tiempos necesarios para la amplificación se reducen, aproximadamente, 10 veces, y se mejora la especificidad.

Ejemplo 1

(Ejemplo de referencia)

La figura 4 muestra los resultados de cuatro perfiles diferentes de temperatura/tiempo (A-D) y sus productos de amplificación resultantes después de treinta ciclos (A-D). Los perfiles A y B de la figura 4 se obtuvieron utilizando un dispositivo de bloque calentador de la técnica anterior que utiliza un tubo de microfuga de la técnica anterior. Tal como se puede observar en la figura 4, las transiciones entre temperaturas son lentas y en los perfiles A y B se observan muchas bandas no específicas. El perfil B muestra la mejora en la eliminación de algunas de las bandas no específicas (en comparación con el perfil A) mediante la limitación del tiempo que cada muestra permanece a cada temperatura, indicando de este modo que a tiempos más cortos se consiguen resultados más deseables.

Los perfiles C y D se obtuvieron utilizando un ciclador rápido de temperatura. Tal como se puede observar en la figura 4, la amplificación es específica y, aunque el rendimiento es máximo con tiempos de elongación de 60 segundos (C), es aún completamente adecuado con tiempos de elongación de 10 segundos (D).

Se determinaron también los tiempos y temperaturas óptimas para la amplificación de un fragmento de 536 pares de bases de beta-globina de ADN genómico humano. Los rendimientos de la amplificación y la especificidad de los productos fueron óptimos cuando la desnaturalización (93°C) y la fijación (55°C) fueron inferiores a 1 segundo. No se encontró ninguna ventaja cuando se alargaron los tiempos de desnaturalización o fijación. El rendimiento se incrementó con tiempos de elongación más largos a 77°C, pero hubo poco cambio con tiempos de elongación más largos de 10-20 segundos. Estos resultados inesperados indican que los dispositivos disponibles previamente utilizados para la amplificación del ADN no maximizan las condiciones necesarias para optimizar los requerimientos físicos y enzimáticos de la reacción.

Se puede obtener información adicional de: C.T. Wittwer y otros, "Rapid Cycle Allele-Specific Amplification with Cystic Fibrosis delta F(508) Locus" ("Amplificación Específica de Alelo de Ciclo Rápido con el Locus delta F(508) de la Fibrosis quística"), 39 *Clinical Chemistry* 804 (1993) y C.T. Wittwer y otros, "Rapid DNA Amplification" ("Amplificación rápida del ADN"), *THE POLIMERASE CHAIN REACTION* 174 (1994). La instrumentación utilizada para la adquisición de fluorescencia y el ciclado rápido de temperaturas se describe en profundidad en el No. de Serie 08/537.612, véase anteriormente.

Tal como se ha indicado anteriormente, la reacción en cadena de la polimerasa se puede realizar rápidamente. Además de facilitar la transferencia rápida de calor, la utilización de tubos capilares ópticamente transparentes permite la monitorización continua por fluorescencia de la amplificación del ADN según la presente invención.

Las sondas fluorescentes se pueden utilizar para detectar y monitorizar la amplificación del ADN. Entre las sondas útiles se incluyen colorantes de ADN específico de doble cadena, como ejemplos comparativos y sondas específicas de secuencia. En la figura 5 se comparan tres técnicas diferentes para el seguimiento de la amplificación de ADN. En la figura 5A, la fluorescencia depende de la hibridación del producto de la PCR, tal como se detecta con un colorante de ADN específico de doble cadena. En la figura 5B, la fluorescencia depende de la hidrólisis de una sonda de inhibición de 5'-exonucleasa, que se conoce muy bien en la técnica, como se ha descrito anteriormente. La figura 5C representa un esquema de hibridación en base a la transferencia de energía de resonancia entre fluoróforos de dos sondas adyacentes.

El método de la figura 5A no es específico de la secuencia, a pesar de que la especificidad del producto se puede determinar mediante curvas de fusión, un aspecto de la presente invención. Tanto la figura 5B como la 5C son específicas de secuencia. Sin embargo, el método de hibridación también permite el análisis con curvas de fusión, otro aspecto de la presente invención.

En la monitorización de la fluorescencia a partir de reacciones que implican sondas de hidrólisis, como en la figura 5B y a partir de reacciones que implican sondas de hibridación, como en la figura 5C, es ventajoso medir la fluorescencia emitida tanto por el fluoróforo donador como por el fluoróforo aceptor. En la práctica, la mayor parte de la fluorescencia emitida por sondas de hidrólisis procede del fluoróforo donador, y la mayor parte de la fluorescencia emitida por sondas de hibridación procede del fluoróforo aceptor.

Selección del colorante de ADN específico de doble cadena. Los expertos en la materia conocerán la utilización de bromuro de etidio en técnicas de fluorescencia. Cuando se utiliza un colorante fluorescente específico de doble cadena durante la amplificación, la fluorescencia aumenta, generalmente, a medida que se produce más producto de doble cadena, véase R. Higuchi y otros, "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences" ("Amplificación y detección simultánea de las secuencias de ADN específicas"), 10 *Bio/Technology* 413-417 (1992). En la técnica se conoce también un ensayo de la PCR por fluorescencia para el ARN de la hepatitis C que utiliza el intercalador YO-PRO-1. Véase T. Ishiguro y otros, "Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater" ("Ensayo cuantitativo homogéneo del ARN del virus de la hepatitis C mediante la reacción en cadena de la polimerasa de un intercalador fluorescente"), 229 *Anal. Biochem.* 207-213 (1995). Se prefiere que el SYBRTM Green I, que se conoce bien en la técnica y está disponible en Molecular Probes of Eugene, Oregón, se utilice como colorante específico de doble cadena. La estructura molecular de este colorante es un secreto comercial, pero está recomendado por el fabricante como un colorante específico de doble cadena más sensible para la detección de ADN en geles. Sin embargo, el SYBRTM Green I es termolábil y, de

este modo, no es útil para la monitorización de la fluorescencia de la PCR según los métodos convencionales en los que la temperatura de la mezcla de reacción se mantiene en las temperaturas de fusión durante períodos prolongados de tiempo. Debido a esta termolabilidad, no se esperaba descubrir que el SYBRTM Green I se pudiera utilizar para monitorizar las reacciones PCR cuando las temperaturas de fusión no se mantienen durante períodos prolongados, es decir, cuando la PCR se lleva a cabo mediante ciclado rápido según el paradigma cinético descrito anteriormente.

Ejemplo 2

Se compararon diferentes colorantes de ADN específicos de doble cadena mediante la monitorización de la amplificación de un fragmento de 110 pares de bases del par de cebadores PCO3/PCO4 del gen de la beta-globina humana de 10.000 copias de la platilla. Los cebadores se sintetizaron mediante la química estándar de la fosforamida tal como se conoce en la técnica, es decir, utilizando la Pharmacia Biotech Gene Assembler Plus (Piscataway, New Jersey). Los cebadores PCO3/PCO4 de la beta-globina humana (110 pares de bases) se describen en C.T. Wittwer y otros, "Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air" ("Reacción en cadena de la polimerasa automatizada en tubos capilares con aire caliente"), 17 Nucl. Acids. Res. 4353-4357 (1989). La amplificación del ADN se realizó en Tris 50 mM, pH 8,5 (25°C), MgCl₂ 3 mM, albúmina de suero bovino 500 µg/ml, 0,5 µM de cada cebador, 0,2 mM de cada desoxinucleósido trifosfato y 0,2 U de Taq polimerasa por cada 5 µl de muestra a menos que se afirme lo contrario en los siguientes ejemplos. El producto de la amplificación purificado se utilizó como plantilla del ADN y se obtuvo mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación en etanol, véase D.M. Wallace, "Large- and small-scale phenol extractions and precipitation of nucleic acids" ("Extracciones con fenol y precipitación de ácidos nucleicos a pequeña y gran escala"), 152 Methods in Enzymology 33-48 (1987), seguidas por la eliminación de los cebadores mediante lavados repetidos a través de un microconcentrador Centricon 30 (Amicon, Danvers, Massachusetts). Las concentraciones de las plantillas se determinaron mediante la absorbancia a 260 nm. Las proporciones A(260):A(280) de las plantillas eran superiores a 1,7.

El SYBRTM Green I (Molecular Probes, Eugene, Oregon) se utilizó en una dilución 1:10.000, el bromuro de etidio en una concentración de 5 µg/ml, y naranja de acridina en una concentración de 3 µg/ml. Se determinó que estas concentraciones eran las concentraciones óptimas para maximizar la señal de fluorescencia observada durante la amplificación para cada colorante. La excitación se realizó a través de un filtro de interferencia a 450-490 nm a partir de una fuente de arco de xenón, a excepción del bromuro de etidio, en el que se utilizó una excitación a 520-550 nm. Para el SYBRTM Green I, se monitorizó la emisión a 520-550 nm. La fluorescencia del bromuro de etidio se observó a través de un paso de banda de 580-620 nm. La señal del naranja de acridina se recogió como la proporción de la fluorescencia verde (520-550 nm) con respecto a la roja (>610 nm). La fluorescencia de la muestra antes de la amplificación se comparó con la fluorescencia después de 35 ciclos (94°C máximo, 60°C durante 20 segundos) a 60°C. El incremento de la fluorescencia fue de 5,3 veces para el SYBRTM Green I, de 1,7 veces para el bromuro de etidio, y de 1,2 veces para el naranja de acridina. En experimentos separados, la fluorescencia del SYBRTM Green I fue estable durante más de 30 minutos a 70°C. Se excita también de forma conveniente con luz visible y se constata que es menos mutágeno que el bromuro de etidio. La fluorescencia de fondo, en todos los casos, surge principalmente de los cebadores.

El SYBRTM Green I es un colorante específico de doble cadena preferido para monitorizar por fluorescencia la PCR principalmente, debido a la sensibilidad superior, que resulta de una mayor discriminación entre los ácidos nucleicos de cadena doble y de cadena sencilla. El SYBRTM Green I se puede utilizar en cualquier amplificación y no es caro. Además, la especificidad del producto se puede obtener mediante el análisis de curvas de fusión, tal como se describirá inmediatamente.

Ejemplos Comparativos - Selección de colorante de transferencia de energía de resonancia para sondas de hibridación

La transferencia de energía de resonancia por fluorescencia puede producirse entre 2 fluoróforos si están en proximidad física y el espectro de emisión de un fluoróforo se solapa con el espectro de excitación del otro. La teoría introductoria a la transferencia de energía de resonancia por fluorescencia puede encontrarse en muchos artículos de revisión recientes. La velocidad de transferencia de energía de resonancia es:

$$(8,785E - 5) (t^{-1}) (k^2) (n^{-2}) (q_D) (R^{-6}) (J_{DA})$$

donde:

t = tiempo de vida de estado excitado del donador en ausencia del aceptor;

k² = es un factor de orientación entre el donador y el aceptor;

n = índice de refracción de luz visible en el medio intermedio;

q_D = eficacia cuántica del donador en ausencia del aceptor;

ES 2 326 050 T3

R = distancia entre el donador y el aceptor (en angstroms);

J_{DA} = la integral de $(F_D)(e_A)(W^4)$ con respecto a W en todas las longitudes de onda solapantes

con:

F_D = espectro de fluorescencia normalizado máximo del donador,

e_A = coeficiente de absorción molar del aceptor ($M^{-1}cm^{-1}$), y

W = longitud de onda (nm).

Para cualquier donador y aceptor dado, puede calcularse una distancia en la que se produce el 50% de la transferencia de energía de resonancia, y se abrevia como R_0 . Puesto que la velocidad de transferencia de energía de resonancia depende de la 6ª potencia de la distancia entre el donador y el aceptor, la transferencia de energía de resonancia cambia rápidamente a medida que R varía de R_0 . A $2R_0$, se produce muy poca transferencia de energía de resonancia, y a $5R_0$, la eficacia de transferencia es casi completa, a menos que predominen otras formas de des-excitación (es decir, inhibición por colisión). Los valores de R_0 de muchos pares de donador y aceptor diferentes se han compilado y pueden variar entre 22 y 72 angstroms.

En el ADN de doble hélice, 20 bases están separadas por aproximadamente 34 angstroms. Marcando las bases de ADN con fluoróforos donadores y aceptores, puede utilizarse la transferencia de energía de resonancia como regla de medida espectroscópica para observar la geometría helicoidal del ADN y analizar la estructura de una intersección de ADN de cuatro brazos. La transferencia de energía de resonancia también puede utilizarse como monitor de la hibridación. Si un oligonucleótido marcado hibrida con una cadena de plantilla marcada, R puede llevarse desde mucho mayor de R_0 a muy por debajo de R_0 , aumentando la transferencia de energía de resonancia drásticamente. Como alternativa, 2 sondas marcadas pueden hibridar con la misma cadena de plantilla para un cambio similar de transferencia de energía por fluorescencia.

La utilización práctica de la transferencia de energía de resonancia para monitorizar la hibridación depende de la sensibilidad requerida y de la cantidad de tiempo disponible. Utilizando una técnica de hibridación competitiva con sondas marcadas 1 nM, se detectó ADN amplificado por la PCR después de 15 minutos a 40°C. La generación de señales más rápida es deseable. Si solamente se requirieran segundos para la hibridación, los productos de la PCR podrían cuantificarse convenientemente cada ciclo de amplificación. Es más, el grado de hibridación de la sonda podría monitorizarse en un ciclo de temperatura.

La hibridación es un proceso de segundo orden (véase B. Young Y M. Anderson, Quantitative analysis of solution hybridization (Análisis Cuantitativo de hibridación en solución). En: Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach (Hibridación de Ácidos nucleicos; Una Aproximación Práctica) 47-71, (B. Hames, S. Higgins ed., 1985). Cuando la concentración de la sonda es mucho mayor que la concentración de la diana, la velocidad de hibridación es inversamente proporcional a la concentración de la sonda. Por ejemplo, al doblar la concentración de la sonda, el tiempo de hibridación se reduce a la mitad. Serían necesarias altas concentraciones de sonda para la monitorización ciclo por ciclo durante la PCR, puesto que la hibridación debe ocurrir antes de que el sitio de hibridación quede cubierto por la extensión de polimerasa.

Las altas concentraciones de sonda requeridas para la monitorización de la hibridación durante la PCR requieren un par de transferencia de energía de resonancia con características únicas. Considerar la excitación de un par de donador (D) y aceptor (A) con luz. El número de fluoróforos D y A excitados directamente será proporcional al coeficiente de extinción (e) de cada fluoróforo a la longitud de onda de excitación, o:

Número de moléculas de D excitadas directamente = $(K)(e_D)$

Número de moléculas de A excitadas directamente = $(K)(e_A)$.

Donde K es una constante de proporcionalidad. La des-excitación del donador se producirá mediante fluorescencia, transferencia de energía de resonancia y otros procesos que se resumen como inhibición térmica. Si p_F = la probabilidad de transferencia de energía de resonancia y p_{TD} = probabilidad de inhibición térmica del donador, entonces la probabilidad de fluorescencia del donador es:

$$1 - p_F - p_{TD}$$

Y el número de moléculas donadoras que emiten fluorescencia es:

$$(K)(e_D)(1 - p_F - p_{TD})$$

ES 2 326 050 T3

Si la probabilidad de detectar una emisión del donador en la ventana de emisión del donador (por ejemplo una ventana de filtro de paso de banda) es P_{DD} , entonces el número de emisiones del donador observadas es:

$$(P_{DD}) (K) (e_D) (1 - p_F - p_{TD})$$

Ahora, el número de fluoróforos aceptores excitados es la suma de aquellos excitados directamente y de aquellos excitados a través de transferencia de energía de resonancia:

$$(K) (e_A) + (K) (e_D) (p_F)$$

Si p_{IA} = la probabilidad de inhibición térmica del aceptor, entonces la probabilidad de fluorescencia del aceptor es:

$$1 - p_{IA}$$

Y el número de moléculas de aceptor que emiten fluorescencia es:

$$[(K) (e_A) + (K) (e_D) (p_F)] [1 - (p_{TA})]$$

Si la probabilidad de detectar una emisión del aceptor en la ventana de emisión del aceptor es P_{AA} , entonces el número de emisiones del aceptor observadas es:

$$(P_{AA}) [(K) (e_A) + (K) (e_D) (p_F)] [1 - (p_{TA})]$$

Finalmente, si la probabilidad de observar una emisión del donador en la ventana de emisión del aceptor es p_{DA} , entonces el número de emisiones observadas (tanto D como A) en la ventana de emisión del aceptor es:

$$(p_{AA}) [(K) (e_A) + (K) (e_D) (p_F)] [1 - (p_{TA})] + (p_{DA}) (K) (e_D) (1 - p_F - p_{TD})$$

Puesto que las mediciones de fluorescencia son relativas y K está presente en todos los términos, si eliminamos K y reordenamos, la intensidad observada en la ventana del donador es proporcional a (excitación del donador) - (transferencia de energía):

$$(e_D) (p_{DD}) (1 - p_{TD}) - (e_D) (p_{DD}) (p_F) \quad 1)$$

y la intensidad observada en la ventana del aceptor es proporcional a (excitación del aceptor) + (transferencia de energía) + (emisión del donador en la ventana del aceptor):

$$(e_A) (p_{AA}) (1 - p_{TA}) + (e_D) (p_{DD}) (p_F) (1 - p_{TA}) + (e_D) (p_{DA}) (1 - p_{TD} - p_F) \quad 2)$$

A medida que la transferencia de energía de resonancia aumenta, la señal del donador disminuye y la señal del aceptor aumenta. El porcentaje de cambio de la señal depende de la intensidad de luz de fondo en cada ventana. Con altas concentraciones de sondas, esta intensidad de luz de fondo es alta. Durante la PCR, cuando se necesita monitorizar concentraciones de diana (producto) variantes, no es posible hacer coincidir la concentración de donador con la concentración de diana. Las moléculas de donador en exceso contribuyen a la intensidad de luz de fondo en las ventanas de donador y de aceptor y enmascaran parcialmente los fenómenos de transferencia de energía. La luz de fondo en la ventana del aceptor no solamente procede de la emisión del donador en la ventana del aceptor, sino también de la excitación directa del aceptor. Este fondo puede minimizarse con un bajo e_A y una baja P_{DA} .

El par de transferencia de energía por fluorescencia fluoresceína/rodamina, utilizado habitualmente para la detección de ácido nucleico, tiene una alta fluorescencia de fondo. Tanto la excitación directa del aceptor (e_A , aproximadamente el 10% de e_{MAX}) como la emisión del donador a longitudes de onda utilizadas para detectar emisión del aceptor (P_{DA} , aproximadamente al 20% de la emisión máxima) son altas. Este par puede utilizarse para monitorizar la hibridación si la concentración de sonda se acerca a la concentración diana y se permite el tiempo suficiente para completar la hibridación. Éste no es un par útil de fluoróforos para la monitorización continua de la PCR puesto que se requieren altas concentraciones de sonda y la concentración de plantilla en la PCR está cambiando continuamente.

La monitorización de la concentración de producto durante la PCR mediante hibridación no ha sido posible en el pasado puesto que no se ha descubierto un par de transferencia de energía de resonancia aceptable. Se han hecho unos pocos intentos de utilizar transferencia de energía de resonancia para la detección directa "no competitiva" de la hibridación. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.565.322 afirma que "la eficacia de transferencia de

energía observada en términos de re-emisión por el aceptor era relativamente baja". A concentraciones de sonda que son lo suficientemente altas para que se produzca hibridación significativa en segundos, la fluorescencia de fondo es demasiado alta.

La fluoresceína es quizás el fluoróforo utilizado más ampliamente. Su coeficiente de extinción y eficacia cuántica son altos y su utilización está muy extendida en microscopía, inmunoensayos y citometría de flujo. Es el donador en un par de transferencia de energía de resonancia utilizado habitualmente con rodamina. Cy5 es un fluoróforo popular de re-emisión con un coeficiente de extinción muy alto. La estructura del éster de N-hidroxysuccinimida de Cy5 se muestra en la figura 6, y la estructura del colorante relacionado Cy5.5, se muestra en la figura 7. Estos colorantes son colorantes de indodicarbocianina que se utilizan habitualmente en citometría de flujo y secuenciadores de fluorescencia automatizados y están disponibles de Amersham (Pittsburg, PA). Tanto la fluoresceína como Cy5 están disponibles en el mercado como amiditas para incorporación directa automatizada en oligonucleótidos. Sin embargo, nunca se ha descrito Cy5 como par de transferencia de energía de resonancia con fluoresceína. De forma intuitiva, la emisión de fluoresceína y la absorción de Cy5 no se solapan lo suficiente para considerar la transferencia de energía de resonancia. El espectro de emisión de la fluoresceína y el espectro de absorción de Cy5 unido a oligonucleótidos se muestran en la figura 8. Cuando las áreas bajo las curvas se normalizan, el solapamiento de los espectros técnicos es del 19%. La excitación de Cy5.5 se desplaza al rojo en aproximadamente 25 nm, disminuyendo adicionalmente el solapamiento con la emisión de fluoresceína a aproximadamente el 15%. Trabajar en la región roja/infrarroja del espectro es ventajoso cuando se seleccionan componentes ópticos para instrumentación. Pueden utilizarse diodos láser para la iluminación, los detectores de fotodiodos tienen una sensibilidad excelente y la mayor parte de los materiales tienen una autofluorescencia mínima en la región espectral pertinente.

A pesar de un bajo solapamiento de espectros, se ha descubierto que la fluoresceína y Cy5 o Cy5.5 forman un excelente par de transferencia de energía de resonancia para la monitorización de la hibridación durante la PCR.

25

Ejemplo 3

(Ejemplo de referencia)

30

Se amplificó un fragmento de beta-globina de 110 pares de bases a partir de 50 ng de ADN genómico humano según el procedimiento del Ejemplo 2 con las sondas internas CAAACAGACA CCATGGTGCA CCTGACTCCT GAGGA-fluoresceína (SEQ ID N°: 3) y Cy5-GAAGTCTGCC GTTACTGCCC TGTGGGGCAA G-p (SEQ ID N°: 18) a 0,2 μ M cada una y 0,8 U de KlenTaq1 polimerasa (una variante de Taq polimerasa deficiente en 5'-exonucleasa - Patente de Estados Unidos N° 5.436.149) en una reacción de 10 μ l. Las sondas hibridaban internamente con los cebadores en la misma cadena y eran inmediatamente adyacentes sin bases intermedias algunas.

35

Las sondas y los cebadores se sintetizaron mediante química de fosforamidita estándar como se conoce en la técnica, utilizando Pharmacia Biotech Gene Assembler Plus (Piscataway, New Jersey). La sonda marcada con fluoresceína en el extremo 3' se sintetizó en una casete CPG marcada con fluoresceína (Glen Research, Sterling, VA) con el tritil-ON final para ayudar con la purificación por HPLC de fase inversa en C 18. El pico de elución tardío se recogió y el grupo tritilo se eliminó en un PolyPack (Glen Research). El oligonucleótido marcado con fluoresceína se eluyó con acetonitrilo al 50% y se purificó de nuevo mediante HPLC de fase inversa en C 18. La sonda marcada con Cy5 en 5' se sintetizó con un agente de fosforilación química en el extremo 3' (Glen Research) y añadiendo una amidita Cy5 (Pharmacia) al extremo 5' durante la síntesis de tritilo-OFF. Las secuencias fallidas se eliminaron mediante HPLC de fase inversa en C 18. La pureza de la sonda se comprobó con electroforesis en poliacrilamida y la absorbancia del colorante y el oligonucleótido.

45

La HPLC se realizó en una columna Hypersil ODS de 4 x 250 mm (Hewlett Packard) con una fase móvil de acetato de trietanolamina 0,1 M y un gradiente de acetonitrilo a 1 ml/min. El eluato se monitorizó para absorbancia (A_{260}) y fluorescencia (excitación a 490 nm y emisión a 520 nm para fluoresceína y excitación a 650 nm y emisión a 670 nm para Cy5). Los oligonucleótidos tritilados y marcados con fluoresceína se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo al 10-20% y los oligonucleótidos marcados con Cy5 se eluyeron en un gradiente de acetonitrilo al 10-40%.

50

El ciclado de temperaturas fue de 94°C durante 0 segundos con una velocidad de aproximación programada de 20°C/segundo, 60°C durante 20 segundos con una velocidad de aproximación de 20°C/segundo y 75°C durante 0 segundos con una velocidad de aproximación de 1°C/segundo en un ciclador rápido de temperaturas por fluorescencia capilar. Durante el ciclado de temperaturas, se adquirió la fluorescencia de fluoresceína y Cy5 en cada ciclo al final del segmento de fijación/extensión. Se observó la transferencia de energía de resonancia tanto como una disminución de la fluorescencia de fluoresceína como en un aumento de la fluorescencia de Cy5, comenzando aproximadamente en el ciclo 26 de amplificación (figura 9). En general, se prefiere la observación de la proporción de fluorescencia de Cy5 con respecto a fluoresceína.

60

Los inesperadamente buenos resultados con el par de fluoresceína/Cy5, como mínimo, pueden racionalizarse parcialmente. La integral de solapamiento, J_{DA} depende no solamente del solapamiento de espectros, sino también del coeficiente de extinción del aceptor (Cy5 tiene un coeficiente de extinción de $250.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 650 nm) y de la 4ª potencia de la longitud de onda. Todos estos factores favorecerán una alta J_{DA} para Cy5, incluso dado un solapamiento de espectros bajo. Recientemente, la ficoeritrina y Cy7 mostraron ser un tándem de sonda eficaz para inmunofluo-

65

rescencia, a pesar del bajo solapamiento espectral. En un ejemplo posterior, se demuestra la utilidad de fluoresceína y Cy5 como marcas en sondas de hibridación. Puede utilizarse la transferencia de energía de resonancia por fluorescencia para monitorizar la hibridación de ácido nucleico incluso cuando los colorantes que interactúan tienen un solapamiento espectral bajo. La utilización de fluoresceína con Cy5, Cy5.5 y otros colorantes que emiten en rojo o en infrarrojo como pares de transferencia de energía de resonancia para monitorizar la hibridación no se ha reconocido anteriormente. La fluoresceína tiene una larga "cola" de emisión que va hasta 600 nm, 700 nm y más allá, que puede utilizarse para excitar a estos colorantes del rojo lejano e infrarrojo. La velocidad de transferencia de energía depende de la integral de solapamiento, pero también se ve afectada por la 6ª potencia de la distancia entre los fluoróforos. Si las sondas se diseñan de modo que los colorantes de transferencia de energía de resonancia estén muy próximos, la velocidad de transferencia es alta. Como mínimo, con fluoresceína/Cy5, fluoresceína/Cy5.5 y pares similares, la transferencia de energía de resonancia parece predominar sobre la inhibición por colisión y otras formas de pérdida de energía cuando los fluoróforos están próximos entre sí, como en el ejemplo anterior donde los fluoróforos están unidos a sondas adyacentes sin bases intermedias.

La utilidad potencial de un par de transferencia de energía de resonancia para sondas de hibridación puede juzgarse observando el cambio de la proporción de intensidad de la luz en las ventanas del donador y del aceptor a transferencia de energía de resonancia mínima y máxima. Una manera de obtener transferencia mínima y máxima es unir ambos fluoróforos al mismo oligonucleótido y medir la proporción de fluorescencia antes y después de la digestión con fosfodiesterasa.

Ejemplo 4

(Referencia)

La sonda marcada doblemente con fluoresceína/Cy5 Cy5-CTGCCG-F-TACT GCCCTGTGGG GCAAGGp (SEQ ID N°: 19) se sintetizó mediante química de fosforamidita estándar, donde p es un fosfato 3' terminal (reactivo de fosforilación química, Glen Research), F es un resto de fluoresceína introducido como amidita con un esqueleto de 2-aminobutil-1,3-propanodiol para mantener la distancia natural internucleotídica de 3 carbonos del fosfodiéster (Clontech, Palo Alto, CA) y Cy5 se añade como la amidita (Pharmacia). La proporción de Cy5 con respecto a fluoresceína en Tris 0,1 M, pH 8,0 se obtuvo antes y después de la exhaustiva hidrólisis con fosfodiesterasa (Sigma, St. Louis, MO). El cambio de la proporción de fluorescencia era de 220 veces después de la hidrólisis. Una sonda marcada doblemente con fluoresceína/rodamina F-ATGCCCT*CCC CCATGCCATC CT-GCGTp (SEQ ID N°: 20) se adquirió de Perkin Elmer (Foster City, CA), donde F es fluoresceína y * es una rodamina unida a un resto T modificado mediante un brazo enlazador de amino. El cambio de la proporción de fluorescencia (rodamina con respecto a fluoresceína) era de 22 veces después de la hidrólisis con fosfodiesterasa.

La señal potencial del par de fluoresceína/Cy5 era 10 veces la del par fluoresceína/rodamina.

Ejemplo 5

(Referencia)

Se estudió el efecto de la proporción, concentración y separación de sondas de hibridación adyacentes marcadas con fluoresceína y Cy5 durante la PCR. Se utilizó la amplificación del par de locus de beta-globina y sonda del Ejemplo 3 y se observó el máximo cambio en la proporción de fluorescencia de Cy5 con respecto a fluoresceína. La máxima señal se produjo cuando la proporción de sondas marcadas con Cy5 con respecto a las marcadas con fluoresceína era de 2:1 (figura 10). A esta proporción de 2:1, la mejor señal se produjo a una concentración de sonda con fluoresceína de 0,2 μ M y a una concentración de sonda marcada con Cy5 de 0,4 μ M (figura 11). El número óptimo de bases intermedias entre sondas de hibridación adyacentes durante la PCR también se determinó. Varias sondas de la misma longitud pero ligeramente desplazadas en su posición de hibridación se sintetizaron según el Ejemplo 3, de modo que cuando hibridaban con la diana de beta globina, quedaban 0, 1, 2, 3, 4 ó 6 bases entre las sondas. La señal más alta durante la PCR se produjo con una base intermedia (figura 12). Aunque se detectó algo de transferencia de energía de resonancia a una separación de 15 e incluso 25 bases, se producía una transferencia mucho mejor a 0-5 bases.

Heller y otros, (Patente de Estados Unidos N° 4.996.143), descubrieron que la eficacia de transferencia de energía disminuía a medida que el número de nucleótidos entre fluoróforos disminuía de 4 a 0 unidades. Por el contrario, la mejor transferencia de energía con el par fluoresceína/Cy5 se observaba a de 0 a 2 nucleótidos intermedios.

Método de la sonda de hibridación. Si se sintetizan 2 sondas que hibridan de forma adyacente en una diana y cada una se marca con un fluoróforo de un par de transferencia de energía de resonancia, la transferencia de energía de resonancia aumenta cuando se produce hibridación (figura 5C). El par de fluoresceína/rodamina es el que se utiliza más habitualmente para la detección de ácido nucleico.

En el presente documento se describe un método de hibridación homogénea específica de secuencia para la detección de productos de la PCR. No es obvio cómo conseguir esto. La utilización de sondas de hibridación durante la amplificación va en contra del razonamiento. No se observa que pueda producirse la hibridación de la sonda y

la extensión de polimerasa. Para conseguir fluorescencia específica de secuencia, las sondas deben hibridar, pero las sondas no pueden hibridar si la polimerasa es para completar la extensión del cebador y amplificar exponencialmente el ADN.

Una solución a este problema es utilizar una única sonda doblemente marcada y utilizar la actividad 5'-exonucleasa de las ADN polimerasas termoestables habituales para escindir la sonda durante la extensión, separando de este modo los 2 fluoróforos. En este caso, la señal de fluorescencia surge de la separación del par de transferencia de energía de resonancia después de la hidrólisis de la sonda (figura 5B), en lugar de la aproximación de los fluoróforos mediante hibridación adyacente (figura 5C). Sin embargo, las sondas doblemente marcadas son difíciles de preparar, requiriendo la adición manual, como mínimo, de un fluoróforo al oligonucleótido y habitualmente requieren purificación extensiva. Las sondas son caras, y dos sondas doblemente marcadas son necesarias para la cuantificación competitiva de una diana o para detección de la mutación. Una preocupación adicional es que la fluorescencia observada depende de la cantidad acumulativa de sonda hidrolizada, no directamente de la cantidad de producto presente en cualquier ciclo dado. Esto da como resultado un aumento continuado de fluorescencia incluso después de que se alcance la meseta de la PCR. Finalmente y lo más importante, la hidrólisis de la sonda no siempre se produce durante la extensión de polimerasa, un efecto que no se entiende bien. Por ejemplo, la sonda marcada doblemente con fluoresceína/Cy5 del Ejemplo 4 mostró una hidrólisis muy mala durante la PCR cuando estaba flanqueada por cebadores. De hecho, se prepararon varias sondas doblemente marcadas con fluoresceína/Cy5, incluyendo aquellas con marcas terminales, y todas mostraban mala hidrólisis y generación de señales durante la amplificación.

La detección homogénea de productos de la PCR con sondas de hibridación adyacentes resolvería muchos de los problemas del sistema de 5'-exonucleasa. La síntesis de sondas de hibridación adyacentes es relativamente sencilla puesto que están disponibles amiditas de fluoresceína y Cy5 para la incorporación directa durante la síntesis automatizada y no se requiere el marcado doble de una sonda. Puesto que su fluorescencia es el resultado de la hibridación, no de la hidrólisis, la dependencia de la temperatura de la fluorescencia de la sonda podía utilizarse para la detección y cuantificación de mutación. Sin embargo, la utilización de sondas de hibridación adyacentes para la detección homogénea de productos de la PCR no se ha descrito anteriormente. Sorprendentemente, puede producirse hibridación para la generación de señales y amplificación mediante extensión de polimerasa a través del área bloqueada por las sondas.

Ejemplo 6

(Referencia)

Se amplificó un fragmento de beta-globina de 110 pares de bases a partir de ADN genómico con sondas adyacentes marcadas con fluoresceína y Cy5 como se describió en el Ejemplo 3. Se utilizaron 0,4 U (Taq) ó 0,8 (fragmento Stoffel, Perkin Elmer o Klen Taq1) de enzima en reacciones de 10 μ l. A menos que se indique lo contrario, el ciclado de temperatura era a 94°C durante 0 segundos con una velocidad de aproximación programada de 20°C/segundo, 60°C durante 20 segundos con una velocidad de aproximación de 20°C/segundo y 75°C durante 0 segundos con una velocidad de aproximación de 1°C/segundo. La figura 13 muestra el desarrollo de fluorescencia mediante 2 sondas de hibridación adyacentes inmediatamente después de que la plantilla se amplificara durante 30 ciclos. Después de una breve desnaturalización a 94°C, la temperatura se rebajó a 60°C y la fluorescencia aumentaba durante aproximadamente 20 segundos. La magnitud de la señal es mayor con una polimerasa deficiente en exonucleasa (fragmento Stoffel) que con Taq polimerasa nativa que incluye actividad 5'-exonucleasa. Después de aproximadamente 20 segundos, la fluorescencia cae a medida que la polimerasa se desplaza y/o hidroliza las sondas. La disminución relativa de la fluorescencia es relativamente más rápida cuando la polimerasa tiene actividad 5'-exonucleasa (Taq ADN polimerasa) que cuando carece de esta actividad (fragmento Stoffel).

En la figura 14 (panel superior), la temperatura se cicla entre 94°C y 60°C con un mantenimiento a 60°C durante 20 segundos. La fluorescencia se adquiere al finalizar los 20 segundos cuando la fluorescencia es máxima. La buena amplificación se produce con Taq (exo⁻), pero no con fragmento Stoffel (exo⁻) como se verifica tanto mediante desarrollo de fluorescencia como mediante geles de agarosa (no se muestran los geles). Sin embargo, si el tiempo a 60°C aumenta de 20 segundos a 120 segundos (figura 14, panel central), la polimerasa exo⁻ amplifica bien. La más lenta velocidad de desplazamiento de la sonda con una polimerasa exo⁻ aparentemente requiere más tiempo a 60°C para la amplificación eficaz que la polimerasa exo⁻. El tiempo requerido por polimerasas exo⁻ puede reducirse aumentando lentamente la temperatura de 60°C a 75°C (figura 14, panel inferior). La polimerasa se detiene cuando alcanza la sonda. Sin embargo, a las temperaturas de fusión de la sonda, las sondas se funden de la plantilla y la polimerasa continua sin impedimentos para completar la polimerización de la cadena. La polimerización se completa siempre que la temperatura no se eleve demasiado rápido después de la fusión de la sonda. La figura 14 (panel inferior) muestra una polimerasa exo⁻ (Taq) y dos polimerasas exo⁻ (fragmento Stoffel y Klen Taq 1).

Cuando la actividad exonucleasa está presente, parte de la sonda se hidroliza cada ciclo como se demuestra mediante una disminución de la fluorescencia con amplificación extensiva. Esto se observa en las figuras 13 y 14 (paneles central e inferior), pero no se produce con polimerasas exo⁻. Puesto que la fluorescencia es estable en amplificación extensiva, se prefieren las polimerasas exo⁻ tales como KlenTaq 1.

El éxito de la utilización de sondas de hibridación adyacentes para monitorizar la PCR depende de varios factores. La transferencia de energía de resonancia se maximiza cuando hay cualquiera de 0 a 2 bases intermedias entre sondas

de hibridación adyacentes. Para aumentar la fracción de cadenas que hibridan con las sondas antes de que el cebador se extienda a través del área de hibridación de la sonda, las temperaturas de fusión de la sonda deben ser mayores que las temperaturas de fusión del cebador (preferiblemente $> 5^{\circ}\text{C}$).

Fluorescencia ciclo por ciclo. El análisis convencional del punto final de la amplificación de ADN mediante electroforesis en gel identifica el tamaño del producto y estima la pureza. Sin embargo, dado que la amplificación es inicialmente estocástica, a continuación exponencial, y finalmente estagnante, la utilidad del análisis del punto final se limita a la cuantificación. En el presente documento se describe la monitorización ciclo por ciclo con sondas de hibridación para la cuantificación del número de copias de la plantilla inicial. Tal como se apreciará por los expertos en la materia, la monitorización de una vez por ciclo de muestras múltiples que experimentan la amplificación del ADN es una potente herramienta cuantitativa. La monitorización ciclo por ciclo se consigue mediante la adquisición de fluorescencia durante la extensión o la fase combinada de fijación/extensión de cada ciclo y relacionando la fluorescencia con la concentración del producto.

Ejemplo 7

La monitorización ciclo por ciclo de la PCR se realizó mediante tres técnicas de fluorescencia diferentes. La fluorescencia se monitorizó mediante (i) el colorante específico de doble cadena, SYBRTM Green I (ii) una disminución en la inhibición de la fluoresceína por rodamina tras la división de exonucleasa de una sonda de hidrólisis doblemente marcada (Ejemplo Comparativo) y (iii) la transferencia de energía de resonancia de la fluoresceína a la Cy5 mediante sondas de hibridación adyacentes (Ejemplo Comparativo). Los reactivos y las condiciones de amplificación fueron las descritas en el Ejemplo 2. Los cebadores RS42/KM29 (536 pares de bases) y PC03/PC04 (110 pares de bases) de la beta-globina humana se describen en C.T. Wittwer y otros, "Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air" ("Reacción en cadena de la polimerasa automatizada en tubos capilares con aire caliente"), 17 Nucl. Acids. Res. 4353-4357 (1989), que se incorpora en el presente documento por referencia. El ciclado de temperaturas para la beta-globina fue de 95°C como máximo, 61°C como mínimo, 15 segundos a 72°C y una velocidad promedio entre temperaturas de $5,2^{\circ}\text{C/s}$. Los cebadores de beta-actina y la sonda dual de fluoresceína/rodamina se obtuvieron de Perkin Elmer (no. N808-0230). El ciclado de temperaturas para la beta-actina fue de 94°C como máximo, 15 segundos a 60°C con una velocidad promedio entre temperaturas de $6,2^{\circ}\text{C/s}$. Las sondas marcadas individualmente 5'-CAAACAGACA CCATGGTGCA CCTGACTCCT GAGGA-fluoresceína-3' (Secuencia de Identificación (SEQ ID No:3) y 5'-Cy5-AAGTCTGCCG TTACTGCCCT GTGGGGCAAGp (SEQ ID No:4) se sintetizaron como en el Ejemplo 3. Estas sondas adyacentes se hibridan de forma interna al par de cebadores de la beta-globina PC03/PC04 en la misma cadena de ADN y están separadas por un par de bases. El ciclado de temperaturas fue de 94°C como máximo, 20 segundos a 59°C con una velocidad promedio entre temperaturas de $7,0^{\circ}\text{C/s}$. Las sondas de hibridación (beta-actina y beta-globina) se utilizaron cada una a una concentración de $0,2\ \mu\text{M}$.

Cuando se monitorizan muestras múltiples una vez por ciclo con SYBRTM Green I, se puede distinguir un intervalo de 10^7 a 10^8 de concentración inicial de plantilla, tal como se representa en la figura 15. Esta amplificación es de un fragmento de 536 pares de bases del gen de la beta-globina, con SYBRTM Green I como colorante específico de doble cadena. Cuando se normalizaron los datos como el porcentaje de fluorescencia máxima de cada muestra, se separaron claramente cien copias iniciales de diez copias. Sin embargo, la diferencia entre una y diez copias era marginal, y no se observó diferencia entre cero y una copia de promedio por muestra.

Por el contrario, las sondas específicas de secuencia tienen un intervalo dinámico similar, pero parecen discriminar incluso una única copia de plantilla inicial de controles negativos. La generación de la señal con sondas 5'-exonucleasa (fragmento beta-actina, figura 16) depende no solamente de la síntesis de ADN, sino que requiere hibridación e hidrólisis entre los fluoróforos de la sonda doblemente marcada. La hidrólisis reduce la inhibición y la proporción de emisión de fluorescencia de fluoresceína con respecto a rodamina aumenta. Mientras que la fluorescencia de colorantes de doble cadena disminuye con un ciclado excesivo (figura 15), la señal de sondas de exonucleasa sigue aumentando con cada ciclo (figura 16). Incluso aunque no se está sintetizando producto neto, la hibridación y la hidrólisis de la sonda siguen produciéndose. A medida que el número de copias de la plantilla disminuye por debajo de 10^3 , la intensidad de la señal disminuye, pero bajos números de copias pueden seguir cuantificándose, puesto que la señal del control negativo es estable.

En la figura 17 la amplificación se monitoriza utilizando sondas de hibridación adyacentes y se expresa como un proporción de fluorescencia de Cy5 con respecto a fluoresceína. El cambio de proporción de fluorescencia se debe en gran medida a un incremento de la fluorescencia de Cy5 a partir de la transferencia de energía de resonancia (figura 9). Al contrario que las sondas de hidrólisis doblemente marcadas, la señal de fluorescencia de las sondas de hibridación disminuye a altos números de ciclos si la polimerasa contiene una actividad exonucleasa (véase también la figura 14). Dos métodos diferentes para la detección de transferencia de energía de resonancia de hibridación durante la PCR se demostrarán posteriormente como ejemplos comparativos. El primer método utiliza dos sondas de hibridación adyacentes, una marcada en 3' con fluoresceína y la otra marcada en 5' con Cy5. A medida que se acumula producto durante la PCR, las sondas hibridan próximas entre sí durante el fragmento de fijación de cada ciclo. El segundo método utiliza un cebador marcado con Cy5 y una única sonda de hibridación. El cebador marcado se incorpora en el producto de la PCR durante la amplificación y solamente es necesaria una única hibridación.

