

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 977**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6844 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2012 PCT/JP2012/073710**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO13039228**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2012 E 12832061 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2762562**

54 Título: **Método para detectar ácido nucleico diana**

30 Prioridad:

14.09.2011 WO PCT/JP2011/071048
03.08.2012 JP 2012173347

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
09.01.2020

73 Titular/es:

NGK INSULATORS, LTD. (100.0%)
2-56, Suda-cho, Mizuho-ku
Nagoya-shi, Aichi 467-8530, JP

72 Inventor/es:

NIWA, KOUSUKE;
HIROTA, TOSHIKAZU y
KAWASE, MITSUO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 736 977 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para detectar ácido nucleico diana

5 Campo técnico

La presente descripción se refiere a una técnica para detectar un ácido nucleico diana.

Descripción de la técnica anterior

10 Hasta ahora, se han propuesto métodos para detectar, identificar y ensayar exhaustivamente ácidos nucleicos, como un método para analizar los genes de organismos individuales o investigar la presencia de virus, bacterias y organismos similares en muestras biológicas. En dichos análisis y similares, normalmente se prepara de antemano una sonda o similar asociada a una secuencia de ácido nucleico diana, y la hibridación de la sonda o similar con un
15 fragmento de ADN amplificado por un método de amplificación de ácido nucleico de una muestra biológica, se utiliza para detectar el ácido nucleico diana mediante un marcador unido a la sonda y el fragmento de ADN.

Por ejemplo, se describe un método en el que se diseñan cebadores para incluir secuencias de bases a las que puede unirse una sustancia específica en ambos extremos de un fragmento de ADN amplificado, mediante un método de
20 amplificación de ácido nucleico, y esta sustancia específica se utiliza para detectar el fragmento de ADN (documento de patente 1).

También se han desarrollado matrices especializadas para detectar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, siglas del inglés *single nucleotide polymorphisms*) (véanse, por ejemplo, los documentos de patente 2 y 3, y el documento
25 no de patente 1). En estos métodos, se prepara de antemano una sonda de detección que tiene una secuencia de bases artificial, y la etapa de preparación de muestras está diseñada para permitir la amplificación de aquellos fragmentos de ADN que tienen secuencias de bases que se unen a esta secuencia de nucleótidos artificial.

Además, también se ha desvelado un método para utilizar una matriz de ADN extraído de bacterias para detectar
30 visualmente la sensibilidad a los fármacos de la bacteria de la tuberculosis (documento no de patente 2).

La PCR y otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos normalmente amplifican partes diana bicatenarias. Por lo tanto, el producto de amplificación de ácidos nucleicos es también bicatenario. Para determinar si se ha producido el producto de amplificación diana, la doble cadena se desnaturaliza con calor en cadenas sencillas, y algunas de las
35 cadenas sencilla se hibridan con un oligonucleótido u otra sonda para detectar el producto.

Sin embargo, la eficacia de la hibridación puede disminuir cuando los ácidos nucleicos se desnaturalizan con calor en cadenas sencillas y se hibridan con una sonda.

40 Listado de citas bibliográficas**Bibliografía de patente**

Bibliografía de patente 1: documento WO 2009/034842
45 Bibliografía de patente 2: publicación de solicitud de patente japonesa N.º 2006-211982
Bibliografía de patente 3: publicación de solicitud de patente japonesa N.º 2006-101844

Bibliografía no de patente

50 Bibliografía no de patente 1: Analytical Biochemistry 364 (2007), 78-85
Bibliografía no de patente 2: Proceedings of the 14th Annual Meeting of the Association for the Rapid Method and Automation in Microbiology (ARMAM): 45-50

Sumario de la invención

55 En el método descrito en el documento de patente 1, un sitio de unión a una sustancia específica (secuencia de bases específica que puede unirse con una sustancia específica) en un fragmento de ADN amplificado, es reconocido por una sustancia específica, que se une a la secuencia de bases específica. Sin embargo, en el fragmento de ADN amplificado, incluso la secuencia de bases específica, está en forma de una doble cadena con una cadena
60 complementaria, en lugar de ser una sola cadena que puede interaccionar fácilmente con la sustancia específica. Por lo tanto, el reconocimiento de la secuencia de bases específica por la sustancia específica no es muy eficaz, y es necesario concentrar el fragmento bicatenario unido a la sustancia específica.

Mientras tanto, en los métodos descritos en los documentos de patente 2 y 3 y en el documento no de patente 1, la
65 reactividad se mejora realizando la amplificación con una concentración relativamente más alta de un cebador (denominada PCR asimétrica) o similar en la etapa de marcaje, para amplificar de forma deliberada y selectiva la

cadena de ADN que reacciona con la sonda en la matriz. Sin embargo, en dicha PCR asimétrica, la eficacia de la propia amplificación tiende a disminuir.

Además, aunque la bacteria de la tuberculosis puede detectarse visualmente con el método descrito en el documento de no patente 2, el ADN extraído de la bacteria debe desnaturalizarse con calor antes de aplicarse a la matriz.

En la hibridación de sondas habitual, los fragmentos amplificados de ADN utilizados como muestra son, por supuesto, fragmentos bicatenarios, y normalmente se desnaturalizan con calor o álcali para obtener cadenas sencilla para conseguir una hibridación eficaz con la sonda. Sin embargo, existe el riesgo de que los fragmentos amplificados desnaturalizados vuelvan a adoptar gradualmente su forma bicatenaria, reduciendo la eficiencia de la hibridación. Para controlar esto, puede ser necesario optimizar el tiempo de hibridación, la temperatura y otras condiciones.

Otro método posible es uno en el que como producto de amplificación de una reacción de amplificación de ácido nucleico, se obtiene ADN parcialmente bicatenario que comprende cadenas sencillas (denominadas cadenas identificadoras de acuerdo con este documento) en los extremos 5' del ácido nucleico del ADN bicatenario. El ADN parcialmente bicatenario obtenido como producto de amplificación en este método puede hibridarse con otras cadenas de ADN y similares en ambos extremos. Por tanto, la cadena de identificación en un extremo del ADN parcialmente bicatenario puede utilizarse para hibridarse con una sonda, mientras que la otra cadena de identificación puede utilizarse para hibridar con una sonda marcadora o similar. Este método tiene la ventaja de eliminar la etapa de desnaturalización con calor, pero los inventores han descubierto los siguientes problemas. Principalmente, el problema es que cuando se utiliza dicho ADN parcialmente bicatenario, resulta más difícil diseñar las secuencias de bases de las cadenas de identificación. Es decir, dado que el ADN parcialmente bicatenario tiene dos cadenas de identificación, para detectar un solo ácido nucleico diana utilizando esta doble cadena parcial, una cadena de identificación debe ser una secuencia que se hibride específicamente con el ácido nucleico diana, mientras que la otra cadena de identificación debe ser una secuencia que no se hibride con el ácido nucleico diana ni inhiba (interfiera con) la hibridación entre la primera cadena de identificación y el ácido nucleico. Además, cuando el objetivo es detectar simultáneamente múltiples ácidos nucleicos diana, ambas cadenas de identificación deben diseñarse para que no interfieran con otros ácidos nucleicos diana que no son el objetivo de este ADN parcialmente bicatenario. Además, las secuencias de bases de ambas cadenas de identificación deben diseñarse de modo que no se hibriden entre sí.

Además, en este método también es más difícil diseñar las condiciones de amplificación. Esto se debe a que las cadenas de identificación excedentes, que no participan en la amplificación, están unidas a los cebadores directos e inversos, respectivamente.

Como resultado, en este método existe el riesgo de que disminuya la eficacia en la etapa de amplificación y en la etapa de hibridación y cromatografía de ácidos nucleicos, y de que disminuya la precisión de la detección debido a una hibridación errónea. En particular, como el movimiento y la evaporación del medio de revelado son factores que influyen en la cromatografía de ácidos nucleicos, ha habido un problema de baja eficacia de hibridación en comparación con la hibridación por inmersión, en la que la matriz se sumerge en la solución de hibridación.

A la luz de estas circunstancias, esta Descripción proporciona un método de detección de ácido nucleico diana por el cual los problemas con fragmentos de ADN de muestra en la hibridación de sondas convencional pueden resolverse para conseguir una hibridación de sondas eficaz, y un agente de amplificación de genes y una composición de hibridación que utilice este método.

Esta Descripción también proporciona un método y un kit de detección de ácido nucleico diana que son más adecuados para el uso práctico, o en otras palabras, que permiten que un ácido nucleico diana se detecte con mayor precisión con una operativa fácil.

Los inventores investigaron modificaciones en los métodos de amplificación de ácido nucleico desde la perspectiva de mejorar la sensibilidad y la eficacia de la hibridación con la sonda cuando se aplica a la hibridación de la sonda. Como resultado de tanta investigación, se descubrió que la sensibilidad de detección podría mejorarse con una alta eficacia de hibridación introduciendo un sitio capaz de inhibir o detener el progreso de una reacción de polimerasa en una parte de un cebador utilizado en la amplificación de ácido nucleico. También se descubrió que la hibridación podría realizarse con alta sensibilidad en un corto período de tiempo sin tener que desnaturalizar aplicando calor. Esta Descripción proporciona los siguientes medios basados en estos hallazgos.

Un método para detectar un ácido nucleico diana, comprendiendo el método:

- una etapa de hibridación en la que uno o dos o más ácidos nucleicos parcialmente bicatenarios asociados con uno o dos o más ácidos nucleicos diana, se ponen en contacto con una o dos o más sondas que están en un soporte de cuerpo en fase sólida y se asocian con el uno o dos o más ácidos nucleicos diana, en condiciones que permitan la hibridación, donde la etapa de hibridación se realiza mediante cromatografía de ácidos nucleicos; y
- una etapa de detección en la que se detecta el producto de hibridación producido en la etapa de hibridación, donde cada uno de los uno o dos o más ácidos nucleicos parcialmente bicatenarios tiene una parte de identificación

monocatenaria solo en el extremo 5' de una primera cadena, que consta únicamente de ácidos nucleicos naturales y que es una secuencia identificadora capaz de hibridarse específicamente con una de las sondas, y tiene un marcador o

una sustancia que se une a un marcador en el extremo 5' de una segunda cadena,

antes de la etapa de hibridación, una etapa de amplificación en la que el ácido nucleico parcialmente bicatenario se obtiene como un producto de una reacción de amplificación realizada en un ácido nucleico diana utilizando un primer cebador que tiene la secuencia identificadora y una primera secuencia de reconocimiento que reconoce una primera secuencia de bases en el ácido nucleico diana y que tiene un sitio enlazador capaz de inhibir o

detener una reacción de ADN polimerasa dispuesto entre la secuencia identificadora y la primera secuencia de reconocimiento, y

un segundo cebador que tiene una segunda secuencia de reconocimiento que reconoce una segunda secuencia de bases en el ácido nucleico diana y el marcador o la sustancia de unión a un marcador; en donde el sitio enlazador comprende una cadena de alquileo opcionalmente sustituida con un número de elementos de 2 a 40, adyacente a un nucleótido en el cebador a través de un enlace fosfodiéster; y donde el sitio enlazador está representado por la siguiente fórmula:



Fórmula (1)

(donde 5' representa el átomo de oxígeno de un enlace fosfodiéster en el extremo 5', 3' representa el átomo de fósforo de un enlace fosfodiéster en el extremo 3', y m es un número entero de 3-12).

Opcionalmente, el método comprende además el uso de la secuencia específica de la sonda de detección que se selecciona de las secuencias de bases representadas por las SEQ ID NO: 1 a 100 representadas por las SEQ ID NO en la siguiente **tabla** y sus secuencias complementarias.

[Tabla 1]

Nombre	Sec(5→3')	SEQ.ID.
D1-001	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC	1
D1-002	TGGAAGTGGGAACGCTTTAGATG	2
D1-003	TCGCTTCGTTGTAATTCGGAC	3
D1-005	TAGCCCAGTGATTTATGACATGC	5
D1-006	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT	6
D1-010	GAGTAGCAGGCAAATACCCTAGA	10
D1-012	AGTCATACAGTGAGGACCAAATG	12
D1-014	TGCTCACTTACATTACGTCCATG	14
D1-016	AGGTCCGGTAGTAATTTAGGTGC	16
D1-020	TATTCTACCAACGACATCACTGC	20
D1-023	CATCTCCAAGAATTGACCCACCA	23
D1-025	GAAGGATCGCTTTTATCTGGCAT	25
D1-026	CATTGTGAGGTACAGTCCACTT	26
D1-027	GCCCACACTCTTACTTATCGACT	27
D1-030	CCGTCTGGGTAAAGATTGCTAG	30
D1-035	ATGCCGTTGTCAAGAGTTATGGT	35
D1-038	CGCGACATTTAGTCCAGGAGATG	38
D1-040	AGACAATTAGAATCAGTGCCCCT	40
D1-041	GCATTGAGGTATTGTTGCTCCCA	41
D1-044	GAGTCCGCAAAAATATAGGAGGC	44
D1-045	GCCTCACATAACTGGAGAAACCT	45
D1-050	GGGATAGGTATTATGCTCCAGCC	50
D1-052	GCCTATATGAACCAAGCCACTGC	52
D1-062	CTAGCACAATTAATCAATCCGCC	62
D1-064	GCCTATAGTGTCGATTGTCCTCG	64
D1-065	CGATCACGGATTAATGTCACCCC	65
D1-077	CGCAGTTTGCAAGAACGAACAAA	77
D1-084	CCGTGTGTATGAGTATGACAGCA	84
D1-089	GAGTCGAAGACCTCCTCCTACTC	89
D1-090	ATGCCAATATGTACTCGTGACTC	90

(continuación)

Nombre	Sec(5→3')	SEQ.ID.
D1-095	TGCCGGTTATACCTTTAAGGACG	95
D1-097	CGCGGTACTATTAGAAAGGGCTA	97
D1-100	TGCAGTGTAAGCAACTATTGTCT	100

La presente divulgación desvela adicionalmente que la etapa de hibridación es una etapa de suministro de un líquido que contiene el fragmento amplificado como fase móvil en un cuerpo en fase sólida que contiene una pluralidad de la sonda de detección, y de expansión de la fase móvil en el cuerpo en fase sólida.

5 En el presente documento se describe un agente de amplificación de ácido nucleico para uso en un método de amplificación de ácido nucleico, que comprende, en orden desde el extremo 5', una primera secuencia de bases arbitraria y una primera secuencia de reconocimiento que reconoce una primera secuencia de bases en un ácido nucleico que se va a amplificar, y que también comprende un derivado de oligonucleótido que tiene un sitio enlazador
10 capaz de inhibir o detener una reacción de ADN polimerasa, dispuesto entre la primera secuencia de bases arbitraria y la primera secuencia de reconocimiento.

El agente de amplificación de ácido nucleico puede ser uno en el que la primera secuencia de bases tiene un marcador unido al mismo. En el presente documento se describe un kit de amplificación de ácido nucleico que contiene dos o
15 más del agente de amplificación de ácido nucleico.

En el presente documento se describe una composición para la hibridación de sondas, que comprende un fragmento de ADN bicatenario que tiene una parte monocatenaria en el lado 5' de al menos una cadena y una parte bicatenaria formada por emparejamiento de bases, en donde al menos una de las cadenas de ADN tiene un sitio enlazador capaz
20 de inhibir o detener una reacción de ADN polimerasa dispuesto entre la parte monocatenaria y la parte de unión bicatenaria, y la parte monocatenaria tiene una secuencia de reconocimiento que reconoce una secuencia de bases en la sonda.

Opcionalmente, la composición para la hibridación de sondas comprende además una parte monocatenaria en el lado 5' de la otra cadena, y tiene un marcador unido a esta parte monocatenaria.

25 En el presente documento se describe un fragmento de ADN bicatenario que tiene una parte monocatenaria en el lado 5' de al menos una cadena y una parte bicatenaria formada por emparejamiento de bases, en donde al menos una de las cadenas de ADN tiene un sitio enlazador capaz de inhibir o detener una reacción de ADN polimerasa dispuesto entre la parte monocatenaria y la parte de unión bicatenaria.

30 En el presente documento se describe un método para amplificar un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo el método una etapa de realizar la amplificación de ácido nucleico en la muestra utilizando al menos un primer cebador que tiene una primera secuencia de bases arbitraria y una primera secuencia de reconocimiento que reconoce una primera secuencia de bases en el ácido nucleico diana, y que tiene un sitio enlazador capaz de
35 inhibir o detener una reacción de ADN polimerasa dispuesto entre la primera secuencia de bases arbitraria y la primera secuencia de reconocimiento.

Los inventores investigaron modificaciones en los métodos de amplificación de ácido nucleico desde la perspectiva de una detección más práctica del ácido nucleico diana. Como resultado de una intensa investigación, se descubrió que proporcionando expresamente una estructura de ácido nucleico para la hibridación a través de cromatografía de ácidos
40 nucleicos se simplifica el diseño del cebador y sus procesos en la etapa de amplificación que tiene lugar antes de la especificación, y permite aumentar la eficacia de la tasa de hibridación en la etapa de hibridación suprimiendo al mismo tiempo una hibridación errónea. Esta Descripción proporciona los siguientes medios basados en estos hallazgos.

45 En el presente documento se describe un método para detectar un ácido nucleico diana mediante cromatografía de ácidos nucleicos, comprendiendo el método:

una etapa de hibridación en la que uno o dos o más ácidos nucleicos parcialmente bicatenarios asociados con uno o dos o más ácidos nucleicos diana, se ponen en contacto con una o dos o más sondas que están en un soporte
50 de cuerpo en fase sólida y se asocian con el uno o dos o más ácidos nucleicos diana, en condiciones que permitan la hibridación por cromatografía de ácidos nucleicos; y

una etapa de detección en la que se detecta el producto de hibridación producido en la etapa de hibridación, donde cada uno del uno o dos o más ácidos nucleicos parcialmente bicatenarios, tiene una parte identificadora monocatenaria en el extremo 5' de una primera cadena, que es una secuencia identificadora capaz de hibridarse
55 específicamente con una de las sondas, y

al menos parte del ácido nucleico bicatenario tiene un marcador o una sustancia que se une a un marcador. En el presente documento se describe un método en el que el ácido nucleico parcialmente bicatenario presenta el marcador o la sustancia de unión a un marcador en el extremo 5' de una segunda cadena.

60 En el presente documento se describe un método que comprende, antes de la etapa de hibridación, una etapa de

amplificación en la que el ácido nucleico parcialmente bicatenario se obtiene como un producto de una reacción de amplificación realizada en un ácido nucleico diana utilizando un primer cebador que tiene la secuencia identificadora y una primera secuencia de reconocimiento que reconoce una primera secuencia de bases en el ácido nucleico diana y que tiene una parte enlazadora capaz de inhibir o detener una reacción de ADN polimerasa dispuesta entre la secuencia identificadora y la primera secuencia de reconocimiento, y un segundo cebador que tiene una segunda secuencia de reconocimiento que reconoce una segunda secuencia de bases en el ácido nucleico diana y el marcador o la sustancia de unión a un marcador.