Ejemplo 8

La monitorización ciclo por ciclo de la PCR se realizó mediante transferencia de energía de resonancia entre un cebador marcado con Cy5 y una sonda de hibridación marcada con fluoresceína. Esto se comparó con la monitorización con sondas de hibridación con Cy5/fluoresceína adyacentes. El cebador marcado con Cy5 era CAACTTCATC CACGT*TCACC (SEQ ID N°: 21) donde T* es una base T modificada con Cy5 unida y la sonda correspondiente era GTCTGCCCGTT ACTGCCCTGT GGGGCAA-fluoresceína (SEQ ID N°: 22). Las sondas de hibridación adyacentes eran CCTCAAACAG ACACCATGGT GCACCTGACT CC-fluoresceína (SEQ ID N°: 23) y Cy5-GAAGTCTGCC GTTACTGCCC TGTGGGGCAAp (SEQ ID N°: 24). Las sondas de hibridación se sintetizaron según el Ejemplo 3 y se utilizaron a 0,2 μ M. El cebador marcado con Cy5 se sintetizó en dos etapas. Se utilizó síntesis automatizada para incorporar un modificador de amino C6dT (Glen Research) en la posición T deseada. A continuación, el éster de N-hidroxisuccinimida monovalente de Cy5 (figura 6) se conjugó de forma manual con el enlazador de amino según las instrucciones del fabricante (Amersham). La purificación mediante HPLC era como se ha descrito en el Ejemplo 3.

Se utilizó el cebador marcado con Cy5 (0,5 μ M) en lugar de PC04 para amplificar el fragmento de beta-globina de 110 pares de bases de ADN genómico humano como en el Ejemplo 3, excepto que se utilizaron 0,4 U de Taq polimerasa por 10 μ l. Las sondas de hibridación adyacentes también monitorizaban la amplificación del mismo fragmento de beta-globina. El ciclado de temperatura se realizó a 94°C durante 0 segundos y 60°C durante 20 segundos. La fluorescencia se monitorizaba una vez cada ciclo al final del fragmento de fijación/extensión. En ambos métodos, la transferencia de energía por fluorescencia a Cy5 aumenta con la hibridación y se representa como una proporción de fluorescencia de Cy5 con respecto a fluoresceína (figura 18).

En experimentos adicionales, se modificó el número de bases que separan la marca de Cy5 y la marca de fluoresceína. La mejor transferencia de energía de resonancia por fluorescencia se observó con aproximadamente 4-6 bases entre los fluoróforos, aunque una señal era detectable hasta como mínimo con 15 bases.

Al contrario que las sondas de hidrólisis, la señal de fluorescencia de sondas de hibridación no es acumulativa y se desarrolla de nuevo durante cada fase de fijación. La fluorescencia es una medida directa de la concentración de producto puesto que la hibridación es una reacción de pseudo-primer orden. Puesto que la concentración de la sonda es mucho mayor que la del producto, la fracción de producto hibridada con la sonda es independiente de la concentración del producto. Estas características indican que la utilización de una sonda individual de hibridación junto con un cebador marcado proporcionará una monitorización superior de la acumulación de producto para su cuantificación. La varianza inherente de las diferentes técnicas de fluorescencia durante la monitorización ciclo por ciclo es también importante para la cuantificación.

Ejemplo 9

Se realizó la amplificación del ADN, según el Ejemplo 2, para cada uno de los tres métodos diferentes de monitorización de la fluorescencia. Se utilizó SYBRTM Green I en una dilución 1:10.000 en la amplificación de un fragmento de 205 pares de bases de beta-globina humana a partir de los cebadores KM29 y PC04. La sonda y las condiciones de hidrólisis son las especificadas en el Ejemplo 7. La sonda de hibridación, TCTGCCGTTA CTGCCCTGTG GGGCAAG-fluoresceína (SEQ ID No: 5) se utilizó con KM29 y el cebador marcado en Cy5 CAACTTCATCCACGTT*CACC (SEQ ID No: 6), en la que T* era una base T marcada en Cy5, que se sintetizó como en el ejemplo 8. Todas las amplificaciones se realizaron en diez replicados con 15.000 copias de la plantilla (50 ng de ADN genómico humano/10 μ l). Los ciclos de temperatura fueron de 31 segundos de duración (máximo de 94°C, 60°C durante 20 segundos, velocidad promedio entre temperaturas de 6,2°C/s). La fluorescencia se adquirió para cada muestra entre los segundos 15 y 20 de la fase de fijación/extensión.

La figura 19 permite la comparación de tres técnicas de monitorización de la fluorescencia para la PCR. Las sondas de fluorescencia son el colorante de ADN de doble cadena, SYBRTM Green I (figura 19A), una sonda de hidrólisis de fluoresceína/rodamina doblemente marcada (figura 19B), y una sonda de hibridación marcada con fluoresceína con un cebador marcado en Cy5 (figura 19C). Todas las sondas tenían casi la misma sensibilidad con la fluorescencia detectable que tenía lugar alrededor del ciclo 20. Con la amplificación extendida, la señal siguió incrementándose con la sonda de hidrólisis, se niveló con el SYBRTM Green I, y disminuyó ligeramente con la sonda de hibridación. La precisión de las tres técnicas de monitorización de la fluorescencia se comparan en la figura 19D. Para cada punto se indican la media +/- la desviación estándar. Los datos están representados como el coeficiente de variación (desviación estándar/media) de la proporción de la fluorescencia sobre la línea base (tomada como el promedio de los ciclos 11-15).

A pesar de que el cambio en la proporción de fluorescencia de la sonda de hidrólisis es mayor que la de la sonda de hibridación (figuras 19B y 19C), el coeficiente de variación de la fluorescencia de las sondas de hidrólisis es superior (figura 19D). Es decir, la fluorescencia resultante del método con la sonda de hibridación es más precisa que el que utiliza una sonda de hidrólisis, aunque los niveles absolutos de la señal son inferiores. Ésta es una ventaja inesperada de las sondas de hibridación sobre las sondas de hidrólisis doblemente marcadas más habituales.

Cuantificación del número de copias iniciales de la plantilla. La PCR cuantitativa se ha convertido en una importante técnica tanto en la investigación biomédica como en el laboratorio clínico. El proceso de cuantificación incluye frecuentemente la elaboración de una curva estándar de muestras que contienen números de copias conocidos de la

ES 2 326 050 T3

secuencia diana. El número de copias de una muestra desconocida se determina por extrapolación entre los valores conocidos. Cuando se monitoriza ciclo por ciclo una curva de amplificación completa utilizando fluorescencia, radioactividad o cualquier otro método que proporciona una señal proporcional a la cantidad de ADN presente, se dispone de muchos puntos para el análisis y no está claro qué valor elegir para representar una muestra estándar o desconocida. La técnica anterior se utiliza para elegir una “valor umbral” de la señal y, a continuación, utilizar el número de ciclos cuando la muestra estándar o desconocida traspasa ese umbral como valor representativo (véase Higuchi y Watson, EPA 0 640 828 A1). Esta aproximación utiliza una cantidad muy pequeña de los datos disponibles en una curva de amplificación. Además, la asignación del valor umbral es altamente subjetiva y está sometido a una desviación consciente o inconsciente. En una curva de amplificación se podrían utilizar objetivamente más de los datos disponibles mediante la aplicación de técnicas de ajuste de curvas no lineales a los datos. Preferiblemente, se podrían encontrar ecuaciones que describen la forma de las curvas de amplificación mediante factores de modelación del proceso subyacente.

Se podrían utilizar un conjunto de diferentes ecuaciones para ajustar los datos obtenidos durante la amplificación. Las amplificaciones de ADN tienen, habitualmente, un fragmento logarítmico lineal y los datos en este fragmento se pueden ajustar a una ecuación que describe un incremento exponencial como el esperado en una amplificación de ADN. La parte logarítmica lineal de una amplificación de ADN se puede describir mediante la siguiente ecuación:

$$y = A * [ADN] * (1 + E)^n$$

en la que

A es un factor de escala que convierte unidades de señal en unidades de ADN; [ADN] es la concentración inicial de ADN en la reacción;

E es la eficacia de la reacción; y n es el número de ciclos.

Un proceso de cuantificación implicaría: (1) el ajuste de los estándares conocidos a esta ecuación permitiendo la flotación de los parámetros A y E, y (2) el ajuste de las muestras desconocidas a la ecuación utilizando los valores de A y E a partir de los estándares y permitiendo la flotación de [ADN]. Esta técnica utiliza muchos más datos y utiliza la parte de los datos, la parte logarítmica lineal, que probablemente es más informativa. Las figuras 20, 21 y 22 muestran un ejemplo de esta aproximación. Se amplificaron diluciones de diez veces de un producto de PCR purificado como una curva estándar y se utilizó un estándar de ADN genómico humano “desconocido”. La figura 20 muestra que la parte logarítmica lineal es identificada fácilmente por el usuario o bien, mediante software. La figura 21 muestra un ajuste de la ecuación $y = A * [ADN] * (1 + E)^n$ al estándar de 10^4 copias. La figura 22 utiliza valores promedio de los estándares para A y E y ajusta la [ADN]. El valor de ajuste de 16.700 está muy próximo al valor teórico para un gen copia único en el ADN genómico (15.000 copias).

La utilización de todos los datos en una curva de amplificación incluiría el nivel de fondo y el valor del plateau. Mientras que con un número de copias el valor del plateau no es informativo, con un número bajo de copias es frecuentemente proporcional al número de copias iniciales. El nivel de fondo podría ser útil en la determinación del primer punto que muestra un incremento significativo de la señal. En este punto no se conocen todos los factores implicados en la forma de la curva de amplificación del ADN, así que una aproximación es describir la forma de la curva. La figura 23 muestra las curvas de amplificación que utilizan sondas de hibridación fluorescentes para detectar rangos de magnitud de quinto orden de las concentraciones de la plantilla de ADN. Cada curva se ajusta a la ecuación:

$$y = ((as * x + ab) - (ds * x + db)) / (1 + (x/c)^b) + (ds * x + db)$$

en la que “as” es el fondo de la línea inclinada, “ab” es la intersección de y con la línea de fondo, “ds” es la pendiente de la línea plateau, “db” es la intersección de y con la línea inclinada, “c” es el número de ciclo en el que la reacción está a medio camino entre el fondo y la línea plateau (A_{50}), y “b” es la pendiente de la parte logarítmica lineal de la amplificación.

Esta ecuación proporciona buenos ajustes a estos datos de amplificación, y la figura 24 muestra que el valor de la A_{50} se correlaciona bien con el logaritmo del número de copias iniciales a lo largo de siete órdenes de magnitud. La figura 25 muestra la misma ecuación ajustada a los datos de amplificaciones que utilizaron una sonda de hidrólisis para detectar una plantilla de ADN sobre un rango de 5 órdenes de magnitud. Esta ecuación proporciona buenos ajustes a estos datos de amplificación, y la figura 26 muestra que el valor de la A_{50} se correlaciona bien con el logaritmo del número de copias iniciales. Esto demuestra la flexibilidad de la aproximación completa del ajuste de la curva ya que la ecuación ha proporcionado buenos ajustes tanto a los plateaus estrechos de las curvas de amplificación con sondas de hibridación como a los “plateaus” de incremento estable de las curvas con sondas de hidrólisis.

Los ajustes totales de las curvas no se limitan a esta ecuación. La figura 27 muestra una amplificación de tres concentraciones de la plantilla de ADN ajustada a la ecuación:

$$y = (((as * x + ab) - (dmax * x / dd + x)) / (1 + (x/c)^b)) + (dmax * x / dd + x),$$

que es similar a las primeras ecuaciones de 6 parámetros excepto que el plateau se define mediante una curva hiperbólica en lugar de mediante una línea. La figura 28 muestra que la A_{50} para esta ecuación se correlaciona bien con el número de copias iniciales.

5 Aunque la A_{50} se ha utilizado en estos ejemplos, se podía elegir el nivel entre el fondo y el plateau si una técnica particular es más robusta, inferior o superior en el perfil de amplificación. Por ejemplo, se evalúa la mejor correlación entre el número de copias iniciales y la A_{10} , la A_{20} , la A_{30} , la A_{40} y la A_{50} en un conjunto de curvas estándar de amplificación. Se determina el nivel de amplificación que mejor se correlaciona con el número de copias iniciales conocidas. Esto será diferente para los diferentes sistemas de detección. La figura 19 muestra el coeficiente de variación
10 para varios sistemas de detección. El nivel de amplificación que es el mejor indicador es probable que sea el nivel con el coeficiente de variación más bajo.

Dado que la reacción de amplificación de ADN se entiende mejor por sí misma, se podrían utilizar otras ecuaciones que tienen parámetros que reflejan los procesos físicos. El plateau de la curva de amplificación del ADN tiene
15 diferentes causas en diferentes reacciones. Frecuentemente es debido a la incapacidad de los cebadores de competir con el producto en la refijación en los últimos ciclos. Este efecto se podría capturar con un parámetro que depende del cuadrado de la concentración del producto en la reacción (ya que la velocidad de refijación es proporcional al cuadrado de la concentración de producto). Otra causa del plateau puede ser la depleción de los cebadores. Las reacciones limitadas por los cebadores tienen una forma característica, tienen un plateau estrecho que se puede reconocer.
20 Los ajustes de la reacción limitada por los cebadores incluirán parámetros que definen este máximo estrecho. Las reacciones limitadas por las enzimas tienen un plateau redondo que se puede ajustar adecuadamente. Se pueden idear factores del peso de manera que reflejen los coeficientes de variación conocidos para el sistema dado cuanto mayor es el peso, más fiables son los puntos de los datos. Mediante el ajuste de más puntos en un perfil de amplificación, se pueden obtener estimaciones más precisas y robustas de un número inicial de copias. Se pueden utilizar uno o más de
25 los parámetros de estos ajustes para estimar el número inicial de copias de muestras desconocidas.

Monitorización continua de la fluorescencia de la PCR. A continuación, se describirá la característica de la presente invención de monitorización continua, es decir, la monitorización de forma repetida dentro de cada ciclo de la PCR. Aunque la monitorización de la fluorescencia durante la PCR se puede realizar una vez en cada ciclo a una
30 temperatura constante, la presente invención proporciona la ventaja importante de proporcionar una monitorización continua a lo largo del ciclo de la PCR. La temperatura es importante porque la fluorescencia cambia a medida que cambia la temperatura. Las figuras 29A y B muestran la relación inversa entre la temperatura y la fluorescencia para el SYBRTM Green I. Este es un efecto desconcertante durante el ciclado de temperaturas que se elimina, habitualmente, considerando la fluorescencia sólo una vez por ciclo a una temperatura de extensión constante. Sin embargo, según
35 la presente invención, la monitorización de la fluorescencia durante los cambios de temperatura es muy informativa. Anteriormente a la presente invención, no se ha realizado la monitorización continua de la fluorescencia dentro de cada ciclo, en oposición a una vez por cada ciclo. Según la presente invención, se obtienen datos de tiempo, temperatura y fluorescencia cada segundo, cada 200 ms, cada 100 ms o incluso a una frecuencia mayor. Dichos datos pueden revelar detalles exactos de la desnaturalización, refijación y extensión del producto, y la fijación y fusión de la sonda durante
40 el ciclado rápido, que no están disponibles en los métodos disponibles previamente.

Ejemplo 10

45 Se amplificó un fragmento de 180 pares de bases del gen del antígeno de superficie de la hepatitis B a partir de 10^6 copias del producto purificado de la PCR utilizando cebadores 5'-CGTGGTGGAC TTCTCTCAAT-3' (SEQ ID No: 1), y 5'-AGAAGATGAG GCATAGCAGC-3' (SEQ ID No: 2) (Secuencia HVHEPB del Banco de Genes). Se siguieron las condiciones de amplificación del Ejemplo 2, a excepción de que la reacción contenía una dilución 1:20.000 del SYBRTM Green I y $MgCl_2$ 2 mM. Cada ciclo de temperaturas fue de 27 segundos (máximo de 92°C, mínimo de 59°C, 5
50 s a 70°C, velocidad promedio entre temperaturas de 3,0°C/s). Se adquirieron datos de tiempo, temperatura, y 2 canales de fluorescencia cada 200 ms y se mostró de forma continua como las representaciones de la fluorescencia frente al número de ciclos y la fluorescencia frente a la temperatura. La figura 30 muestra un rastreo tridimensional de la temperatura, el tiempo y la fluorescencia para los ciclos 10 a 34. Esta curva tridimensional también se proyecta en la figura 30 como representaciones bidimensionales de la temperatura frente al tiempo, la fluorescencia frente al tiempo,
55 y la fluorescencia frente a la temperatura. La proyección de la temperatura frente al tiempo de la figura 30 se repite para cada ciclo y proporciona, esencialmente, la misma información que la establecida en la figura 3. Dado que la fluorescencia varía de forma inversa con la temperatura, la proyección de la fluorescencia frente al tiempo mostrada en la figura 30 en los ciclos iniciales es una imagen especular a escala de la representación de la temperatura frente al tiempo (véase la figura 29). A medida que se acumula el producto, la fluorescencia aumenta a cualquier temperatura con el producto de doble cadena. Sin embargo, a temperaturas de desnaturalización, la fluorescencia vuelve a la línea base ya que sólo está presente ADN de cadena sencilla. La proyección de la fluorescencia frente a la temperatura de los colorantes de doble cadena mostrada en la figura 30 elimina el eje del tiempo y muestra la dependencia con la temperatura del tipo de cadena durante la amplificación del ADN.

65

Ejemplo 11

Se amplificó un fragmento de 536 pares de bases del gen de la beta-globina humana a partir de 25 ng de ADN genómico y una dilución 1:10.000 del SYBRTM Green I en un volumen de 5 μ l. Cada ciclo de temperaturas fue de 28 segundos (máximo de 95°C, mínimo de 61°C, 15 s a 72°C con una velocidad promedio entre temperaturas de 5,2°C/s). El resto de condiciones son las mismas que las descritas en la figura 30. Se muestran los ciclos 15-40. La dependencia con la temperatura del tipo de cadena del producto durante la PCR se observa mediante las representaciones de la fluorescencia frente a la temperatura que se utilizan tal como se describe en la figura 31. Los ciclos iniciales representados aparecen idénticos, con un incremento no lineal de la fluorescencia a temperaturas inferiores. A medida que se lleva a cabo la amplificación, los ciclos de temperaturas aparecen como bucles ascendentes entre las temperaturas de fijación y desnaturalización. A medida que la muestra se calienta, la fluorescencia es elevada hasta que tiene lugar la desnaturalización. A medida que se enfría la muestra, la fluorescencia aumenta, reflejando la refijación del producto. Cuando la temperatura es constante durante la extensión, el incremento de la fluorescencia se correlaciona con la síntesis de ADN adicional.

Tal como se valorará del entendimiento de esta descripción, la monitorización continua dentro de un ciclo puede proporcionar elementos para comprender la mecánica de la amplificación de ADN que no estaban disponible previamente en la técnica. Utilizando la presente invención, se entienden muchos aspectos de la amplificación de ADN que hasta ahora no se habían entendido demasiado. Por ejemplo, la amplificación de ciclo rápido constata la desnaturalización del producto en menos de un segundo, mientras que la técnica anterior utiliza de diez segundos a un minuto de desnaturalización. La observación de la fusión del producto mediante la monitorización de la fluorescencia en tiempo real con colorantes de doble cadena, según la presente invención (figuras 30 y 31), muestra que la utilización de tiempos más cortos de desnaturalización es eficaz. Como otro ejemplo, se han propuesto muchas causas del conocido “efecto plateau”, pero se disponen de muy pocos datos para distinguir entre las alternativas. Tal como se muestra en la figura 31, la refijación del producto es muy rápida. De hecho, durante los ciclos posteriores de la amplificación, la mayor parte del producto se refija en cada ciclo durante el enfriamiento antes de alcanzar la temperatura de fijación del cebador. Esto tiene lugar con velocidades de enfriamiento de 5-10°C/s en la instrumentación de ciclo rápido. La refijación del producto será más lenta, los cicladores de temperatura de la técnica anterior serán más extensos y este efecto indeseable será superior. La refijación del producto parece ser una causa principal, o quizás la única, del “efecto plateau”.

Ahora se considera la monitorización continua de las sondas específicas de secuencia. Tal como se valorará del entendimiento de esta descripción, la monitorización continua dentro de un ciclo puede identificar la naturaleza de la fluorescencia de la sonda.

Ejemplo 12

(Ejemplo Comparativo)

Se realizó la monitorización continua de la amplificación cada 200 ms con una sonda de hidrólisis doblemente marcada (beta-actina) y sondas de hibridación adyacentes (beta-globina), tal como en el Ejemplo 3. En la figura 32A, se muestran los ciclos 20-45 de una reacción monitorizada con la sonda de hidrólisis. Las sondas de hidrólisis muestran un cambio lineal en la proporción de fluorescencia con la temperatura y un incremento paralelo en la fluorescencia a medida que se hidrolizan más sondas. En cambio, la proporción de fluorescencia de las sondas de hibridación varía de forma radical con la temperatura (figura 32B, ciclos 20-40). Durante la fase de fijación/extensión, las sondas se hibridan al producto de cadena única y aumenta la proporción de fluorescencia (Cy5/fluoresceína). Durante el calentamiento hasta las temperaturas de desnaturalización del producto, las sondas se disocian alrededor de los 70°C, y la proporción de la fluorescencia vuelve a los niveles de fondo.

Ejemplo 13

Un fragmento de beta-globina de 110 pares de bases se amplificó a partir de 50 ng de ADN genómico en un volumen de 10 μ l. Las condiciones de amplificación y las sondas de hibridación adyacentes del Ejemplo 3 se seguían con 0,4 U de Taq polimerasa o 0,8 U de KlenTaq1. La fluorescencia se monitorizó cada 100 ms. Las representaciones de fluorescencia frente a temperatura que utilizan KlenTaq1 (figura 33) y Taq (figura 34) demuestran la fusión de las sondas a aproximadamente 70°C. La señal máxima con KlenTaq1 es mayor que la de Taq, debido a la actividad exonucleasa de esta última. En los últimos ciclos con Taq, la fluorescencia cada ciclo comienza a disminuir a medida que la concentración de sonda intacta disminuye. La representación tridimensional de temperatura, tiempo y fluorescencia se muestran en la figura 35 (KlenTaq1) y en la figura 36 (Taq).

La combinación de (1) la monitorización continua de la fluorescencia dentro de cada ciclo de temperaturas y (2) el análisis de la dependencia con la temperatura y el tiempo de la hibridación, de la presente invención, proporciona ventajas que no son obtenibles de otras maneras. La figura 2 muestra que la información que previamente no se podía obtener, se puede extraer mediante la monitorización continua durante todo el ciclo. La monitorización continua de la fluorescencia durante la fase de fusión del producto del ciclo proporciona información útil sobre la pureza, la identidad, y la cantidad de ADN presente durante ese ciclo.

A medida que se calienta la reacción de la PCR desde la temperatura de extensión hasta la temperatura de desnaturalización, cualquier ADN de la muestra se funde hasta cadenas únicas. Esta desnaturalización se puede observar como una gota en la fluorescencia del SYBRTM Green I. Para productos de la PCR pequeños, la transición de fusión tiene lugar sobre un intervalo de temperaturas pequeño y el punto medio de ese intervalo de fusión se refiere como la T_m. De forma similar a la medición del tamaño por electroforesis en gel, el análisis de los picos de fusión mide una característica fundamental del ADN y se puede utilizar para identificar productos amplificados. A diferencia de la electroforesis en gel, el análisis de la curva de fusión puede distinguir productos de la misma longitud pero de diferente proporción GC/AT. Además, dos productos con la misma longitud y contenido de GC, pero que difieren en la distribución de GC (por ejemplo, distribuido a partes iguales frente a una abrazadera de GC en un extremo), tendrían curvas de fusión muy diferentes.

La temperatura a la que los productos de la PCR se funden varía sobre un intervalo amplio. Utilizando fórmulas empíricas conocidas en la técnica, el efecto del contenido de GC sobre la temperatura de fusión (T_m) del ADN predice que un 0% de dúplex GC se fundiría 41°C por debajo de un 100% de dúplex GC. Para un mismo contenido de GC, un dímero de cebadores de 40 pares de bases se fundiría 12°C por debajo de un producto de 1000 pares de bases. Por lo tanto, el intervalo de T_m para productos potenciales de la PCR abarca, como mínimo, 50°C. Este intervalo amplio permite diferenciar la mayoría de productos de la PCR mediante curvas de fusión. De este modo, la combinación de la monitorización de la fluorescencia de la PCR con el análisis de las curvas de fusión proporciona la amplificación, detección, y diferenciación simultánea de los productos de la PCR.

Ejemplo 14

Se obtuvieron curvas de fusión de ADN para tres productos diferentes de la PCR en un fluorímetro microvolumétrico integrado con un ciclador térmico de 24 muestras con instrumentación óptica para la fluorescencia del SYBRTM Green I (LightCycler LC24, Idaho Technology, Idaho Falls, Idaho). Los cebadores para la amplificación de las 180 pares de bases del gen del antígeno de superficie de la hepatitis B fueron 5'-CGTGGTGGAC TTCTCTCAAT-3' (SEQ ID No: 1) y 5'-AGAAGATGAG GCATAGCAGC-3' (SEQ ID No: 2). Los cebadores para la amplificación de los 292 pares de bases del gen del antígeno específico de próstata (PSA) fueron 5'-CTGTCCGTGA CGTGGATT-3' (SEQ ID No: 7) y 5'-AAGTCCTCCG AGTATAGC-3' (SEQ ID No: 8). La amplificación de los 536 pares de bases del gen de la beta-globina humana se realizó como en el Ejemplo 3, la PCR se llevó a cabo tal como se describe en el Ejemplo 2. Los productos de amplificación se purificaron por extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol, seguidas por lavados repetidos a través de un microconcentrador Centricon 30 (disponible en Amicon de Danvers, Massachusetts). Las concentraciones de las plantillas se determinaron mediante la absorbancia a 260 nm y se obtuvieron proporciones A(260)/A(280) superiores a 1,7.

Se pipetearon cincuenta ng de ADN purificado en Tris 50 mM, pH 8, 5, MgCl₂ 2 mM, y 250 µg/ml de albúmina de suero bovino y un volumen de 5 µl en el depósito de plástico abierto de los tubos de reacción de vidrio compuesto/plástico, se centrifugó a una velocidad baja para situar la muestra en la punta del capilar de vidrio, y se selló el interior con un tapón de plástico. Se adquirieron los datos de fluorescencia para las curvas de fusión mediante la integración de la señal sobre 0,25-2,0 segundos durante una transición lineal de temperatura hasta 95°C a 0,1-10,0°C/s. Se adquirieron de forma continua datos de fluorescencia y se mostraron en representaciones de fluorescencia frente a temperatura en el entorno de programación LabView (Nacional Instrument, Austin, TX). La figura 37 muestra las curvas de fusión de los tres productos purificados de la PCR.

Las T_ms de los tres productos de la figura 37 abarcan sólo 6 grados y dos de las curvas están separadas por sólo 2 grados. Esta pequeña separación es suficiente para permitir la fácil diferenciación de los productos. La importancia del porcentaje de GC sobre la longitud en la T_m se muestra mediante la fusión del producto PSA de 292 pares de bases a una temperatura mayor que el fragmento más largo de 536 pares de bases de la beta-globina. Las curvas de fusión se obtienen frecuentemente a velocidades de 0,5°C/minuto para asegurar el equilibrio. Además, a medida que disminuye la velocidad de calentamiento, las curvas de fusión se desplazan a temperaturas más bajas y se estrechan (figura 38; fragmento de hepatitis B). Sin embargo, hay que apuntar que las curvas de fusión de la figura 37 se obtuvieron durante una velocidad de calentamiento de 0,2°C/segundo (12°C/minuto) y se pueden diferenciar productos que se diferencian en la T_m por 2°C o menos.

La T_m aparente de los productos de la PCR también depende de la concentración del colorante de ADN específico de doble cadena (figura 39, fragmento de hepatitis B). Concentraciones superiores de colorante incrementan la estabilidad del dúplex de ADN y la T_m observada.

Para monitorizar las curvas de fusión con el SYBRTM Green I, las condiciones preferidas son una dilución de 1:7.000-1:30.000 de SYBRTM Green I con velocidades de calentamiento de 0,1-0,5°C/segundo. Estas condiciones permiten la fácil diferenciación de productos que difieren en la T_m en 2°C.

Un control más preciso de la temperatura y un software para el análisis de los picos de fusión reducirá la diferencia detectable en la T_m hasta una fracción de un grado. Esto permitirá la diferenciación de la mayoría de los productos de la PCR. Sin embargo, no todos los productos se pueden diferenciar mediante la T_m, pues al ser posible malinterpretar los resultados de la electroforesis debido a la comigración de dos o más productos, es posible que alguno de los productos que se funden en el intervalo esperado no sea el productos deseado. Sin embargo, si no hay un ADN que se

funda en el intervalo del producto esperado, se puede concluir que ninguno de los productos esperados se encuentra presente.

Otra forma para diferenciar los productos, disponible con el análisis de las curvas de fusión son los patrones distintivos de fusión de dominios observados en productos más largos de la PCR. Aunque los productos cortos (< 300 pares de bases) se funden habitualmente en una transición, los productos más largos pueden tener dominios de fusión internos que proporcionan curvas de fusión con una forma compleja distintiva. Estas curvas de fusión complejas se pueden utilizar como una huella dactilar para la identificación del producto.

El análisis de las curvas de fusión se puede utilizar para diferenciar el producto deseado de productos no específicos, tales como dímeros de cebadores. Los dímeros de cebadores se funden en un intervalo amplio de temperaturas bajas; muy diferente de las curvas de fusión estrechas de los productos específicos de la amplificación por la PCR. Los productos heterogéneos más largos que surgen después de realizar muchos ciclos en unas condiciones de fijación poco severas tienen curvas de fusión más bajas y anchas en comparación con el producto puro de la PCR.

Ejemplo 15

Se realizó la amplificación del fragmento de 536 pares de bases del gen de la beta-globina, según el Ejemplo 7, con una dilución 1:30.000 de SYBRTM Green I, a excepción de que se variaron las condiciones. En la reacción A (figura 40), no se añadió ninguna plantilla y la reacción se desarrolló en un ciclo a 94°C durante 0 s, 60°C durante 0 s, y 72°C durante 10 s durante 30 ciclos para producir productos pequeños no específicos de amplificación. En B, la amplificación de 10⁶ copias iniciales de la plantilla purificada en condiciones poco severas (94°C durante 0 s, 50°C durante 0 s, y 72°C durante 10 s) durante 55 ciclos mostró un intervalo amplio de tamaños de los productos de amplificación en electroforesis en gel y se funden a lo largo de un intervalo amplio de temperaturas. En C, 10⁶ copias iniciales de la plantilla purificada se introdujeron en un ciclo a 94°C durante 0 s, 60°C durante 0 s, y 72°C durante 10 s durante 30 veces y se muestra una banda única destacada y se funden en una transición estrecha. La velocidad de la transición de la temperatura fue 0,2°C/s. Se utilizó la digestión con Hind III del ADN del fago λ (M) como marcador.

La figura 40 muestra cómo las curvas de fusión reflejan de forma precisa la especificidad de una reacción PCR. La curva de fusión C estrecha y de temperatura elevada corresponde a una banda única en un gel. La curva de fusión A ancha y de temperatura baja proviene del análisis de un control sin plantilla que muestra únicamente dímeros de cebadores. La sobreamplificación del producto en C proporciona la curva de fusión intermedia B, aún claramente diferenciable del producto específico.

Las curvas de fusión observadas, por ejemplo, en la figura 37, se pueden cuantificar mejor mediante la consideración, en primer lugar, de la derivada de la fluorescencia (F) respecto a la temperatura (T). Esta derivada se representa como $-dF/dT$ frente a T y convierte las curvas de fusión en picos de fusión.

Ejemplo 16

Los fragmentos purificados del gen de la hepatitis B y la beta-globina del Ejemplo 14 se fundieron de forma individual y conjunta con una velocidad de transición de temperatura de 0,2°C/s y otras condiciones, tal como se especifica en el Ejemplo 14 (figura 41). La determinación en parte subjetiva de la T_m a partir de las curvas de fusión (parte superior) es fácil visualmente a partir de los picos de fusión (parte inferior). El área bajo los picos de fusión también se puede cuantificar mediante la integración del área bajo las curvas. La línea de base de fluorescencia se extrajo en primer lugar de la representación $-dF/dT$ frente a T suponiendo que la magnitud de la línea base varía como el área por debajo de la curva. A continuación, los picos se ajustaron a gaussianos mediante regresión mínimo-cuadrática no lineal con la media, desviación estándar, y altura del pico como parámetros de ajuste. El área por debajo de cada gaussiano se tomó como el área del pico. Todos los cálculos se realizaron en el entorno de programación LabView (National Instruments, Austin, TX). La figura 41 muestra un ejemplo de esta conversión de las curvas de fusión en picos de fusión. El código para estos cálculos se incluye como el apéndice A de la descripción.

La capacidad para distinguir el producto específico del dímero de cebadores y de otros componentes de la reacción mejora la utilización de los colorantes de ADN específico de doble cadena en la cuantificación de un número de copias iniciales bajo. Se han cuantificado un número de copias iniciales de la plantilla relativamente grandes utilizando bromuro de etidio (Higuchi y Watson, véase anteriormente). Sin embargo, en un número de copias iniciales bajo, la amplificación de fondo de los dímeros de cebadores y otros componentes de la amplificación interfieren con la señal de amplificación específica. Con la capacidad de la presente invención para diferenciar productos específicos de componentes no específicos, se pueden utilizar colorantes de ADN específico de doble cadena para cuantificar el bajo número de copias iniciales de la plantilla. Esto es ventajoso debido a la simplicidad de utilización de estos colorantes. Los colorantes de ADN específico de doble cadena se pueden utilizar en cualquier amplificación y no son necesarios oligonucleótidos habituales marcados por fluorescencia. La cuantificación de un número de copias bajo con colorantes de ADN específico de doble cadena requiere una especificidad de amplificación muy buena o, tal como se proporciona en la presente invención, un medio para diferenciar el producto deseado de la amplificación no específica.

Ejemplo 17

La aproximación para la determinación de la pureza del producto se utilizó para mejorar la PCR cuantitativa basada en la monitorización de una vez por ciclo de la fluorescencia de los colorantes de ADN específico de doble cadena. Los datos de fluorescencia se adquirieron una vez por ciclo después de la extensión de la polimerasa del producto para un conjunto de reacciones que varían en la concentración inicial de la plantilla de beta-globina purificada (véase la figura 42A). La plantilla de la beta-globina y las condiciones de amplificación fueron tal como se describen en el Ejemplo 7. El incremento logarítmico lineal sobre la fluorescencia de fondo empezó en un número de ciclo dependiente de la concentración de platilla inicial. Las representaciones de las cinco reacciones que varían de 10^6 a 10^2 copias por reacción se separaron mediante, aproximadamente, cuatro ciclos. La muestra con un promedio de 10^2 copias por reacción mostró una disminución en la eficacia de la reacción, y las reacciones con un número de copias iniciales por debajo de 100 dieron perfiles de fluorescencia que eran menos útiles. Los perfiles de fluorescencia para las reacciones que contenían 10 y 1 copias (de promedio) aumentan en orden inverso, y el control negativo mostró una amplificación después de, aproximadamente, 30 ciclos. Esto es debido a la amplificación de los dímeros de cebadores y otros productos de amplificación no específicos que no se pueden distinguir del producto deseado mediante la monitorización una vez por ciclo de la fluorescencia de colorantes de ADN específico de doble cadena.

Los picos de fusión se obtuvieron para cada muestra (figura 42B) y se encontró que se correlacionaban bien con los resultados de la electroforesis (figura 42C). La reacción que contenía un promedio de copias iniciales de plantilla de cero y una no produjo una banda de electroforesis discernible en la posición de las 536 pares de bases. Las reacciones que contenían 10 y 100 copias iniciales de la plantilla mostraron bandas de electroforesis débiles. Esto concordaba con el análisis de los picos de fusión, que no mostró fusión del ADN en el intervalo del producto deseado (90-92°C) para las reacciones que contenían cero y una copias iniciales y mostró picos pequeños en este intervalo de temperaturas para 10 y 100 copias. Las bandas de electroforesis intensas para las reacciones que contenían 10^3 - 10^6 copias iniciales se correlacionan bien con los picos de fusión amplios en el intervalo esperado de 90-92°C.

La proporción del producto deseado con respecto al producto total, determinada mediante la integración de los picos de fusión, variaba de 0,28 para 10^5 copias a 0,0002 para cero copias iniciales de la plantilla. Cada valor de fluorescencia en la figura 41A se multiplicó por la proporción adecuada para proporcionar la representación corregida (designada como “fluorescencia corregida” en la figura 42D). Este procedimiento extendió el intervalo dinámico eficaz de cuantificación entre 10 y 1 copias iniciales de la plantilla.

Los picos de fusión pueden distinguir productos específicos de productos no específicos (figura 40) y pueden distinguir dos productos purificados de la PCR mezclados conjuntamente (figura 41), de manera que podrían ser útiles para distinguir dos productos específicos amplificados juntos en un único tubo de reacción. Las curvas de fusión obtenidas por monitorización continua de las reacciones PCR, según la presente invención, son útiles en la PCR multiplex.

Ejemplo 18

En este ejemplo, se amplificaron simultáneamente dos fragmentos de genes a partir de ADN genómico y se monitorizaron con la fluorescencia del SYBRTM Green I. Durante cada ciclo de amplificación, se desnaturalizan diferentes productos de amplificación a temperaturas de fusión dependientes de la longitud del producto, la proporción de GC; y otros factores bien conocidos en la técnica. La temperatura a la que cada producto se funde se puede monitorizar con el colorante específico de doble cadena, SYBRTM Green I. Se amplificó un fragmento de 81 pares de bases del gen de la fibrosis quística utilizando los cebadores descritos en el presente documento como SEQ ID No: 14 y SEQ ID No: 15 junto con un fragmento de 98 pares de bases del oncogén c-erbB-2 (HER2/neu) utilizando los cebadores descritos en el presente documento como SEQ ID No: 16 y SEQ ID No: 17.

Las reacciones de amplificación estaban comprendidas de Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, MgCl₂ 3 mM, 500 µg/ml de albúmina de suero bovino, 200 µM de cada dNTP, y 0,5 µM de los cebadores de la fibrosis quística, 0,3 µM de los cebadores HER2/neu, una dilución 1:30.000 de SYBRTM Green I, 1 U de AmpliTaq Gold ADN polimerasa (Perkin Elmer, Foster City, CA), y 50 ng de ADN genómico humano en 10 µl.

Después de la activación de la polimerasa a 95°C durante 30 minutos, las muestras se sometieron a un ciclo a 94°C durante 0 segundos (pendiente = 20), 55°C durante 0 segundos (pendiente = 20), y 70°C durante 10 segundos (pendiente = 20) durante 35 ciclos. Las muestras se enfriaron hasta 70°C, y se adquirieron los valores de fluorescencia de forma continua durante un gradiente de 0,2°C/s hasta 94°C. Las curvas de fusión (figura 43) mostraron claramente dos productos diferentes que funden a 78°C (CFTR) y 88°C (neu). Los dos productos difieren en la T_m en, aproximadamente, 10°C y son fácilmente distinguibles.

La amplificación multiplex es útil en los casos en que se necesita un control interno durante la amplificación. Por ejemplo, muchas translocaciones son detectables mediante la PCR colocando cebadores a cada lado del punto de ruptura. Si no tiene lugar la amplificación, no habrá translocación, siempre y cuando el ADN esté intacto y no esté presente ningún inhibidor. Estas posibilidades se pueden descartar amplificando un locus de control positivo en la misma mezcla de reacción. Dichas amplificaciones de control se realizan mejor como controles internos con una amplificación y detección simultánea.

Ejemplo 19

En este ejemplo, se siguió el procedimiento del Ejemplo 18 a excepción de que después de la activación de la polimerasa a 95°C durante 30 minutos, las muestras se sometieron a un ciclo a 94°C durante 0 segundos (pendiente = 20), 55°C durante 0 segundos (pendiente = 20), y 70°C durante 10 segundos (pendiente = 20) durante 20 ciclos, seguido de 94°C durante 0 segundos (pendiente = 1), 55°C durante 0 segundos (pendiente = 20), y 70°C durante 20 segundos (pendiente = 20) durante 15 ciclos. Para los ciclos 26-31, se adquirieron valores de fluorescencia de forma continua durante cada transición de 1°C/s desde 70°C hasta 94°C. Las curvas de fusión se transformaron en picos de fusión y se mostraron (figura 44).

Hay que apuntar que la eficacia de la amplificación del fragmento de CFTR aparece más grande que la del fragmento de neu. La eficacia de la amplificación se puede determinar de forma rigurosa integrando los datos de los picos de fusión, tal como se indica en el Ejemplo 16.

Este tipo de datos cuantitativos referidos a un control tiene muchas aplicaciones. Por ejemplo, ciertos oncogenes, tales como HER2/neu, se amplifican *in vivo* en muchos tumores. Es decir, los genes se replican en el ADN genómico, algunas veces con muchas réplicas. Frecuentemente, el comportamiento clínico del tumor depende del grado de replicación del oncogén. La amplificación del oncogén y una plantilla de control permiten la evaluación cuantitativa del número de copias relativo. A modo de ejemplo adicional, la cuantificación de la carga viral en pacientes infectados con VIH o hepatitis C es importante en la prognosis y la terapia. Utilizando una plantilla de control y monitorizando la eficacia de la amplificación de las plantillas, tanto de control como naturales, durante la amplificación, se consigue una cuantificación exacta del número de copias iniciales de las plantillas.

La característica de la presente invención de utilizar curvas de fusión para la cuantificación relativa se explicará a continuación. Según la presente invención, una utilización adicional de las curvas de fusión es la PCR cuantitativa. La figura 42 mostró que había una correlación entre el área bajo el pico de fusión y la cantidad de producto específico. La cuantificación relativa de dos productos de la PCR sería posible si los dos productos se amplificaran con una eficacia similar (o si se conocieran las diferencias en las eficacias y se compensaran). La cuantificación relativa de dos productos integrando las áreas de los picos de fusión (véase el Ejemplo 16) es un aspecto de la presente invención.

Ejemplo 20

Se amplificaron y purificaron los fragmentos de los genes de la fibrosis quística y HER2-neu del Ejemplo 18, tal como se indica en el Ejemplo 2 y se ajustaron a 175 µg/ml. Las muestras se mezclaron en varias proporciones (total de 8 µl) y se añadieron a una solución tampón (1 µl) y SYBRTM Green I (1 pi). Las concentraciones finales fueron Tris 50 mM, pH 8,3, MgCl₂ 3 mM, albúmina de suero bovino 250 µg/ml, y una dilución 1:30.000 de SYBRTM Green I. Las curvas de fusión se obtuvieron a 0,2°C/s, se extrajo la fluorescencia de fondo y se integraron los picos, tal como se describe en el Ejemplo 16. Los resultados se muestran en la figura 45. Se encontró una correlación excelente entre las áreas relativas bajo los picos de fusión y las cantidades relativas de los dos productos.