En el presente documento se describe un método que comprende, antes de la etapa de hibridación, una etapa de amplificación en la que el ácido nucleico parcialmente bicatenario se obtiene como el producto de una reacción de amplificación realizada en un ácido nucleico diana utilizando un primer cebador que tiene la secuencia identificadora y una primera secuencia de reconocimiento que reconoce una primera secuencia de bases en el ácido nucleico diana y que tiene un sitio enlazador capaz de inhibir o detener una reacción de ADN polimerasa dispuesto entre la secuencia identificadora y la primera secuencia de reconocimiento, un segundo cebador I que tiene una secuencia marcadora y una segunda secuencia de reconocimiento que reconoce una segunda secuencia de bases en el ácido nucleico diana, y un segundo cebador II que tiene el marcador o la sustancia de unión a un marcador y la secuencia marcadora.

En el presente documento se describe un método que, antes de la etapa de hibridación, comprende una etapa de amplificación en la que se realiza una reacción de amplificación en un ácido nucleico diana en presencia de una sonda marcadora que tiene el marcador o la sustancia de unión a un marcador y una secuencia que se hibrida específicamente con la secuencia marcadora que utiliza un primer cebador que tiene la secuencia identificadora y una primera secuencia de reconocimiento que reconoce una primera secuencia de bases en el ácido nucleico diana y que tiene un sitio enlazador capaz de inhibir o detener una reacción de ADN polimerasa dispuesto entre la secuencia identificadora y la primera secuencia de reconocimiento, y un segundo cebador I que tiene una secuencia marcadora y una segunda secuencia de reconocimiento que reconoce una segunda secuencia de bases en el ácido nucleico diana, por lo que se forma un complejo del ácido nucleico parcialmente bicatenario y la sonda marcadora.

En el presente documento se describe un método en el que el ácido nucleico parcialmente bicatenario presenta el marcador o la sustancia de unión a un marcador en la parte bicatenaria.

En el presente documento se describe un método que, antes de la etapa de hibridación, comprende una etapa de amplificación en la que el ácido nucleico parcialmente bicatenario se obtiene como el producto de amplificación de una reacción de amplificación realizada en un ácido nucleico diana utilizando un primer cebador que tiene la secuencia identificadora y una primera secuencia de reconocimiento que reconoce una primera secuencia de bases en el ácido nucleico diana y que también tiene un sitio enlazador capaz de inhibir o detener una reacción de ADN polimerasa dispuesto entre la secuencia identificadora y la primera secuencia de reconocimiento, y un segundo cebador presenta una segunda secuencia de reconocimiento que reconoce una segunda secuencia de bases en el ácido nucleico diana, y que utiliza un nucleósido trifosfato que contiene un derivado de nucleósido trifosfato que tiene el marcador o la sustancia de unión a un marcador.

En el presente documento se describe un método en el que la etapa de hibridación se realiza poniendo en contacto un medio de revelado que comprende una solución de reacción de amplificación que contiene el producto de amplificación de la etapa de amplificación, con una parte del portador de cuerpo en fase sólida.

En el presente documento se describe un método en el que la etapa de hibridación se realiza preparando el medio de revelado que comprende una solución de reacción de amplificación que contiene el producto de amplificación de la etapa de amplificación junto con un marcador para unirse a la sustancia de unión a un marcador, y este medio de revelado se pone en contacto con al menos una parte del portador de cuerpo en fase sólida.

En el presente documento se describe un método en el que la etapa de amplificación se realiza en una cavidad, el medio de revelado se prepara suministrando al menos el marcador a la cavidad que contiene la solución de reacción de amplificación, y el medio de revelado se pone en contacto con parte del soporte de cuerpo en fase sólida en la cavidad.

En el presente documento se describe un método en el que la sustancia de unión a un marcador es una o dos o más sustancias seleccionadas del grupo que, en las reacciones de antígeno-anticuerpo, consta de anticuerpos, biotina, digoxigenina y FITC y de otros haptenos, y el marcador presenta un sitio capaz de unirse con la sustancia de unión a un marcador, y es un marcador que utiliza uno o dos o más marcadores seleccionados de fluorescencia, radioactividad, enzimas, fosforescencia, luminiscencia química y tinción.

En el presente documento se describe una unidad de cromatografía para su uso en el método de detección de ácido nucleico según la presente divulgación, que presenta un soporte de cuerpo en fase sólida, 3 o más regiones de sonda con forma de banda con las sondas fijadas en paralelo entre sí en diferentes ubicaciones en el soporte del cuerpo en fase sólida, y

2 o más regiones marcadoras de posición ubicadas paralelas entre sí y también a las regiones de sonda en posiciones diferentes de las 3 o más regiones de sonda en el soporte del cuerpo en fase sólida, donde tres de las tres o más regiones de sonda están dispuestas a intervalos iguales entre dos regiones marcadoras de posición de las dos o más regiones marcadoras de posición.

5 La unidad de cromatografía puede ser una en la que una o más regiones de sonda están dispuestas a intervalos iguales con respecto a los intervalos entre las tres regiones de sonda en el lado opuesto de los dos marcadores de posición con respecto a las tres regiones de sonda.

10 La unidad de cromatografía puede ser una en la que el soporte de cuerpo en fase sólida tiene una parte de contacto líquido ahusada o un marcador formador de contacto líquido en uno de sus extremos para contactar con el medio de revelado para la cromatografía de ácidos nucleicos.

15 La unidad de cromatografía puede ser una en la que el marcador formador de parte de contacto líquido es un marcador que hace visible un sitio de corte para formar la parte de contacto líquido cortando una parte del soporte del cuerpo en fase sólida.

20 La unidad de cromatografía puede ser una en la que el marcador sea suficientemente débil para permitir que el soporte de cuerpo en fase sólida se corte a lo largo del marcador.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A muestra un esquema de un ejemplo de una etapa de amplificación en el método de detección de la descripción;
 25 la figura 1B muestra un esquema de un ejemplo de otra etapa de amplificación en el método de detección de la descripción;
 la figura 2A muestra un ejemplo del flujo del método de detección de la descripción;
 la figura 2B muestra otro ejemplo del flujo del método de detección de la descripción;
 la figura 2C muestra otro ejemplo del flujo del método de detección de la descripción;
 30 la figura 3 muestra un ejemplo de un ácido nucleico parcialmente bicatenario;
 la figura 4 muestra un ejemplo de un conjunto de cebadores y de una etapa de amplificación de ácido nucleico para obtener un ácido nucleico parcialmente bicatenario;
 la figura 5 muestra otro conjunto de cebadores, etc. para obtener un ácido nucleico parcialmente bicatenario;
 la figura 6 muestra otro conjunto de cebadores, etc. para obtener un ácido nucleico parcialmente bicatenario;
 35 la figura 7 muestra otro conjunto de cebadores, etc. para obtener un ácido nucleico parcialmente bicatenario;
 la figura 8 muestra otro conjunto, etc. para obtener un equivalente de un ácido nucleico parcialmente bicatenario;
 la figura 9 muestra la estructura detallada de una unidad de cromatografía;
 la figura 10 es una vista en planta de una unidad de cromatografía;
 la figura 11 muestra la parte de contacto líquido de una unidad de cromatografía;
 40 la figura 12 muestra los resultados de la amplificación del ADN del genoma en un ejemplo;
 la figura 13 muestra los resultados de detección obtenidos en un ejemplo de la descripción. La figura 14 muestra los resultados de detección obtenidos en un ejemplo de la descripción. La figura 15 muestra una matriz de tipo membrana preparada en un ejemplo;
 la figura 16 muestra los resultados de detección obtenidos en un ejemplo de la descripción
 45 la figura 17 muestra una matriz de tipo membrana (para cromatografía) preparada en un ejemplo; la figura 18 muestra los resultados de detección obtenidos en un ejemplo de la descripción
 la figura 19 muestra una unidad de cromatografía preparada en un ejemplo;
 la figura 20 muestra los resultados de electroforesis de un producto de amplificación;
 la figura 21 muestra el rendimiento de un producto de amplificación; y
 50 la figura 22 muestra los resultados de detección de un ácido nucleico diana de la cromatografía de ácidos nucleicos utilizando un ácido nucleico parcialmente bicatenario.
 La figura 23 muestra los resultados de electroforesis de un producto de amplificación;
 la figura 24 muestra el rendimiento de un producto de amplificación; y
 la figura 25 muestra los resultados de detección de un ácido nucleico diana de la cromatografía de ácidos nucleicos
 55 utilizando un ácido nucleico parcialmente bicatenario.
 La figura 26 muestra los resultados de electroforesis de un producto de amplificación;
 la figura 27 muestra el rendimiento de un producto de amplificación; y
 la figura 28 muestra los resultados de detección de un ácido nucleico diana de la cromatografía de ácidos nucleicos utilizando un ácido nucleico parcialmente bicatenario.
 60 La figura 29 muestra los resultados de electroforesis de un producto de amplificación;
 la figura 30 muestra el rendimiento de un producto de amplificación; y
 la figura 31 muestra los resultados de detección de un ácido nucleico diana de la cromatografía de ácidos nucleicos utilizando un ácido nucleico parcialmente bicatenario.

65 Descripción de las realizaciones

La presente divulgación se refiere a un método para detectar un ácido nucleico diana, y a un agente de amplificación de ácido nucleico y similares. El método para detectar un ácido nucleico diana del presente método destaca el uso del siguiente primer cebador y segundo cebador. **Las figuras 1A y 1B** ilustran un ejemplo de la etapa de amplificación en el presente método de detección.

Como se muestra en **la figura 1A**, el primer cebador comprende una primera secuencia de bases, como una secuencia identificadora complementaria a una sonda de detección asociada previamente al ácido nucleico diana, y una primera secuencia de reconocimiento que reconoce una primera secuencia de bases en el ácido nucleico diana, y tiene un sitio enlazador capaz de inhibir o detener una reacción de ADN polimerasa dispuesto entre la primera secuencia de bases arbitraria y la primera secuencia de reconocimiento, mientras que el segundo cebador contiene una segunda secuencia de reconocimiento que reconoce una segunda secuencia de bases en el ácido nucleico diana.