La cuantificación relativa de los dos productos de la PCR es importante en muchas aplicaciones cuantitativas de la PCR. La amplificación multiplex de dos o más productos seguida de la integración de las áreas bajo los picos de fusión será extremadamente útil en estas áreas. El ARNm se cuantifica frecuentemente en relación con la cantidad de ARNm de un gen doméstico.

Otra utilización importante de la cuantificación relativa se encuentra en la PCR cuantitativa competitiva. Habitualmente, se sintetiza un competidor que tiene los mismos puntos de cebado, pero que difiere en la longitud de la secuencia diana original. Se añaden cantidades conocidas del competidor a una muestra desconocida y se realiza la cuantificación relativa. Los competidores se pueden producir de manera que difieran de la secuencia diana en la T_m en lugar de la longitud. Las cantidades relativas de los productos se pueden cuantificar comparando las áreas bajo sus puntos de fusión. Dado que se conoce la cantidad de uno de los productos, se puede obtener la cantidad de la diana original. La utilización del método de los picos de fusión es significativamente más fácil que los métodos utilizados actualmente que implican múltiples tubos en funcionamiento para cada muestra desconocida y, frecuentemente, sacando tubos en varios números de ciclos durante la reacción para encontrar la parte logarítmica lineal de la reacción. A continuación, se deben determinar las cantidades relativas de los dos productos. Habitualmente, esto se realiza marcando uno de los dNTPs con un radioisótopo y, a continuación, se cuantifica la cantidad de marcador incorporado en cada banda después de la electroforesis en gel de agarosa. En comparación, la presente invención permite la monitorización continua de la reacción, de manera que la parte logarítmica lineal de la amplificación se puede identificar fácilmente. La cuantificación relativa se puede realizar rápidamente mediante la integración de los picos de fusión. Un proceso de un día de duración se reduce a menos de una hora.

A partir de la discusión anterior, se valorará que la monitorización de la fluorescencia durante la amplificación de ADN es una técnica analítica extraordinariamente potente. Cuando se desean la detección y la cuantificación específicas de una secuencia, se pueden utilizar sondas de transferencia de energía de resonancia en lugar de colorantes de ADN específico de doble cadena. La T_m de las sondas de hibridación se desplaza, aproximadamente, 4-8°C si se encuentra presente una base individual que no se empareja correctamente. Si se coloca una sonda de hibridación en un

sitio de mutación, las mutaciones de bases individuales son detectables como un desplazamiento en la temperatura de fusión de la sonda.

5 Ejemplo 21

(Ejemplo Comparativo)

La mutación del factor V de Leiden es un único cambio de base (G a A) que sustituye un resto de glutamina por un resto de arginina en el resto de aminoácido 506 (R506Q). Para más información, véase R.M. Bertina y otros, Mutation in Blood Coagulation Factor V Associated with Resistance to Activated Protein C (Mutación en el Factor V de Coagulación Sanguínea Asociada con la Resistencia a la Proteína C Activada), 369 Nature 64-67 (1994) y J. Voorberg y otros, Association of Idiopathic Venous Thromboembolism with a Single Point-Mutation at Arg506 of Factor V (Asociación de Tromboembolia Venosa Idiopática con una Única Mutación Puntual en Arg506 del Factor V), 343 Lancet 1535-36 (1994), los cuales se incorporan ambos en el presente documento como referencia. Tal como se utiliza en el presente documento, el “locus de la mutación del factor V de Leiden” significa la posición nucleotídica en el gen del factor V en la que una base de guanina en el no modificado se sustituye por una base de adenina en el mutante del factor V de Leiden. La SEQ ID N°: 9 muestra una porción del gen del factor V no modificado y la SEQ ID N°: 10 muestra la porción correspondiente del gen del factor V de Leiden, con el nucleótido relevante en la posición 31 en cada caso. La secuencia de nucleótidos completa del gen del factor V se describe en R.J. Jenny y otros, Complete DNA and Derived Amino Acid Sequence of Human Factor V (Secuencia de ADN y de Aminoácidos Derivada Completa, del Factor V Humano), 84 Proc. Natl Acad. Sci. USA 4846-50 (1987), incorporada en el presente documento como referencia y también pueden obtenerse secuencias en el locus HUMF10 del Banco de Genes (Genbank). El cambio de aminoácidos en la proteína del mutante del factor V hace a este factor de coagulación resistente a la degradación y aumenta la tendencia a la coagulación o trombosis. Como la causa más común de trombofilia hereditaria, esta mutación es la diana de un ensayo de laboratorio habitual realizado en laboratorios de genética molecular.

El método estándar de análisis para la mutación del factor V de Leiden es amplificar el fragmento génico mediante PCR, digerir los productos amplificados resultantes con una endonucleasa de restricción que corta la secuencia no modificada pero no el mutante, y distinguir los productos no modificados digeridos y los mutantes no digeridos mediante electroforesis en gel. R.M. Berlina y otros, anteriormente. Éste es un método bien conocido en la técnica para el análisis de mutaciones definidas. Dicho ensayo habitualmente requiere aproximadamente 4 horas, que incluyen amplificación por PCR (2 horas), digestión enzimática (1 hora) y electroforesis (1 hora). Las etapas posteriores a la amplificación incluyen abrir el tubo de la muestra, añadir la enzima y transferir la muestra digerida al aparato de electroforesis. El procesamiento post-amplificación aumenta el riesgo de contaminación del producto final y el manejo manual requiere cuidado para evitar el etiquetado erróneo de las muestras. Un método que amplifique y analice simultáneamente mutaciones puntuales eliminaría estas preocupaciones.

Un método para la completa amplificación y análisis de la mutación del factor V de Leiden en 30 minutos en el mismo instrumento comprende la amplificación de forma asimétrica de una porción de una muestra de ADN genómico humano que contiene el locus de la mutación, seguida de la obtención y el análisis de una curva de fusión para el ADN amplificado. El ADN genómico se prepara según métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo J. Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio) (2ª ed., 1989), incorporada en el presente documento como referencia. Preferiblemente, la curva de fusión se obtiene mediante la metodología de transferencia de energía de resonancia descrita anteriormente con una sonda de hibridación fluorogénica. Dicho ensayo discrimina fácilmente entre no modificado homocigótico, mutante homocigótico y genotipos heterocigóticos. En una realización preferente, la sonda de oligonucleótidos está marcada en 3' con fluoresceína y diseñada para hibridar en el ADN amplificado cerca de un cebador marcado con Cy5 para transferencia de energía de resonancia. Este método puede aplicarse a cualquier mutación definida.

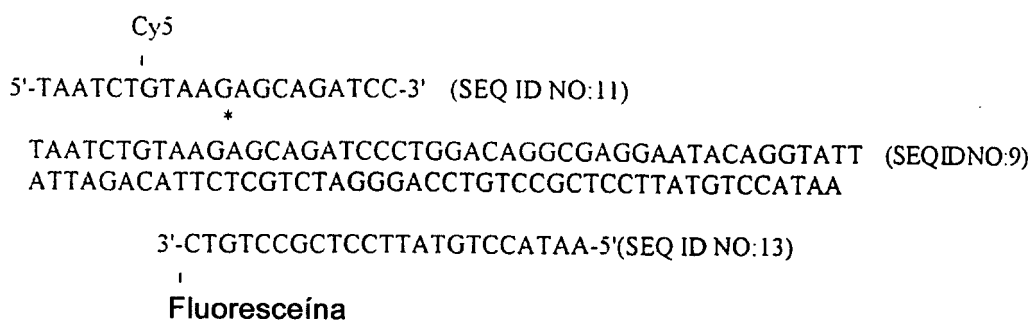
El oligonucleótido de la sonda tiene preferiblemente aproximadamente 15-40 nucleótidos de longitud. La sonda podría contener posiblemente hasta un mínimo de 10 restos de nucleótidos, sin embargo, las posibles desventajas de dichos oligonucleótidos cortos incluyen baja especificidad, baja temperatura de fusión y un mayor fondo. También podrían utilizarse oligonucleótidos de más de 40 restos, pero serían innecesariamente extensos. De este modo, los límites del tamaño del oligonucleótido de la sonda son solamente los impuestos por la funcionalidad. El oligonucleótido de la sonda debe abarcar la mutación, pero la mutación preferiblemente no corresponde al resto de nucleótido 5'- o 3'-terminal de la sonda. Puesto que la presente invención se basa en curvas de fusión y se sabe que la falta de emparejamiento de bases en los extremos tiene un menor efecto sobre las propiedades de fusión que en los sitios internos, la sonda debe diseñarse de modo que la mutación se produzca en una posición interna.

Los cebadores de oligonucleótidos para amplificación del locus de mutación seleccionado tienen preferiblemente aproximadamente de 15 a 30 restos de longitud. Podrían utilizarse cebadores más cortos que el intervalo preferido, pero puede que no sean tan específicos como se desearía. Análogamente, podrían utilizarse cebadores más largos que el intervalo preferido, pero serían innecesariamente caros. De este modo, los límites de los tamaños de los cebadores de la PCR son solamente los impuestos por la funcionalidad.

La distancia entre el par de transferencia de energía de resonancia también es importante para el funcionamiento adecuado de la presente invención. La distancia óptima entre el par de transferencia de energía de resonancia es de

aproximadamente nucleótidos. Se prefiere una distancia de aproximadamente 2 a 8 nucleótidos, aunque una distancia de hasta aproximadamente 10-15 nucleótidos es funcional. Tener el par de transferencia de energía de resonancia en nucleótidos adyacentes no es necesariamente beneficioso puesto que la distancia entre el par de transferencia de energía de resonancia está afectada por la posición de la hélice de ADN.

En este ejemplo, la amplificación por PCR se realizó en mezclas de reacción de 10 μ l que comprenden Tris 50 mM, pH 8,3, MgCl₂ 3 mM, 500 μ g/ml de albúmina de suero bovino, 200 μ M de cada dNTP, 0,5 μ M de cebador marcado con Cy5 (SEQ ID N°: 11), 0,2 μ M de cebador opuesto no marcado (SEQ ID N°: 12), 0,1 μ M de sonda marcada con fluoresceína (SEQ ID N°: 13), 0,4 U de Taq polimerasa y cincuenta ng de ADN genómico humano. Se ensayaron cuatro muestras diferentes de ADN: ADN genómico humano de un individuo homocigótico para la mutación del factor V de Leiden: ADN genómico humano de un individuo heterocigótico, ADN genómico humano de un individuo homocigótico para el alelo del factor V no modificado; y un control negativo sin ADN. La orientación del cebador marcado con Cy5, la sonda marcada con fluoresceína y el sitio de mutación (identificado mediante un asterisco) se muestran a continuación:



La secuencia del cebador opuesto no marcado era TGTTATCACACTGGTGCTAA (SEQ ID N°: 12) y el producto amplificado fue de 186 pares de bases de longitud. El cebador marcado con Cy5 se obtuvo como en el Ejemplo 8. Las condiciones de ciclado fueron 94°C durante 0 segundos (pendiente = 20), 50°C durante 10 segundos (pendiente = 20) y 72°C durante 0 segundos (pendiente = 1) durante 50 ciclos, seguido de enfriamiento a 45°C y monitorización continua de la fluorescencia a una pendiente de 0,2°C/segundo hasta 94°C para la curva de fusión. Las curvas de fusión de mayor calidad se obtuvieron al final de la amplificación con una velocidad de transición de temperatura lenta (0,2°C/segundo - figura 46), aunque la monitorización durante cada ciclo a 1°C/segundo entre 50°C y 94°C también proporcionaba una clara identificación del genotipo (figura 47). Las curvas de fusión son más fáciles de visualizar representando la derivada negativa de fluorescencia con respecto a temperatura frente a temperatura (-dF/dT frente a T). Dicha representación permite una fácil identificación visual de todos los posibles genotipos a partir de los datos de fluorescencia en bruto.

Cuanto más cerca esté la marca de Cy5 del extremo 3' del cebador, mayor será la señal de transferencia de energía de resonancia. Sin embargo, el extremo 3' debe tener un hidroxilo 3' libre para la extensión de polimerasa y la colocación de la Cy5 demasiado cerca del extremo 3' (en la base 3' o en la penúltima) puede inhibir la unión y la extensión de polimerasa. La sonda de fluoresceína 3' debe hibridar lo más cerca posible del cebador (puede tolerarse un solapamiento secundario de 1-3 bases) y el sitio de la mutación debe estar cerca del centro de la sonda. Una separación de 5 bases entre los fluoróforos hibridados y una mutación en la base 8 de una sonda de 23-meros dio un desplazamiento de la curva de fusión de 8°C entre las secuencias mutante y no modificada (figura 46).

La detección de la mutación mediante fusión de la sonda también puede realizarse con 2 sondas marcadas en lugar de una sonda marca y un cebador marcado. En esta realización, una sonda se marca en 5' con Cy5 y la otra sonda se marca en 3' con fluoresceína. Puesto que estas dos sondas fluorescentes pueden sintetizarse directamente a partir de las amiditas, no se requiere una etapa de síntesis manual como en el sistema de cebador/sonda. La sonda marcada con fluoresceína debe diseñarse de modo que el locus de la mutación esté cerca del centro de la sonda marcada con fluoresceína. La longitud de la sonda marcada con Cy5 debe diseñarse de modo que se funda a una temperatura más alta (> 5°C) que la sonda marcada con fluoresceína que abarca el locus de la mutación. Puesto que fondo de la fluoresceína es más problemático que el de Cy5, la concentración de la sonda marcada con Cy5 debe ser preferiblemente 2-5 veces la de la sonda marcada con fluoresceína. Las dos sondas deben hibridar con la misma cadena de ADN genómico y el par de transferencia de energía de resonancia debe estar separado por aproximadamente de 0 a 5 restos de nucleótidos. Como alternativa, la sonda que abarca el sitio de la mutación puede marcarse con Cy5 y la otra sonda marcarse con fluoresceína.

Se valorará que las sondas y cebadores particulares que se dan a conocer en el presente documento para la detección de la mutación del factor V de Leiden son meramente ilustrativas, y que un experto en la materia será capaz de diseñar otras sondas y cebadores para la detección de mutaciones sin experimentación indebida siguiendo los principios y directrices que se dan a conocer en el presente documento. También se debe reconocer que aunque la invención se describe con respecto a la detección de una mutación de una única base en el ADN genómico, los mismos principios

pueden aplicarse a la detección de una mutación en ADNc. La preparación del ADNc requiere etapas del proceso y tiempo extra, así como un buen conocimiento de la técnica, por lo tanto se prefiere utilizar ADN genómico debido a las ventajas de velocidad y menor coste. Además, puede utilizarse la misma técnica para detectar inserciones y deleciones diseñando la sonda de hibridación de modo que su temperatura de fusión cambie cuando la mutación o polimorfismo esté presente. La presente invención puede utilizarse para detectar cualquier mutación conocida donde puede diseñarse una sonda para que difiera en temperatura de fusión cuando hibrida con mutante frente a no modificado.

Aunque se utilizaron fluoresceína y Cy5 como marcas de transferencia de energía de resonancia en el ejemplo anterior, otros aceptores, tales como Cy5.5, también pueden utilizarse con fluoresceína.

10

Ejemplo 22

(Ejemplo Comparativo)

15

El locus del factor V del Ejemplo 21 se amplificó como anteriormente excepto que el cebador se marcó con Cy5.5 en lugar de Cy5. La emisión de Cy5.5 se observó a través de un cristal dicróico de paso único a 683 nm y un filtro de interferencias de paso de banda a 683-703 nm. La proporción de Cy5.5 con respecto a fluoresceína aumentaba por encima del fondo en aproximadamente el ciclo 30 y la proporción se doblaba aproximadamente a los 50 ciclos de amplificación asimétrica. Cuando se amplificaba con ADN no modificado, la T_m de la sonda era de 65-66°C según se juzga mediante los picos de fusión.

20

A continuación se proporcionará otro ejemplo para detectar mutaciones de una única base.

25

Ejemplo 23

(Ejemplo Comparativo)

Hay una mutación puntual habitual en el gen de metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) ($C_{677}T$) que convierte un resto de alanina en uno de valina y da como resultado una enzima termolábil. Esta mutación puede reducir la actividad de MTHFR y conducir a niveles de homocisteína en plasma elevados, que se han implicado como un factor de riesgo independiente para enfermedad vascular temprana y trombosis, como se conoce bien en la técnica. Uno de los cebadores se marcó con Cy5 (TGAAGGAGAAGGTGTCT*GCGGGA) (SEQ ID N°: 25) donde T* representa un resto T modificado unido a Cy5 (véase el Ejemplo 9 para la síntesis y purificación). La secuencia de la sonda era fluoresceína-CCTCGGCTAAATAGTAGTGCCTCGA (SEQ ID N°: 26) y el otro cebador era AGGACGGTGCGG TGAGAGTG (SEQ ID N°: 27). Un fragmento de 198 pares de bases del gen de MTHFR se amplificó a partir de 50 ng de ADN genómico humano en Tris 50 mM, pH 8, 3, $MgCl_2$ 2 mM, 500 $\mu g/ml$ de albúmina de suero bovino, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 μM del cebador marcado con Cy5, 0,1 μM del cebador opuesto, 0,1 μM de la sonda marcada con fluoresceína y 0,4 U de Taq ADN polimerasa por 10 μl . Cada ciclo era de 30 segundos de duración y consistía en desnaturalización a 94°C seguida de una etapa de 20 segundos de fijación/extensión combinadas a 60°C. La velocidad de transición de temperatura entre las etapas era de 20°C/segundo. Después de 60 ciclos, se adquirió una curva de fusión de la siguiente manera: calentamiento de 50-65°C a 0,5°C/segundo, 65-75°C a 0,1°C/segundo y 75-94°C a 0,5°C/segundo. Después de la resta de la línea de base y la conversión a picos de fusión, todos los genotipos posibles se distinguían fácilmente (figura 48).

45

La potencia discriminatoria de las sondas de hibridación también se utiliza para una gran ventaja en PCR multiplex o competitiva. Por ejemplo, se diseña una plantilla artificial con un cambio de una única base interna y se diseña una sonda de hibridación para cubrir el cambio de base como en los Ejemplos 21 y 23. La amplificación relativa del competidor y la plantilla natural se determinan adquiriendo e integrando picos de fusión como en el Ejemplo 16. Como alternativa, si se utilizan múltiples sondas de detección que se separan por fusión secuencialmente de diferentes dianas a diferentes temperaturas, se consigue una cuantificación relativa mediante el mismo análisis. En general, cualquier técnica cuantitativa descrita anteriormente para colorantes de ADN específicos de cadena doble puede hacerse específica de secuencia con sondas de hibridación.

55

Concentración absoluta del producto mediante la cinética de la refijación del producto. Las determinaciones de la concentración de producto se llevan a cabo también de forma ventajosa utilizando la presente invención. La monitorización continua de la formación de ADN de doble cadena permite la cuantificación del ADN en cualquier ciclo de la amplificación mediante la cinética de la refijación. La temperatura de la muestra se disminuye rápidamente desde la temperatura de desnaturalización y se mantiene constante a una temperatura inferior que aún es suficientemente elevada para evitar la fijación del cebador (figura 2). La velocidad de refijación del producto sigue una cinética de segundo orden (véase B. Young y M. Anderson, "Quantitative analysis of solution hybridization" ("Análisis cuantitativo de la hibridación de la solución"), En: "Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach" ("Hibridación de ácidos nucleicos: una aproximación práctica") 47-71 (B. Hames y S. Higgins, eds. (1985)), que se incorpora ahora en el presente documento como referencia. Para cualquier temperatura y producto de la PCR dados, se puede medir una constante de velocidad de segundo orden. Una vez se conoce la constante de velocidad, se puede determinar cualquier concentración de ADN desconocida a partir de los datos experimentales de refijación. El enfriamiento nunca es instantáneo, y parte de la refijación puede tener lugar antes de que se alcance una temperatura constante. Un enfriamiento rápido

65

maximizará la cantidad de datos disponibles para la determinación de la constante de velocidad y la concentración de ADN. La técnica requiere el producto de la PCR puro, pero eso se puede asegurar mediante las curvas de fusión obtenidas también durante el ciclado de temperaturas que utiliza la presente invención.

- 5 Este método de cuantificación de la presente invención es, de forma ventajosa, independiente de cualquier variación de la intensidad de la señal entre las muestras.

Ejemplo 24

10

Se amplificó un fragmento de 536 pares de bases del gen de la beta-globina del ADN genómico humano (Ejemplo 7) y se purificó (véase el Ejemplo 2). Se mezclaron diferentes cantidades del ADN purificado con una dilución 1:30.000 de SYBR™ Green I en 5 μ l de Tris 50 mM, pH 8,3 y MgCl₂ 3 mM. Las muestras se desnaturalizaron a 94°C y, a continuación, se enfriaron rápidamente hasta 85°C. Se monitorizó con el tiempo la fluorescencia a 520-500 nm a 15 85°C. Cuando se probaron diferentes concentraciones de ADN, la forma de la curva de refijación era característica de la concentración de ADN (véase la figura 49). Para cualquier temperatura y producto de la PCR dados, se puede determinar una constante de velocidad de segundo orden. La figura 50 muestra la determinación de una constante de velocidad de la refijación de segundo orden para 100 ng del fragmento de 536 pares de bases en 5 μ l a 85°C. La curva se ajustó mediante una regresión mínimo-cuadrática no lineal con $F_{\max}$, $F_{\min}$, t_0 y k como parámetros de flotación 20 utilizando la ecuación de velocidad de segundo orden mostrada en la figura 50. Los programas de análisis para este tipo de ajuste de curvas son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, el usuario definió el ajuste de la curva de Delta Graph, DeltaPoint, Inc, Monteray, CA). Una vez se conoce la constante de velocidad, se puede determinar cualquier concentración de ADN desconocida a partir de los datos experimentales de refijación.

- 25 Con la constante de velocidad (k) definida, se determinan las concentraciones de ADN en las muestras desconocidas. Las curvas de la fluorescencia frente al tiempo de las muestras desconocidas se ajustan mediante una regresión mínimo-cuadrática no lineal, preferiblemente, durante el ciclado de temperatura en tiempo real (por ejemplo, utilizando el método no lineal de Levenberg-Marquardt descrito en el entorno de programación LabView, Nacional Instruments, Austin, TX). Para este ajuste, $F_{\max}$, $F_{\min}$, t_0 , y la [ADN] son los parámetros de flotación y k es constante.

30

Dado que algunos colorantes fluorescentes afectan a la refijación dependiente de alguna manera de la concentración, la suposición de la cinética de segundo orden para la refijación del producto se comprueba mediante la determinación de la constante de velocidad a diferentes concentraciones estándares de ADN. Se define la relación y se incorporan como necesarias las fórmulas alternativas para el ajuste.

35

También se ejemplifica la utilización de velocidades de fijación de la sonda para determinar concentraciones de producto. La velocidad de transferencia de energía de resonancia por fluorescencia se sigue a lo largo del tiempo después de una rápida caída a una temperatura de fijación de la sonda, que es mayor que la temperatura de fijación del cebador (figura 2). Para el caso de amplificación con un cebador marcado y una sonda marcada, la velocidad de fijación (y la generación de fluorescencia) es de segundo orden. Cuando se utilizan dos sondas marcadas, la velocidad de desarrollo de fluorescencia es de tercer orden. Estas dos ordenaciones se muestran en la figura 18. Cuando la concentración de la sonda o las sondas es mucho mayor que la concentración de producto, ecuaciones de pseudo-primer orden y de pseudo-segundo orden son adecuadas para describir las posibilidades. Las ecuaciones de velocidad apropiadas para estas diferentes condiciones se conocen bien en la técnica (véase Young, B. y Anderson, M., anteriormente). Para los fines de la presente invención, es adecuado que la técnica anterior sugiera ecuaciones de velocidad apropiadas que se ensayan experimentalmente y se corrigen si fuera necesario.

Cuando se utilizan velocidades de fijación de la sonda para determinar concentraciones de producto, los posibles efectos interferentes incluyen re-fijación de productos (con desplazamiento de la sonda mediante migración por rama 50 “*branch migration*”) y fijación y extensión del cebador a través de la sonda. Esto último se minimiza cuando las Tms de la sonda son más altas que las Tms del cebador y se selecciona una temperatura de fijación de la sonda para minimizar la fijación del cebador. La figura 13 muestra que, incluso si se produce la extensión, la fluorescencia aumenta con el tiempo durante aproximadamente 20 segundos. Durante este periodo, el incremento de fluorescencia depende de la concentración de producto.

55

Las velocidades de fijación de la sonda se utilizan para determinar la concentración de producto de forma similar al método descrito anteriormente para determinar la concentración del producto mediante la refijación del producto. Las etapas se resumen, tal como se indica a continuación: (1) elección de la ecuación de velocidad adecuada para el sistema, (2) análisis de estándares de ADN conocidos para determinar la constante de velocidad, (3) comprobación de la validez de la ecuación de velocidad comparando las diferentes constantes de velocidad derivadas de las diferentes concentraciones, y (4) utilización de las constantes de velocidad para determinar la concentración de ADN de muestras desconocidas a partir de sus datos de fijación de la sonda.

60

Retroalimentación de la fluorescencia para el control del ciclado de temperaturas. En comparación con el análisis de punto final y ciclo por ciclo, la presente invención también puede monitorizar la fluorescencia a lo largo de cada ciclo de temperaturas. Se puede utilizar la monitorización continua de la fluorescencia para controlar los parámetros del ciclado de temperaturas. La presente invención utiliza la retroalimentación de la fluorescencia para el control en tiempo real y la optimización de la amplificación. Se puede utilizar la monitorización continua de la fluorescencia de

ES 2 326 050 T3

las muestras de la PCR que contienen un colorante de ADN específico de doble cadena o sondas de oligonucleótidos marcados de forma fluorescente, para monitorizar la hibridación y la fusión durante los ciclos de amplificación individual. Esta información se puede utilizar mediante los algoritmos de control de temperatura en los aparatos de ciclado de temperaturas para mejorar y normalizar las condiciones de ciclado térmico. La PCR convencional se realiza programando todos los parámetros del ciclado antes de la amplificación. Con una monitorización continua, la determinación de los requerimientos para el ciclado de temperaturas puede tener lugar durante la amplificación, basándose en la observación continua de la fijación, extensión, y desnaturalización. Entre las ventajas potenciales de la utilización de la información de hibridación para controlar el ciclado de temperaturas se incluyen:

1. Asegurar la desnaturalización completa del producto de la PCR en cada ciclo:

- a. Minimizando la exposición a temperaturas de desnaturalización excesivamente elevadas, evitando así el daño inducido por el calor en los productos de amplificación y la polimerasa. La limitación del tiempo que el producto está expuesto a las temperaturas de desnaturalización es especialmente útil para la amplificación de productos largos.
- b. Incrementando la especificidad de la reacción minimizando la temperatura de desnaturalización. Esto se selecciona frente a productos con una T_m superior a la del producto de amplificación deseado.

2. Maximizar la eficacia de la amplificación asegurando el tiempo adecuado para la fijación del cebador en cada ciclo:

- a. Minimizando la cantidad de tiempo necesario para la amplificación sin permitir más tiempo del necesario para alcanzar una cierta eficacia de fijación del cebador.
- b. Aumentando la especificidad de la reacción minimizando el tiempo en la temperatura de fijación.

3. Maximizar la eficacia de la amplificación asegurando el tiempo adecuado para la extensión del producto en cada ciclo:

- a. Minimizando la cantidad de tiempo necesario para la amplificación sin permitir más tiempo del necesario para completar la extensión del producto.
- b. Aumentando la especificidad de la reacción seleccionando frente a productos más largos que el producto de amplificación deseado. Esto requeriría más tiempo que el asignado para completar la extensión del producto.

4. Iniciar los cambios del ciclado térmico dependientes del nivel de fluorescencia obtenido o de la eficacia actual de la amplificación. Por ejemplo, se pueden minimizar la sobreamplificación y los productos de reacción no específicos finalizando el ciclado térmico cuando la eficacia disminuye hasta un cierto nivel. En otro ejemplo, el ciclado de temperaturas se puede modificar para iniciar gradientes de temperaturas más lentos para la adquisición de curvas de fusión cuando se puede detectar la fluorescencia. Esto ahorra tiempo ya que los gradientes más lentos no son necesarios en los ciclos iniciales. Otros cambios deseables pueden resultar evidentes en la práctica continua de la presente invención.

El control está basado en una estimación de los parámetros de reacción a partir de los datos de fluorescencia. Los datos originales de fluorescencia se adquieren como un cambio de la fluorescencia con el tiempo (velocidades específicas de las temperaturas de desnaturalización, fijación, y extensión), un cambio en la fluorescencia con la temperatura (T_m del producto o la sonda), o un cambio en la extensión de la amplificación (rendimiento y eficacia de la amplificación). Estas velocidades, T_m s y su primera y segunda derivada se utilizan para determinar los parámetros de reacción óptimos que incluyen la temperatura de desnaturalización y el tiempo, la temperatura de fijación del cebador y el tiempo, la temperatura de fijación de la sonda y el tiempo, la temperatura de extensión de la enzima y el tiempo, y el número de ciclos.

Los colorantes de ADN específicos de doble cadena se utilizan para el control de la desnaturalización, el control de la extensión, y para iniciar los cambios de ciclado térmico en un cierto nivel de amplificación o eficacia. Se utilizan colorantes de transferencia de energía de resonancia para el control de la fijación como se describirá después del siguiente ejemplo.

Ejemplo 25

Se modificó un ciclador térmico comercial de monitorización de la fluorescencia (LC24 LightCycler, Idaho Technology Inc., Idaho Falls, Idaho), de manera que no se programa el software con los puntos de entrada temperatura/tiempo, sino que se programa para obtener valores de fluorescencia y, a continuación, utilizar estos valores para el control del ciclador térmico.

ES 2 326 050 T3

Tal como se representa en el Diagrama de Bloques Funcional (figura 51), el Programa Ejecución-Tiempo se comunica a través de interfaces en serie y tablero DAQ con el LightCycler. Esto permite un nivel de acceso elevado a los datos de temperatura o fluorescencia y se puede utilizar por el software del nivel del Tablero para el control de la temperatura. Sin embargo, en la presente realización del instrumento, sólo los datos de temperatura se transforman en forma digital en el nivel de hardware controlador. Los datos de la fluorescencia se envían de forma analógica a través del tablero interfaz de adquisición digital, se analiza mediante el Programa Ejecución-tiempo, y se devuelve al software del nivel del tablero a través de la interfaz en serie.

Control de la fusión del producto

Se adquirió un pico de fusión para el producto de la PCR deseado y se adquirió una fluorescencia de línea de base para la muestra que contiene la mezcla de reacción a la temperatura a la que el producto se fundió completamente.

A continuación, cada ciclo de la reacción utilizó este valor de fluorescencia como un objetivo. La aproximación a la desnaturalización del producto se realizó en dos etapas para superar el lapso de tiempo debido a la necesidad de enviar el valor de fluorescencia a un ordenador remoto para el análisis, y, a continuación, devolver la instrucción de que el valor ha sido alcanzado. Con cada etapa de fusión del producto, la temperatura se incrementó hasta que la fluorescencia alcanzó un valor intermedio, a continuación, se redujo el poder de calefacción, de manera que una velocidad de gradiente de temperatura de, aproximadamente, 3°C/s proporcionó al ordenador el tiempo para analizar la fluorescencia y señalar al ciclador térmico que había tenido lugar la desnaturalización del producto.

La representación temperatura/tiempo resultante (figura 52) muestra un incremento característico en la temperatura de fusión después del ciclo 20 a medida que aumenta la concentración del producto de amplificación. La T_m del producto está en función de la concentración del producto.

Fijación/Extensión del producto

Durante la extensión constante a una temperatura de fijación/extensión combinada, se monitorizó la fluorescencia y esta información se utilizó para asegurar que se había permitido un tiempo adecuado, pero no excesivo, para la extensión del producto. La fluorescencia se monitorizó en intervalos de 10 segundos, si la fluorescencia aumentaba más que una proporción establecida (habitualmente, 1,00-1,05), a continuación, se continuaba la etapa de fijación/extensión. De lo contrario, se iniciaba la siguiente etapa de fusión del producto. El intervalo de 10 segundos se eligió para proporcionar un mínimo de 20 segundos en la temperatura de fijación/extensión.

La representación fluorescencia/tiempo resultante (figura 52) muestra un incremento característico en el tiempo de residencia a la temperatura de fijación/extensión combinada a medida que aumenta la concentración del producto de amplificación. A medida que la concentración del cebador y la polimerasa se hace limitante, se necesita más tiempo para completar la extensión del producto con cada ciclo.

Plateau de amplificación

Al final de cada etapa de fijación/extensión, se adquirió el valor de la fluorescencia y se guardó. Cuando este valor había aumentado hasta 1,2 veces el valor más bajo de la fluorescencia del final del ciclo y, posteriormente, se había parado el incremento por debajo de una proporción establecida por el usuario (habitualmente, 1,00-1,02), se terminó el ciclado térmico. Como alternativa, se inició la etapa de obtención de la curva de fusión introduciendo un segundo gradiente lento de temperaturas de 0,1-0,2°C/s a lo largo de la T_m del producto y monitorizando de forma continua la fluorescencia de la muestra.

La representación fluorescencia/tiempo resultante (figura 52) muestra que después de veinticinco ciclos de amplificación, la proporción del crecimiento de la fluorescencia ciclo por ciclo cayó por debajo de 1,00 y se terminó la reacción.

En una realización de la presente invención, se utiliza la detección del plateau de amplificación para obtener curvas de fusión de elevada resolución para cada muestra en un proceso de muestras múltiples en el ciclo de temperatura óptima para cada muestra. A medida que la muestra alcanza su plateau de amplificación, se obtiene una curva de fusión para esa muestra, a continuación, el ciclado regular de temperaturas se reanuda hasta que otra reacción alcanza su plateau de amplificación.

La presente invención también proporciona la monitorización y el control en tiempo real de la fijación distinta de la extensión. Si uno de los cebadores está marcado en 3' con Cy5, no se puede producir la extensión. Sin embargo, si se mezcla el cebador marcado (1-10%) con cebador no marcado (90-99%), la eficacia de amplificación disminuirá ligeramente, pero la fijación es observable como transferencia de energía por fluorescencia de un colorante específico de cadena doble para Cy5. El cebador con la T_m más baja (según lo determinado mediante la termodinámica del vecino más próximo, como se conoce en la técnica) se marca con Cy5 y se incluye SYBRTM Green I como colorante específico de cadena doble. Como alternativa, la fijación del cebador puede monitorizarse indirectamente con oligonucleótidos complementarios equivalentes. Un oligonucleótido de la misma longitud y T_m que el cebador de fusión más baja, se diseña con ninguna complementariedad con la secuencia amplificada. Este oligonucleótido se marca en 5' con Cy5 y su complemento se marca en 3' con fluoresceína o algún otro par de transferencia de energía de resonancia. La

5 hibridación de estos oligonucleótidos se sigue mediante transferencia de energía de resonancia. La concentración de una sonda se iguala a la concentración del cebador de Tm más baja y la concentración de la otra sonda se hace mucho menor que ésta para obtener cinética de pseudo-primer orden que se aproxima a la cinética de pseudo-primer orden de la fijación del cebador al producto. La eficacia de la fijación se monitoriza y se utiliza para controlar la temperatura y tiempos de fijación mediante uno de estos métodos.

También está dentro del alcance de la presente invención sustituir completamente los valores establecidos de temperatura y tiempo por el control de retroalimentación de la fluorescencia. Por ejemplo, se colocan tres muestras en un ciclador de temperatura por fluorescencia con capacidad de retroalimentación. Las muestras son:

- 10 1. Una muestra que no reacciona que contiene producto amplificado y SYBR™ Green I.
2. Una muestra que no reacciona que contiene cebadores complementarios marcados de forma fluorescente con una Tm igual al cebador con la Tm más baja y concentraciones como se han indicado anteriormente.
- 15 3. La muestra a amplificar y SYBR™ Green I.

20 Con cada ciclo de amplificación, la desnaturalización del producto se asegura monitorizando la muestra 1 a medida que la temperatura aumenta. Se determina una curva de fusión en tiempo real y cuando la muestra se ha desnaturalizado, comienza la transición a la etapa de fijación. La fijación del cebador se monitoriza indirectamente a través de la hibridación de dos cebadores complementarios en la muestra 2. Uno de los cebadores está marcado en 3' con fluoresceína y el otro está marcado en 5' con Cy5 o un colorante similar. La temperatura se rebaja hasta que la muestra 2 muestra hibridación del cebador según se indica mediante un incremento en la proporción de fluorescencia a 25 670 nm/540 nm. Esta proporción aumenta debido a la transferencia de energía de resonancia entre los fluoróforos cuando estos se aproximan por hibridación. El seguimiento de la extensión del producto se realiza monitorizando la fluorescencia de una o más de las muestras actuales como se demostró en el Ejemplo 25.

Resumen. A partir de la discusión anterior, se valorará que la monitorización continua de la fluorescencia durante 30 la amplificación de ADN para monitorizar la hibridación es una técnica analítica extraordinariamente poderosa. Utilizando los métodos descritos en el presente documento y dependiendo del número de copias iniciales de las plantillas presentes, se puede conseguir la identificación y cuantificación del producto en de cinco a veinte minutos después del inicio del ciclo de temperaturas. La presente invención consiguió varias ventajas no disponibles hasta la fecha en la técnica. Por ejemplo, la presente invención proporciona métodos de fluorescencia de un único color para monitorizar la 35 pureza del producto, la cuantificación relativa mediante la PCR multiplex o la PCR competitiva, la cuantificación absoluta del producto mediante la cinética de refijación, y un método mejorado para la cuantificación de la plantilla inicial mediante representaciones de la fluorescencia frente al número de ciclos. La presente invención también proporciona métodos de dos colores específicos de secuencia para la detección de variación de la secuencia, cuantificación relativa mediante la PCR multiplex o la PCR competitiva, cuantificación del producto mediante la cinética de refijación, y un 40 método para la cuantificación de la plantilla inicial mediante representaciones de la fluorescencia frente al número de ciclos.

La siguiente tabla compara colorantes de ADN específicos de doble cadena, sondas de hidrólisis y sondas de hibridación útiles en la monitorización continua de la PCR. La fluorescencia de los colorantes de ADN específicos 45 de doble cadena depende del estado de la cadena del ADN. Las sondas de hidrólisis doblemente marcadas se inhiben mientras la fluorescencia intacta y del donador aumenta cuando la sonda se hidroliza. Las sondas de hibridación dependen del aumento de la transferencia de energía de resonancia cuando la hibridación coloca a 2 fluoróforos más próximos entre sí.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 326 050 T3

Resumen de sondas fluorescentes para la monitorización continua de la PCR

5	Sonda Fluorescente			
	Hibridación	Colorante de Hidrólisis	Hibridación	
		ADN de cadena		
10		doble		
	Mecanismo	Estado de la Inhibición	Transferencia	
		cadena		
15	Síntesis de	Innecesario	Difícil	Sencilla
	la sonda			
	Especificidad	Tm del producto	Secuencia	Secuencia
20	Análisis de	Sí	No	Si
	fusión			
	Análisis	No	Si	Si
25	multicolor			

El tiempo, la temperatura y la fluorescencia se adquieren de 1-10 veces cada segundo y los detalles exactos de la hibridación del producto y/o la sonda se observan durante el ciclado de temperaturas. Con colorantes de ADN específicos de doble cadena, se utiliza la hibridación del producto con respecto a la temperatura para identificar los productos mediante curvas de fusión. Además, la cuantificación relativa del producto se consigue mediante la amplificación multiplex de dos o más productos diferentes que difieren en la Tm. Además, la PCR competitiva se realiza alterando la secuencia interna en los cebadores comunes, de manera que dos o más productos tienen Tms diferentes. La cuantificación absoluta del producto se obtiene enfriando rápidamente el producto desnaturalizado y observando la cinética de refijación. La sensibilidad de la cuantificación de la plantilla inicial con las representaciones de la fluorescencia frente al número de ciclos se incrementa mediante el análisis de las curvas de fusión del producto para controlar la amplificación no específica y los algoritmos de ajuste de las curvas. Finalmente, la retroalimentación inmediata de la fluorescencia para controlar las condiciones de desnaturalización, los tiempos de elongación y el rendimiento del producto se obtienen monitorizando el estado de la cadena del producto con colorantes de ADN específico de doble cadena.

La capacidad de monitorizar la hibridación de la sonda con fluorescencia durante el ciclado de temperatura es una potente herramienta. La presente invención proporciona métodos de fluorescencia de dos colores que dependen de la hibridación de la sonda (no de la hidrólisis) para la detección y cuantificación específica de secuencia durante la PCR. La cinética de fijación y la fusión de sondas de hibridación proporcionan información no disponible con sondas que depende de la hidrólisis de exonucleasa entre fluoróforos. La monitorización continua de la hibridación de la sonda específica de secuencia puede seguirse en los cambios de temperatura mediante transferencia de energía de resonancia. La fusión de la sonda se produce a una temperatura característica determinada por su secuencia y complementaria al producto. Se han detallado dos esquemas mediante la presente invención, (1) dos sondas de hibridación adyacentes y (2) una sonda marcada que hibrida con un producto de la PCR de cadena sencilla que incorpora un cebador marcado. La temperatura de fusión de las sondas específicas de secuencia identifica y discrimina productos durante la PCR. Los polimorfismos y mutaciones de ADN, incluyendo mutaciones de base única, se detectan mediante desplazamientos en la Tm de la sonda. Además, la cuantificación relativa del producto se consigue mediante amplificación multiplex de, cómo mínimo, dos productos diferentes con una o más sondas que se funden de sus productos respectivos a diferentes temperaturas. Además, la PCR competitiva se realiza alterando la secuencia interna a los cebadores de modo que una o más sondas hibridan con el competidor y la plantilla natural a diferentes Tm. Como alternativa, se realiza PCR relativa o competitiva mediante análisis multicolor con sondas marcadas con diferentes fluoróforos, tales como Cy5 y Cy5.5. La concentración absoluta de producto se determina mediante análisis de la cinética de fijación de la sonda. El número de copias de la plantilla inicial se determina a partir de representaciones de fluorescencia frente al número de ciclo mediante algoritmos de ajuste de curva.

Cuando se desea el análisis multiplex en una reacción PCR, es una práctica común utilizar diferentes marcadores fluorescentes con un espectro de emisión distinguible para identificar los múltiples productos. El análisis es complicado por el número limitado de fluoróforos disponibles y el solapamiento de los espectros de emisión de estos fluoróforos que están disponibles (ver HM Shapiro, véase anteriormente). El análisis de la hibridación de la sonda o el producto con las curvas de fusión es otro método para distinguir múltiples productos de la PCR. Siguiendo la hibridación durante el ciclado de temperaturas, se puede minimizar el número de sondas y/o colores espectrales necesarios para distinguir los múltiples productos. La presente invención puede realizarse en otras formas específicas sin alejarse de su espíritu o

ES 2 326 050 T3

características esenciales. Las realizaciones descritas deben considerarse en todos los aspectos únicamente ilustrativas y no restrictivas. El alcance de la invención se indica, por lo tanto, mediante las reivindicaciones adjuntas en lugar de mediante la anterior descripción. Todos los cambios que entren dentro del significado e intervalo de equivalencia de las reivindicaciones deben considerarse dentro de su alcance.