El sitio enlazador inhibe o detiene la reacción de ADN polimerasa. Es decir, dado que este sitio enlazador no contiene bases naturales entre otras razones, no puede ser un molde para una reacción de extensión de ADN por una ADN polimerasa. Por tanto, cuando el ADN monocatenario amplificado por el primer cebador se transforma en una cadena molde y después se amplifica con el segundo cebador como se muestra en **la figura 1A**, la reacción de extensión de ADN del segundo cebador se inhibe o se detiene en el extremo 3' que comienza en el sitio emparejado con el sitio enlazador. Por consiguiente, se cree que el fragmento amplificado (fragmento de ADN bicatenario) obtenido en la etapa de amplificación, se proporciona en un extremo con la primera secuencia de bases arbitraria como una sola cadena que sobresale, y con una parte bicatenaria formada por emparejamiento de bases.

La figura 1B muestra el proceso de amplificación cuando el segundo cebador también tiene una segunda secuencia de bases arbitraria, y tiene el sitio enlazador dispuesto entre la segunda secuencia de bases arbitrarias y una segunda secuencia de reconocimiento. Como en el caso del primer cebador mostrado en **la figura 1A**, cuando el ADN monocatenario amplificado por el segundo cebador se transforma en una cadena de molde y después se amplifica con el primer cebador como se muestra en **la figura 1B**, la reacción de extensión de ADN del primer cebador se inhibe o detiene en el extremo 3' comenzando en el sitio emparejado con el sitio enlazador. Por consiguiente, se cree que los fragmentos amplificados (fragmentos de ADN bicatenario) obtenidos en la etapa de amplificación, se proporcionan en un extremo con una secuencia identificadora como una sola cadena que sobresale, en el otro extremo con una secuencia de bases arbitraria como una sola cadena que sobresale, y con una parte bicatenaria formada por emparejamiento de bases. Revelado

Esto confirma la idea de que un ácido nucleico diana puede detectarse rápidamente y con una sensibilidad extremadamente alta cuando se obtiene un fragmento amplificado al realizar una etapa de amplificación con una ADN polimerasa en una muestra que contiene el ácido nucleico diana, utilizando un conjunto de cebadores que tiene una primera secuencia de bases arbitraria como secuencia identificadora complementaria a una sonda de detección asociada previamente al ácido nucleico diana, se hibrida tal como está con la sonda de detección sin desnaturalizarse. Tal como se muestra en **las figuras 1A y 1B**, se piensa que dado que el fragmento de ADN bicatenario resultante comprende partes bicatenarias formadas con la primera secuencia de bases y la segunda secuencia de bases del ácido nucleico diana, con la secuencia identificadora sobresaliendo en el extremo como una sola cadena, esta cadena sencilla puede hibridarse de manera eficaz con la sonda. La sensibilidad mejora cuando aumenta la eficiencia de hibridación.

Con el método de detección actual se obtiene al menos uno de los siguientes efectos.

- (1) Hibridación más eficaz(rápida).
- (2) Marcaje más eficaz.
- (3) Mayor sensibilidad de detección.
- (4) Un proceso más simple (más rápido), en particular, por omisión de la etapa de desnaturalización de la doble cadena en una sola cadena

Un derivado de oligonucleótido que tiene una secuencia de bases que contiene dicho sitio enlazador es útil como cebador u otro agente amplificador de ácido nucleico. Además, un método de amplificación de ácido nucleico utilizando dicho cebador, el fragmento de ADN bicatenario resultante y una composición de hibridación que contiene este fragmento, también puede tener al menos un efecto según sus realizaciones.

La Descripción se refiere, por separado, a un método para detectar un ácido nucleico diana mediante cromatografía de ácidos nucleicos y a un cuerpo en fase sólida o similar adecuado para este método. Con el método de detección de un ácido nucleico diana desvelado en esta Descripción, es posible especificar un ácido nucleico parcialmente bicatenario que es deseable para la hibridación por cromatografía de ácidos nucleicos, y de este modo obtener una hibridación eficaz y muy precisa. A diferencia de la hibridación en una matriz habitual, la hibridación en cromatografía de ácidos nucleicos implica el movimiento de un medio de revelado basado en el efecto capilar y la evaporación del medio de revelado, que hace que sea difícil obtener la hibridación. Sin embargo, preparando el ácido nucleico parcialmente bicatenario desvelado en esta Descripción con el fin de detectar un ácido nucleico diana en la cromatografía de ácidos nucleicos, es posible obtener una hibridación eficaz y muy precisa.

Además, con el método desvelado en esta Descripción, dado que la hibridación se realiza poniendo en contacto parte de un cuerpo en fase sólida con un medio de revelado que contiene una solución de reacción de amplificación y haciendo que el medio de revelado se mueva en un portador de cuerpo en fase sólida, es posible prevenir eficazmente la contaminación y similar que se produce cuando parte de una solución de reacción de amplificación de ácido nucleico se suministra a un cuerpo en fase sólida, y simplificar las operaciones para la etapa de hibridación.

Además, dado que la unidad de cromatografía desvelada en esta Descripción tiene marcadores de posición, una región de sonda correspondiente a un ácido nucleico diana se puede especificar fácilmente incluso cuando se detectan múltiples ácidos nucleicos diana simultáneamente, y la facilidad y precisión de la detección se pueden mejorar simultáneamente. Esto es particularmente adecuado para la detección visual, por lo que la presencia o ausencia del ácido nucleico diana puede detectarse de un vistazo con un sistema de detección visual.

Las diversas realizaciones desveladas en esta Descripción se explican con detalle a continuación.

En esta Descripción, un "ácido nucleico" es un polímero compuesto de nucleótidos, cuyo número no está limitado. Los ácidos nucleicos abarcan oligonucleótidos formados por la unión de decenas de nucleótidos, así como polinucleótidos más largos. Además de ADN monocatenario o bicatenario, los ácidos nucleicos incluyen ARN monocatenario o bicatenario, así como híbridos de ADN/ARN, quimeras de ADN/ARN y similares. Los ácidos nucleicos pueden consistir en bases naturales, nucleótidos y nucleósidos, pero también pueden consistir en parte en bases no naturales, nucleótidos y nucleósidos. Además de todo tipo de ADN y ARN, incluido el ADNc, ADN genómico, ADN sintético, ARNm, ARN total, ARNhc y ARN sintético, los ácidos nucleicos incluyen ácidos peptidonucleicos, ácidos nucleicos de morfolino, ácidos nucleicos de metilfosfonato, ácidos S-oligonucleicos y otros ácidos nucleicos sintetizados artificialmente. Estos pueden ser monocatenarios o bicatenarios.

En esta Descripción, un "ácido nucleico diana" es cualquier ácido nucleico cuya existencia o cantidad se detecte, sin ninguna limitación particular. Un ácido nucleico diana puede sintetizarse de manera natural o artificial. Los ácidos nucleicos diana naturales incluyen bases o secuencias de bases que son marcadores genéticos para propiedades físicas y enfermedades genéticas, y para la aparición, diagnóstico, pronóstico, y selección de fármacos y tratamientos para el cáncer y otros trastornos específicos en seres humanos, animales no humanos y otros organismos. Los ejemplos típicos incluyen los SNP y otros polimorfismos y mutaciones congénitas y adquiridas. Los ácidos nucleicos derivados de patógenos, virus y otros microorganismos, también se consideran ácidos nucleicos diana. Los ejemplos de ácidos nucleicos diana sintéticos incluyen ácidos nucleicos sintetizados artificialmente para algún tipo de reconocimiento. También incluyen productos de amplificación obtenidos mediante reacciones de amplificación de ácidos nucleicos de algún tipo de ácidos nucleicos naturales o artificiales.

La muestra que se comenta a continuación o una fracción de ácido nucleico de la misma, puede utilizarse como tal para el ácido nucleico diana, pero es deseable utilizar un producto de amplificación obtenido al amplificar múltiples ácidos nucleicos diana en una reacción de amplificación por PCR, y preferentemente en una reacción de amplificación por PCR múltiple.

En esta Descripción, una "muestra" es una muestra que puede contener un ácido nucleico diana. No hay limitaciones particulares en la fuente de la muestra, pero los ejemplos de muestras que pueden contener ácidos nucleicos diana incluyen varias muestras biológicas (sangre, orina, esputo, saliva, tejidos, células (incluidas varias células animales cultivadas, células vegetales cultivadas y células microbianas cultivadas) y similares, o muestras de extractos de ADN extraído de dichas muestras biológicas. También incluyen muestras de ADN y similares obtenidas extrayendo ARN de dichas muestras biológicas y convirtiéndolo en ADN. Un experto en la materia puede obtener fracciones que contienen ácidos nucleicos de estas diversas muestras en función de la técnica anterior apropiada.

En esta Descripción, una "secuencia diana es una secuencia que consta de una o dos o más bases específicas de ácido nucleico diana que es el objeto de detección. Por ejemplo, puede ser una secuencia parcial con baja homología entre los ácidos nucleicos diana, o una secuencia con baja complementariedad u homología con otros ácidos nucleicos que pueden estar contenidos en la muestra. La secuencia diana puede ser una secuencia específica para el ácido nucleico diana. La secuencia diana como esta puede haber sido modificada artificialmente.