5 En las figuras 53-105 se encuentra el código de programación para llevar a cabo la curva de fusión y otros análisis.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para analizar una secuencia de ADN diana de una muestra biológica, comprendiendo dicho método las etapas de:

la amplificación de la secuencia diana por la reacción en cadena de la polimerasa en presencia de una cantidad de una entidad fluorescente que se une al ácido nucleico, comprendiendo dicha reacción en cadena de la polimerasa las etapas de adición a la muestra biológica de una polimerasa termoestable y cebadores para la secuencia de ácidos nucleicos diana y el ciclado térmico de la muestra biológica entre, como mínimo, una temperatura de desnaturalización y una temperatura de elongación;

la excitación de la muestra con una luz a una longitud de onda absorbida por la entidad fluorescente que se une al ácido nucleico;

la monitorización de la fluorescencia dependiente de la temperatura de la entidad fluorescente que se une al ácido nucleico a medida que cambia la temperatura de la muestra;

la adquisición de una curva de fusión del producto amplificado de dicha etapa de monitorización; y

la realización de un análisis de la curva de fusión para el producto amplificado.

2. Método, según la reivindicación 1, en el que dicha entidad fluorescente que se une al ácido nucleico comprende un colorante fluorescente que se une a un ácido nucleico de cadena doble.

3. Método, según la reivindicación 1, en el que la entidad fluorescente que se une al ácido nucleico es SYBRTM Green I.

4. Método, según la reivindicación 2, en el que dicho fluorescente que se une a un ácido nucleico específico de cadena doble es un miembro seleccionado entre el grupo que comprende SYBRTM Green I, bromuro de etidio, Picogreen, naranja de acridina, naranja de tiazol, YO-PRO 1 y cromomicina A3.

5. Método, según la reivindicación 1, en el que la entidad fluorescente que se une al ácido nucleico es SYBRTM Green I, la etapa de excitación incluye la excitación de la muestra biológica con luz a una longitud de onda absorbida por el SYBRTM Green I y la etapa de monitorización incluye la monitorización de la fluorescencia dependiente de la temperatura de SYBRTM Green I.

6. Método, según la reivindicación 5, en el que dicha etapa de monitorización comprende la determinación de un perfil de fusión de la secuencia diana amplificada.

7. Método, según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de

la determinación de una constante de velocidad de segundo orden para la secuencia diana amplificada para determinar la concentración de la secuencia diana amplificada, comprendiendo la etapa de determinación de la constante de velocidad de segundo orden

la elevación la temperatura de una mezcla que comprende una concentración conocida de la secuencia diana amplificada y una cantidad eficaz de un colorante fluorescente específico de cadena doble, por encima de la temperatura de desnaturalización de la secuencia diana amplificada para dar como resultado una secuencia diana amplificada desnaturalizada;

la rápida reducción de la temperatura de la mezcla que comprende la cantidad conocida de secuencia diana amplificada desnaturalizada a una temperatura seleccionada por debajo de la temperatura de desnaturalización de la secuencia diana amplificada, mientras se monitoriza de forma continua la fluorescencia de la mezcla en función del tiempo; y

la representación de la fluorescencia en función del tiempo para determinar la fluorescencia máxima, fluorescencia mínima, el tiempo a la fluorescencia mínima y la constante de velocidad de segundo orden para la concentración conocida de secuencia diana amplificada a partir de la ecuación

$$F = F_{\max} - \frac{F_{\max} - F_{\min}}{k(t - t_0)[ADN] + 1}$$

en la que F es fluorescencia, $F_{\max}$ es fluorescencia máxima, $F_{\min}$ es fluorescencia mínima, k es la constante de velocidad de segundo orden, t_0 es el tiempo a $F_{\min}$ y [ADN] es la concentración conocida de la secuencia diana amplificada.

8. Método, según la reivindicación 1, en el que

la secuencia de ácido nucleico diana es un fragmento seleccionado de una plantilla de ácido nucleico diana,

5 la reacción en cadena de la polimerasa se produce en una mezcla de reacción y la mezcla de reacción comprende además una cantidad desconocida de la plantilla de ácido nucleico diana, un segundo par de cebadores de oligonucleótidos configurados para amplificar un fragmento seleccionado de una plantilla de referencia y una cantidad conocida de la plantilla de referencia, donde la amplificación da como resultado un fragmento amplificado de la plantilla diana y un fragmento amplificado de la plantilla de referencia,

10 la etapa de monitorización incluye la monitorización de la fluorescencia emitida en función de la temperatura para dar como resultado una curva de fusión de los productos amplificados en la que el fragmento amplificado de la plantilla diana y el fragmento amplificado de la plantilla de referencia se funden a diferentes temperaturas;

15 la conversión de las curvas de fusión a picos de fusión y la determinación de cantidades relativas de la plantilla diana y la plantilla de referencia a partir de dichos picos de fusión; y

20 el cálculo de la concentración de la plantilla diana en base a la cantidad conocida de la plantilla de referencia y las cantidades relativas de plantilla diana y plantilla de referencia.

9. Método, según la reivindicación 1, en el que

25 la amplificación se produce en una mezcla de reacción y los cebadores se configuran para amplificar la secuencia de ácido nucleico diana para dar como resultado un producto diana amplificado, comprendiendo además la mezcla de reacción,

una plantilla de control positivo y un segundo par de cebadores de oligonucleótidos configurados para amplificar la plantilla de control positivo para dar como resultado un producto de control amplificado,

30 la etapa de monitorización comprende la monitorización de forma continua de la fluorescencia durante un ciclo de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa para dar como resultado un primer pico de fusión del producto diana amplificado si se amplifica la secuencia de ácido nucleico diana, y un segundo pico de fusión del producto de control amplificado si se amplifica la plantilla de control positivo;

35 donde la obtención del segundo pico de fusión indica que la reacción en cadena de la polimerasa era operativa, la obtención del primer pico de fusión indica que el fragmento diana seleccionado era amplificable, y la ausencia del primer pico de fusión indica que el fragmento diana seleccionado no era amplificable.

40 10. Método, según la reivindicación 3, en el que la etapa de amplificación produce productos amplificados y la fluorescencia dependiente de la temperatura se utiliza para identificar los productos amplificados, en el que los productos amplificados se identifican mediante el análisis de las curvas de fusión.

45 11. Método, según la reivindicación 10, en el que las cantidades relativas de dos o más productos amplificados se determinan mediante el análisis de las curvas de fusión.

12. Método, según la reivindicación 10, en el que las áreas bajo las curvas de fusión se encuentran mediante regresión mínimo-cuadrática no lineal de la suma de gaussianos múltiples.