En esta Descripción, la cromatografía de ácidos nucleicos es una cromatografía que utiliza un soporte de cuerpo poroso en fase sólida capaz de dispersar y mover un líquido (medio de revelado) por acción capilar, en el que un ácido nucleico es movido por este líquido dentro del soporte de cuerpo en fase sólida, forma un producto de hibridación por emparejamiento de bases específicas con una sonda preparada previamente en el soporte de cuerpo en fase sólida, y de este modo es capturado por el soporte de cuerpo en fase sólida

Los ejemplos específicos típicos y no limitativos de las descripciones de esta Descripción se explican con detalle a continuación con referencia a los dibujos. Estas explicaciones detalladas están destinadas simplemente a mostrar con detalle ejemplos preferidos de las divulgaciones de la Descripción para que un experto en la técnica pueda implementarlas y no pretenden limitar el alcance de las divulgaciones de la Descripción. Las características y divulgaciones adicionales descritas a continuación pueden utilizarse por separado o junto con otras características para proporcionar un método mejorado adicional para detectar un ácido nucleico diana o similar.

Las combinaciones de características y etapas descritas en las explicaciones detalladas a continuación, no son esenciales para implementar las divulgaciones de la Descripción en el sentido más amplio, y se presentan solo con el propósito de explicar ejemplos típicos de las divulgaciones de la descripción en particular. Además, las diversas características de los ejemplos típicos anteriores y siguientes y las diversas características descritas en las reivindicaciones independientes y dependientes no tienen que combinarse de la misma manera que en los ejemplos específicos descritos en el presente documento, o en el orden enumerado, al proporcionar además realizaciones útiles de las divulgaciones de la Descripción.

Todas las características descritas en la Descripción y/o en las Reivindicaciones se conciben como divulgaciones individuales e independientes que restringen las divulgaciones iniciales y el asunto reivindicado que especifica la presente invención por separado de la constitución de las características descritas en los Ejemplos y/o Reivindicaciones. Además, todas las descripciones de intervalos numéricos y grupos o conjuntos tienen la intención de incluir configuraciones intermedias con el fin de restringir las divulgaciones iniciales y la materia reivindicada que especifica el presente método.

[Método de detección de secuencias dianas en ácido nucleico diana]

El método de detección desvelado en esta Descripción presenta una etapa de preparación de un cuerpo en fase sólida que comprende una sonda de detección, una etapa de utilizar un primer cebador y un segundo cebador para realizar la amplificación de ácido nucleico en la muestra, una etapa de hibridación en la que un fragmento amplificado obtenido en la etapa de amplificación se pone en contacto con la sonda de detección de tal manera que puede hibridarse por medio de la secuencia identificadora, y una etapa de detección en la que el producto de hibridación del fragmento amplificado y la sonda de detección se detecta en el cuerpo en fase sólida. El método de detección desvelado en esta Descripción es aplicable a uno o dos o más tipos de ácidos nucleicos, y más específicamente, se utiliza para detectar secuencias diana asociadas con secuencias características en estos ácidos nucleicos. A continuación se explica una serie de etapas, principalmente para un tipo de ácido nucleico, pero las siguientes etapas también son aplicables a la detección simultánea de múltiples o muchos ácidos nucleicos diana.

(Etapas de preparación de cuerpo en fase sólida)

Como se muestra en la **figura 2A**, el método de detección desvelado en esta Descripción (denominado también simplemente "el método de detección" a continuación) puede comprender una etapa de preparación de un cuerpo en fase sólida. Dicho cuerpo en fase sólida puede prepararse de antemano antes de implementar el método de detección, o puede obtenerse en el comercio, o puede prepararse cada vez que se implementa el método de detección.

Como se muestra en la **figura 2A**, el cuerpo en fase sólida puede comprender múltiples sondas de detección, cada una de ellas con una secuencia de bases única diferente como secuencia de detección, dispuesto en un soporte. Al preparar un cuerpo en fase sólida, es posible evitar la investigación en diseño y síntesis de sondas, preparación de matrices, y condiciones de hibridación.

La **figura 2A** muestra un ejemplo de un cuerpo en fase sólida. Cada sonda de detección tiene una secuencia de detección, que es una secuencia de bases única para propósitos de sondeo. Dicha secuencia de detección puede diseñarse independientemente de la secuencia característica del ácido nucleico diana, o en otras palabras, de la secuencia diana. El diseño de la secuencia, independientemente de la secuencia diana, hace posible inhibir o eliminar la unión inespecífica entre las secuencias de detección de múltiples sondas de detección, e incorporar en el diseño cuestiones de temperatura de hibridación óptima, tiempo y otras condiciones de hibridación. También hace posible utilizar siempre la misma sonda de detección independientemente del tipo de ácido nucleico diana.

La longitud preferida de la secuencia de detección no está específicamente limitada, pero es preferentemente de 20 bases a 50 bases. La secuencia de detección que tiene las bases en longitud puede garantizar tanto la especificidad de cada secuencia de detección como la eficacia de hibridación. Por ejemplo, la secuencia de detección que tiene las bases en longitud puede seleccionarse de 46 bases de secuencias cuyas secuencias de bases descritas por las SEQ ID: 1 a 100 y sus secuencias complementarias se combinan y sus secuencias modificadas se realiza la adición o eliminación de la base. Más preferentemente, la longitud de la secuencia de detección es de 20 bases a 25 bases. Por ejemplo, la secuencia de detección que tiene dicho número de bases de longitud puede seleccionarse de secuencias de 23 bases, cada una de las cuales se describe mediante una cualquiera de las SEQ ID: 1 a 100 y sus secuencias complementarias y sus secuencias modificadas, cuya adición o eliminación de bases se realiza de forma arbitraria. La secuencia identificadora del primer cebador es la secuencia que se empareja con la secuencia de detección. Por lo tanto, preferentemente, la secuencia identificadora tiene una longitud de 20 a 50 bases, más preferentemente de 20 a 25 bases al igual que la secuencia de detección.

La secuencia de detección en la sonda de detección puede ser una secuencia de bases de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 100 o sus secuencias de bases complementarias. Estas secuencias de bases tienen la misma longitud de bases y tienen una temperatura de fusión (T_m ; *melting*) de 40 °C o superior y de 80 °C o inferior, más preferentemente de 50 °C o superior y de 70 °C o inferior, dando así resultados de hibridación homogéneos en las mismas condiciones de

hibridación. Como se ha comentado anteriormente, pueden combinarse dos secuencias diferentes seleccionadas de este grupo de secuencias de bases. Además, en estas secuencias, las bases pueden añadirse, eliminarse, sustituirse o similar, siempre que no se pierda la especificidad. Las secuencias de detección para las sondas de detección que se utilizarán simultáneamente se seleccionan preferentemente de cualquiera de las secuencias de nucleótidos (grupo) representadas por las SEQ ID NO: 1-100, o de las secuencias de nucleótidos (grupo) complementarias a estas secuencias.

Las secuencias de detección de las sondas de detección pueden seleccionarse y utilizarse apropiadamente a partir de dichas secuencias de bases candidatas o de sus secuencias complementarias, aunque de estas, es deseable utilizar un conjunto de sondas que conste solo de una o dos o más sondas teniendo cada una de ellas, como secuencia de detección, una o dos o más secuencias de bases seleccionadas de las secuencias de bases enumeradas en la siguiente **tabla** o sus secuencias complementarias, o un conjunto de sondas que conste solo de sondas, teniendo cada una de ellas, como secuencias de detección, las siguientes secuencias de bases o sus secuencias complementarias. Seleccionando dichas secuencias de bases como secuencias de sondas, es posible acortar el tiempo de hibridación, dando como resultado una hibridación más rápida.

[Tabla 2]

Nombre	Se (5' → 3')	SEQ.ID.
D1-001	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC	1
D1-002	TGGAAGTGGGAACGCTTTAGATG	2
D1-003	TCGCTTCGTTGTAATTCGGAC	3
D1-005	TAGCCAGTGATTTATGACATGC	5
D1-006	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT	6
D1-010	GAGTAGCAGGCAAATACCCTAGA	10
D1-012	AGTCATACAGTGAGGACCAAATG	12
D1-014	TGCTCACTTACATTACGTCCATG	14
D1-016	AGGTCCGGTAGTAATTTAGGTGC	16
D1-020	TATTCTACCAACGACATCACTGC	20
D1-023	CATCTCCAAGAATTGACCCACCA	23
D1-025	GAAGGATCGCTTTTATCTGGCAT	25
D1-026	CATTTGTCAGGTACAGTCCACTT	26
D1-027	GCCCACACTCTTACTTATCGACT	27
D1-030	CCGTCTGGGTAAAGATTGCTAG	30
D1-035	ATGCCGTTGTCAAGAGTTATGGT	35
D1-038	CGCGACATTTAGTCCAGGAGATG	38
D1-040	AGACAATTAGAATCAGTGCCCCCT	40
D1-041	GCATTGAGGTATTGTTGCTCCCA	41
D1-044	GAGTCCGCAAAATATAGGAGGC	44
D1-045	GCCTCACATAACTGGAGAAACCT	45
D1-050	GGGATAGGTATTATGCTCCAGCC	50
D1-052	GCCTATATGAACCAAGCCACTGC	52
D1-062	CTAGCACAATTAATCAATCCGCC	62
D1-064	GCCTATAGTGTCGATTGTCCTCG	64
D1-065	CGATCACGGATTAATGTCACCCC	65
D1-077	CGCAGTTTGCAAGAACGAACAAA	77
D1-084	CCGTGTGTATGAGTATGACAGCA	84
D1-089	GAGTCGAAGACCTCCTCCTACTC	89
D1-090	ATGCCAATATGTAATCGTGACTC	90
D1-095	TGCCGGTTATACCTTTAAGGACG	95
D1-097	CGCGGTACTATTAGAAAGGGCTA	97
D1-100	TGCAGTGTAAAGCAACTATTGTCT	100

La secuencia de detección en la sonda de detección también se denomina secuencia de ortonormalización y está diseñada en función de los cálculos en una misma longitud consecutiva, de la predicción de temperatura de fusión por el método del vecino más cercano, de una distancia de Hamming, de la predicción de la estructura secundaria en secuencias de ADN que tienen ciertas longitudes de base obtenidas a partir de números aleatorios. Las secuencias de ortonormalización son secuencias de bases de ácidos nucleicos que tienen temperaturas de fusión homogéneas y, por tanto, están diseñadas para tener las temperaturas de fusión en un intervalo constante, que no inhiba la hibridación con las secuencias complementarias porque los ácidos nucleicos están estructurados intramolecularmente, y que no hibridan establemente con secuencias de bases distintas de las secuencias de bases complementarias. Las secuencias contenidas en un grupo de secuencias de ortonormalización apenas reaccionan o no reaccionan contra

secuencias distintas de una combinación deseada o dentro de sus secuencias. Cuando las secuencias de ortonormalización se amplifican por PCR, la cantidad de los ácidos nucleicos amplificados cuantitativamente corresponde a una cantidad inicial de los ácidos nucleicos que tienen las secuencias de ortonormalización sin influenciar por un problema tal como la hibridación cruzada como se mencionó anteriormente. Dichas secuencias de ortonormalización se revisan en H. Yoshida y A. Suyama, "Solution to 3-SAT by breadth first search", DIMACS Vol.54, 9-20 (2000) y solicitud de patente japonesa No. 2003-108126. Las secuencias de ortonormalización pueden diseñarse utilizando los métodos descritos en estos documentos.