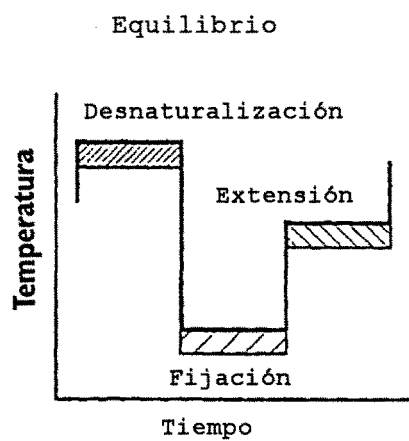


Fig. 1A

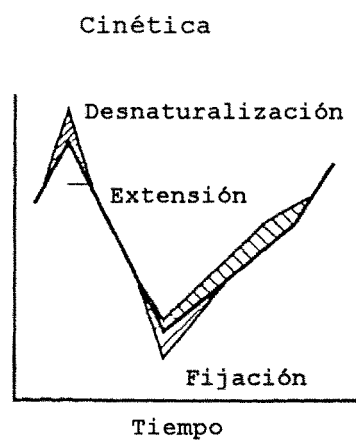


Fig. 1B

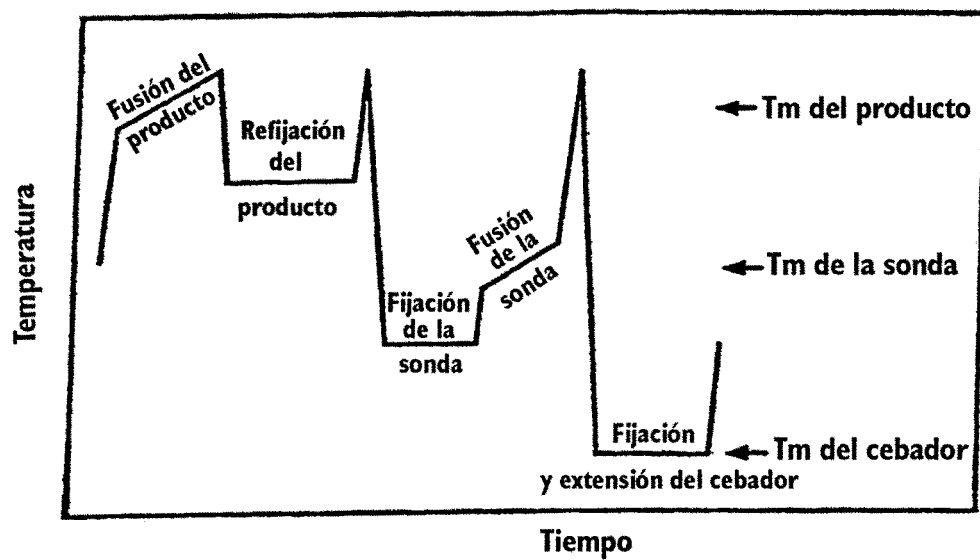


Fig. 2

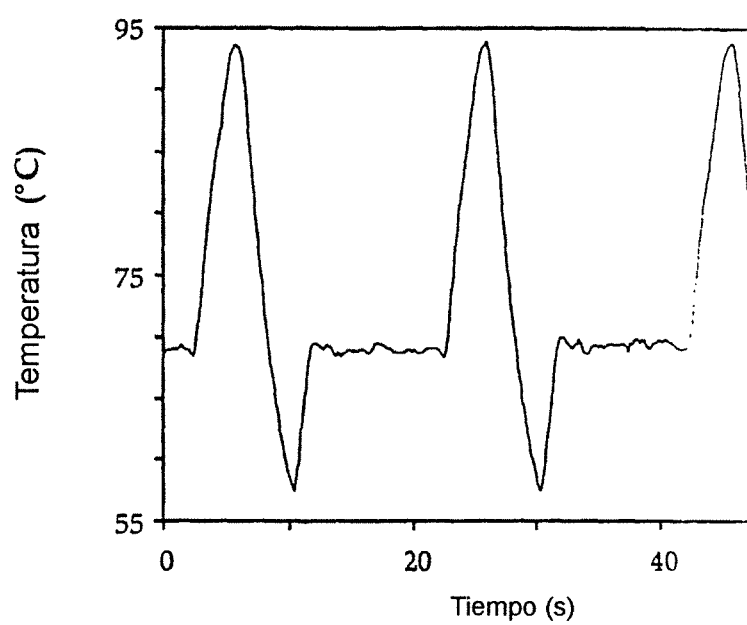


FIG. 3

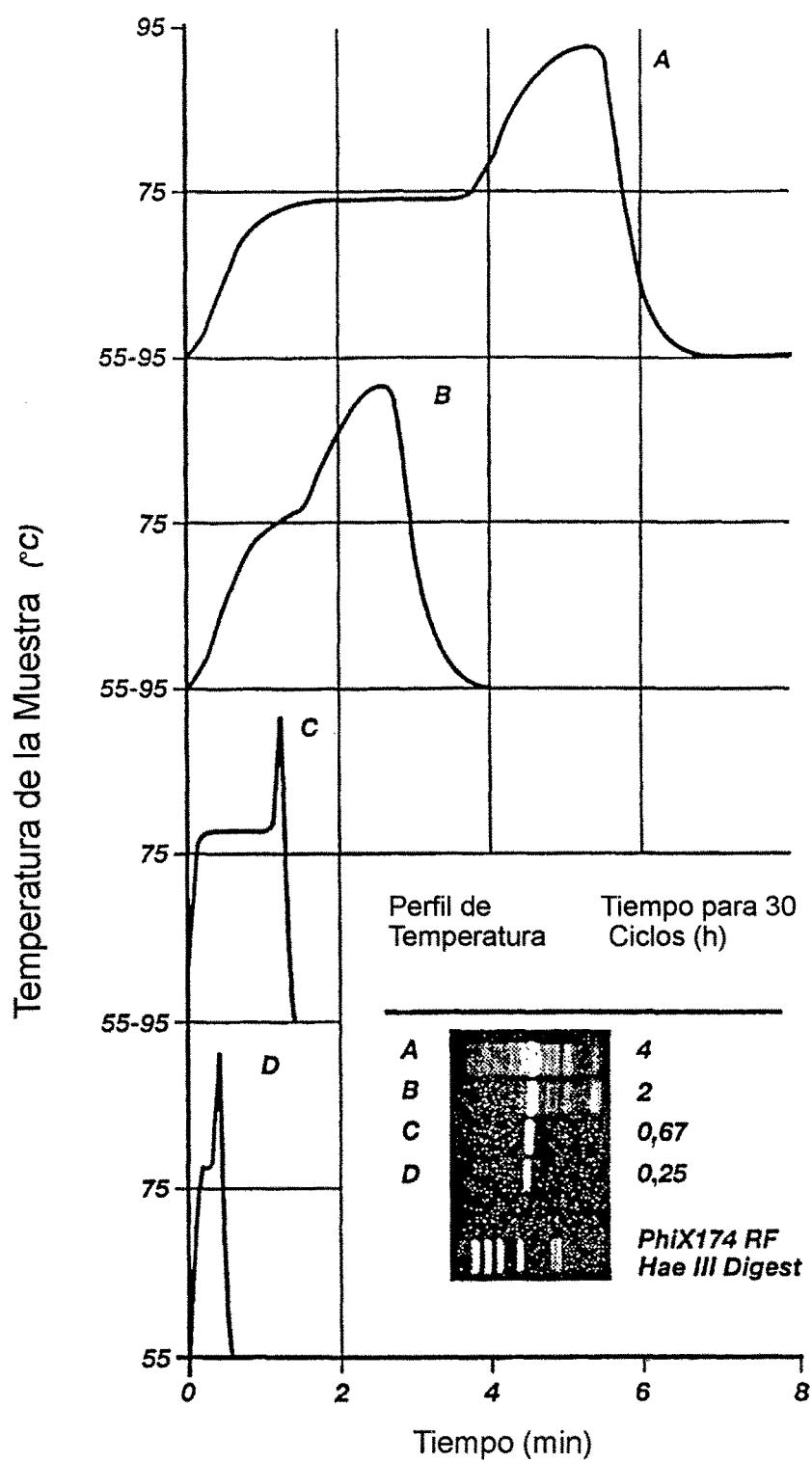


Fig. 4

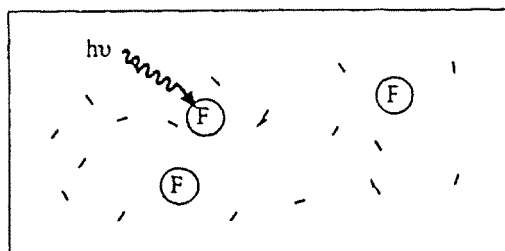


Fig. 5A

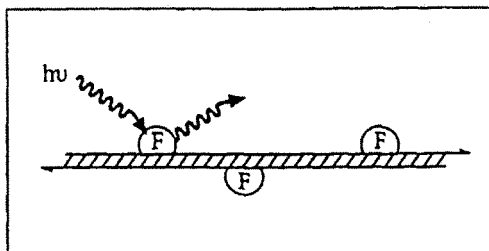


Fig. 5B

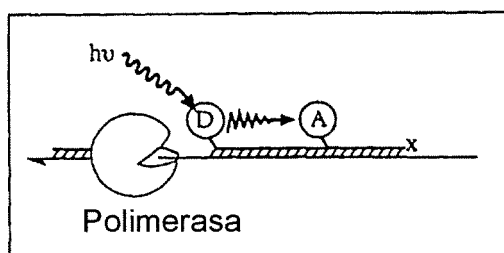


Fig. 5C

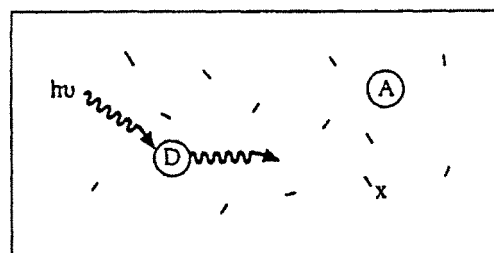


Fig. 5D

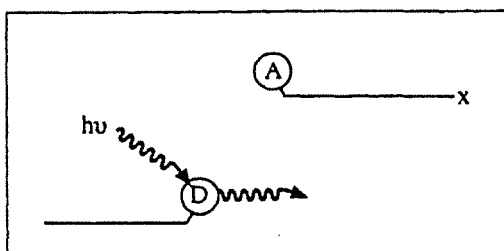


Fig. 5E

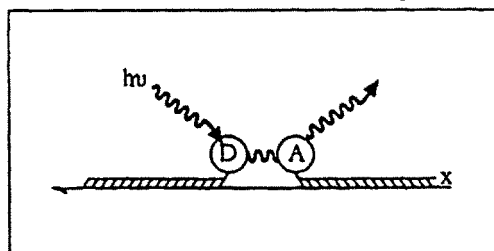


Fig. 5F

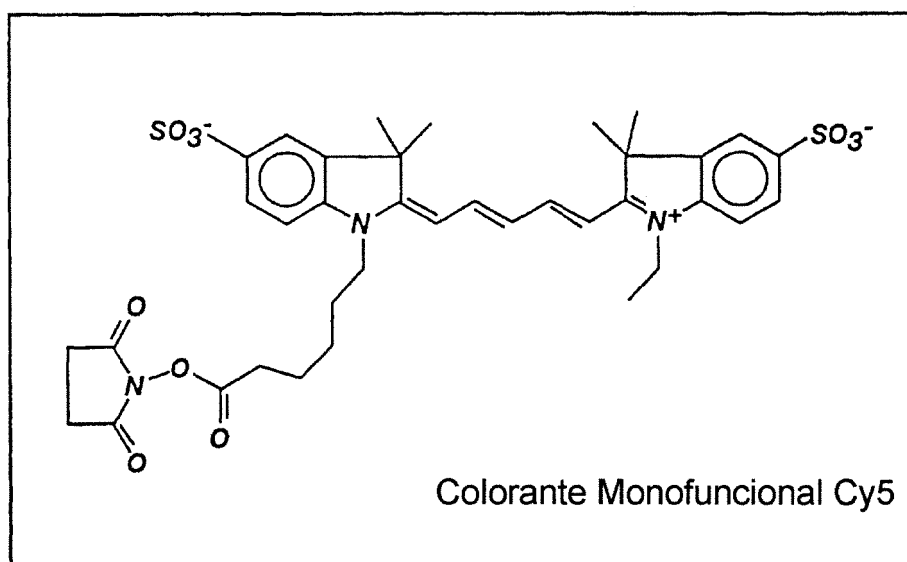


Fig. 6

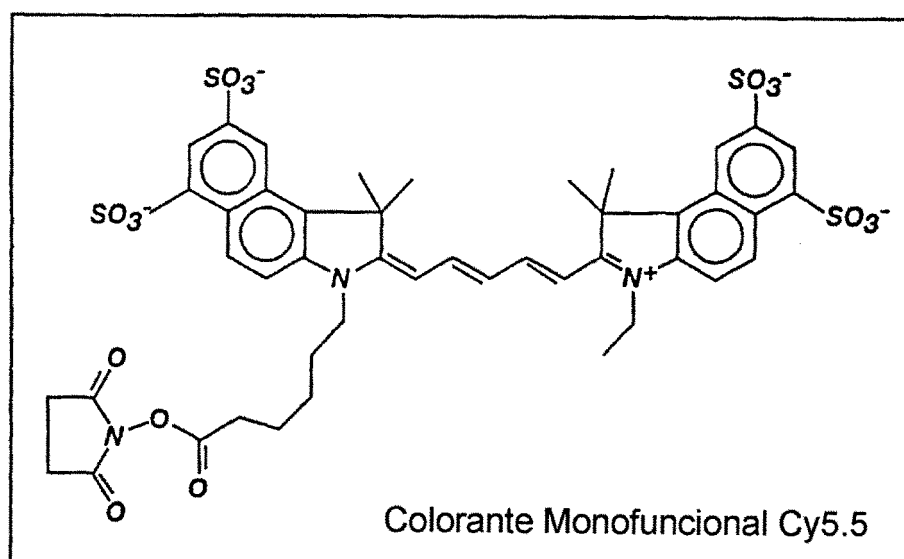


Fig. 7

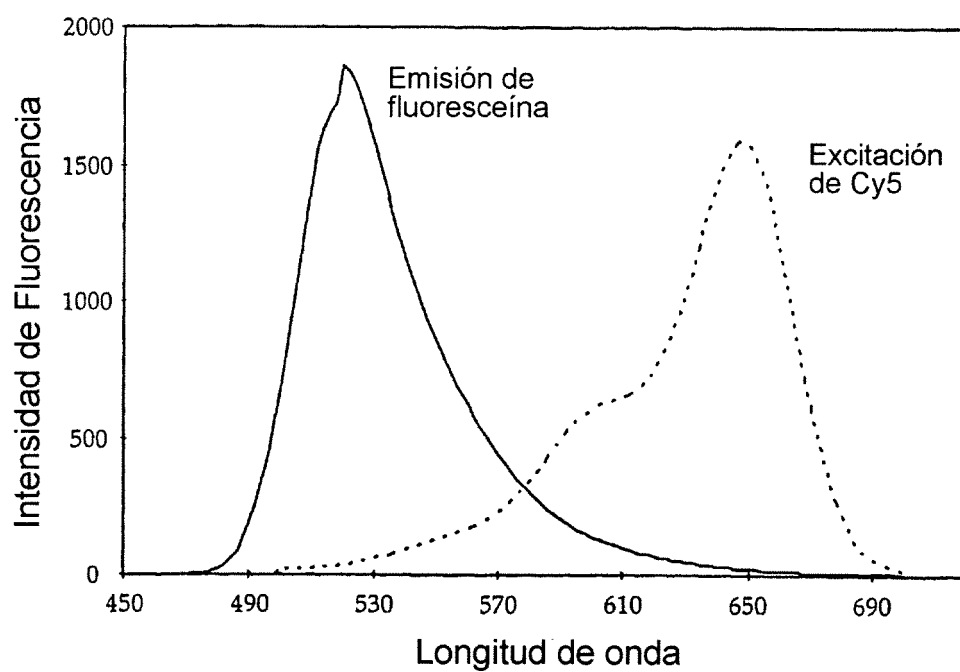


Fig. 8

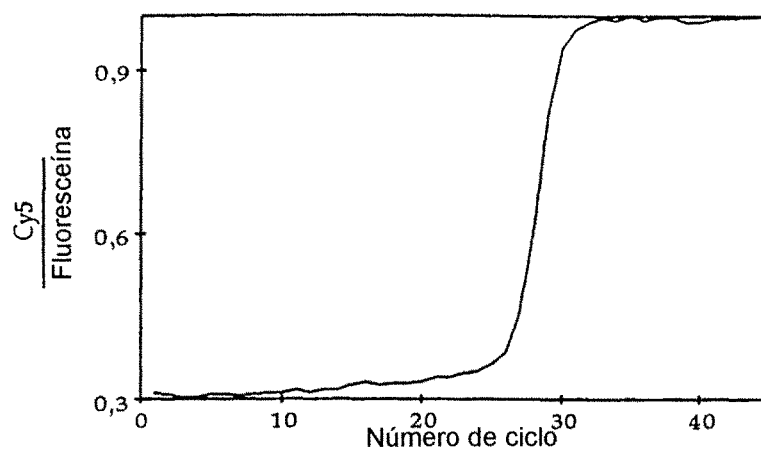


Fig. 9A

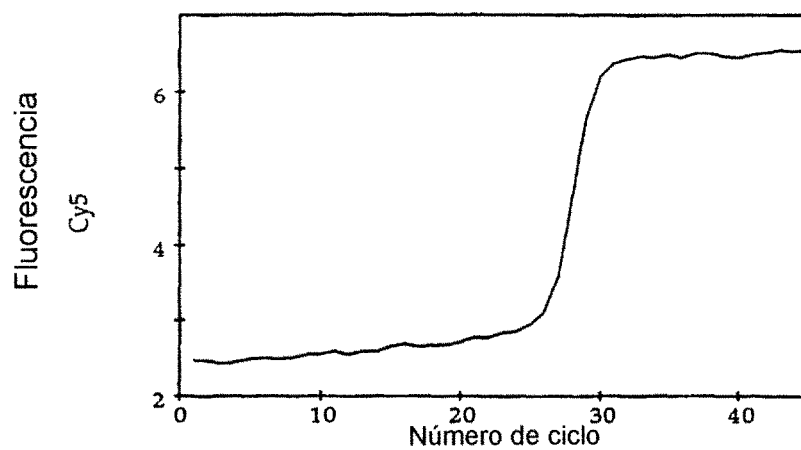


Fig. 9B

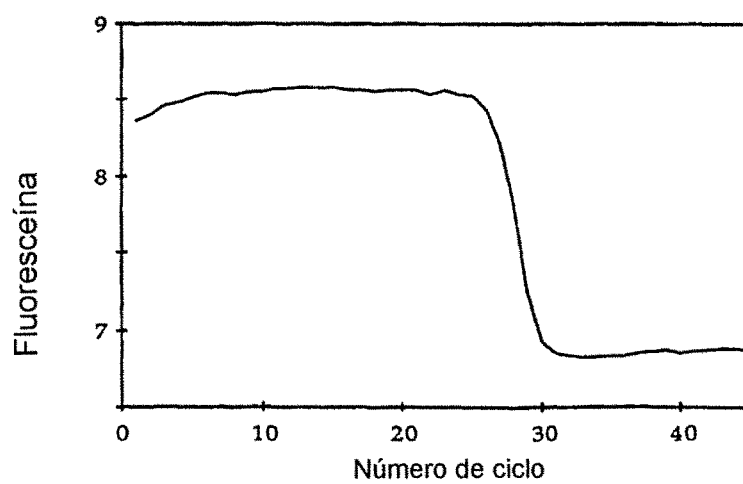


Fig. 9C

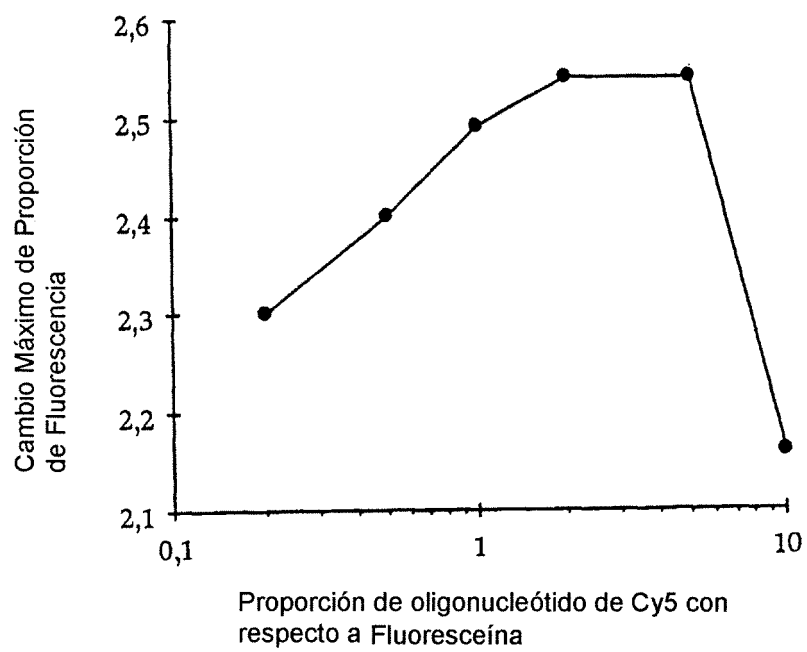


Fig. 10

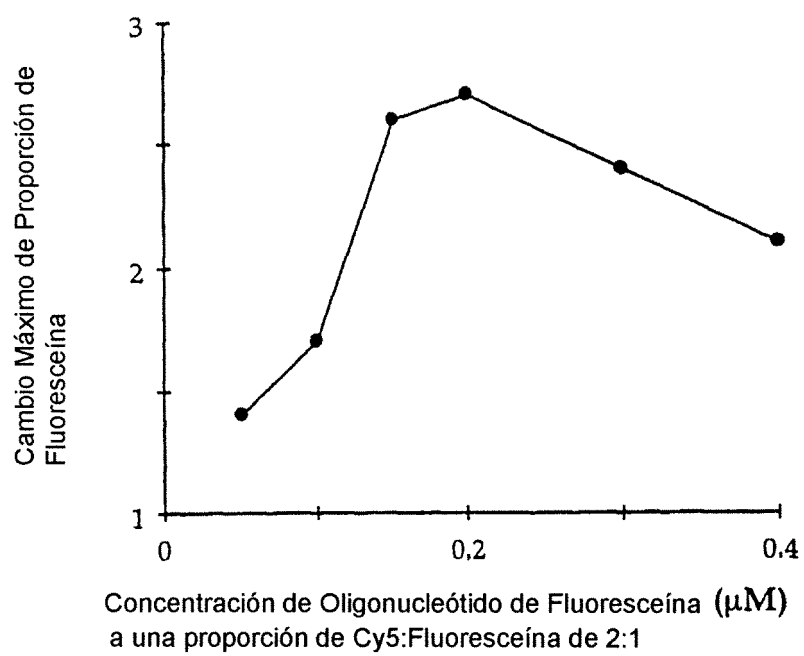


Fig. 11

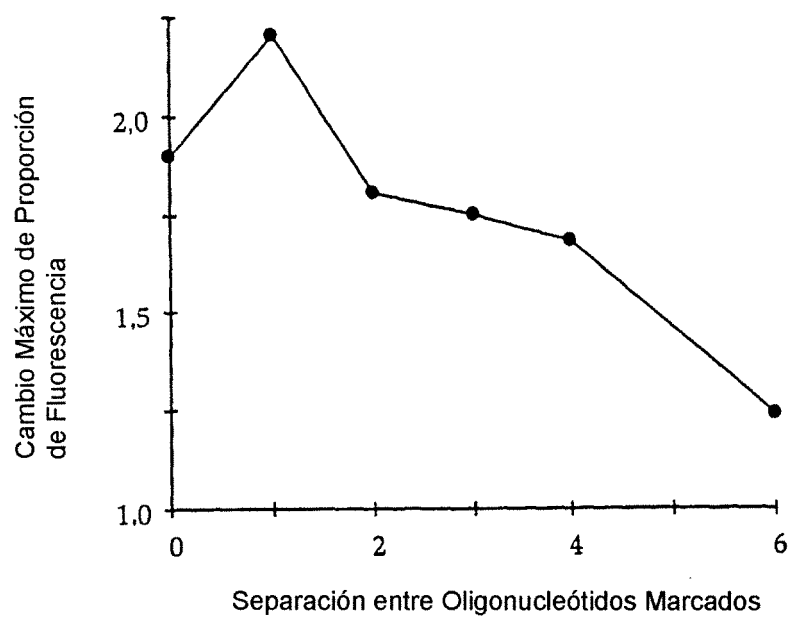


Fig. 12

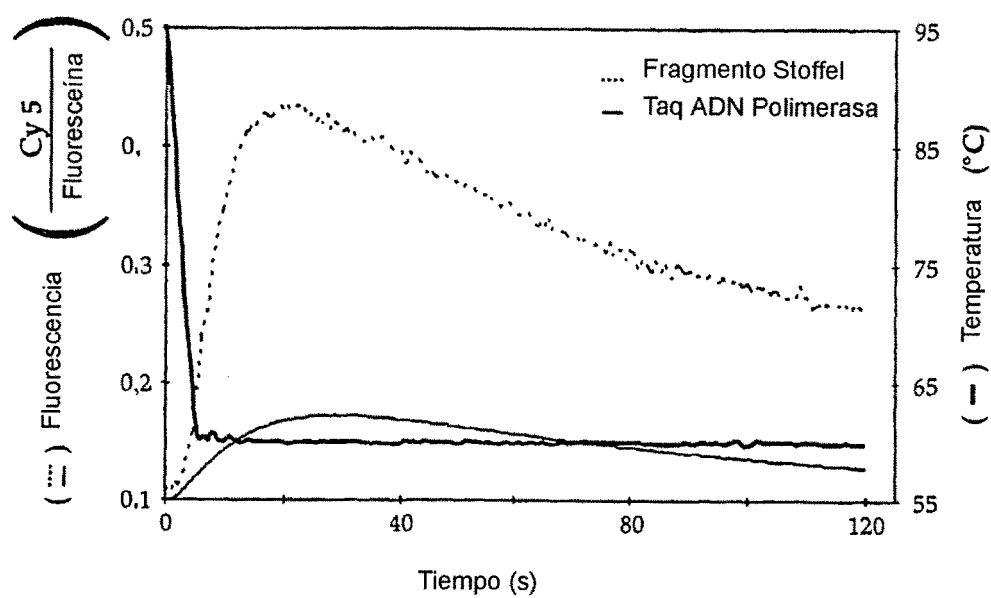


Fig. 13

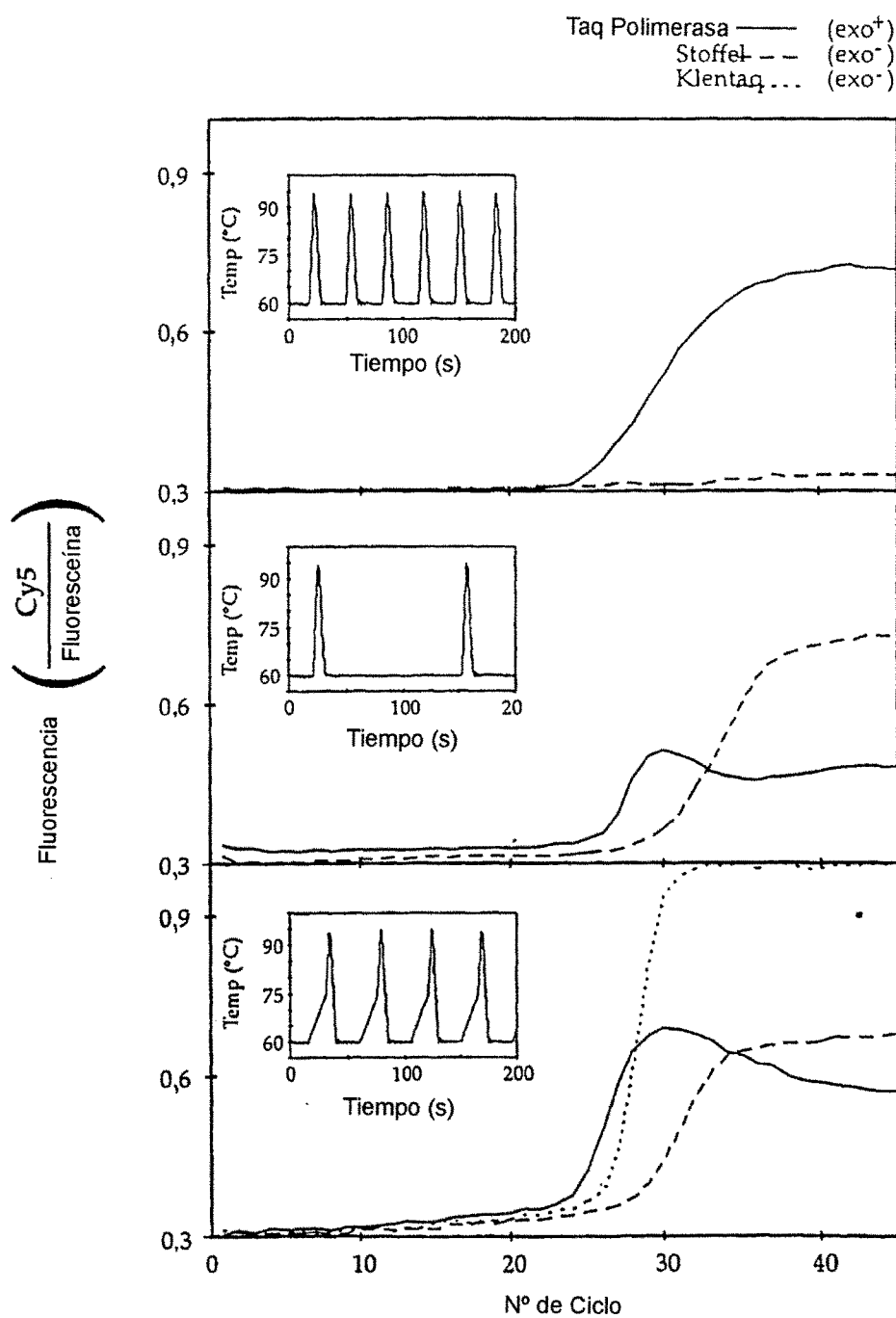


Fig. 14

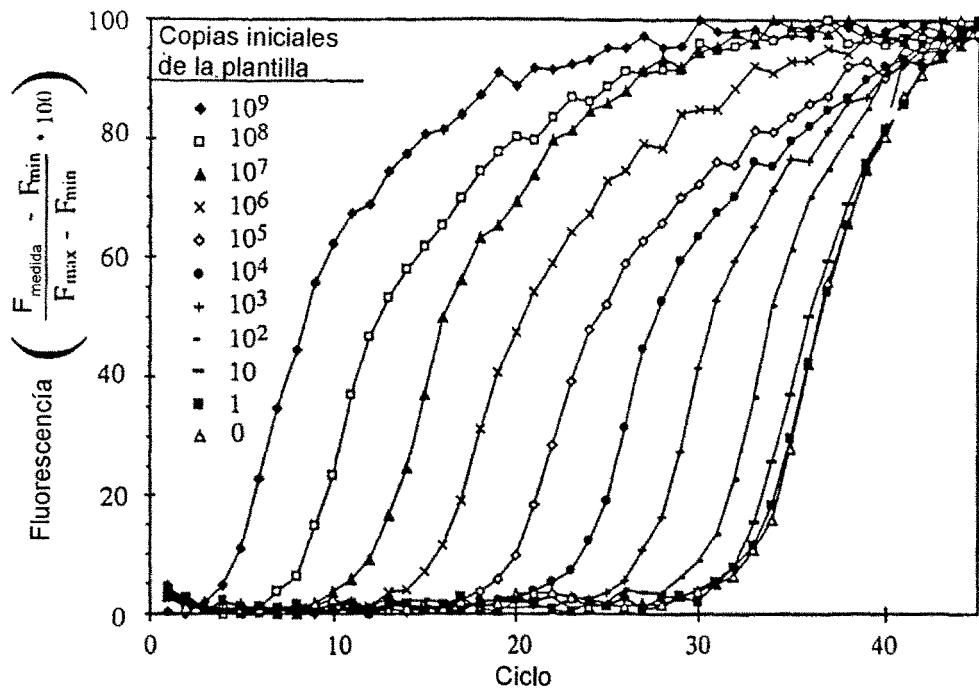


Fig. 15

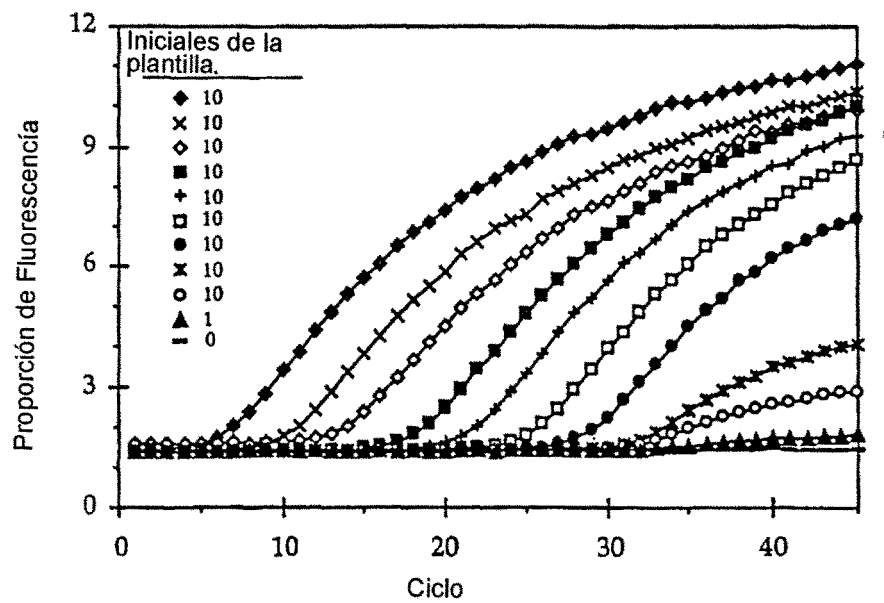


Fig. 16

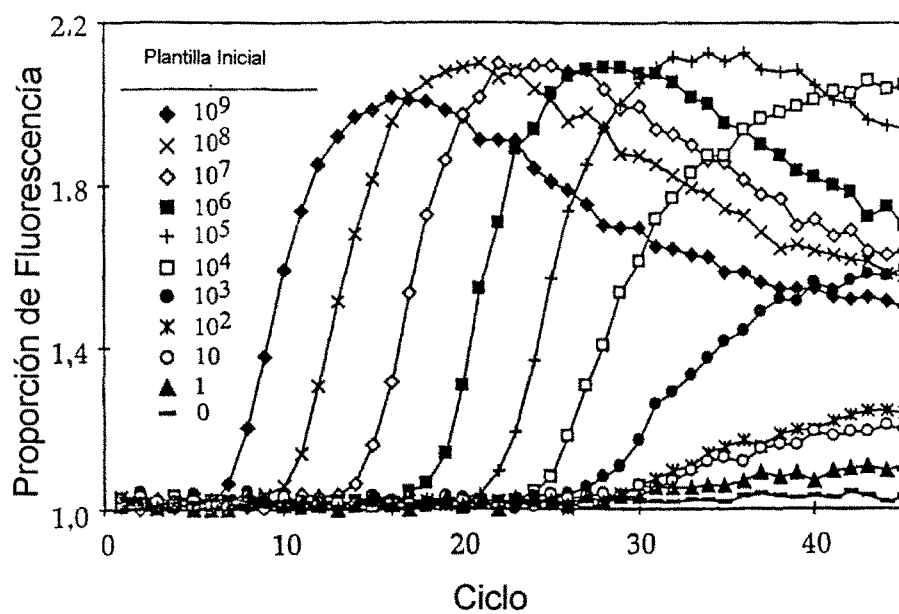


Fig. 17

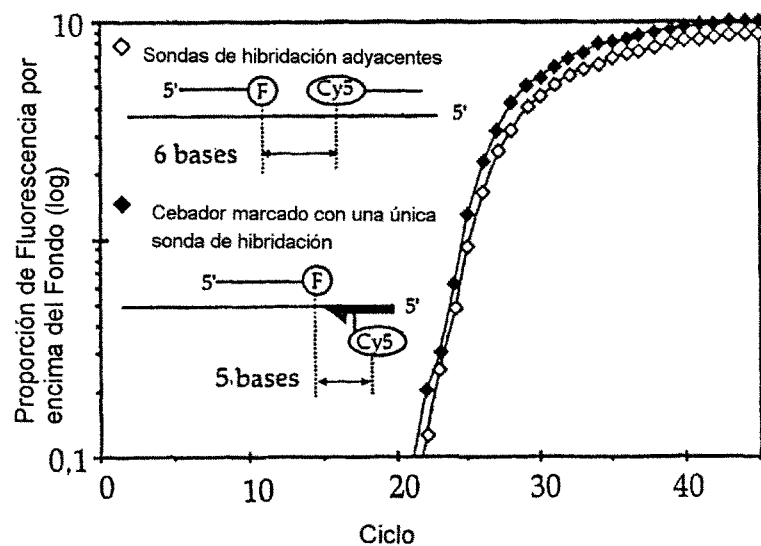


Fig. 18

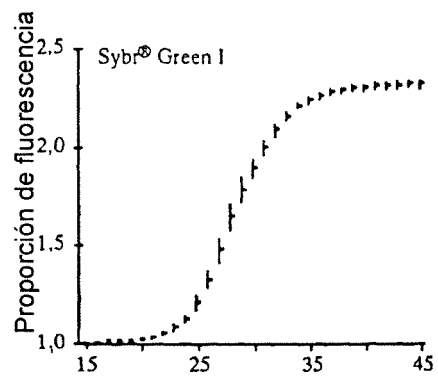


Fig. 19A

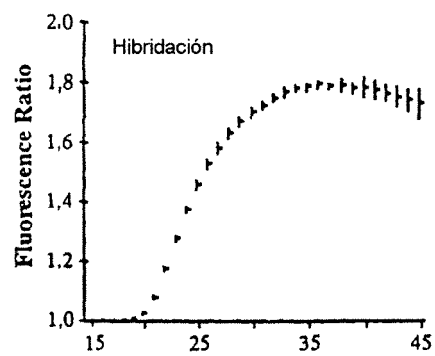


Fig. 19C

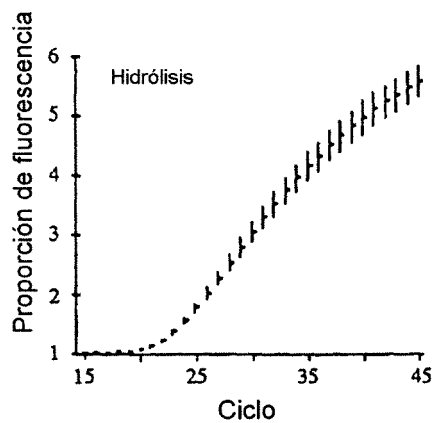


Fig. 19B

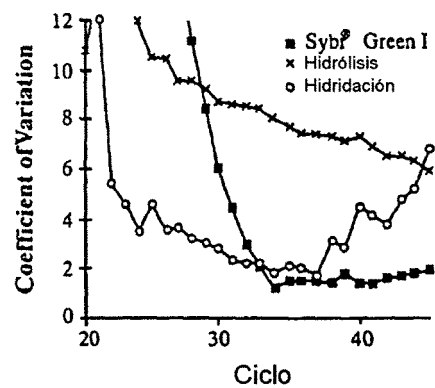


Fig. 19D

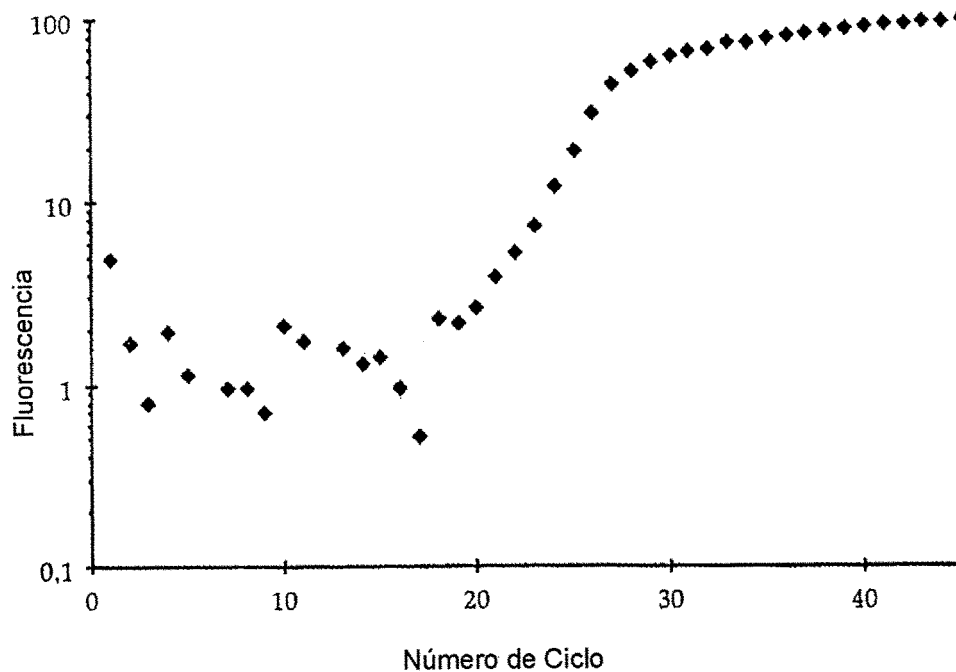


Fig. 20

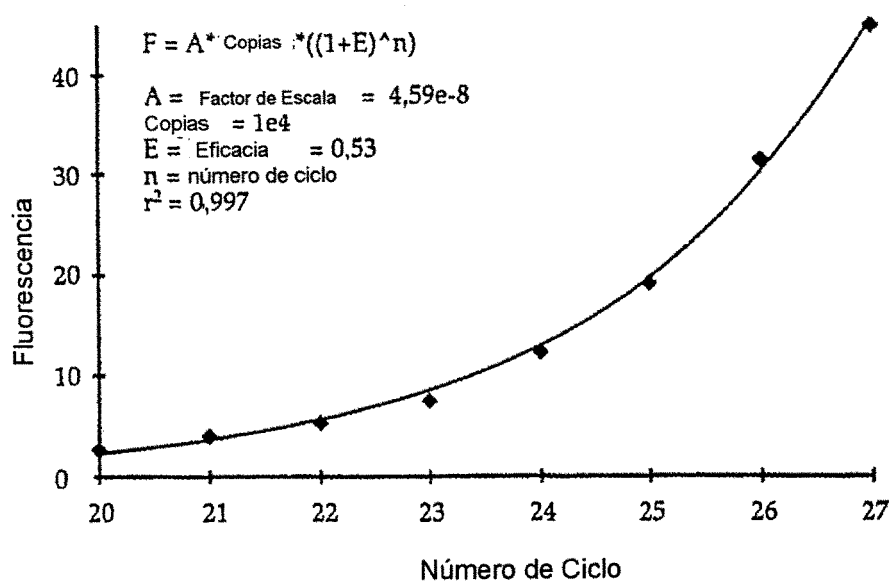


Fig. 21

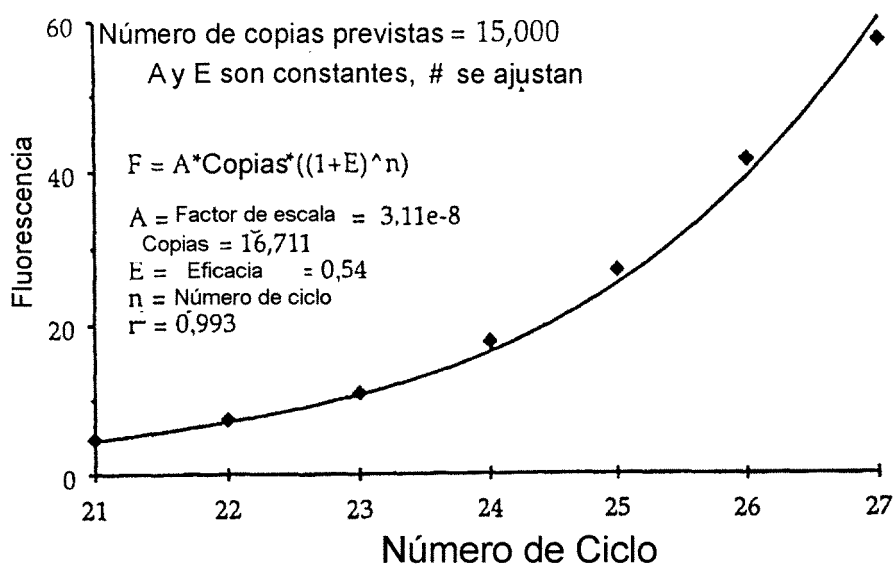


Fig. 22

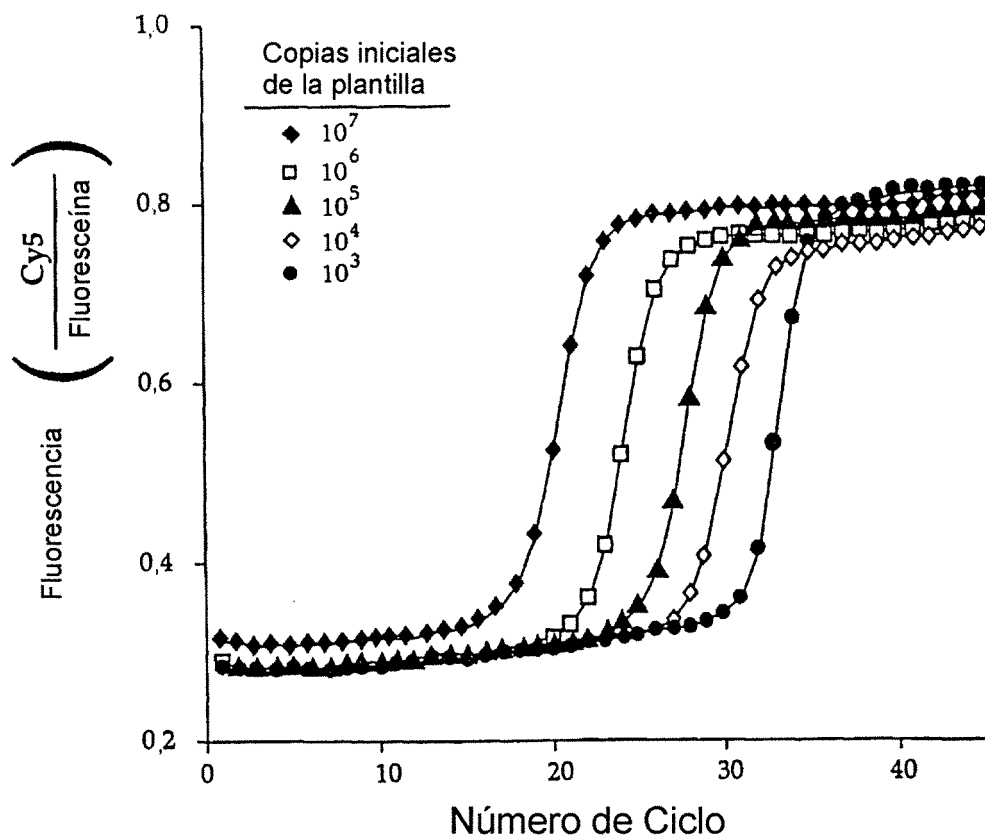


Fig. 23

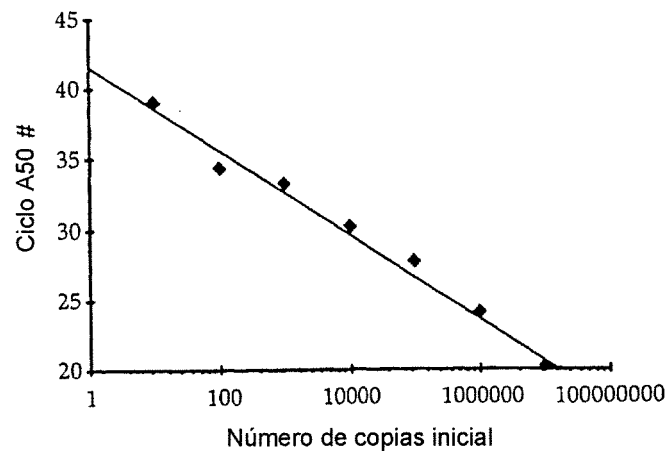


Fig. 24

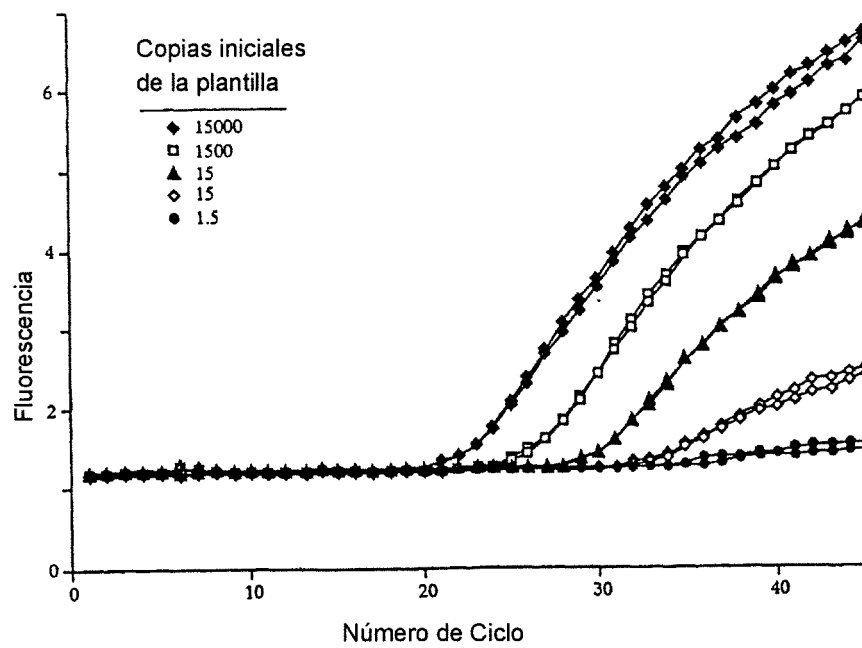


Fig. 25

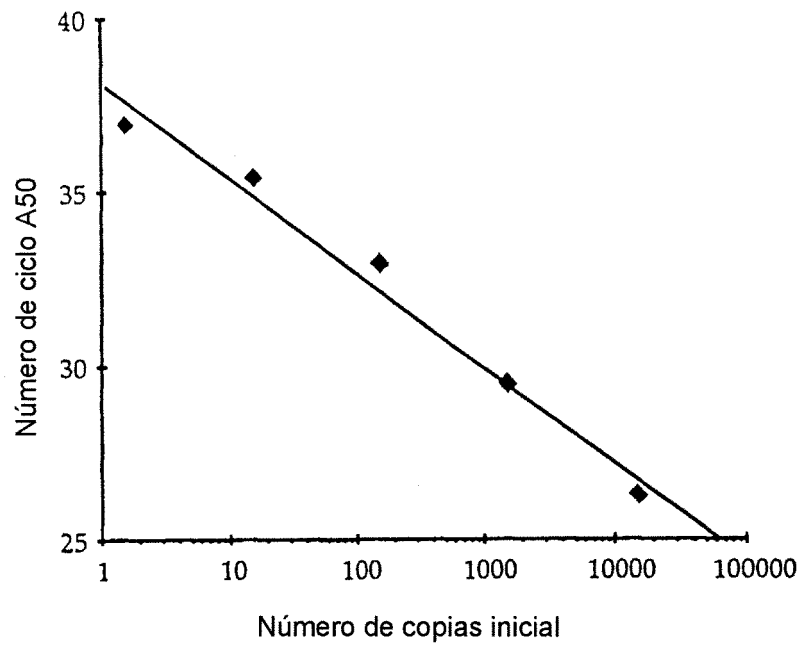


Fig. 26

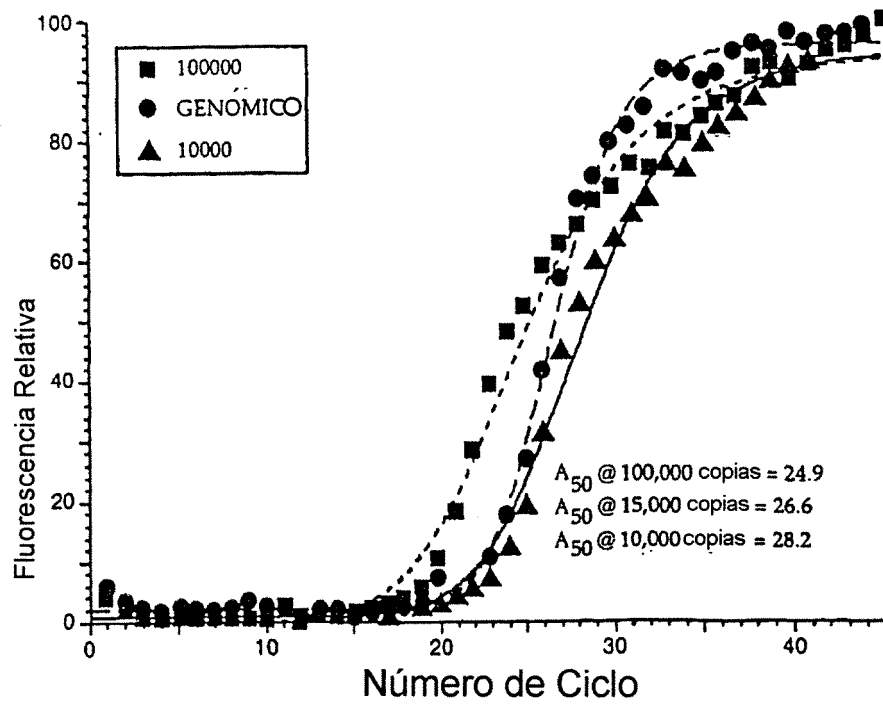


Fig. 27

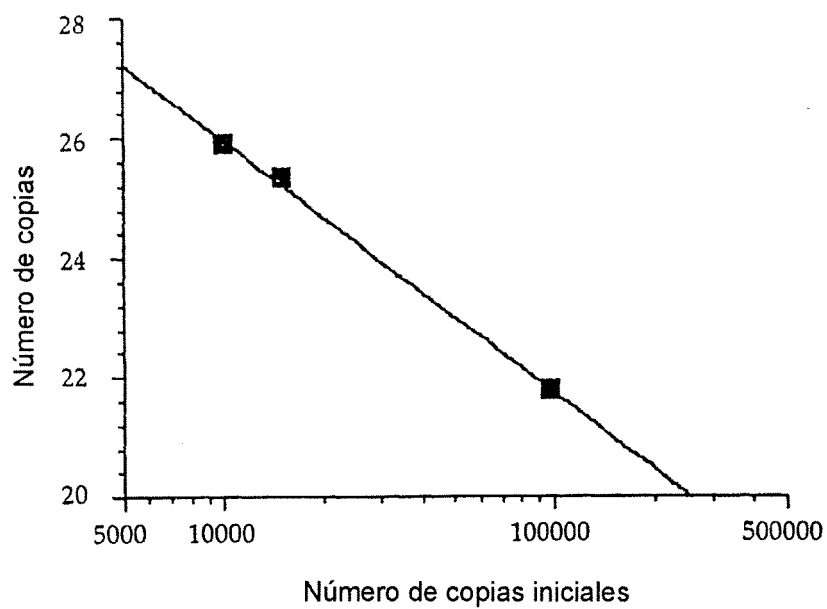


Fig. 28

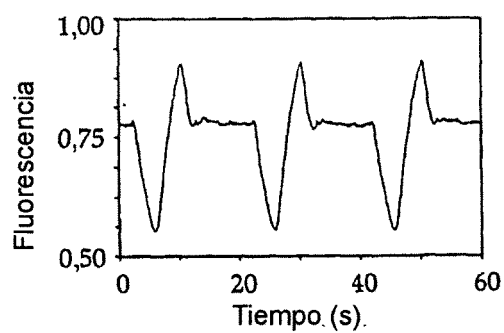


Fig. 29A

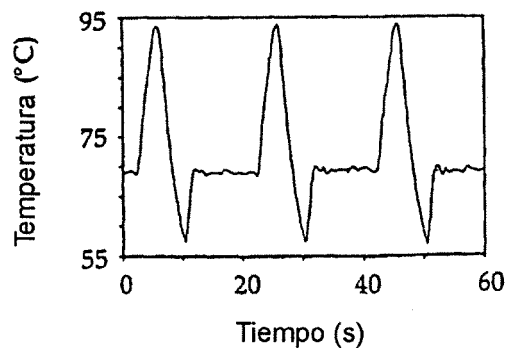


Fig. 29B

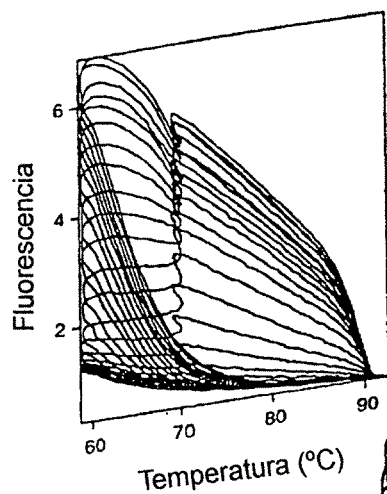


Fig. 30C

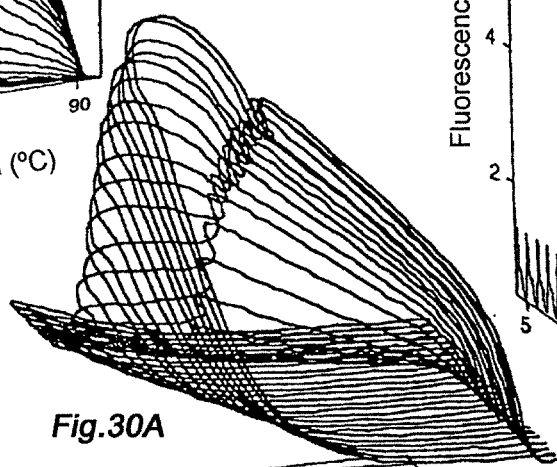


Fig. 30A

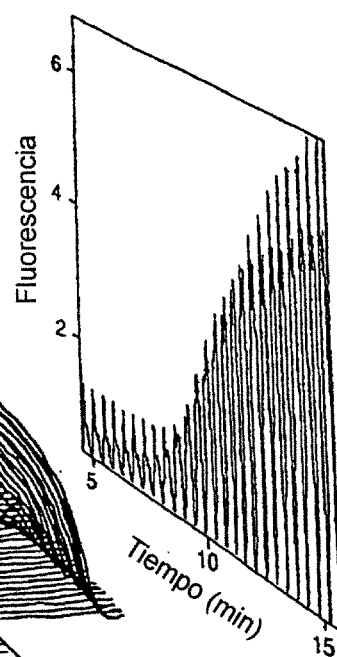


Fig. 30B

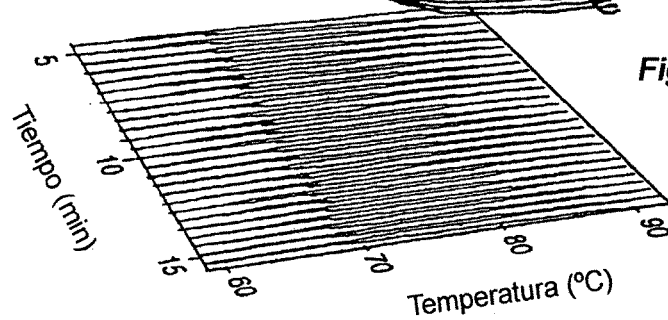


Fig. 30D

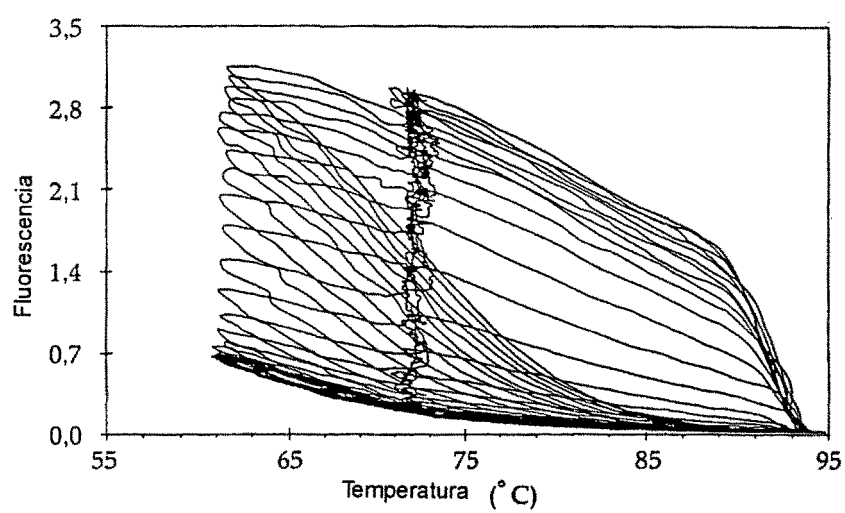


Fig. 31

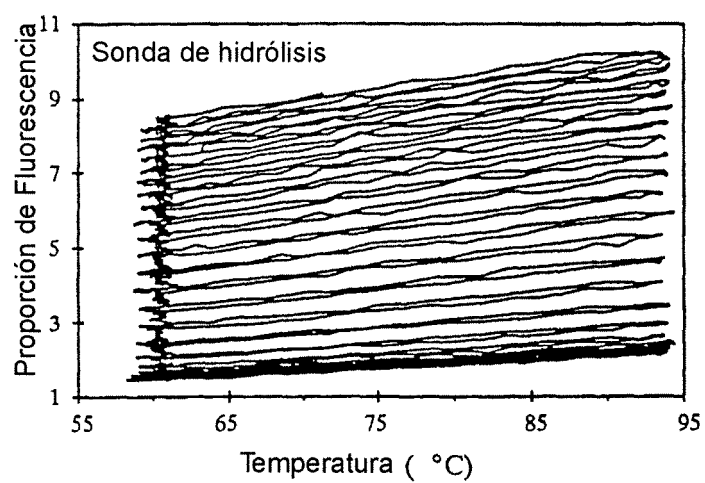


Fig. 32A

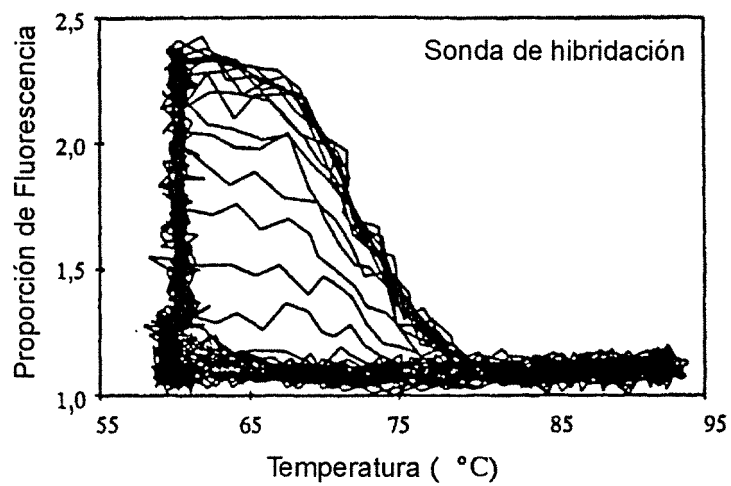


Fig. 32B

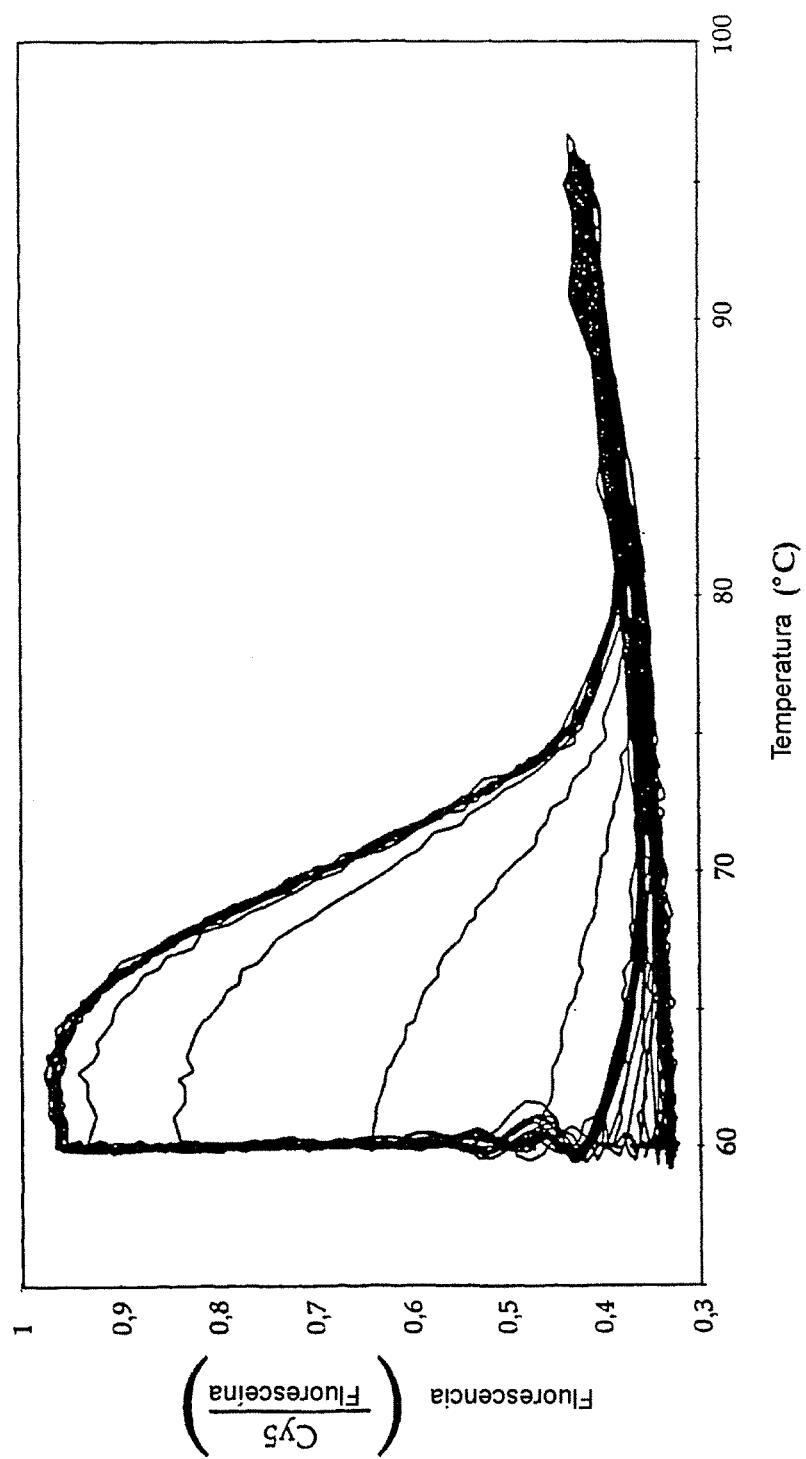


Fig. 33

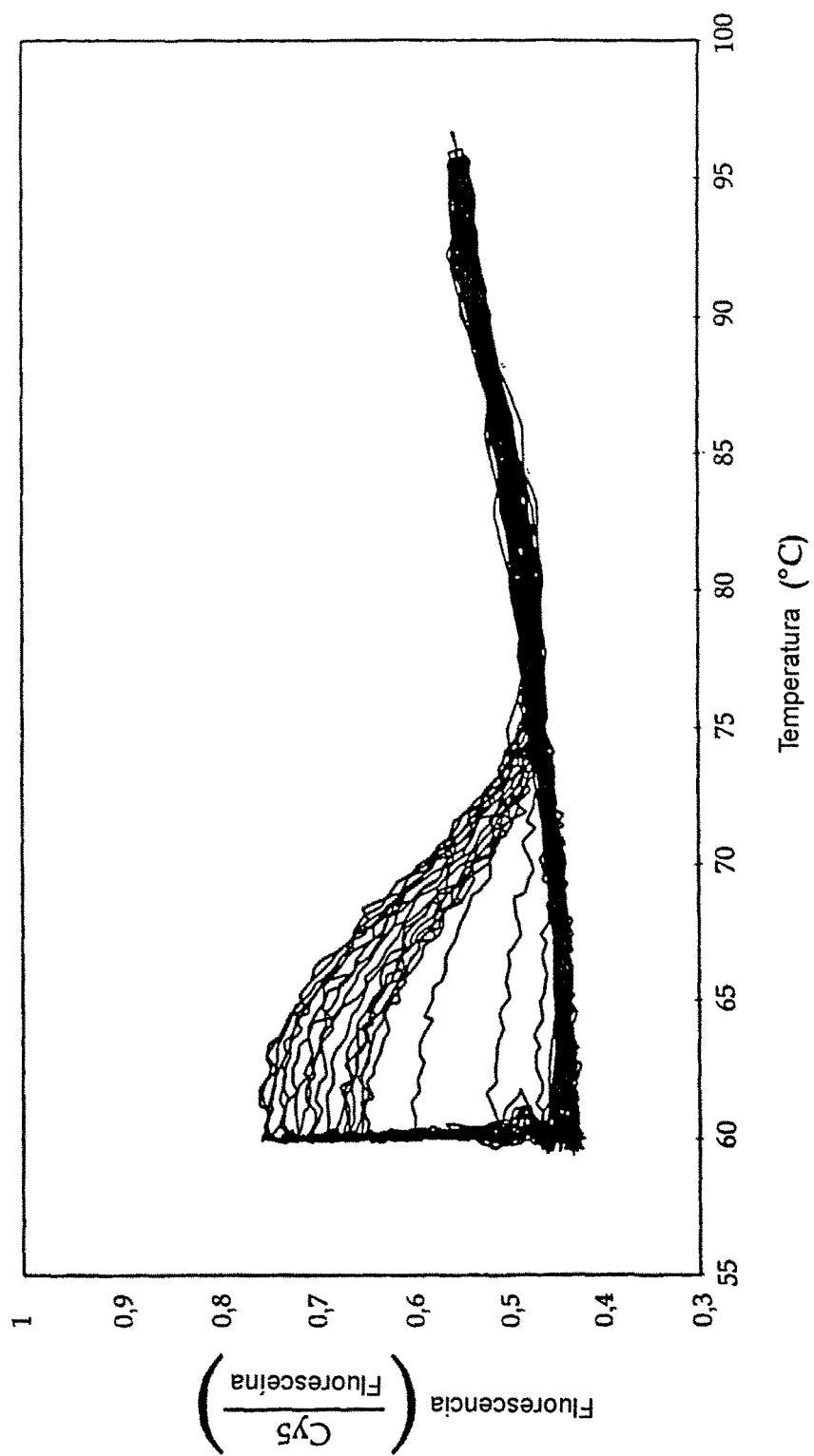


Fig. 34

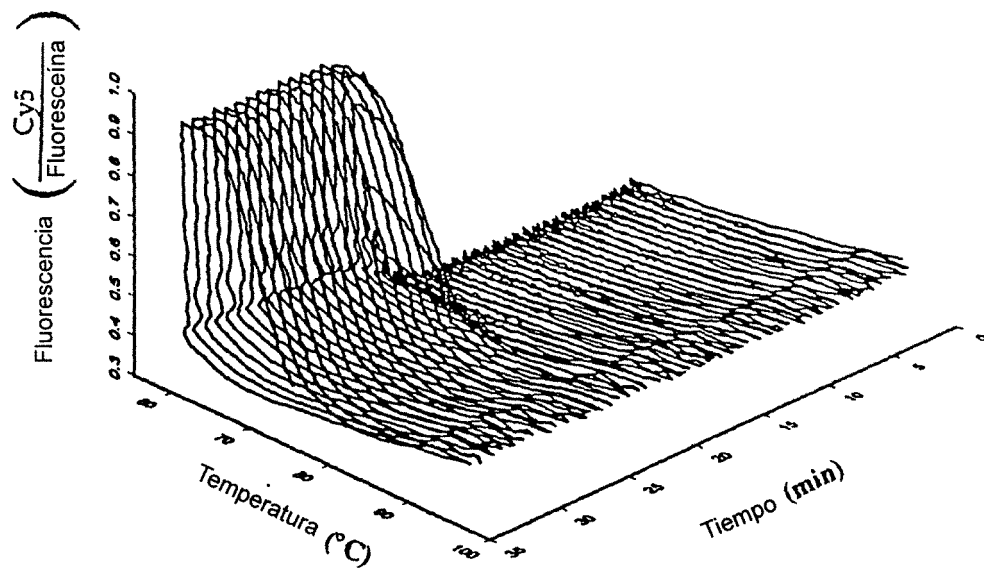