La sonda de detección está fijada en un soporte. Un soporte de cuerpo en fase sólida puede utilizarse como un soporte de este tipo. Por ejemplo, el material del soporte no está particularmente limitado, y puede ser de plástico o vidrio. También puede ser un material poroso como celulosa, nitrocelulosa, nailon o similar. Este tipo de soporte poroso es particularmente adecuado para hibridar una sonda de detección fijada a un soporte de cuerpo en fase sólida con un fragmento amplificado mediante cromatografía de afinidad.

No hay limitaciones particulares sobre la forma del soporte, pudiendo estar en forma de perlas o de una placa plana como se muestra en **la figura 1**. Preferentemente, el cuerpo en fase sólida es una matriz (especialmente una micromatriz) de múltiples sondas de detección fijas en una disposición específica, con el soporte en forma de placa plana consistente. Dado que en una matriz pueden fijarse múltiples sondas de detección, es conveniente para detectar exhaustivamente varios ácidos nucleicos diana diferentes simultáneamente. El cuerpo en fase sólida también puede presentarse con múltiples regiones de matriz compartimentadas en el soporte. Todas estas regiones de múltiples de matrices pueden tener un conjunto de sondas de detección de la misma combinación fijada, o cada una puede tener un conjunto de sondas de detección de una combinación diferente. Si los conjuntos de sondas de detección de diferentes combinaciones se fijan a las múltiples regiones de la matriz, cada región de la matriz individual puede asignarse para detectar un ácido nucleico diana en un gen diferente.

El modo de hibridación (comentado más adelante) puede tenerse en cuenta al diseñar la forma del soporte. Por ejemplo, cuando la hibridación se realiza en un microtubo, tal como el tubo Eppendorf™, muy utilizado en ensayos y en investigación, las regiones de la matriz en el soporte tienen preferentemente un tamaño y forma que las permite sumergirse en la solución de hibridación contenida en el tubo. Normalmente, dicho soporte tiene un área plana de 150 mm² o inferior, una relación de aspecto de 1,5 a 20, y un grosor de 0,01 mm a 0,3 mm.

Cuando la hibridación se realiza utilizando los principios de cromatografía de afinidad con una sonda de detección fijada en un soporte de cuerpo poroso en fase sólida, es deseable que al menos el extremo del soporte tenga un tamaño (anchura) y una forma que le permita sumergirse en una solución de hibridación suministrada a un microtubo tal como el tubo Eppendorf™, que se utiliza mucho en ensayos e investigación. Más preferentemente, está en una forma larga y delgada que presenta un sitio que puede estar contenido dentro de este tipo de tubo desde cerca de la parte inferior hasta la parte superior del tubo.

Las sondas de detección pueden fijarse mediante cualquier modo sin limitación. Las sondas de detección pueden fijarse en el soporte en el extremo 3' o 5'. Los modos pueden ser covalentes o no covalentes. Las sondas de detección pueden fijarse en la superficie del soporte por cualquier método bien conocido en la técnica. Por ejemplo, la sonda de detección se proporciona de manera que las gotas de la solución de la sonda dibujen un patrón planificador predeterminado en el soporte utilizando un método para expulsar gotas finas de la solución de la sonda. Después, la sonda de detección puede secarse calentando según sea necesario y fijarse. Además, por ejemplo, para la inmovilización de la sonda de detección en el soporte sólido, se puede añadir un grupo amino a la sonda de detección. Para aumentar la adhesión de la sonda con el soporte, pueden unirse proteínas tales como albúmina. Además, es posible mejorar la adhesión con varios tipos de radiación, tal como radiación UV o tratamiento térmico.

La sonda de detección también puede presentar una secuencia enlazadora adecuada para enlazarse con la superficie del portador. La secuencia enlazadora tiene preferentemente la misma longitud y la misma secuencia de bases en todas las sondas de detección.

La sonda de detección se suministra al soporte de cuerpo en fase sólida en un patrón específico según el modo de hibridación (comentado más adelante). Cuando todo el cuerpo en fase sólida va a sumergirse en la solución de hibridación, normalmente este es un patrón de puntos que corresponde a las sondas de detección individuales. Cuando el cuerpo en fase sólida se va a revelar con la solución de hibridación como fase móvil, normalmente, las corrientes flujos (bandas) correspondientes a sondas de detección individuales se disponen en uno o dos o más sitios de revelado en la dirección de revelado.

(Etapa de amplificación)

Como se muestra en **la figura 2A**, la etapa de amplificación se realiza utilizando un primer cebador y un segundo cebador. En la etapa de amplificación de ácido nucleico, como método de amplificación de ácido nucleico, pueden utilizarse varios métodos conocidos para obtener fragmentos de ADN bicatenario amplificando el ADN mediante una reacción de ADN polimerasa tal como la PCR.

(Primer cebador)

El primer cebador comprende una secuencia identificadora complementaria a la sonda de detección asociada al ácido nucleico diana, y una primera secuencia de reconocimiento que reconoce una primera secuencia de bases en el ácido nucleico diana. Las longitudes de estas secuencias de bases no están particularmente limitadas, y pueden determinarse de manera apropiada según la naturaleza de la secuencia diana del ácido nucleico diana.

(Primera secuencia de reconocimiento)

La primera secuencia de reconocimiento es una secuencia para amplificar el ácido nucleico diana mediante la amplificación de ácido nucleico, y puede hibridarse específicamente con una primera secuencia de bases que forma parte de la secuencia diana del ácido nucleico diana. La primera secuencia de reconocimiento está diseñada con un grado de complementariedad que la permite hibridarse de forma muy selectiva con la primera secuencia de bases. Preferentemente está diseñada para ser completamente complementaria (específica).

(Secuencia identificadora)

Una secuencia identificadora es una secuencia que hace posible que el fragmento amplificado se hibride con la sonda de detección, y dado que detecta el ácido nucleico diana, se diseña una secuencia identificadora para que pueda hibridarse con la secuencia de detección de la sonda de detección para cada ácido nucleico diana. Normalmente, es una secuencia de bases complementaria a la secuencia de detección. Por lo tanto, un ácido nucleico diana coincide con una sonda de detección. Como se ha explicado anteriormente, la longitud de bases de la secuencia identificadora coincide preferentemente con la longitud de bases de la secuencia de detección de la sonda de detección, y tiene, preferentemente, una longitud de 20 a 50 bases o, más preferentemente, de 20 a 25 bases.

La primera secuencia de bases y la segunda secuencia de bases en el ácido nucleico diana pueden configurarse de cualquier manera en relación con el ácido nucleico diana. Por ejemplo, cuando se detecta una mutación en el ADN, se puede hacer que contenga sitios de mutación en una o dos o más bases solo en una secuencia de bases, o pueden contener sitios de mutación en ambas secuencias de bases. El primer cebador tiene dicha una secuencia identificadora y una primera secuencia de reconocimiento, y junto con las bases naturales u homólogos artificiales de bases naturales que constituyen estas secuencias de bases, también tiene una cadena principal que permite el emparejamiento de bases con un ácido nucleico natural. Normalmente, es un oligonucleótido o un derivado del mismo.

(Sitio enlazador)

La parte del cebador que tiene la secuencia identificadora no está directamente unida a la otra parte del cebador que tiene el primer sitio de reconocimiento, y entre las dos hay un sitio enlazador. Cuando se incorpora en la cadena molde, el sitio enlazador es un sitio capaz de inhibir o detener una reacción de ADN polimerasa. Cuando ya no queda ácido nucleico (o bases) que sirva como molde, la reacción de ADN polimerasa deja de extender la cadena de ADN. Por lo tanto, el sitio enlazador de la divulgación tiene una estructura que no puede servir como molde durante la extensión de ADN por la ADN polimerasa. Es decir, este sitio enlazador no contiene bases naturales o derivados de bases naturales (bases naturales o similares) que se emparejen con bases naturales. Al no incluir tales bases naturales y similares, es posible impedir que el sitio sea un molde, e inhibir o impedir que las cadenas de ADN se extiendan con la ADN polimerasa. Por lo tanto, este sitio enlazador puede consistir únicamente en una cadena esquelética simple que no tiene bases naturales o similares. Es decir, puede ser una cadena principal de azúcar-fosfato u otra cadena principal conocida utilizada en oligonucleótidos artificiales. La ADN polimerasa incluye varias ADN polimerasas conocidas. Los ejemplos típicos incluyen ADN polimerasas utilizadas en varios tipos de PCR y en otros métodos de amplificación de ácido nucleico.

Este sitio enlazador también puede ser un grupo enlazador similar a una cadena que contiene una estructura monocatenaria con un número de elementos de 2 a 40, adyacente a un nucleótido a través de un enlace fosfodiéster. Si el número del elemento es de 1 o inferior, puede que la reacción de la ADN polimerasa no se inhiba o detenga por completo, mientras que si el número del elemento es superior a 40, la solubilidad del nucleótido puede disminuir. Considerando el efecto de inhibir o detener la reacción de la ADN polimerasa, el número de elementos del grupo enlazador similar a una cadena es, preferentemente, de 2 a 36 o más preferentemente de 3 a 16.

Este sitio enlazador contiene un enlace sencillo para facilitar la rotación en el sitio enlazador, y como ejemplos de enlaces sencillos se incluyen enlaces sencillos de tipo carbono-carbono, carbono-oxígeno, carbono-nitrógeno y S-S. Este sitio enlazador consiste, principalmente, en este enlace sencillo. Siempre y cuando el sitio enlazador contenga un enlace sencillo, también puede incluirse un anillo aromático o cicloalcano en parte del sitio.

Preferentemente, se incluye una cadena de alquileo o polioxilalquileo opcionalmente sustituida con un número de elementos de 2 a 40 como este sitio enlazador. Dicha estructura enlazadora similar a una cadena es estructuralmente simple y fácil de introducir como un sitio enlazador.

Un ejemplo de este sitio enlazador es el sitio enlazador representado por la siguiente Fórmula (1):



Fórmula (1)

5 (donde 5' representa el átomo de oxígeno de un enlace fosfodiéster en el extremo 5', 3' representa el átomo de fósforo de un enlace fosfodiéster en el extremo 3', y m es un número entero de 2 a 40).

En la fórmula (1), m es más preferentemente de 2 a 36, o aún más preferentemente de 3 a 16. Normalmente, un sustituyente de H en la Fórmula (1) es un grupo alquilo, un grupo alcoxi, un grupo hidroxilo o similar. El número de átomos de carbono en un grupo alquilo o grupo alcoxi es, preferentemente, de 1 a 8, o más preferentemente de 1 a 4.
10 Cuando hay 2 o más sustituyentes, estos pueden ser iguales o diferentes. Preferentemente no hay sustituyentes.

Otro ejemplo de un sitio enlazador es el sitio enlazador representado por la siguiente Fórmula (2):



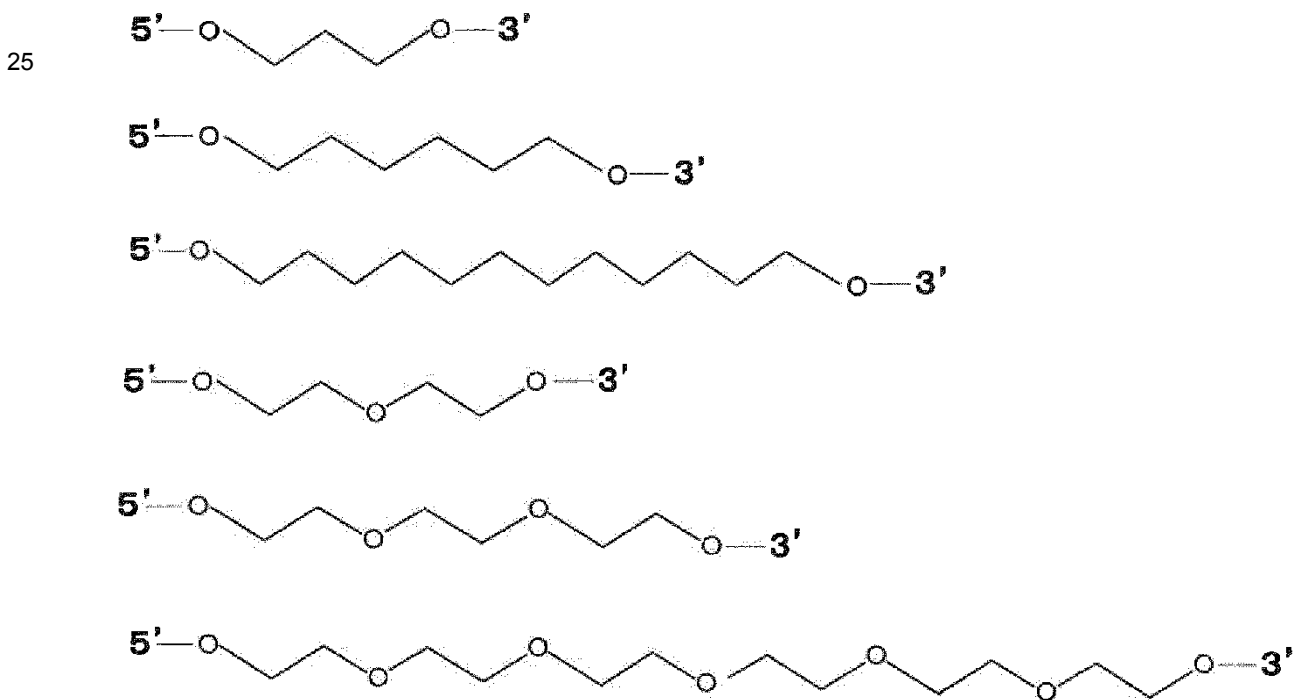
Fórmula (2)

15 (donde 5' representa el átomo de oxígeno de un enlace fosfodiéster en el extremo 5', 3' representa el átomo de fósforo de un enlace fosfodiéster en el extremo 3', n es un número entero de 2 a 4, 1 es 2 o un número entero mayor que 2, y $(n + 1) \times l$ es 40 o un número entero menor que 40).

20 En la Fórmula (2), $(n + 1) \times l$ es preferentemente de 2 a 36, o más preferentemente de 3 a 16. Un sustituyente de H en la fórmula (2) puede ser similar al sustituyente en la fórmula (1).

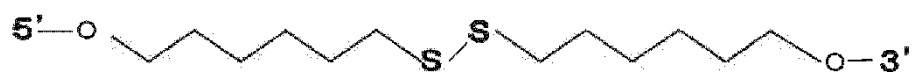
El sitio similar a una cadena que se muestra a continuación es un ejemplo de este sitio enlazador.

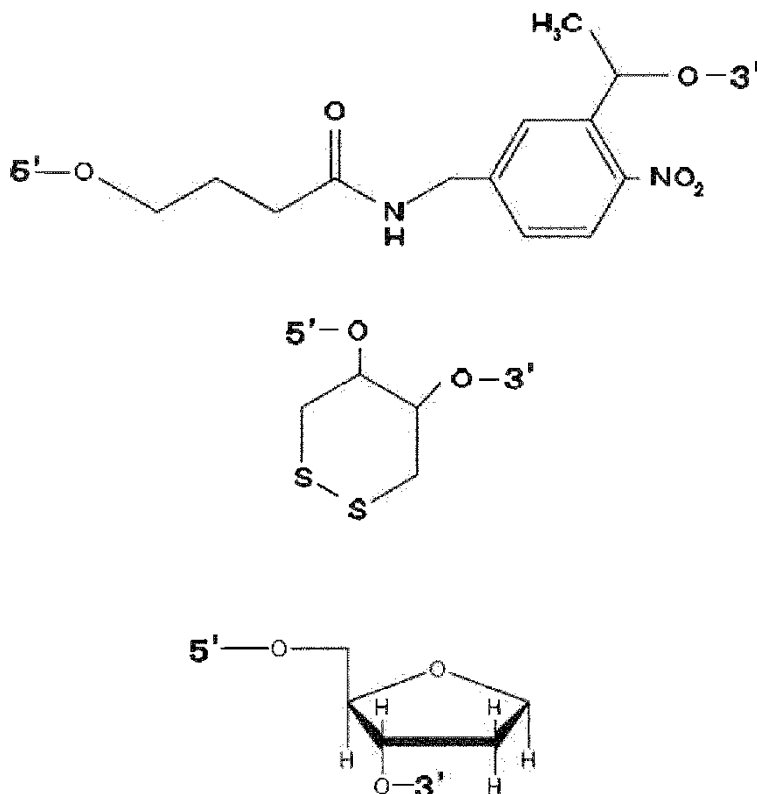
[C1]



El sitio similar a una cadena que se muestra a continuación es otro ejemplo de este sitio enlazador.

[C2]





- 5 El primer cebador tiene una primera secuencia de reconocimiento y una secuencia identificadora, y aparte de las bases naturales u homólogos artificiales de las bases naturales que constituyen estas secuencias de bases, consta principalmente de una cadena vertebral que permite el emparejamiento de bases con un ácido nucleico natural. Normalmente, es un oligonucleótido o un derivado del mismo.
- 10 Preferentemente, el primer cebador tiene una secuencia identificadora, un sitio enlazador y una primera secuencia de reconocimiento en ese orden desde el extremo 5'. Con dicha configuración, cuando una cadena de ADN amplificada por dicho cebador se transforma en una cadena molde para amplificación, la reacción de extensión se inhibe o detiene en el lado 5' del sitio enlazador derivado del primer cebador en la cadena molde, o en otras palabras, hacia el extremo 3' en la cadena de ADN extendida con la ADN polimerasa. Esto da como resultado un fragmento amplificado que tiene
- 15 como su extremo 3' una base que se empareja con una base (o una base cerca de una base) de un nucleótido adyacente en el lado 3' del sitio enlazador derivado del primer cebador en la cadena molde, o con una base adyacente a esa base, y que carece de una cadena de complemento en la secuencia identificadora en el primer cebador (**figuras 1A y 1B, figuras 2A y 2C**).
- 20 También puede incluirse una secuencia no relacionada con la secuencia identificadora o con la primera secuencia de reconocimiento cerca del sitio enlazador, o en otras palabras, en el lado 3' y 5' del sitio enlazador. Esto hace posible reducir o impedir el efecto de promover o detener involuntariamente la reacción de extensión de ADN con respecto a la secuencia identificadora o a la primera secuencia de reconocimiento en la cadena extendida debido a la presencia del sitio enlazador cuando el primer cebador se transforma en una cadena molde.