Fig. 35

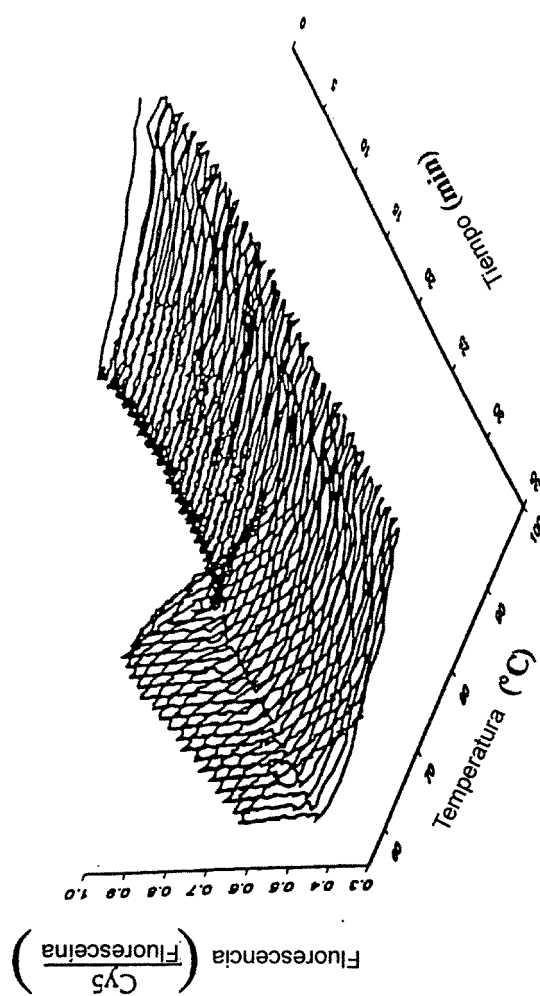


Fig. 36

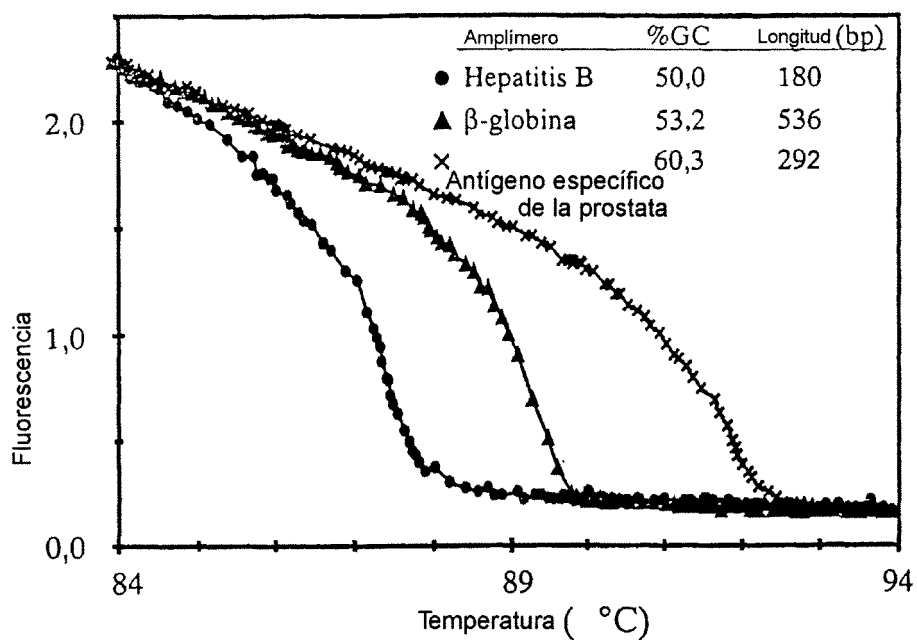


Fig. 37

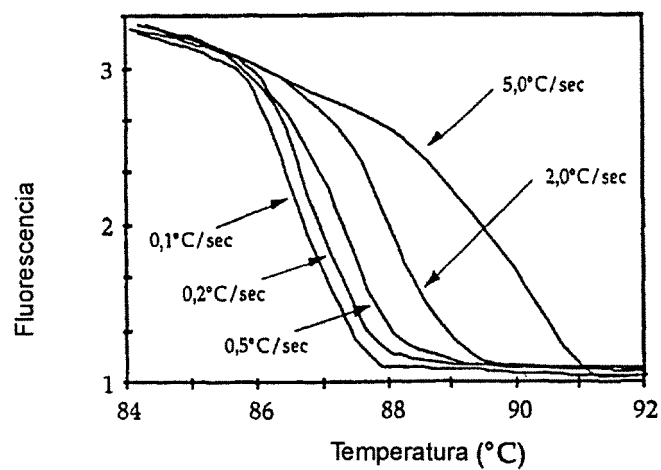


Fig. 38

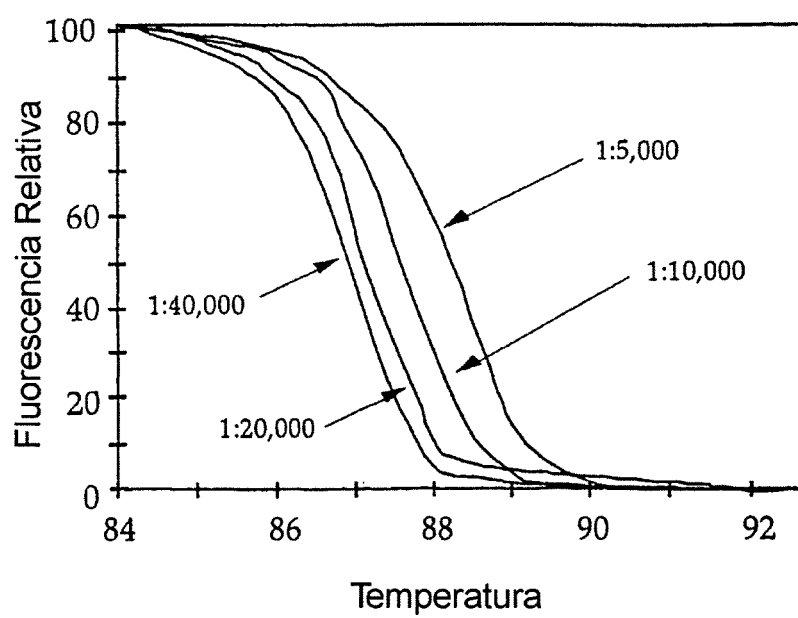


Fig. 39

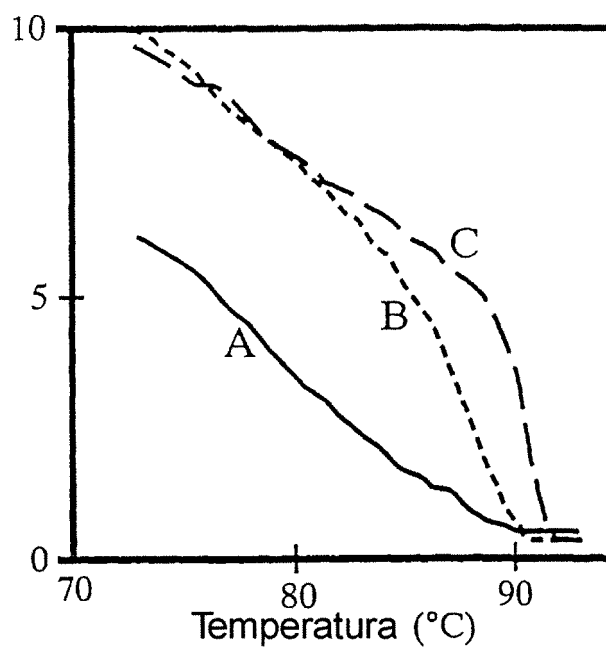


Fig. 40A

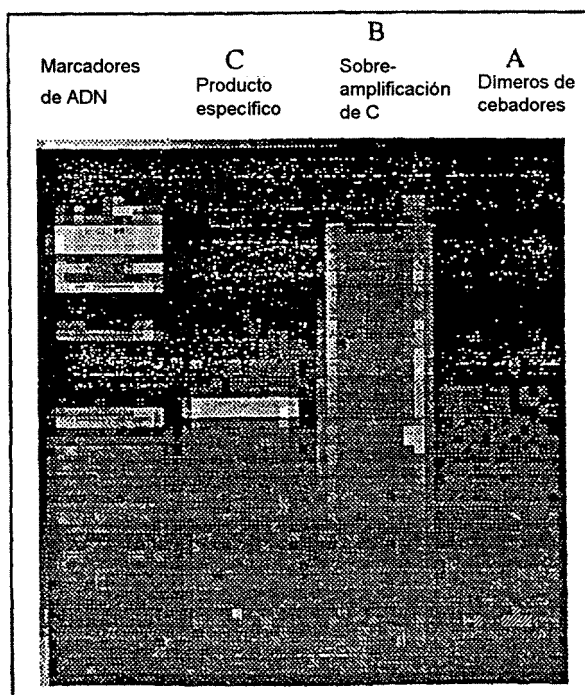


Fig. 40B

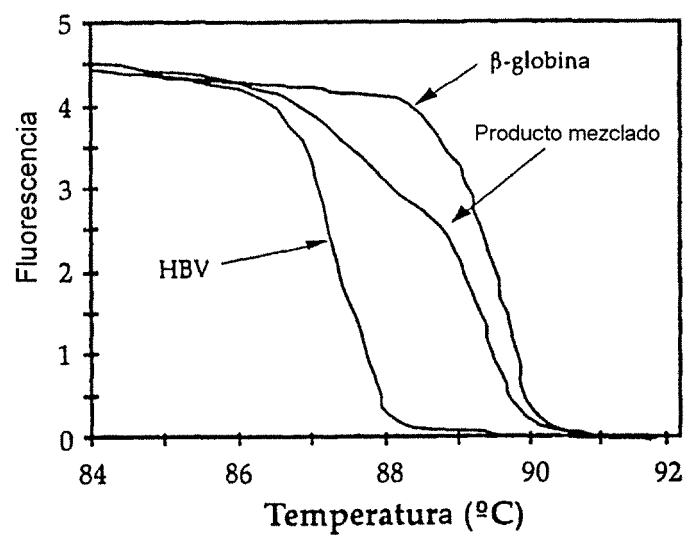


Fig. 41A

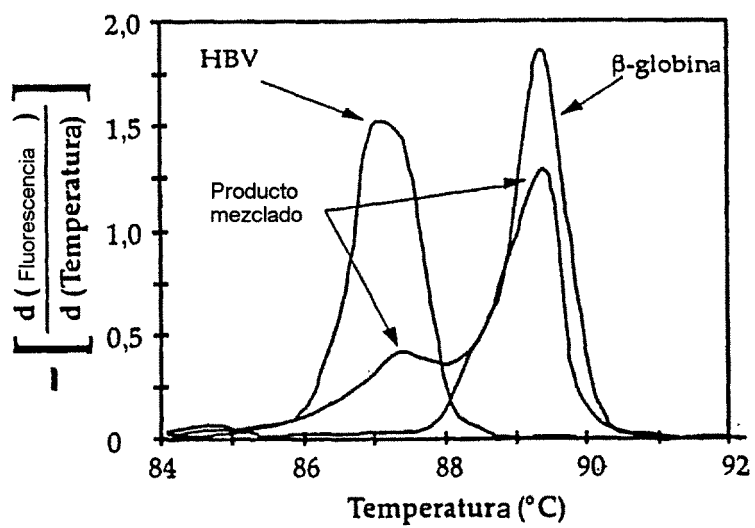


Fig. 41B

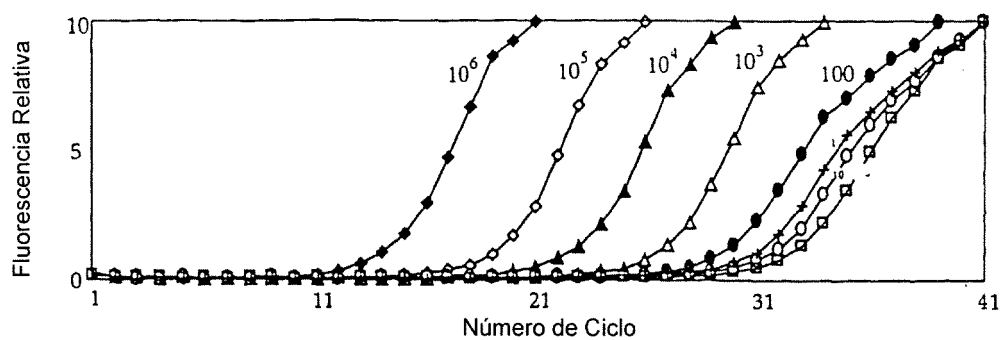


Fig. 42A

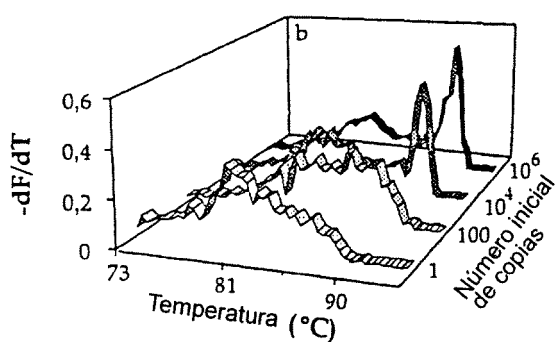


Fig. 42B

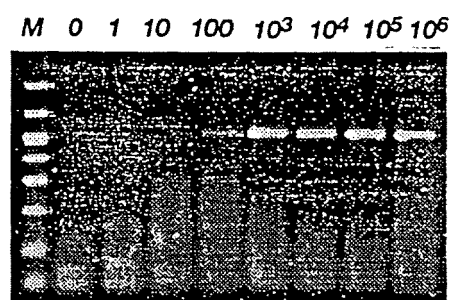


Fig. 42C

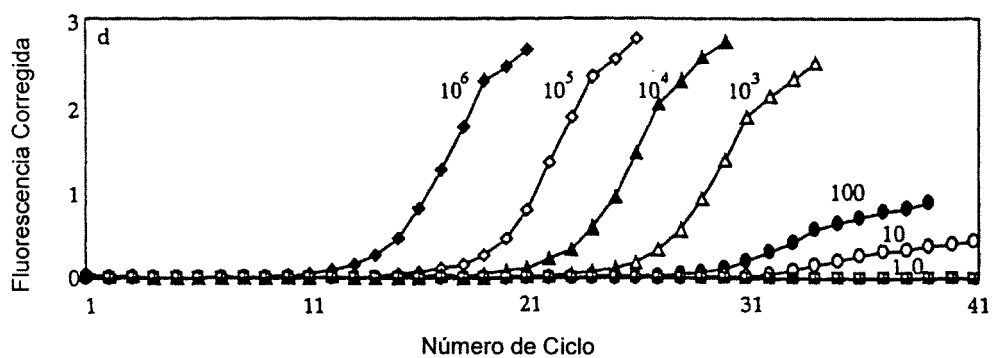


Fig. 42D

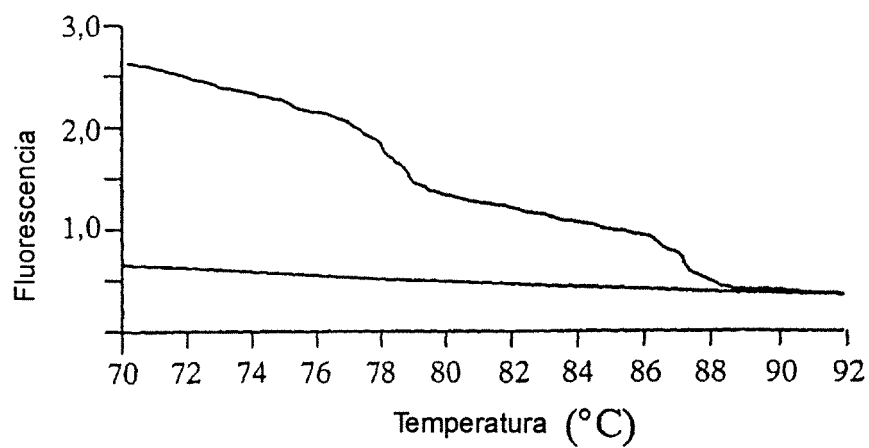


Fig. 43A

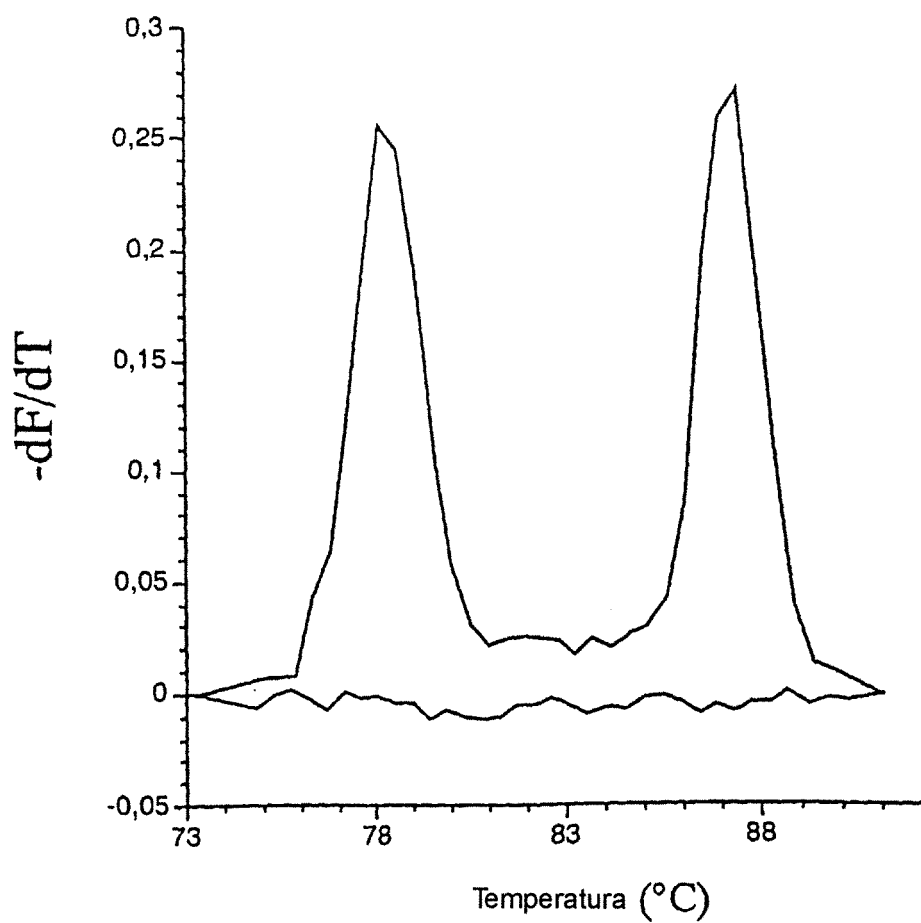


Fig. 43B

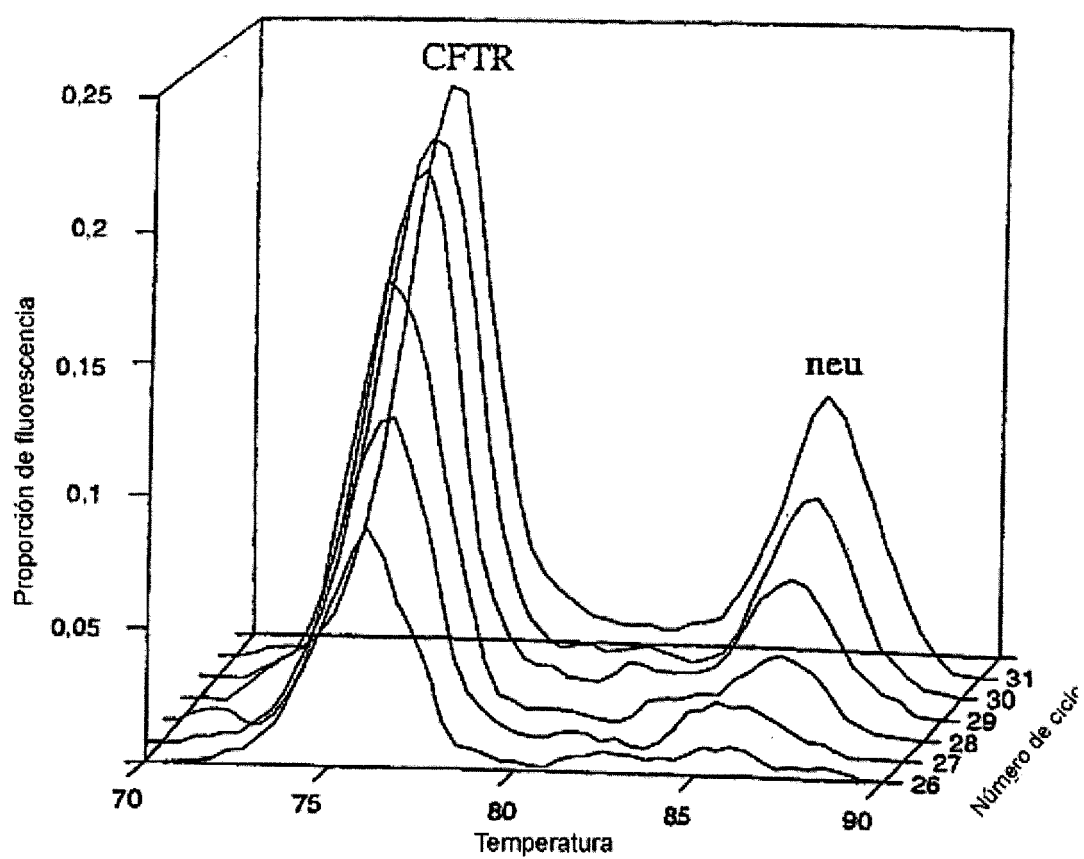


Fig. 44

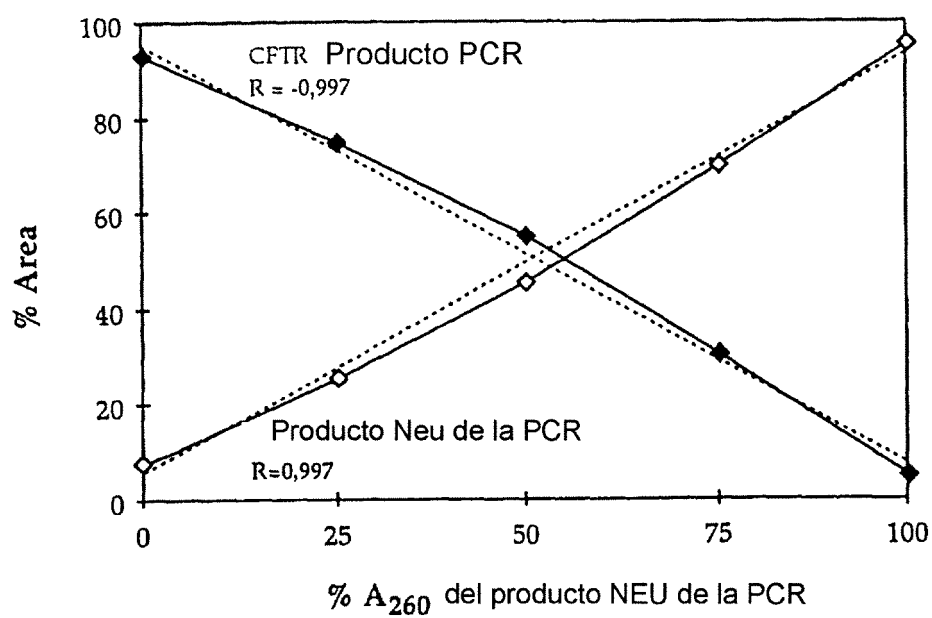


Fig. 45

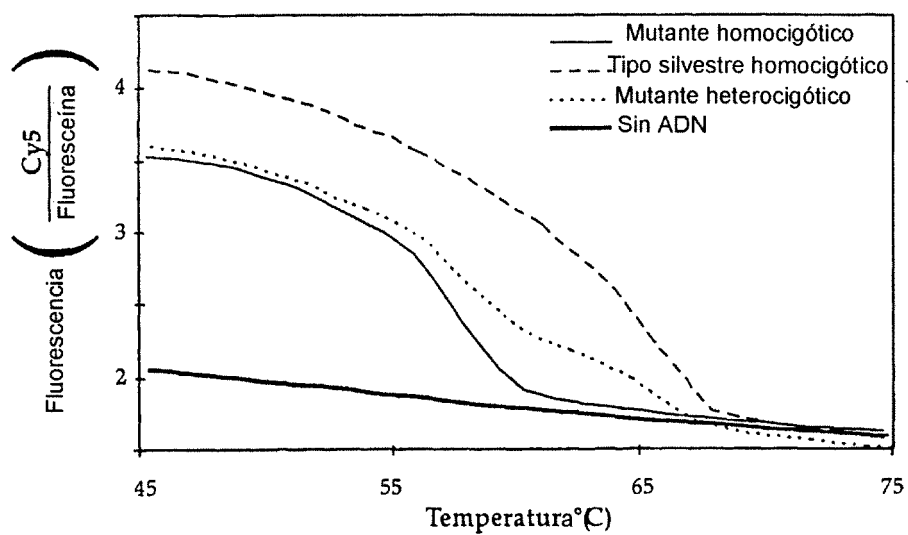


Fig. 46A

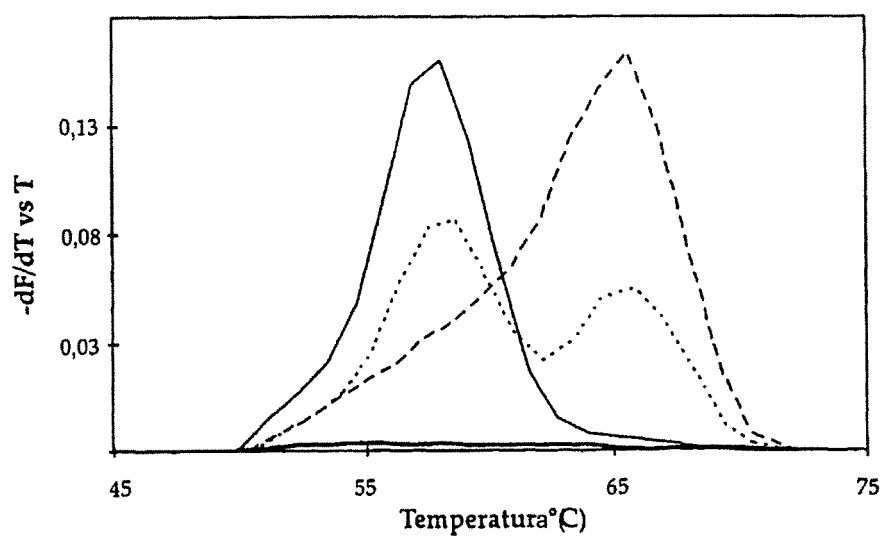


Fig. 46B

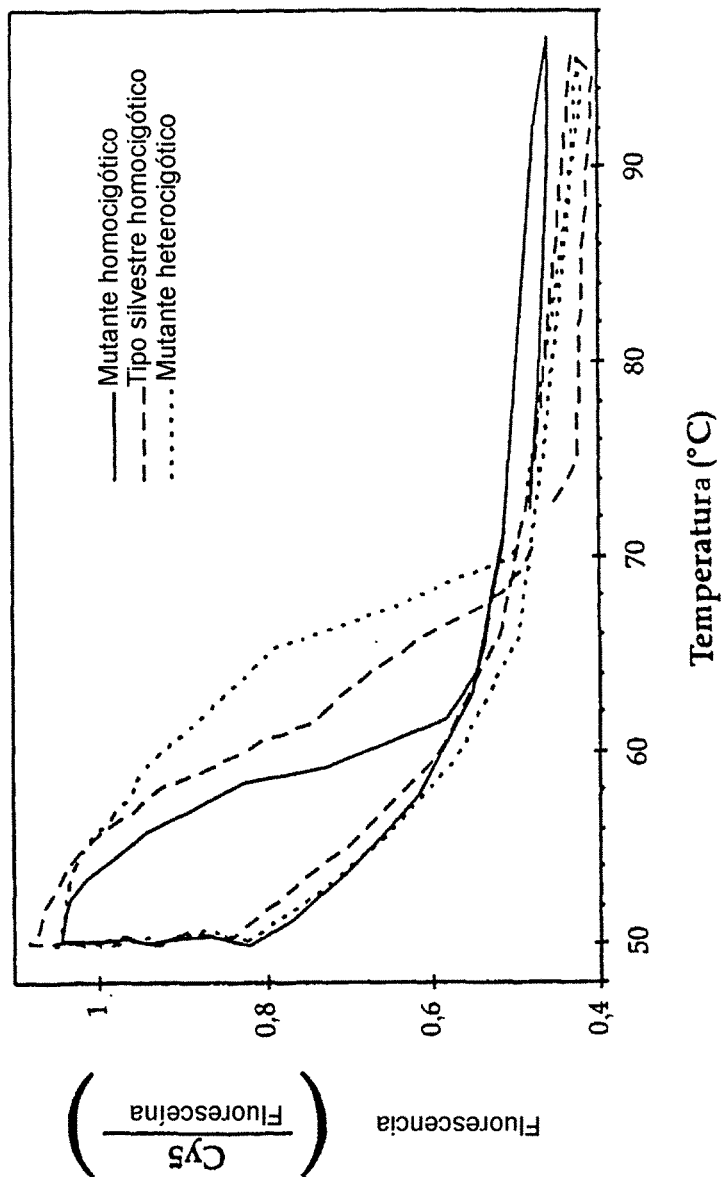


Fig. 47

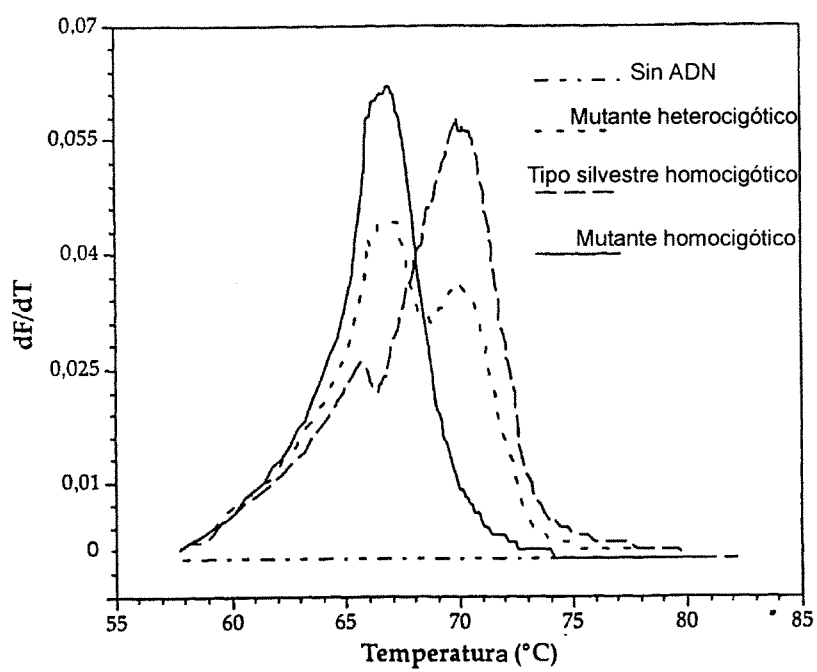


Fig. 48

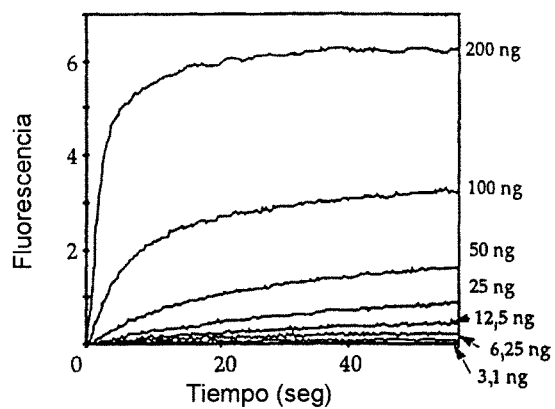


Fig. 49

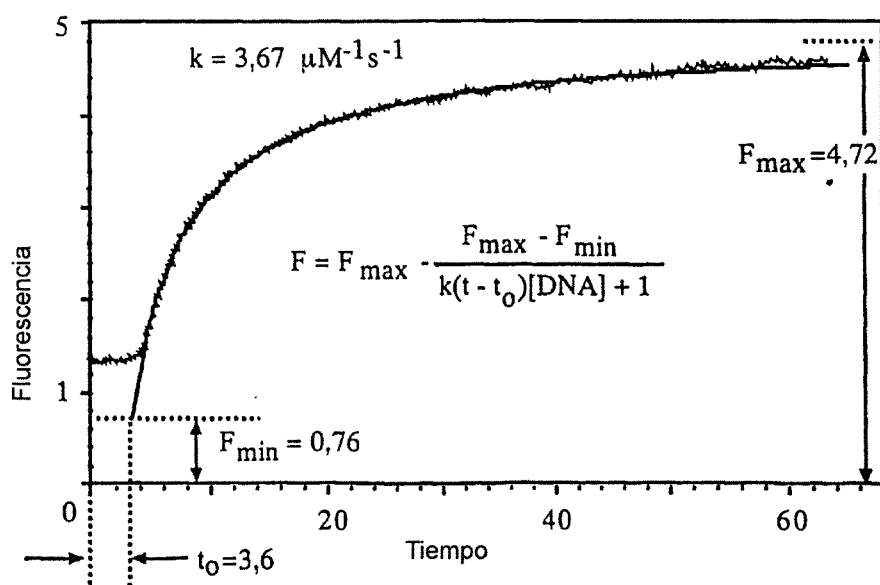


Fig. 50

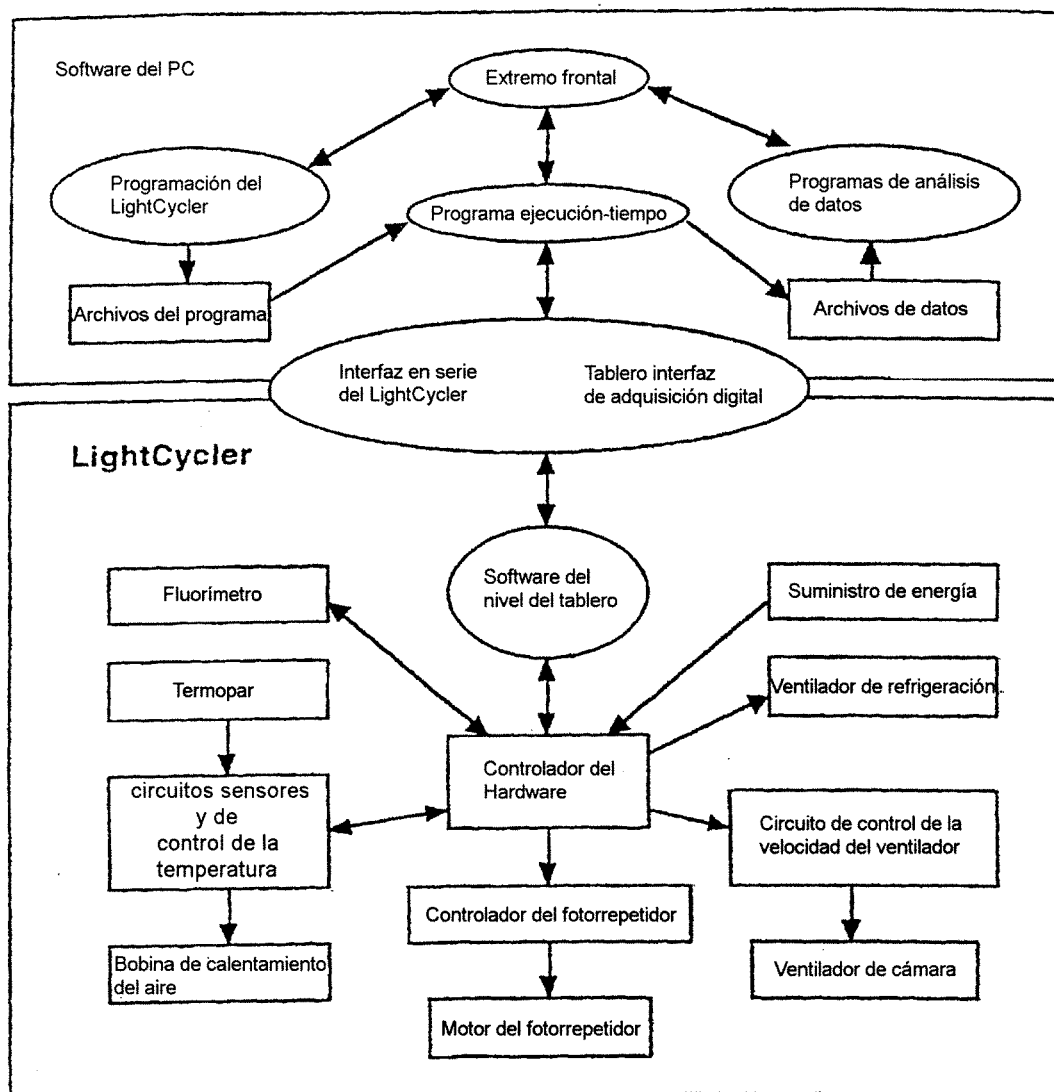


Fig. 51

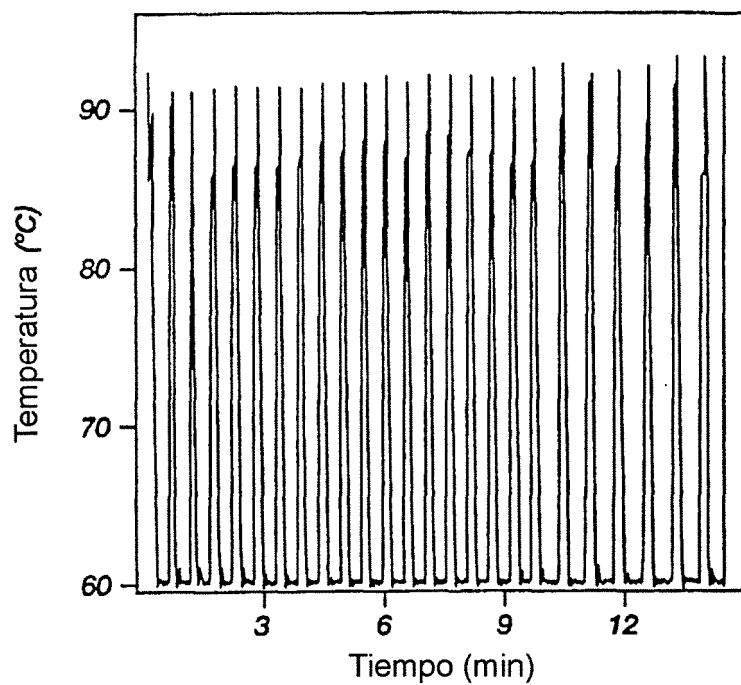


Fig. 52A

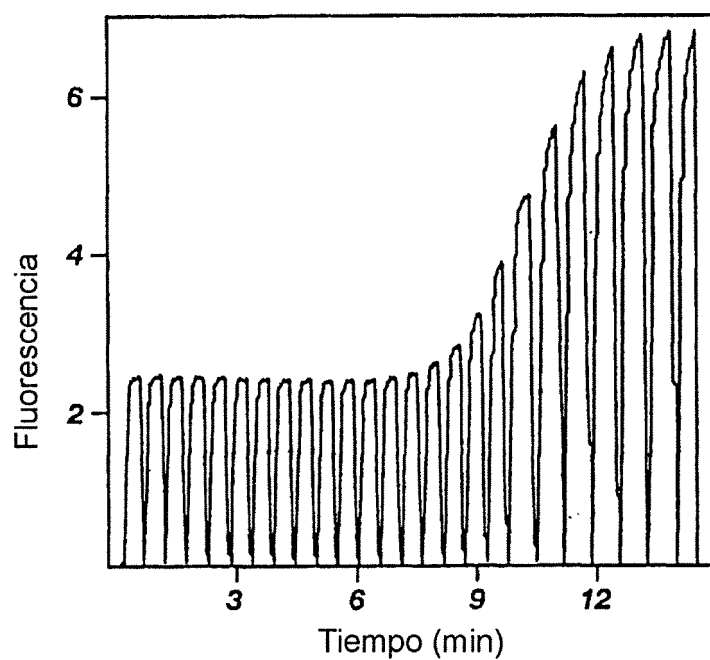


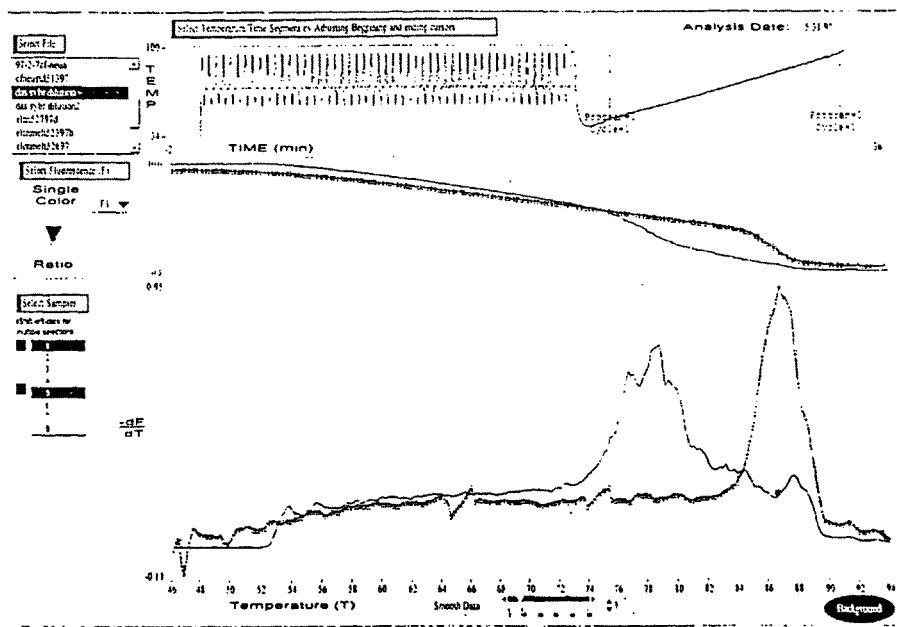
Fig. 52B

CTWMelt11.vi
 ÚLTIMA MODIFICACIÓN 02/06/97 A LAS 7:28 PM
 IMPRESO EL 02/06/97 A LAS 7:39 PM

Cristal Conector



Panel Frontal



CONTROLES E INDICADORES

- ☐ 116 SUAVIZADO
- ☐ 132 SELECCIONAR ARCHIVO
- ☐ 132 S o C
- ☐ TF PARAR
- ☐ 032 PREFERENCIAS DE COLOR

Fig. 53



CTW Melt11.vi

ÚLTIMA MODIFICACIÓN EL 02/06/97 A LAS 07:28 PM
IMPRESO EL 02/06/97 A LAS 7:39 PM

- U32**
- U8**
- TF** F
- U8**
- I32** MÉTODO DE LA PENDIENTE
- TF** CICLOS DE LA MUESTRA
- U8** MUESTRA#
- [F:]** $-dF/dT$
vs T
- [F:]** F vs T
- [U32]** REPRESENTACIÓN EN COLOR
- U32**
- [F:]** SELECCIÓN DEL SEGMENTO TEMPERATURA/TIEMPO AJUSTANDO LOS CURSORES
DEL INICIO Y DEL FINAL
- abc**
- abc** FECHA DE ANÁLISIS
- abc** SELECCINADOR ARCHIVO
- abc** TEMPERATURA/TIEMPO
- abc** FLUORESCENCIA
- abc** MUESTRAS/CICLOS
- abc** SUAVIZAR
- U16** PUNTOS
- U16** PUNTOS
- U16** ARCHIVO FLO
- U16** ARCHIVO TEMP
- U8** CICLOS
- abc**
- abc**

Fig. 54



CTWMelt11.vi

ÚLTIMA MODIFICACIÓN EL 02/06/97 A LAS 7:28 PM

IMPRESO EL 02/06/97 A LAS 7:39 PM

DIAGRAMA DE BLOQUES

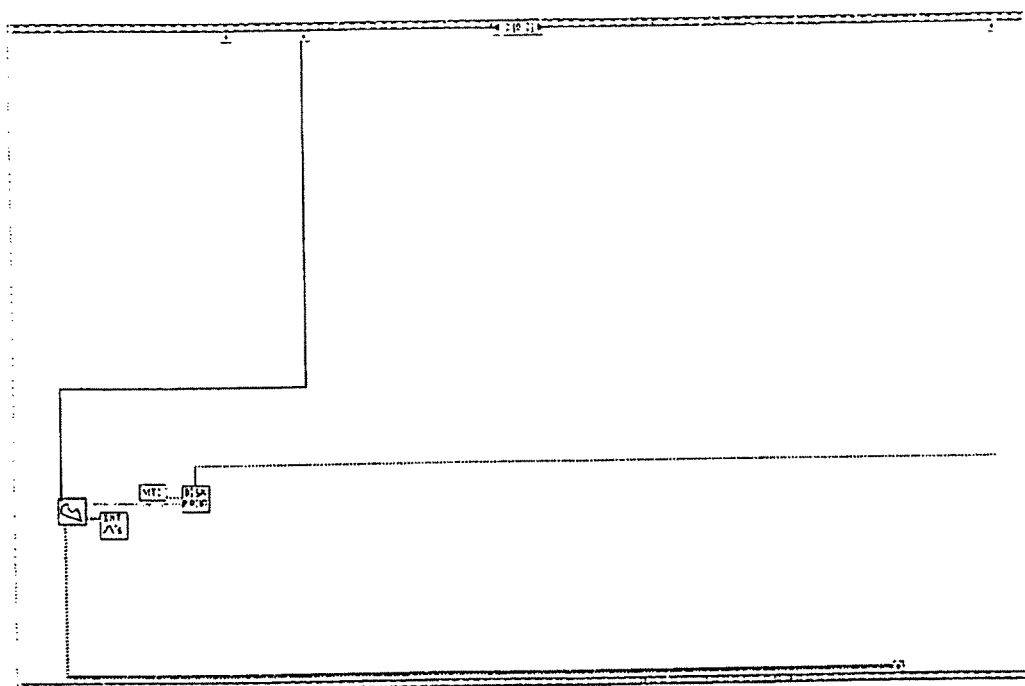


Fig. 55



CTWMe11.vi

ÚLTIMA MODIFICACIÓN EL 02/06/97 A LAS 07:28 PM

IMPRESO EL 02/06/97 A LAS 07:39 PM

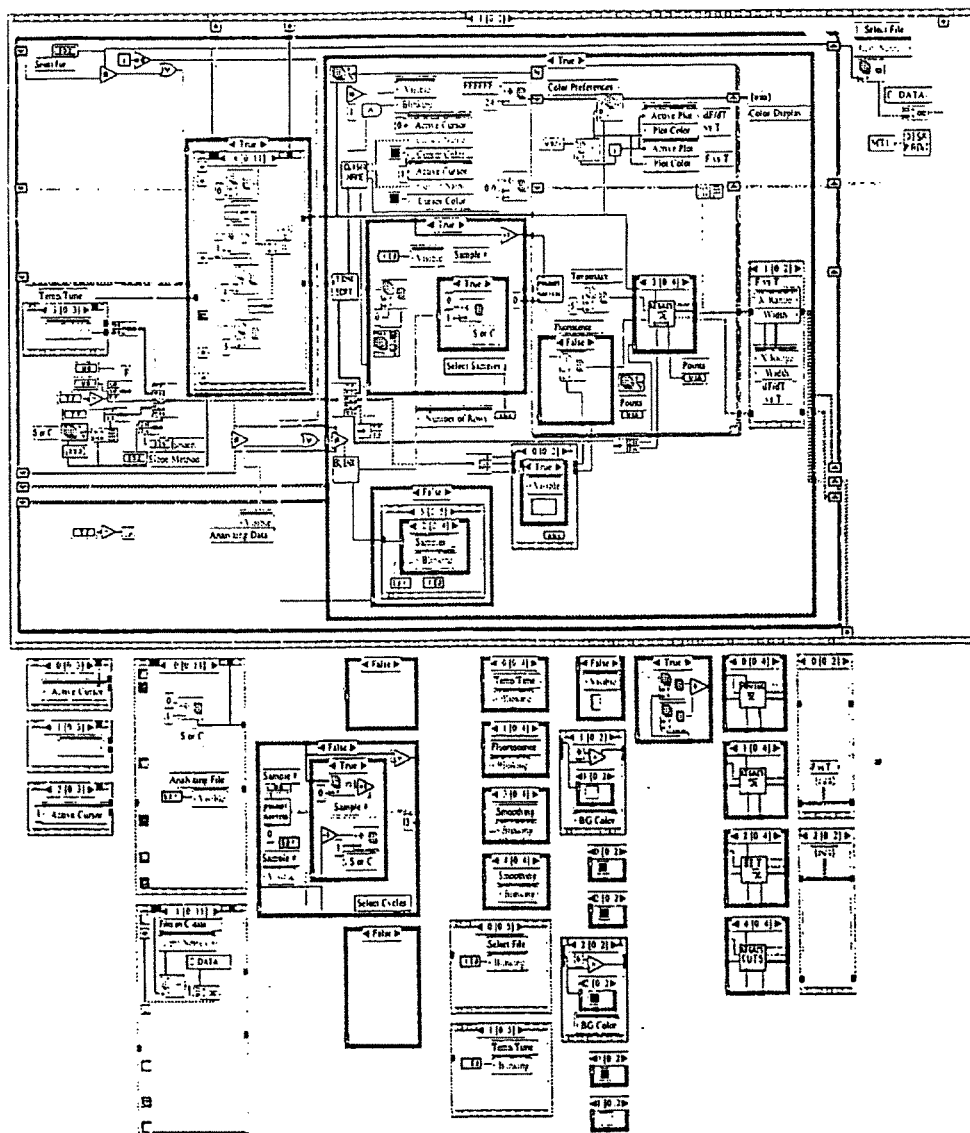
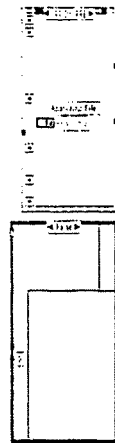


Fig. 57



CTWMelt11.vi

Última modificación el 06/02/97 a las 7:28 PM
Impreso el 06/02/97 a las 7:39 PM



Posición en jerarquía

Fig. 58



CTWMelt11.vi

ÚLTIMA MODIFICACIÓN EL 02/06/97
IMPRESO EL 02/06/97 A LAS 07:39 PM

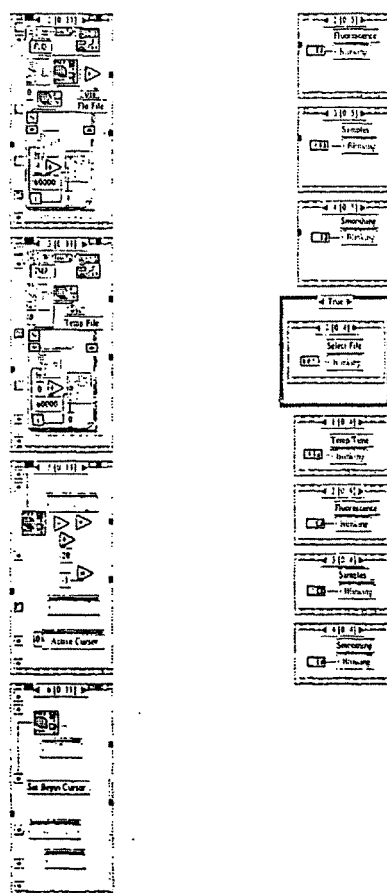


Fig. 59

CTWMeht11.vi

ÚLTIMA MODIFICACIÓN 02/06/97 A LAS 07:28 PM
IMPRESO EL 02/06/97 A LAS 07:39 PM

Página 8

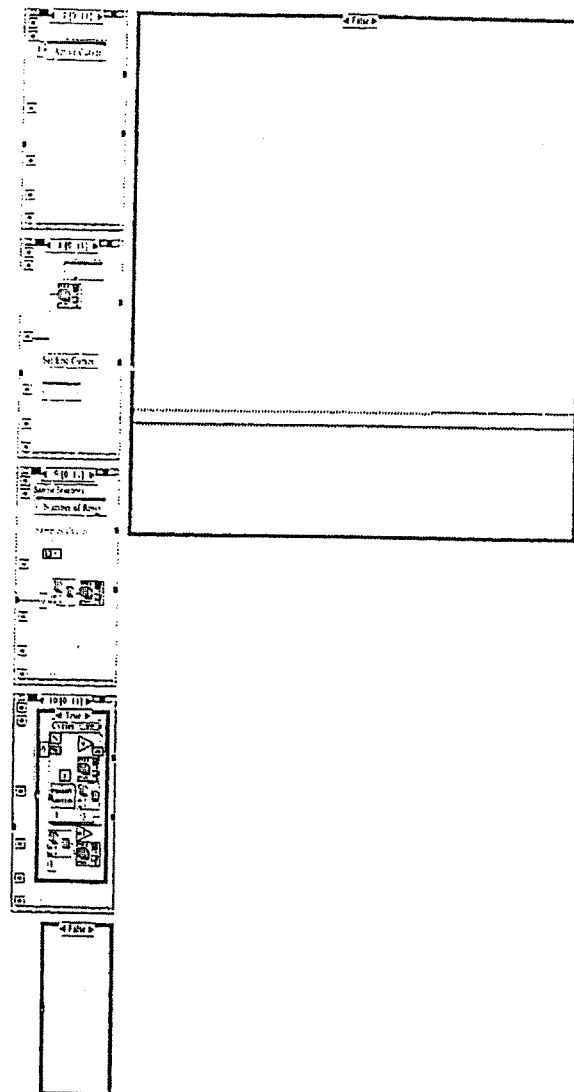
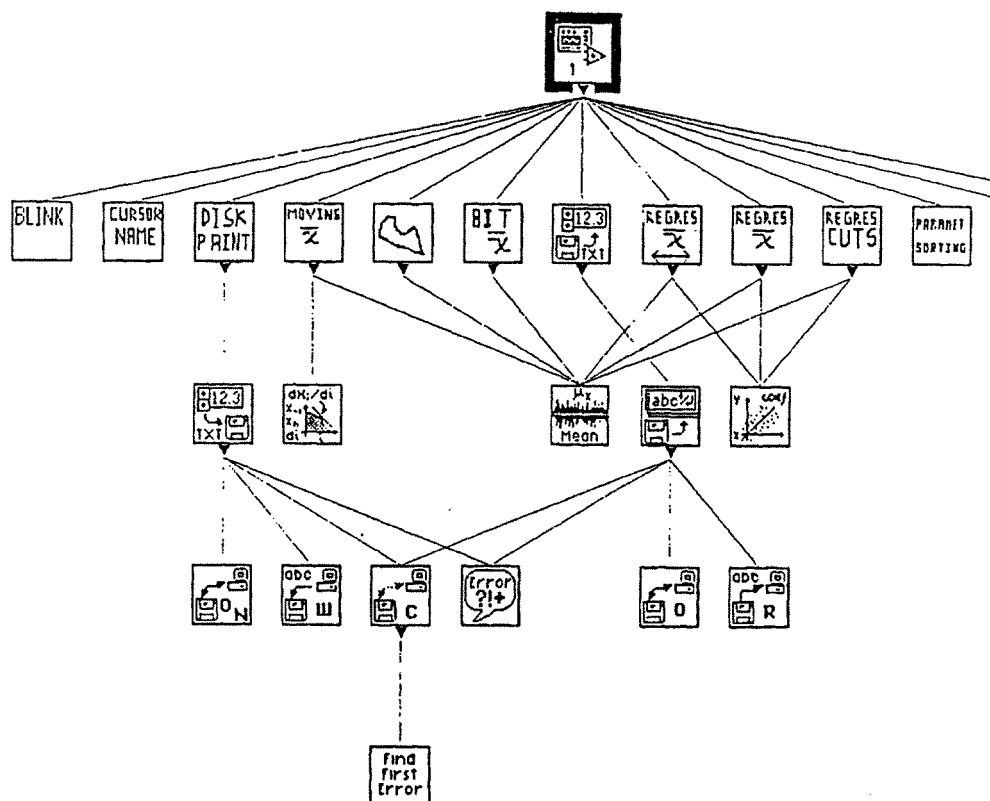


Fig. 60

CTWMe11.vi

ÚLTIMA MODIFICACIÓN 02/06/97 A LAS 07:28 PM
IMPRESO EL 02/06/97 A LAS 07:39 PM

Página 9



LISTA DE SUBVIS

BLINK	Blink updates.vi C:\data 1\Blink updates.vi
PRANET SORTING	CLASIFICACIÓN DEL NÚMERO DE MUESTRA.VI C:/DATA/CLASIFICACIÓN DEL NÚMERO DE MUESTRA VI.

Fig. 61

CTWMelt11.vi

ÚLTIMA MODIFICACIÓN 02/06/97 A LAS 07:28 PM

IMPRESO EL 02/06/97 A LAS 07:39 PM

Página 11



TIME	CLASIFICACIÓN DEL TIEMPO.VI
SORT	C:\data\1\ CLASIFICACIÓN DEL TIEMPO.VI
CURSOR NAME	NOMBRE DEL CURSOR. VI
	C:\data\1\ NOMBRE DEL CURSOR.VI
MOVING X	MOVIMIENTO PROMEDIO.VI
	C:\data\1\ MOVIMIENTO PROMEDIO.VI
BIT X	MOVIMIENTO BIT PROMEDIO.VI
	C:\data\1\ MOVIMIENTO BIT PROMEDIO.VI
BIT2.3 FILE	LECTURA DE LA HOJA DE CÁLCULO.VI
	C:\LABVIEW\vi.lib\UTILITY\file.lib\ LECTURA DE LA HOJA DE CÁLCULO.VI
REGRES X	PROMEDIO DE LA REGRESIÓN. VI
	C:\data\1\ PROMEDIO DE LA REGRESIÓN.VI
REGRES EXTS	PROMEDIO DE LA REGRESIÓN CON EXTREMOS.VI
	C:\data\1\ PROMEDIO DE LA REGRESIÓN CON EXTREMOS.VI
	RECORTES DE LA REGRESIÓN.VI
	C:\data\1\ RECORTES DE LA REGRESIÓN
DISK PRINT	FONDO.VI
	C:\data\1\ FONDO.VI
INT A's	IMPRESIÓN DEL DISCO.VI
	C:\data\1\ IMPRESIÓN DEL DISCO.VI
REGRES X	SUMA DE GAUSSIANOS.VI
	C:\data\1\ SUMA DE GAUSSIANOS.VI

Historial

"CTWMelt11.vi HISTORIAL

Revisión actual: 181

Fig. 63

Diagrama de bloques de la interfaz de usuario para el análisis de regresión:

- Entradas del Usuario:** MUESTRA TEMPERATURA FLUORESCENCIA, SUAVIZADO.
- Procesamiento:** REGRESIÓN (representado por un símbolo de suma).
- Salidas del Sistema:** SALIDA DE DATOS, dF/dT vs T , F vs T , F SALIDA.
- Legenda:** PROMEDIO DE LA REGRESIÓN CON EXTREMOS.VI

MUESTRA #	TEMP	FLUORESCENCIA	-dF/dT vs T
	0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00	0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00	0.00 0.00
SUAVIDADO			F vs T
			0.00 0.00
			0.00 0.00

#SALIDA

U8 MUESTRA#
[DBL] TEMPERATURA
[DBL]
[DBL] FLUORESCENCIA

Fig. 64

PROMEDIO DE LA REGRESIÓN CON EXTREMOS.VI
 ÚLTIMA MODIFICACIÓN 23/03/97 A LAS 01:42 PM
 IMPRESO EL 06/03/97 A LAS 10:54H AM

Página 2



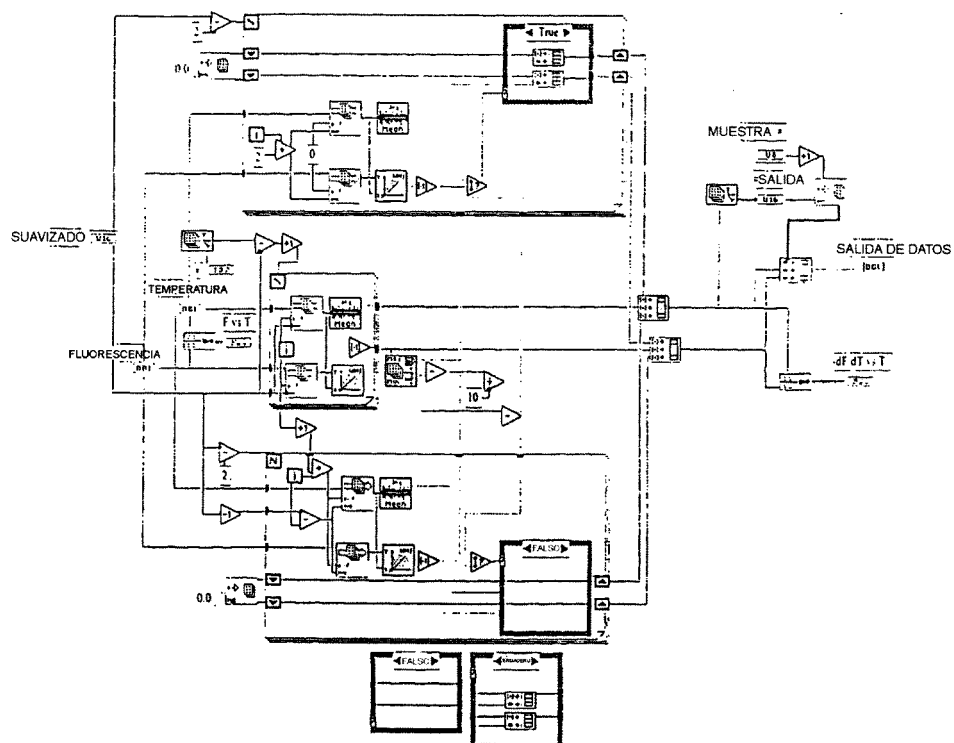
[DBL]
 [U16] SUAVIZADO
 [I32] #
 [DBL] SALIDA DE DATOS
 [DBL]
 [F..] -dF/dT vs T
 [DBL]
 [DBL]
 [DBL]
 [F..] F vs T
 [DBL]
 [DBL]
 [DBL]
 [DBL]
 [U16] # SALIDA

Fig. 65

PROMEDIO DE LA REGRESIÓN CON EXTREMOS
 ÚLTIMA MODIFICACIÓN 23/3/97 A LAS 1:42 PM
 IMPRESO EL 6/3/97 A LAS 10:54 AM

Página 3 

DIAGRAMA DE BLOQUES



POSICIÓN JERARQUÍA

Fig. 66

PROMEDIO DE LA REGRESIÓN CON EXTREMO.VI
 ÚLTIMA MODIFICACIÓN 23/03/97 A LA 01:42 PM
 IMPRESO EL 6/3/97 A LAS 10:54 AM

Página 4 



LISTA DE SUBVIS



MEDIA.VI
 C:\LABVIEW\vi.lib\ANALYSIS\Stat.lib\MEDIA.VI



COEFICIENTES DE AJUSTE LINEAL.VI
 C:\LABVIEW\vi.lib\ANALYSIS\Fits.lib\ COEFICIENTES DE AJUSTE LINEAL.VI

HISTORIAL

"PROMEDIO DE LA REGRESIÓN CON EXTREMOS.VI HISTORIAL"
 REVISIÓN ACTUAL:13

Fig. 67

IMPRESIÓN DEL DISCO.VI
ÚLTIMA MODIFICACIÓN 31/5/97 A LAS 2:59 PM
IMPRESO EL 6/3/97 A LAS 11:02 AM

Página 1 

CRISTAL CONECTOR

DIRECTORIO Y FICHERO 
SUFIJO 
DATOS =

IMPRESIÓN DEL DISCO.VI

PANEL FRONTAL

DIRECTORIO Y FICHERO

SUFIJO

DATOS

0	0,00
0	

CONTROLES E INDICADORES

 DIRECTORIO Y FICHERO

 SUFIJO

 DATOS



DIAGRAMA DE BLOQUES

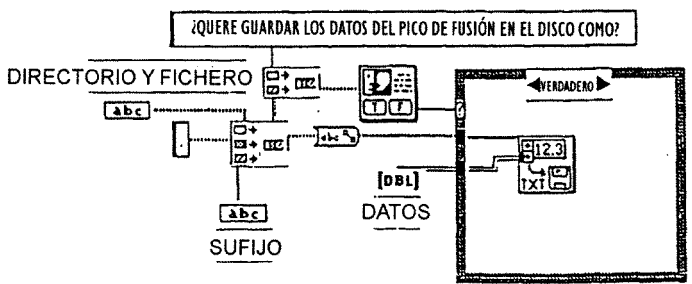
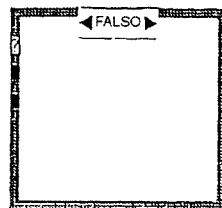
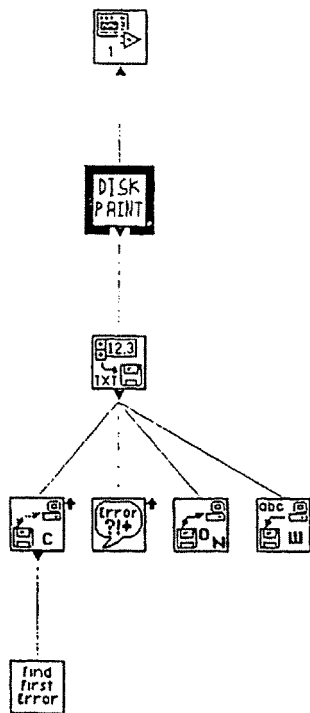


Fig. 68

IMPRESIÓN DEL DISCO.VI
ÚLTIMA MODIFICACIÓN EL 31/5/97 A LAS 2:59 PM
IMPRESO EL 3/6/97 A LAS 11:02 AM



POSICIÓN EN JERARQUÍA



LISTA DE SubVIs



ESCRIBIR A LA HOJA DE CÁLCULO.VI

C:\LABVIEW\vi.lib\UTILITY\file.lib\ESCRIBIR A LA HOJA DE CÁLCULO.VI

Fig. 69

IMPRESIÓN DEL DISCO.VI
ÚLTIMA MODIFICACIÓN 31/5/97 A LAS 2:59 PM
IMPRESO EL 3/6/97 A LAS 11:02 AM

Página 3



HISTORIAL

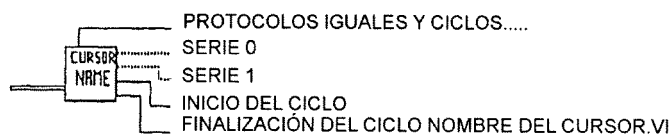
"IMPRESIÓN DEL DISCO.IV HISTORIAL "
REVISIÓN ACTUAL: 8

Fig. 70

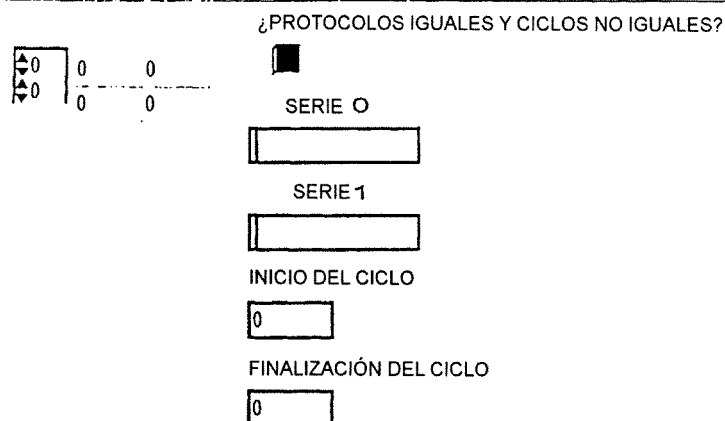
NOMBRE DEL CURSOR.VI
 ÚLTIMA MODIFICACIÓN 31/5/97 A LAS 02:59 PM
 IMPRESO EL 3/6/97 A LAS 11:02 AM

Página 1 CURSOR
NAME

CRISTAL DE CONECTOR



PANEL FRONTAL



CONTROLES E INDICADORES

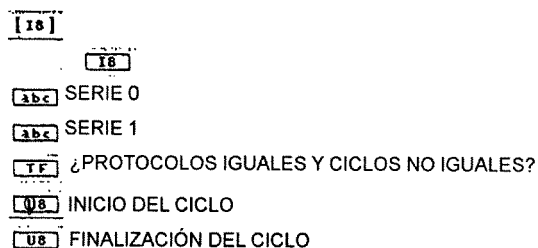
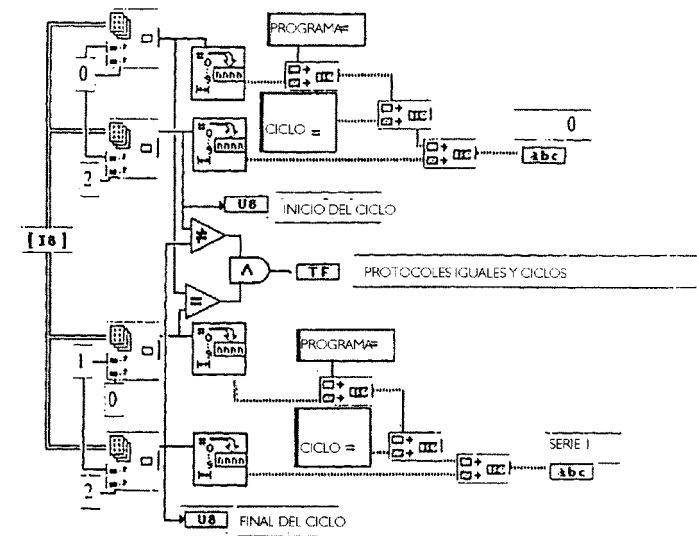


Fig. 71

NOMBRE DEL CURSOR
ÚLTIMA MODIFICACIÓN 11/05/97 A LAS 05:20 PM
IMPRESO EL 03/06/97 A LAS 11:02 AM

DIAGRAMA DE BLOQUES



POSICIÓN DE JERARQUÍA



LISTA DE SubVis

HISTORIAL

"NOMBRE DEL CURSOR. VI HISTORIAL"
REVISIÓN ACTUAL.21

Fig. 72

BLINK UPDATES.VI
ÚLTIMA MODIFICACIÓN 24/03/97 A LAS 8:59 PM
IMPRESO EL 6/03/97 A LAS 11:01 AM

Página 1 

CRISTAL CONECTOR



PANEL FRONTAL

ACTUALIZACIÓN DE CLÚSTERS

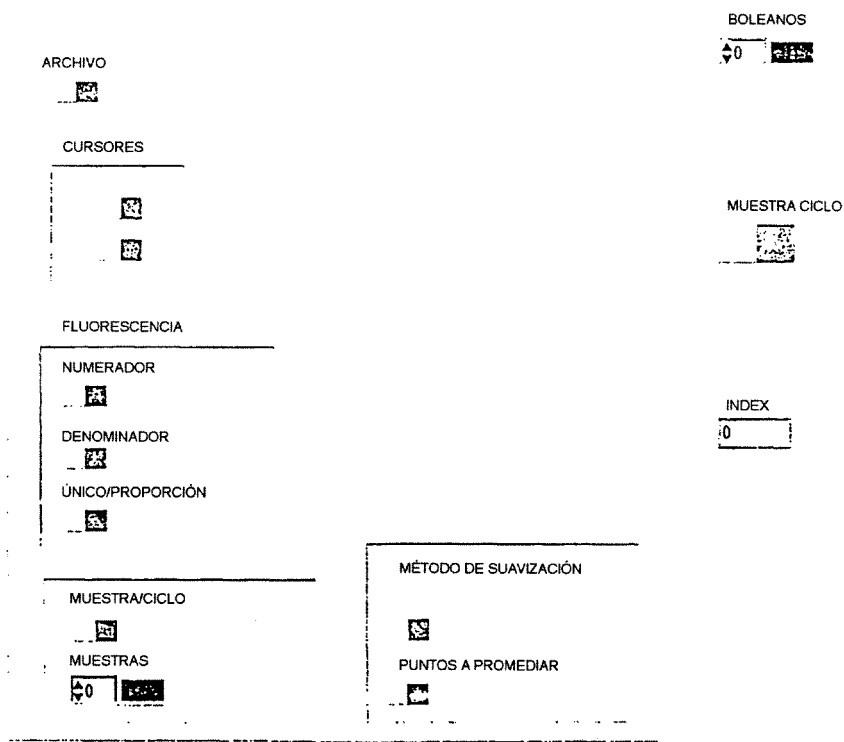


Fig. 73

CONTROLES E INDICADORES

- P... ACTUALIZACIÓN DE CLÚSTERS
 - TF ARCHIVO
 - P... CURSORES
 - TF
 - TF
 - P... FLUORESCENCIA
 - TF NUMERADOR
 - TF DENOMINADOR
 - TF ÚNICO/PROPORCIÓN
 - P...
 - TF MUESTRA/CICLO
 - [TF] MUESTRAS
 - TF
 - P...
 - TF MÉTODO DE SUAVIZACIÓN
 - TF PUNTOS A PROMEDIAR
- I8 Index
- [TF] BOLEANOS
 - TF
- TF MUESTRA / CICLO

DIAGRAMA DE BLOQUES

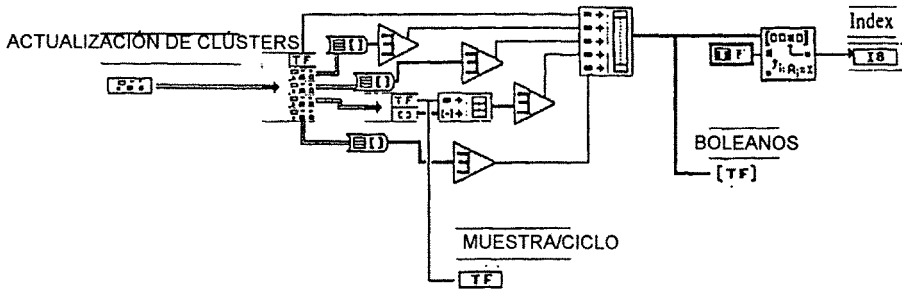


Fig. 74

BLINCK UPDATES.VI
ÚLTIMA MODIFICACIÓN 24/03/97 A LAS 8:59 PM
IMPRESO EL 03/6/97 A LAS 11:01 AM

Página 3



POSICIÓN EN JERARQUÍA



Lista de SubVIs

HISTORIAL

"BLINCK UPDATES.VI HISTORIAL"
REVISIÓN ACTUAL: 17

Fig. 75

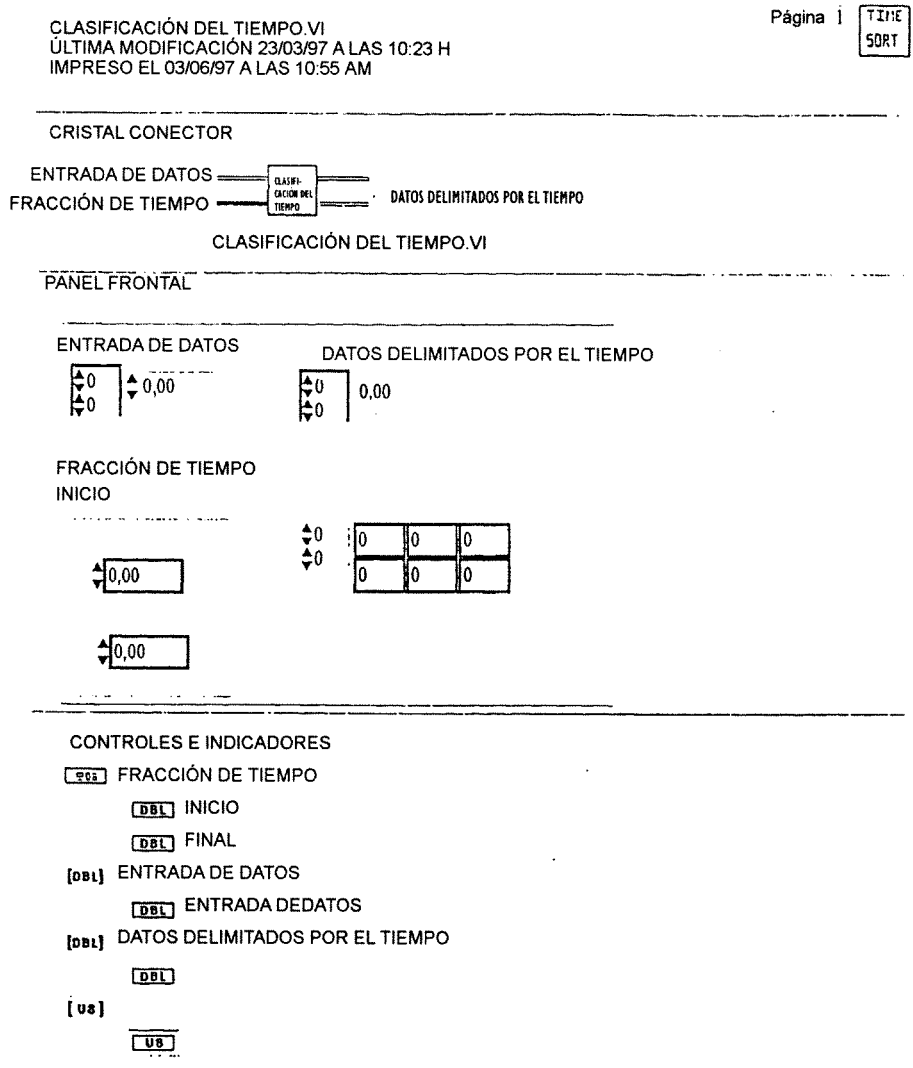


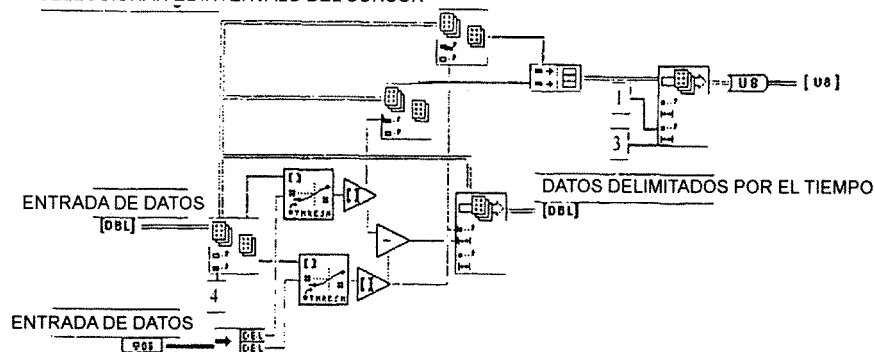
Fig. 76

CLASIFICACIÓN DEL TIEMPO.VI
 ÚLTIMA MODIFICACIÓN 23/03/97 A LAS 10:23 PM
 IMPRESO EL 03/06/97 A LAS 10:55 AM

Página 2 TIME
SORT

DIAGRAMA DE BLOQUES

SELECCIONAR EL INTERVALO DEL CURSOR



POSICIÓN EN JERARQUÍA



LISTA DE SubVis

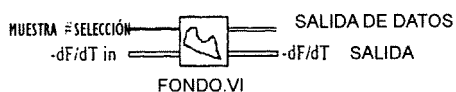
HISTORIAL
 "CLASIFICACIÓN DEL TIEMPO. VI HISTORIAL"
 REVISIÓN ACTUAL: 13

Fig. 77

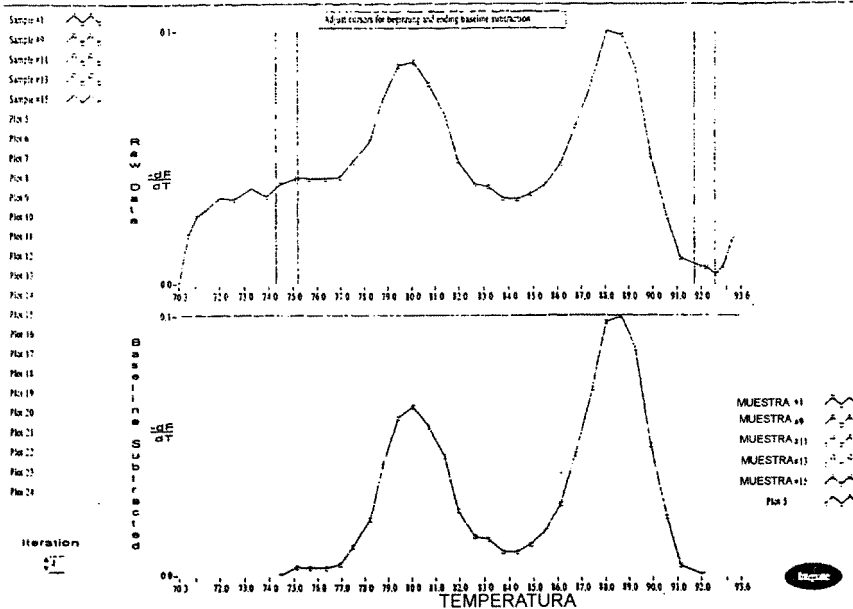
FONDO.VI
ÚLTIMA MODIFICACIÓN 03/06/97 A LAS 11:07 AM
IMPRESO EL 03/06/97 A LAS 11:07 AM

Página 1 

CRISTAL CONECTOR



PANEL FRONTAL



CONTROLES E INDICADORES

[F=] $-dF/dT$ in

[F=]

[DBL]

[DBL]

Fig. 78

FONDO.VI
ÚLTIMA MODIFICACIÓN 03/06/97 A LAS 11:07 AM
IMPRESO EL 03/06/97 A LAS 11:07 AM

Página 2 

```

                                [DBL]
                                [DBL]
                                [YF] PARAR
                                [U8] ITERACIÓN
                                [U8] MUESTRA# SELECCIÓN
                                [U8]
                                [F:] -dF/dT ENTRADA
                                [F:] -dF/dT SALIDA
                                [F:] -dF/dT SALIDA
                                [F:]
                                [DBL]
                                [DBL]
                                [DBL]
                                [DBL]
                                [DBL] SALIDA DE DATOS
                                [DBL]
                                [abc]
    
```

Fig. 79



FONDO.VI
ÚLTIMA MODIFICACIÓN 03/06/97 A LAS 11:07 AM
IMPRESO EL 03/06/97 A LAS 11:07 AM

DIAGRAMA DE BLOQUES

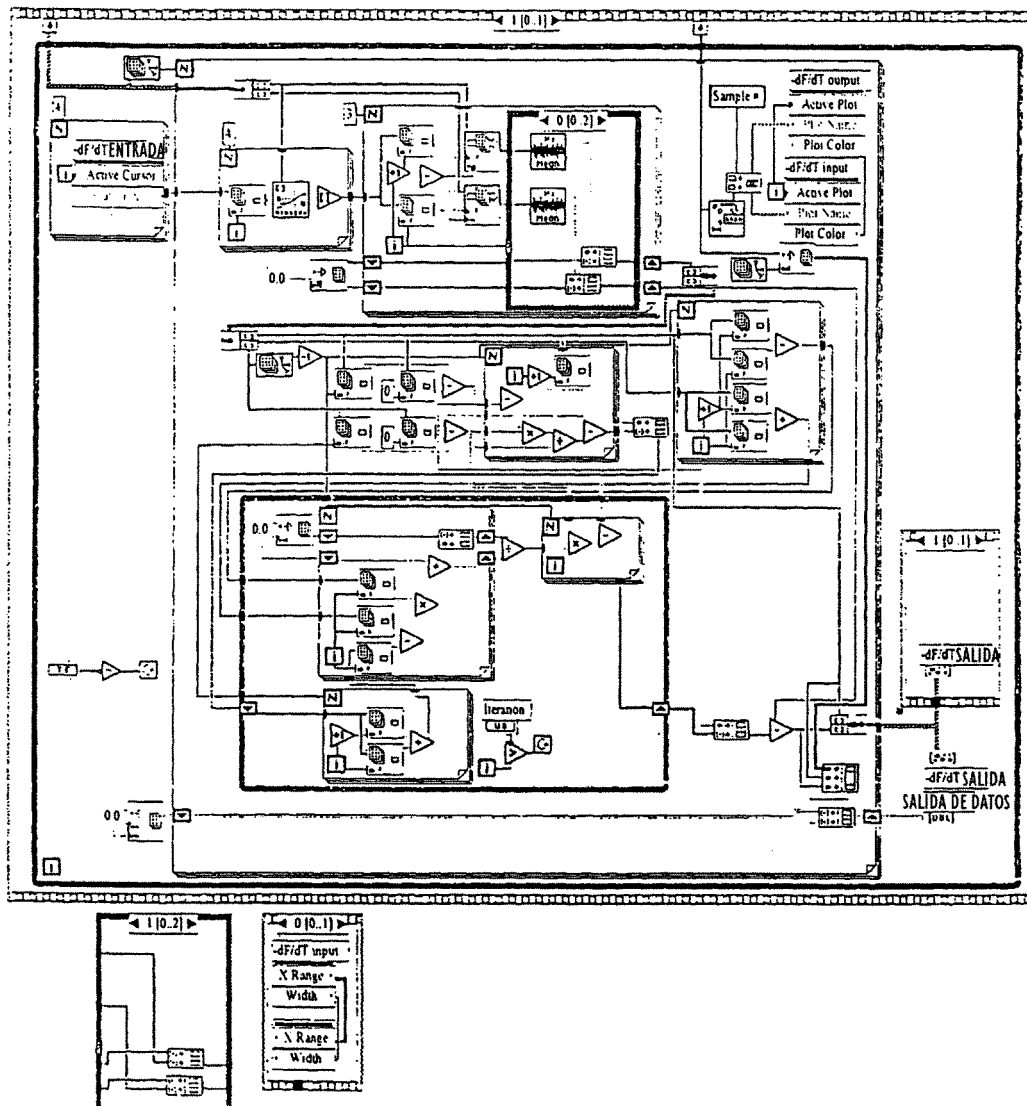


Fig. 80



Fondo.vi

Última modificación 3/06/97 a las 11:07 AM

Impreso el 3/06/97 a las 11:07 AM

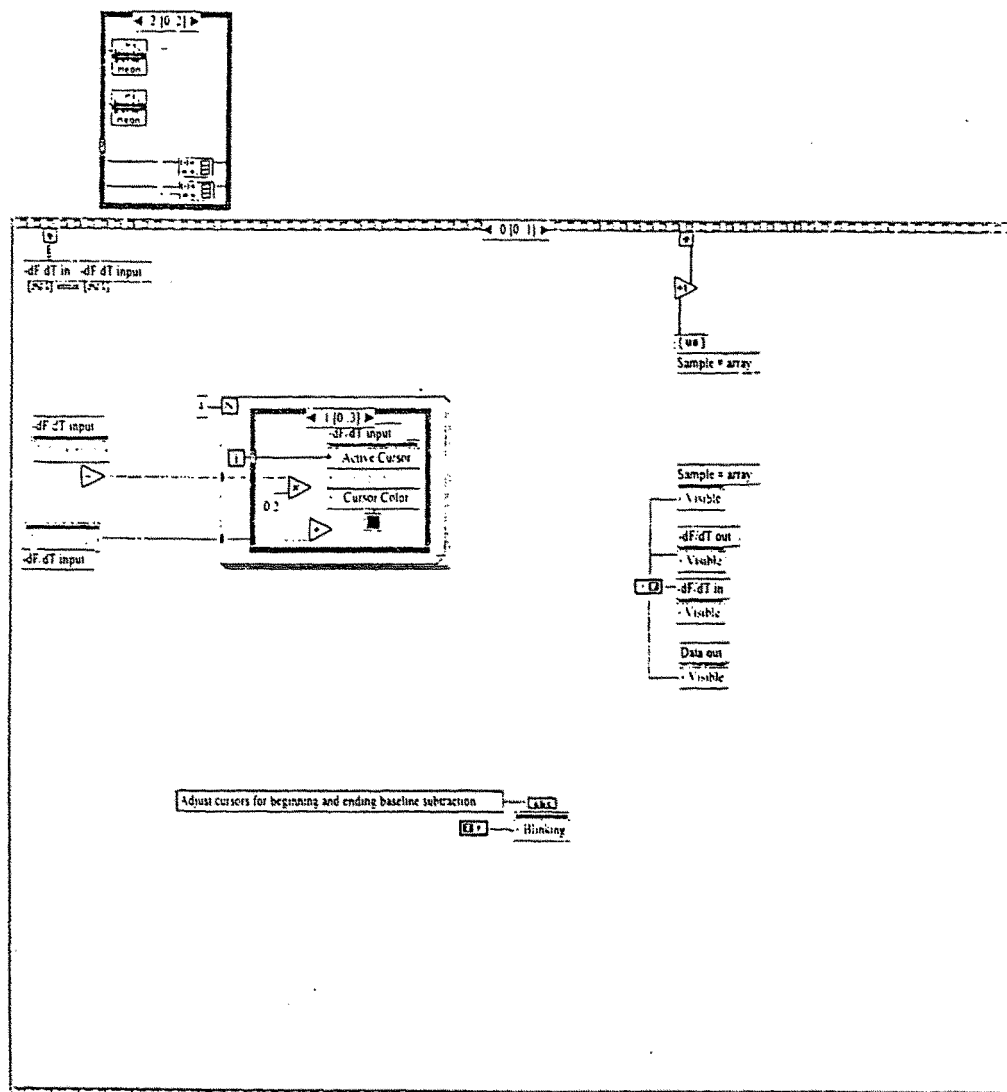
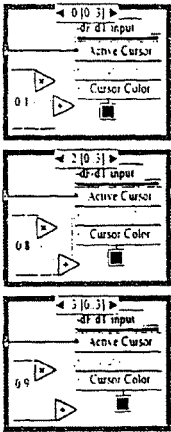


Fig. 81

Fondo.vi
Última modificación 3/06/97 a las 11:07 AM
Impreso el 3/06/97 a las 11:07 AM



Posición en jerarquía



Lista de SubVis

 Media.vi
C:\LABVIEW\vi.lib\ANALYSIS\5stat.lib\Media.vi

Historial

Fig. 82

Fondo.vi
Última modificación 3/06/97 a las 11:07 AM
Impreso el 3/06/97 a las 11:07 AM
"Fondo.vi Historial"
Revisión actual : 58

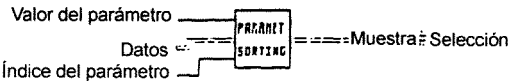
Página 6



Fig. 83

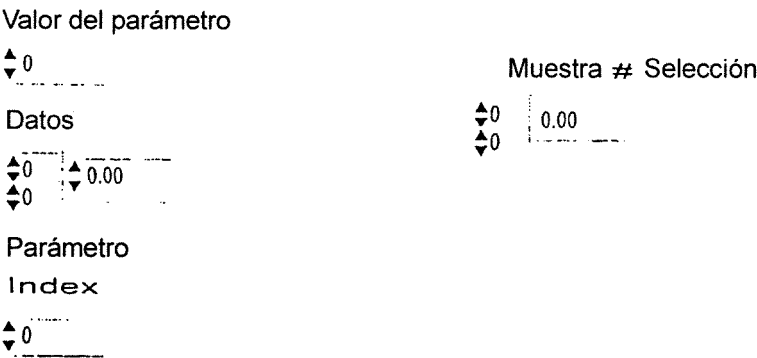
Clasificación del número de muestra
Última modificación 23/03/97 a las 10:23 PM
Impreso el 3/06/97 a las 11:07 AM

Cristal conector



Clasificación del número de muestra

Panel frontal



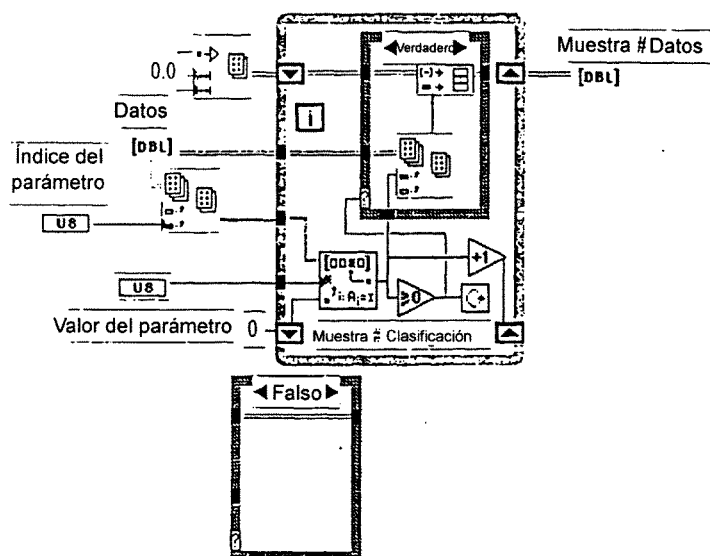
Controles e indicadores

- [DBL] Datos 
- [US] Valor del parámetro 
- [US] Parámetro Index 
- [DBL] Muestra # Datos 

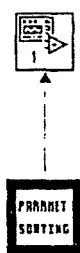
Fig. 84

Clasificación del número muestra.vi
Última modificación 23/03/97 a las 10:23 PM
Impreso el 3/06/97 a las 11:07 AM

Diagrama de bloques



Posición en jerarquía



Lista de SubVIs

Historial

"Clasificación del número de muestra.vi historial"
Revisión actual: 14

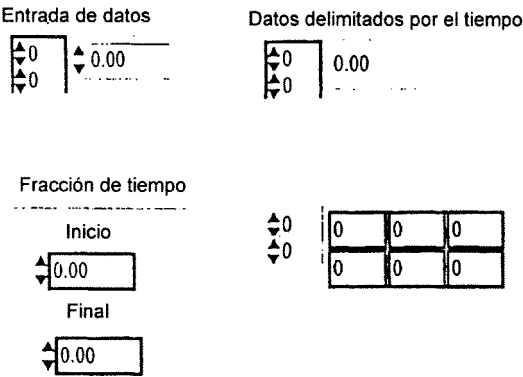
Fig. 85

Clasificación del tiempo.vi
Última modificación 23/03/97 a las 10:23 PM
Impreso el 3/06/97 a las 11:08 AM

Cristal conector



Panel frontal



Controles e indicadores

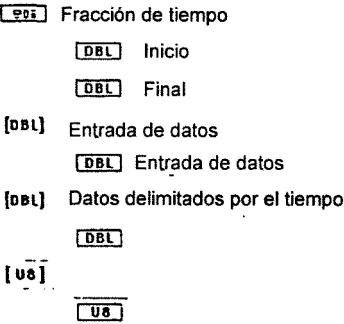


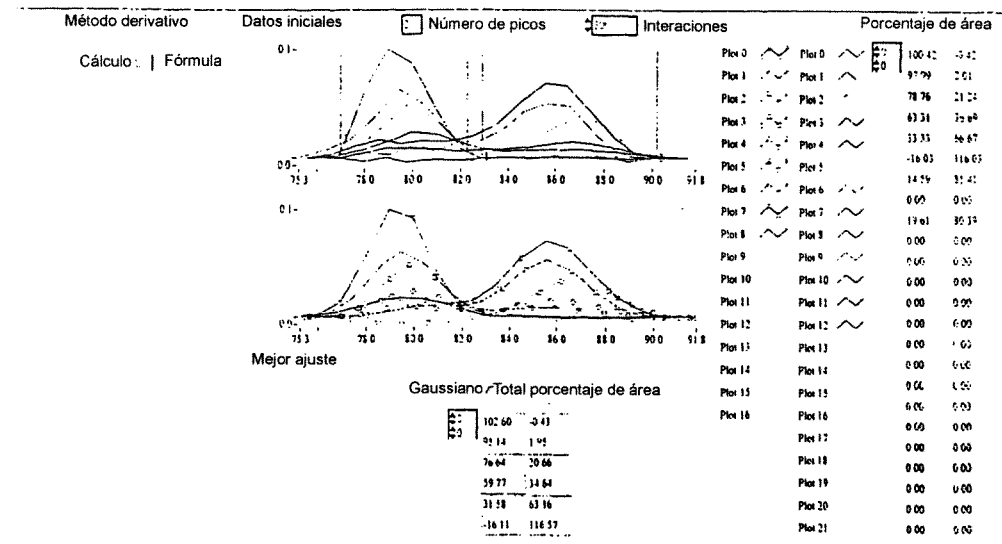
Fig. 86

Última modificación 19/05/97 a la 1:14 PM

Cristal conector

INT
Λ's

Panel frontal



Controles e indicadores

51

[DBL]

DBL

[DBL]

DBL

U16 Interacciones

TF Método de la derivación

[A:] Datos de inicio

Fig. 88

Suma de gaussianos.vi

Última modificación 19/5/97 a la 1:14 PM

Impreso el 3/6/97 a las 11:08 AM

- [P:] Datos de partida
- [U8] Número de picos
- [DBL] Porcentaje de área
- [DBL]
- [DBL] Gaussiano / porcentaje del área total
- [DBL]

Diagrama de bloques

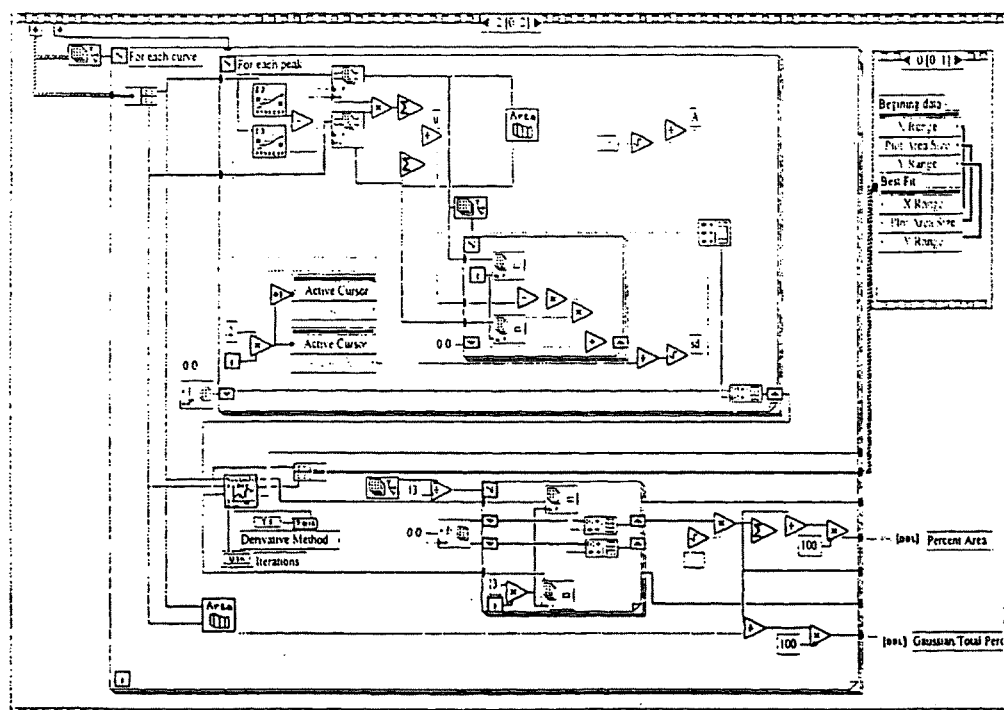


Fig. 89

Suma de gaussianos.vi
 Última modificación 19/5/97 a la 1:14 PM
 Impreso el 3/6/97 a las 11:08 AM

Página 3 INT
^s

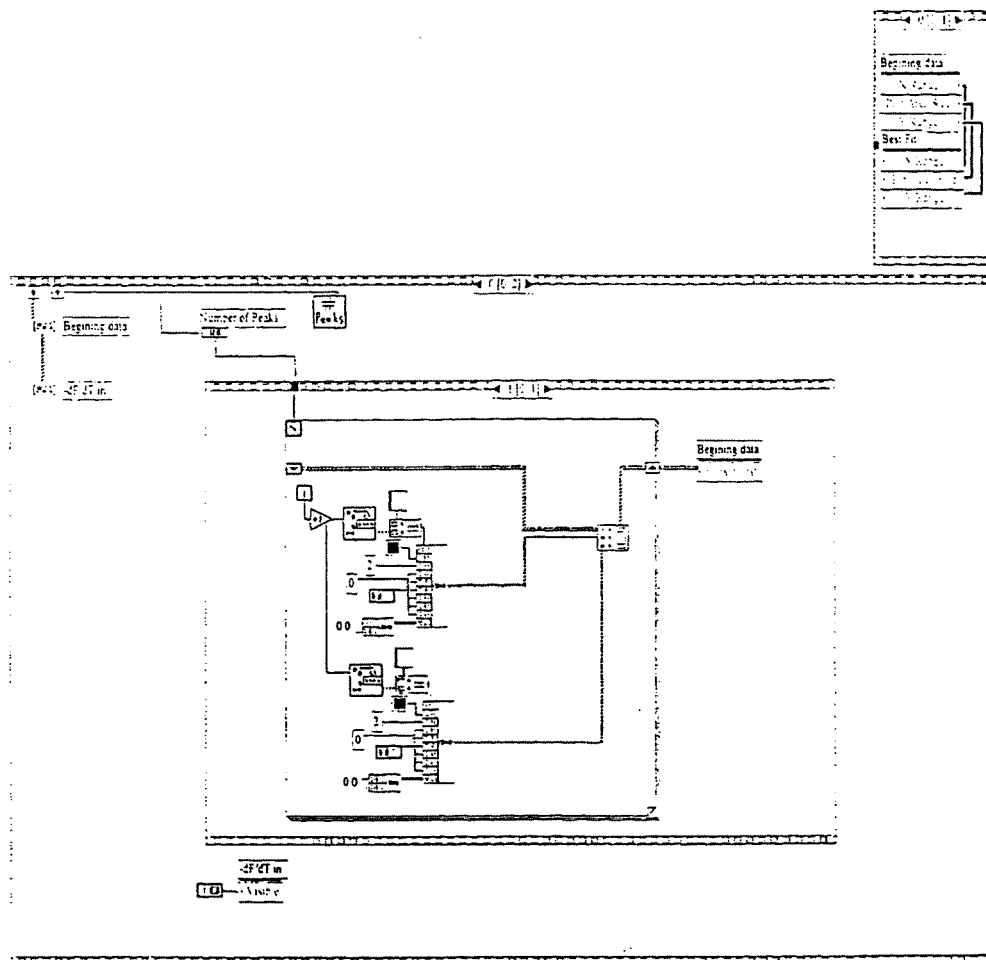


Fig. 90

Suma de gaussianos.vi

Última modificación 19/5/97 a la 1:14 PM

Impreso el 3/6/97 a las 11:08 AM

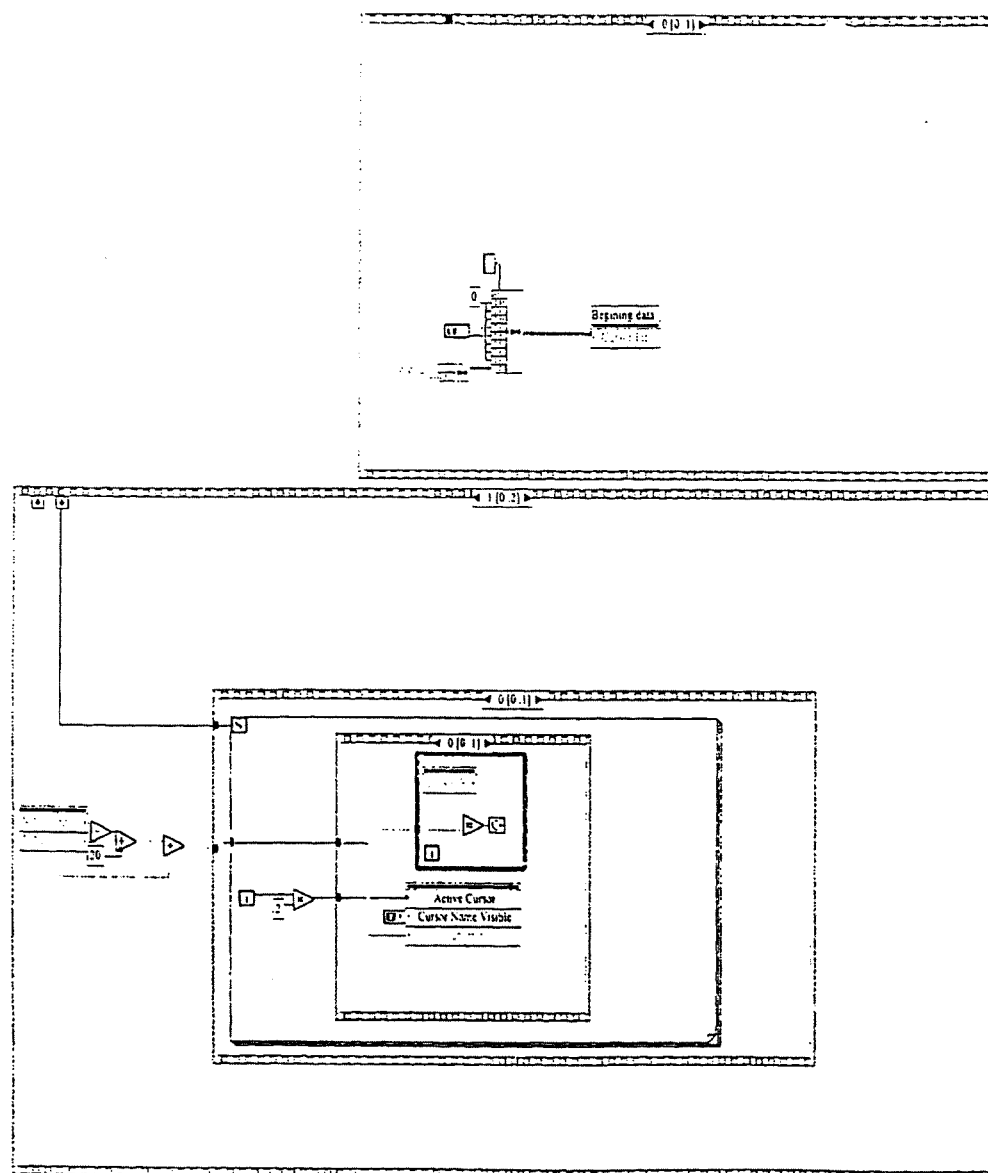
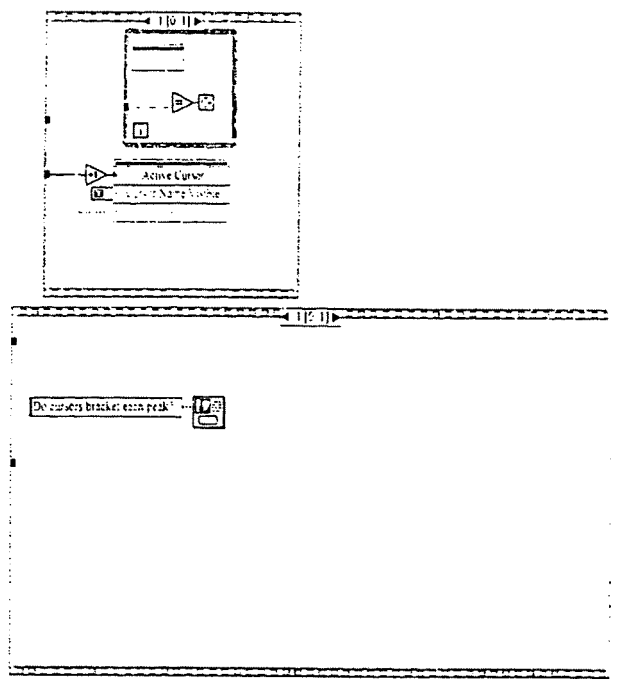


Fig. 91

Suma de gaussianos.vi
 Última modificación 19/5/97 a la 1:14 PM
 Impreso el 3/6/97 a las 11:08 AM

Página 5



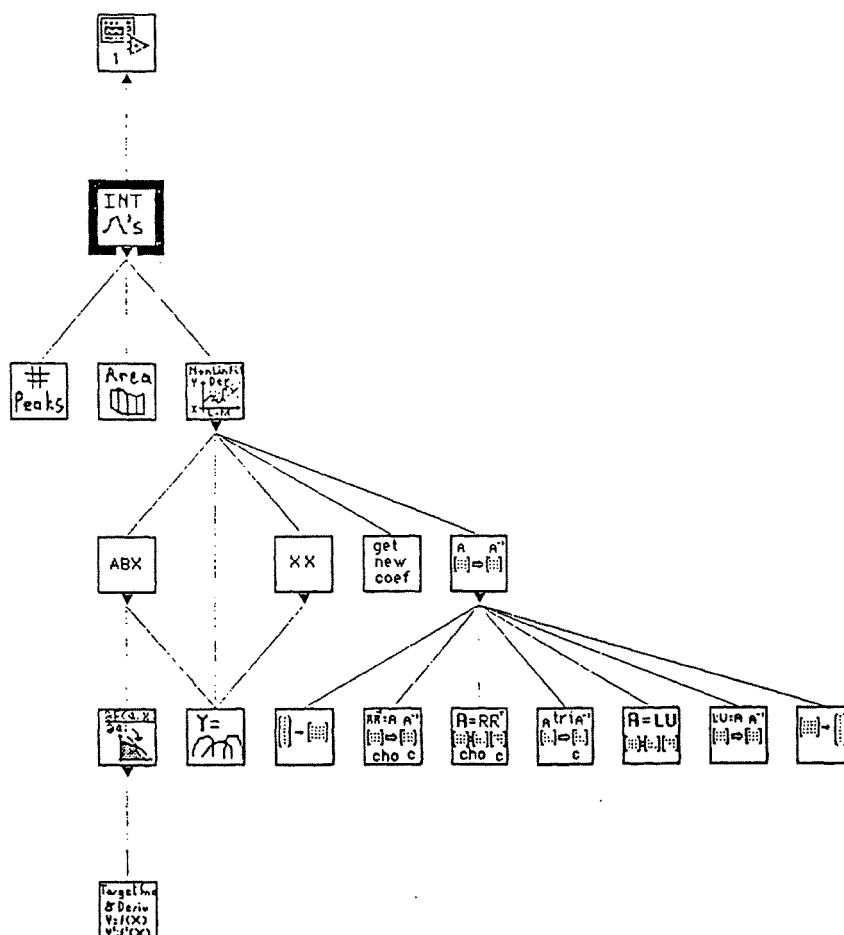
Posición en jerarquía

Fig. 92

Suma de gaussianos.vi

Última modificación 19/5/97 a la 1:14 PM

Impreso el 3/6/97 a las 11:08 AM



Lista de SubVIs

	Suma de gaussianos ajustada.vi C:\Data \Fitsuma de gaussianos.vi
	Pico#.vi C:\Data \Pico#.vi
	Área trapezoidal.vi C:\Data \Área trapezoidal.vi

Fig. 93

Suma de gaussianos.vi

Última modificación 19/5/97 a la 1:14 PM

Impreso el 3/6/97 a las 11:08 AM

Historial

"Suma de gaussianos.vi historial"

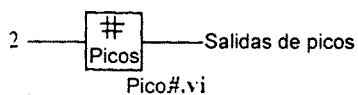
Revisión actual: 35

Fig. 94

Pico#.vi
 Última modificación 16/04/97 a las 7:31 PM
 Impreso el 3/6/97 a las 11:09 AM

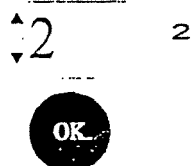
Página 1 

Cristal conector



Panel frontal

¿Cuántos picos quiere
 ajustar?



Controles e indicadores

 2
 stop
 Salida de picos

Diagrama de bloque

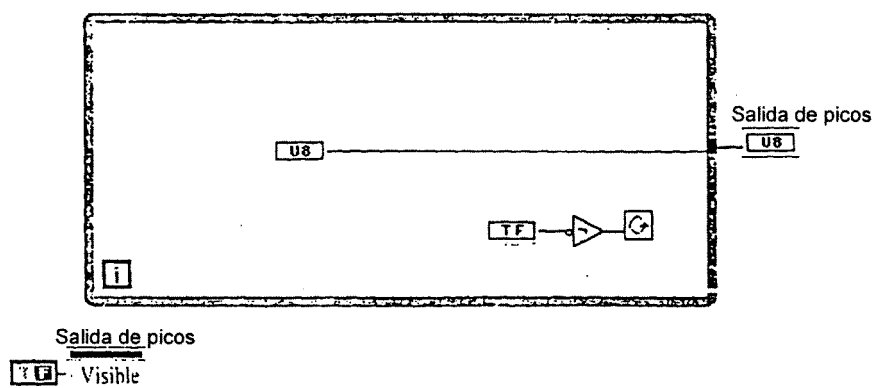


Fig. 95

Pico#.vi
Última modificación 16/4/97 a las 7:31 PM
Impreso el 3/6/97 a las 11:09

Página 2



Posición en jerarquía



Lista de SubVis

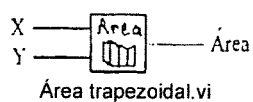
Historial

"Pico#.vi historial"
Revisión actual : 8

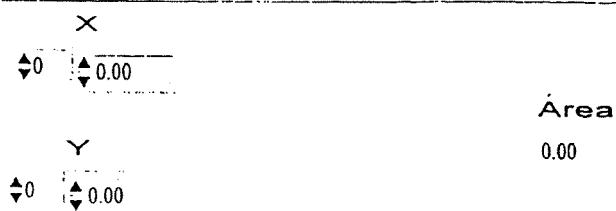
Fig. 96

Área trapezoidal.vi
Última modificación 24/4/97 a las 9:26 PM
Impreso el 3/6/97 a las 11:09 AM

Cristal conector



Panel frontal



Controladores e indicadores

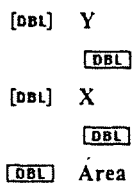


Diagrama de bloque

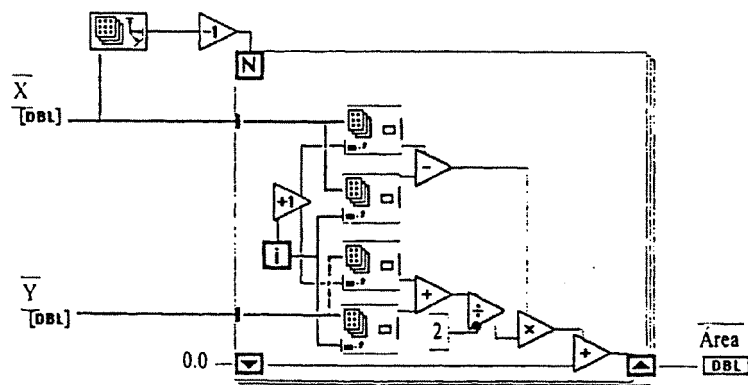


Fig. 97

Área trapezoidal.vi

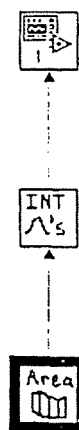
Última modificación 24/4/97 a las 9:26 PM

Impreso el 3/6/97 a las 11:09 AM

Página 2



Posición en jerarquía



Lista de SubVIs

Historial

"Área trapezoidal.vi historial"
Revisión actual: 3

Fig. 98

Suma de gaussianos ajustada.vi

Última modificación el 16/5/97 a las 12:24 AM

Impreso el 3/6/97 a las 11:11 AM

Página 1



Cristal conector

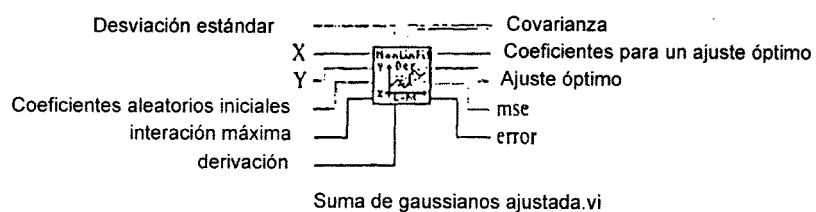


Fig. 99



SUMA DE GAUSSIANOS.VI

ÚLTIMA MODIFICACIÓN EL 16/5/97 A LAS 12:24 AM

IMPRESO EL 3/6/97 A LAS 11:11 AM

AJUSTE NO LINEAL LEV-MAR:

=====

ESTE VI UTILIZA EL ALGORITMO DE LEVENBERG-MARQUARDT PARA DETERMINAR EL CONJUNTO DE COEFICIENTES DE MÍNIMOS CUADRADOS QUE MEJOR AJUSTAN EL CONJUNTO DE PUNTOS DE LOS DATOS DE ENTRADA (X, Y), TAL COMO SE EXPRESA POR UNA FUNCIÓN NO LINEAL $Y=F(X,A)$, EN LA QUE A ES EL CONJUNTO DE COEFICIENTES. ESTE VI TAMBIÉN PROPORCIONA LA CURVA DE AJUSTE ÓPTIMA $Y=F(X,A)$.

EL USUARIO NECESITA ABRIR UN SUB-VI "TARGET FNC & DERIV NONLIN" E INTRODUCIR SU FUNCIÓN NO LINEAL $F(X,A)$ EN EL NODO DE LA FÓRMULA. SI EL USUARIO ELIGE EL CÁLCULO DE LA FÓRMULA POR UN MÉTODO DERIVATIVO, NECESITA TAMBIÉN INTRODUCIR LA DERIVADA PARCIAL DE $F(X,A)$ CON RESPECTO A (A).

ENTRADAS:

X: PUNTOS DE DATOS EXPERIMENTALES.

Y: PUNTOS DE DATOS EXPERIMENTALES.

DESVIACIÓN ESTÁNDAR: DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LOS DATOS DE CADA EXPERIMENTO. SI NO TIENE SUFICIENTE CONOCIMIENTO SOBRE ESTE PARÁMETRO, DÉJELO EN BLANCO.

COEFICIENTES ALEATORIOS INICIALES: SUS COEFICIENTES ALEATORIOS. SI ESTÁN MUY LEJOS DE LOS COEFICIENTES ADECUADOS, EL VI NO CONSEGUIRÁ DEVOLVER LOS COEFICIENTES ADECUADOS NI EL AJUSTE DE CURVA ÓPTIMO.

ITERACIÓN MÁXIMA: MÁXIMA ITERACIÓN QUE INTENTARÁ EL ALGORITMO. SI NO PUEDE CONVERGER CUANDO SE ALCANZA LA MÁXIMA ITERACIÓN, EL VI DEVOLVERÁ UN ERROR.

DERIVACIÓN: EXISTEN DOS MANERAS DE CALCULAR LA DERIVADA PARCIAL DE $F(X,A)$ CON RESPECTO AL COEFICIENTE A. SI ELIGE EL CÁLCULO NUMÉRICO, EL VI UTILIZARÁ UN MÉTODO NUMÉRICO PARA CALCULARLAS DE FORMA INTERNA. SI ELIGE EL CÁLCULO CON FÓRMULA, SE NECESITA INTRODUCIR LA FÓRMULA DERIVADA EN EL SUB-VI "TARGET FNC & DERIV NONLIN". EL CÁLCULO CON FÓRMULA ES MÁS PRECISO QUE EL CÁLCULO NUMÉRICO.

SALIDAS:

COEFICIENTES ALEATORIOS ÓPTIMOS: LOS COEFICIENTES DE LOS MÍNIMOS CUADRADOS.

AJUSTE ÓPTIMO: LA CURVA DE AJUSTE ÓPTIMA $F(X,A)$.

COVARIANZA: COVARIANZA DE LA MATRIZ DE COEFICIENTES ALEATORIOS ÓPTIMOS.

MSE: $MSE = 1/N \cdot \sum [(Y(I) - F(X(I), A)) / STD(I)]^2$

(STD: DESVIACIÓN ESTÁNDAR)

Fig. 100



Suma de gaussianos ajustada.vi

Última modificación el 16/5/97 a las 12:24 AM

Impreso el 3/6/97 a las 11:11 AM

Panel frontal

Ajuste no lineal Lev-Mar

X		Coefficientes para ajuste óptimo
0	0.00	0 0.00
Y		Ajuste óptimo
0	0.00	0 0.00
Desviación estándar		
0	0.00	Covarianza
Coefficientes aleatorios iniciales		0 0.00
0	0.00	0
interacción máxima		mse
200		0.0000E+0
derivación		error
numérica		0

Controles e indicadores

[DBL] X

X es el conjunto de los puntos de los datos que representan la variable independiente X

[DBL] X es la entrada del conjunto de los puntos de los datos que representan la variable dependiente X**[DBL]** Y

Y es el conjunto de los puntos de los datos que representan los valores observados de la variable dependiente Y

[DBL]**[DBL]** Coeficientes aleatorios iniciales

Los coeficientes aleatorios iniciales son la idea inicial de los coeficientes solución.

[DBL]

Fig. 101



SUMA DE GAUSSIANOS AJUSTADA.VI
ÚLTIMA MODIFICACIÓN EL 16/5/97 A LAS 12:24 AM
IMPRESO EL 3/6/97 A LAS 11:11 AM



ITERACIÓN MÁXIMA
LA ITERACIÓN MÁXIMA ES EL MÁXIMO DE ITERACIONES EJECUTADAS QUE SE UTILIZAN EN EL ALGORITMO DE AJUSTE NO LINEAL.

SI SE SUPERA LA ITERACIÓN MÁXIMA Y NO SE HA ENCONTRADO LA SOLUCIÓN, ESTE VI DEVOLVERÁ UN ERROR. EN ESTE PUNTO, SE DEBE INCREMENTAR LA ITERACIÓN MÁXIMA, EL AJUSTE DE LOS COEFICIENTES ALEATORIOS INICIALES O CAMBIAR LA FUNCIÓN OBJETIVO.



DERIVACIÓN
LA DERIVACIÓN SE UTILIZA PARA ESPECIFICAR EL MÉTODO UTILIZADO PARA CALCULAR EL JACOBIANO.

0: APROXIMACIÓN NUMÉRICA
1: EVALUACIÓN POR FÓRMULA. DEBE ESPECIFICAR LA FÓRMULA PARA EL JACOBIANO EN EL DIAGRAMA "TARGET FNC & DERIV NONLIN"

[dbl]

DESVIACIÓN ESTÁNDAR
LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR ES EL CONJUNTO DE DESVIACIONES ESTÁNDAR, SIGMA (I) PARA LOS PUNTOS (X(I), Y(I)).

SI TODAS LAS DESVIACIONES ESTÁNDAR SON IGUALES O SON DESCONOCIDAS, DEJE ESTE CONTROL DESCONECTADO Y LAS DESVIACIONES ESTÁNDAR SE ESTABLECERÁN EN 1.0.



[dbl]

COEFICIENTES DE AJUSTE ÓPTIMO
LOS COEFICIENTES DE AJUSTE ÓPTIMO SON EL CONJUNTO DE COEFICIENTES QUE MINIMIZAN EL ERROR CHI CUADRADO ENTRE EL VECTOR SOLUCIÓN Y LOS VALORES DE Y OBSERVADOS.



[nbl]

AJUSTE ÓPTIMO
EL AJUSTE ÓPTIMO SON LOS DATOS AJUSTADOS $Z(I)=F(X(I),A)$, DONDE A ES EL CONJUNTO DE COEFICIENTES DE AJUSTE ÓPTIMOS.



[dbl]

MSE
MSE ES EL ERROR CHI CUADRADO ENTRE EL AJUSTE ÓPTIMO Y LOS VALORES DE Y OBSERVADOS.



ERROR
PUEDE CONECTAR ESTA SALIDA A LA BÚSQUEDA DEL PRIMER ERROR DE VI PARA PRODUCIR UN CLÚSTER DE ERRORES. A CONTINUACIÓN, ESTE CLÚSTER SE PUEDE CONECTAR AL MANEJADOR SIMPLE DE ERRORES DE VI O AL MANEJADOR GENERAL DE ERRORES DE VI PARA UN INFORME INMEDIATO DE CUALQUIER ERROR. TAMBIÉN PUEDE BUSCAR LOS CÓDIGOS DEL ERROR EN EL APÉNDICE DE LOS CÓDIGOS DE ERROR EN EL MANUAL DE REFERENCIAS CRUZADAS DE LABVIEW.

[dbl]

COVARIANZA
LA COVARIANZA ES LA MATRIZ DE LAS COVARIANZAS C.
 $C[J,K]$ ES LA COVARIANZA ENTRE $A[J]$ Y $A[K]$, Y $C[IJ,J]$ ES LA VARIANZA DE $A[J]$.

Fig. 102



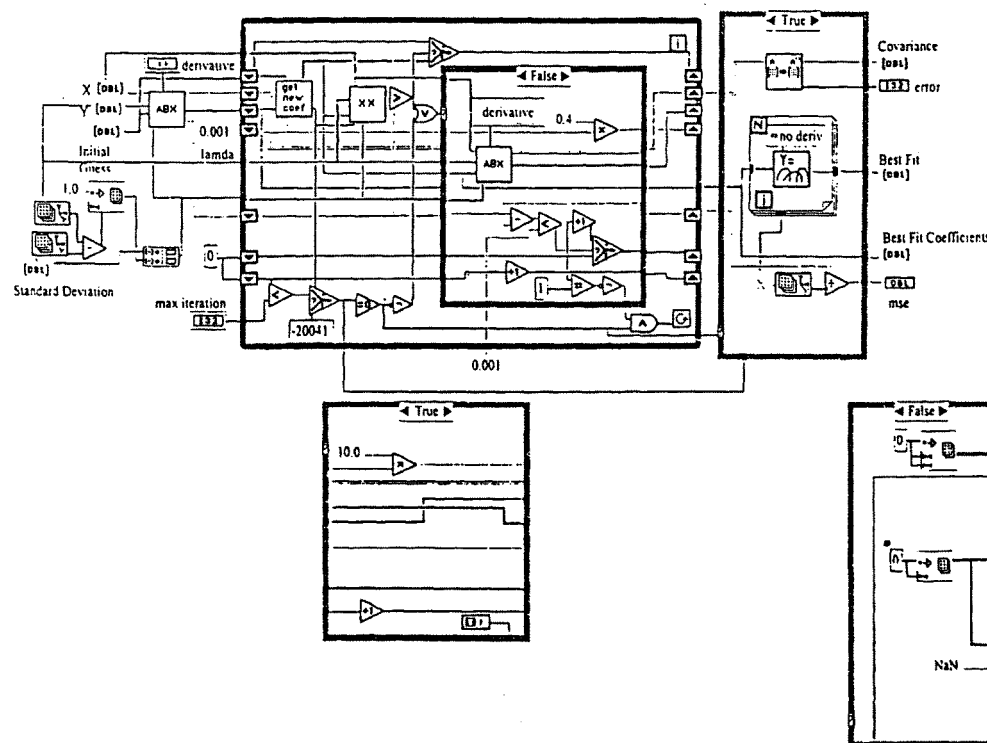
Suma de gaussianos ajustada.vi

Última modificación el 15/5/97 a las 12:24 AM

Impreso el 3/6/97 a las 11:11 AM

DBL

Diagrama de bloque



Posición en jerarquía

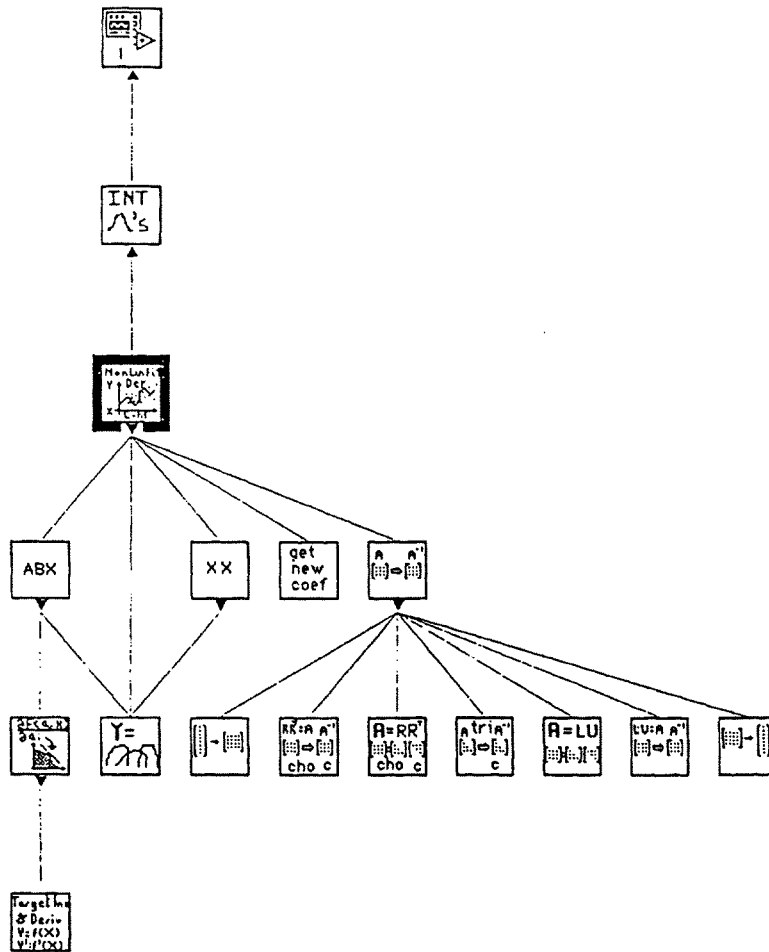
Fig. 103



Suma de gaussianos.vi

Última modificación el 16/5/97 a las 12:24 AM

Impreso el 3/6/97 a las 11:11 AM



Lista de SubVIs

	Matriz inversa.vi C:\LABVIEW\vi.lib\Analysis\7\inalg.lib\Matriz inversa.vi
	obtención de nuevos coeficientes.vi C:\LABVIEW\vi.lib\Analysis\6\fits.lib\obtención de nuevos coeficientes.vi
	Gauss Lev-Mar abx.vi C:\data 1\Gauss Lev-Mar abx.vi

Fig. 104



Suma de gaussianos ajustada.vi
 Última modificación el 16/5/97 a las 12:24 AM
 Impreso el 3/6/97 a las 11:11 AM



Gauss Lev-Mar xx.vi
 C:\data 1\Gauss Lev-Mar xx.vi



Suma de gaussianos.vi
 C:\data 1\ Suma de gaussianos.vi

Historial

"Suma de gaussianos ajustada.vi historial"

Revisión actual: 26

rev. 8 Sun, Sep 25, 1994 1:48:18 PM greggf

VI fue convertido de LabVIEW 3.1b1 a LabVIEW versión 3.1.

Fig. 105

ES 2 326 050 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

- 5 (i) SOLICITANTE: Wittwer, Carl T.
Ririe, Kirk M.
Rasmussen, Randy P.
- 10 (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Monitorización de la hibridación durante la PCR
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 27
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- 15 (A) NOMBRE: Thorpe, North and Western, L.L.P.
(B) CALLE: 9035 South 700 East, Suite 200
(C) CIUDAD: Sandy
(D) ESTADO: Utah
20 (E) PAÍS: Estados Unidos
(F) CP: 84070
- (v) FORMATO DE LECTURA EN EL ORDENADOR:
- 25 (A) TIPO DE MEDIO: Disquete, 3,5 pulgadas, capacidad 1,44 Mb
(B) ORDENADOR: Toshiba T2150CDS
(C) SISTEMA OPERATIVO: Windows 95
30 (D) SOFTWARE: Word Perfect 7.0
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
(B) FECHA DE REGISTRO:
35 (C) CLASIFICACIÓN:
- (vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/658.993
40 (B) FECHA DE REGISTRO: 4-JUNIO-96
- (vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/818.267
45 (B) FECHA DE REGISTRO: 17-MARZO-97
- (viii) INFORMACIÓN DEL APODERADO/AGENTE:
- (A) NOMBRE: Alan J. Howarth
50 (B) NÚMERO DE REGISTRO: 36.553
(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 8616.CIP7
- (ix) INFORMACIÓN POR TELECOMUNICACIÓN:
- 55 (A) TELÉFONO: (801)566-6633
(B) TELEFAX: (801)566-0750

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 1

- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
(B) TIPO: Ácido nucleico
65 (C) CADENAS: Una
(D) TOPOLOGÍA: Lineal

ES 2 326 050 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1

CGTGGTGGAC TTCTCTCAAT 20

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 2

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

10 (B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENAS: Una

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2

AGAAGATGAG GCATAGCAGC 20

20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 35 pares de bases

25 (B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENAS: Una

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3

CAAACAGACA CCATGGTGCA CCTGACTCCT GAGGA 35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 4

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

40 (C) CADENAS: Una

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4

45 AAGTCTGCCG TTACTGCCCT GTGGGGCAAG 30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 5

50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

55 (C) CADENAS: Una

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5

TCTGCCGTTA CTGCCCTGTG GGGCAAG 27

60

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 6

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

65 (A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

ES 2 326 050 T3

(C) CADENAS: Una

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6

5

CAACTTCATC CACGTNCACC 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 7

10

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

15

(C) CADENAS: Una

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7

20

CTGTCCGTGA CGTGGATT 18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 8

25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

30

(C) CADENAS: Una

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8

35

AAGTCCTCCG AGTATAGC 18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 9

40

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 46 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENAS: Una

45

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9

TAATCTGTAA GAGCAGATCC CTGGACAGGC GAGGAATACA GGTATT 46

50

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 10

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 46 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENAS: Una

60

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10

TAATCTGTAA GAGCAGATCC CTGGACAGGC AAGGAATACA GGTATT 46

65 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 11

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 326 050 T3

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENAS: Una

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11

TAATCTGTAA GAGCAGATCC 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 12

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENAS: Una

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12

TGTTATCACA CTGGTGCTAA 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 13

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENAS: Una

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 13

AATACCTGTA TTCCTCGCCT GTC 23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 14

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENAS: Una

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 14

ATGCCTGGCA CCATTAAAGA 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 15

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENAS: Una

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 15

GCATGCTTTG ATGACGCTTC 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 16

ES 2 326 050 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) CADENAS: Una
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 16

CGGATCTTCT GCTGCCGTCG 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 17

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) CADENAS: Una
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 17

CCTCTGACGT CCATCATCTC 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 18

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 31 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) CADENAS: Una
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 18

GAAGTCTGCC GTTACTGCCC TGTGGGGCAA G 31

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 19

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 26 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) CADENAS: Una
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 19

CTGCCGTACT GCCCTGTGGG GCAAGG 26

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 20

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 26 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) CADENAS: Una
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 20

ATGCCCTCCC CCATGCCATC CTGCGT 26

ES 2 326 050 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 21

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENAS: Una

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 21

CAACTTCATC CACGTTCAACC 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 22

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENAS: Una

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 22

GTCTGCCGTT ACTGCCCTGT GGGGCAA 27

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 23

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENAS: Una

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 23

CCTCAAACAG ACACCATGGT GCACCTGAGT CC 32

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 24

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENAS: Una

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 24

GAAGTCTGCC GTTACTGCCC TGTGGGGCAA 30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENAS: Una

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 25

ES 2 326 050 T3

TGAAGGAGAA GGTGTCTGCG GGA 23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 26

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

10

(C) CADENAS: Una

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 26

15

CCTCGGCTAA ATAGTAGTGC GTCGA 25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 27

20

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

25

(C) CADENAS: Una

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 27

30

AGGACGGTGC GGTGAGAGTG 20

35

40

45

50

55

60

65