25 (Segundo cebador)

- Como se muestra en **la figura 2A**, el segundo cebador contiene una segunda secuencia de reconocimiento que reconoce una segunda secuencia de bases en el ácido nucleico diana. Las longitudes de estas secuencias de bases
- 30 no están particularmente limitadas, y pueden determinarse de manera apropiada según la naturaleza de la secuencia diana en el ácido nucleico diana.

(Segunda secuencia de reconocimiento)

- 35 La segunda secuencia de reconocimiento es una secuencia para amplificar un ácido nucleico diana con un primer cebador por amplificación de ácido nucleico, y es capaz de hibridarse específicamente con una segunda secuencia de bases que constituye otra parte de la secuencia diana en el ácido nucleico diana. La segunda secuencia de reconocimiento está diseñada para ser lo suficientemente complementaria para que pueda hibridarse de manera muy

selectiva con la segunda secuencia de bases. Preferentemente está diseñada para ser completamente complementaria (específica).

(Región de unión a un marcador)

5 Como se muestra en **la figura 2A**, la región de unión a un marcador puede proporcionarse de antemano con un marcador. El propósito del marcador es detectar un fragmento de ADN bicatenario unido a la sonda de detección en el cuerpo en fase sólida. Como marcador puede seleccionarse y utilizarse apropiadamente una sustancia convencionalmente conocida. Las posibilidades incluyen varios colorantes, incluyendo sustancias fluorescentes que, por sí mismas, emiten una señal fluorescente cuando se excitan, así como sustancias que emiten varias señales en combinación con segundos componentes por reacciones enzimáticas o reacciones de antígeno-anticuerpo. Normalmente, puede utilizarse un marcador fluorescente tal como Cy3, Alexa555, Cy5 o Alexa647. La región de unión a un marcador presenta el marcador unido a la segunda secuencia de bases mediante un método conocido, directamente o a través de un enlazador adecuado.

15 En esta Descripción, un "marcador" es una sustancia que permite diferenciar una sustancia o molécula, que es objeto de detección, de otras. El marcador no está particularmente limitado, pero como ejemplos típicos se incluyen marcadores que utilizan fluorescencia, radioactividad, enzimas (por ejemplo, peroxidasa, fosfatasa alcalina, etc.), fosforescencia, quimioluminiscencia, tinción y similares.

20 El marcador es, preferentemente, una sustancia luminiscente o una sustancia cromogénica que presenta luminiscencia o tinción que puede detectarse a simple vista. Es decir, es preferentemente una sustancia que puede producir una señal que es, en sí misma, directamente visible a simple vista, sin la necesidad de otro componente. Esto hace que el proceso de detección sea más fácil y más rápido. Como ejemplos típicos de dichas sustancias se incluyen varios pigmentos, tintes y otros colorantes. Sustancias equivalentes incluyen oro, plata y otros metales preciosos, y cobre y varios otros metales y aleaciones, así como compuestos orgánicos que contienen estos metales (que pueden ser compuestos complejos). La mica y otros compuestos inorgánicos también son equivalentes a los colorantes.

30 Como ejemplos típicos de dichos marcadores se incluyen varios colorantes y pigmentos y sustancias quimioluminiscentes, incluidos luminol, isoluminol, compuestos de acridinio, olefinas, éteres de enol, enaminas, éteres de aril vinilo, dioxenos, aril imidazol, lucigenina, luciferina y aecuatorina. Otros ejemplos incluyen látex u otras partículas marcadas con estos marcadores. Otros ejemplos incluyen coloides o soles que incluyen coloides o soles de oro y coloides o soles de plata. También son posibles partículas metálicas, inorgánicas y similares.

35 Como se ha comentado anteriormente, parte del marcador puede presentar partículas. El diámetro promedio de partícula del látex o de otras partículas que forman parte del marcador no está particularmente limitado, pero el diámetro medio de partícula puede ser de 20 nm a 20 μ m, por ejemplo, y normalmente es de 40 nm a 10 μ m, o preferentemente de 0,1 μ m a 10 μ m, o más preferentemente de 0,1 μ m a 5 μ m, o aún más preferentemente de 0,15 μ m a 2 μ m. Dependiendo del diámetro del poro del soporte de cuerpo en fase sólida 210, 500 nm o menor es deseable, 250 nm o menor es más deseable, 100 nm o menor es aún más deseable, y 50 nm o menor es lo más deseable. El límite inferior es preferentemente de 0,1 nm o mayor, o más preferentemente de 1 nm o mayor. Por ejemplo, de 0,1 nm a 250 nm es más deseable, y de 1 nm a 250 nm es aún más deseable. de 0,1 nm a 100 nm es aún más deseable, y de 1 nm a 50 nm es lo más deseable.

45 Se prefieren partículas fabricadas con un material polimérico insoluble en agua que puedan suspenderse en una solución acuosa. Los ejemplos incluyen polietileno, poliestireno, copolímero de estireno-estireno sulfonato, polímeros de ácido acrílico, polímeros de ácido metacrílico, polímeros de acrilonitrilo, acrilonitrilo-butadieno-estireno, acetato de polivinilo-acrilato, polivinil pirrolidona o cloruro de vinilo-acrilato. También son posibles partículas de látex de dichos polímeros que tienen grupos carboxilo, amino o aldehído superficiales u otros grupos activos.

50 La región de unión a un marcador también puede presentar una molécula o sustancia (algunas veces denominada sustancia de unión a un marcador de acuerdo con este documento) capaz de unirse a estas para permitir el reconocimiento final por parte del marcador. También pueden utilizarse, por ejemplo, interacciones proteína-proteína e interacciones entre proteínas y compuestos de bajo peso molecular y similares. Los ejemplos incluyen anticuerpos en reacciones de antígeno-anticuerpo, biotina en sistemas avidina (estreptavidina)-biotina, digoxigenina en sistemas anti-digoxigenina (DIG) -digoxigenina (DIG), y haptenos tales como FITC y similares en sistemas anti-FITC-FITC. En este caso, el marcador que se utiliza en última instancia en la detección se modifica de modo que también funcione como un sitio para la unión entre la sustancia de unión a un marcador y otra molécula o sustancia (un antígeno, por ejemplo, tal como estreptavidina, anti-FITC o similar) que interacciona con la sustancia de unión a un marcador. Cuando el producto de amplificación tiene una sustancia de unión a un marcador, puede formarse un complejo entre la sustancia de unión a un marcador del producto de amplificación y un marcador que presenta un sitio que se une con la sustancia de unión a un marcador, ya sea durante la etapa de hibridación o antes o después de esta etapa, y el marcador puede detectar el producto de amplificación.

65 Dichos marcadores y sustancias de unión a marcadores pueden obtenerse en el comercio, y los métodos para fabricar marcadores y sustancias de unión a marcadores y para marcar partículas con marcadores y similares son muy

conocidos, y un experto en la técnica puede obtenerlos utilizando técnicas conocidas apropiadas. Además, la unión entre dichos marcadores o partículas marcadas o sustancias de unión a marcadores y el ADN y otros oligonucleótidos puede realizarse según sea necesario a través de grupos amino y otros grupos funcionales, y estas cuestiones son muy conocidas en la materia.

Como se muestra en **la figura 2B**, el segundo cebador puede configurarse de modo que la región de unión a un marcador pueda unir el marcador o la sustancia de unión a un marcador. Es decir, puede tener una secuencia de bases específica, así como un marcador o una sustancia de unión a un marcador, y ser capaz de unirse a una sonda marcadora que tenga una secuencia de bases que reconozca la secuencia de unión a un marcador. Dicha sonda marcadora se suministra a un fragmento de ADN bicatenario que se ha hibridado con la sonda de detección en el cuerpo en fase sólida en la etapa de hibridación y en la etapa de detección (comentada más adelante), y puede marcar el fragmento.

Como se muestra en **la figura 2C**, el segundo cebador también puede carecer de una región de unión a un marcador. Es decir, utilizando un trifosfato de nucleósido que contiene un derivado de trifosfato de nucleósido que presenta el marcador en la etapa de amplificación, puede obtenerse un fragmento amplificado marcado con un marcador introducido en el sitio de extensión de ADN del fragmento amplificado.

El segundo cebador tiene una región de unión a un marcador según sea necesario, además de la segunda secuencia de reconocimiento, y tiene nucleótidos naturales o bases artificiales homólogas a las que constituyen la secuencia de bases de la segunda secuencia de reconocimiento. así como una cadena principal que permite el emparejamiento de bases con ácidos nucleicos naturales. Normalmente, es un oligonucleótido o un derivado del mismo.

(Sitio enlazador)

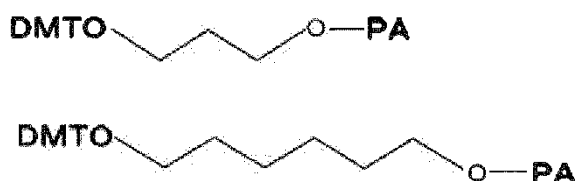
Cuando hay una región de unión a un marcador, la región de unión al marcador y la segunda secuencia de reconocimiento pueden estar unidas directamente, o puede haber un sitio enlazador entre las dos. Como se muestra en la figura 2B, esto es deseable cuando la región de unión a un marcador tiene una secuencia de bases que interacciona con la sonda marcadora y se une a ella. El sitio enlazador ya se ha explicado con referencia al primer cebador.

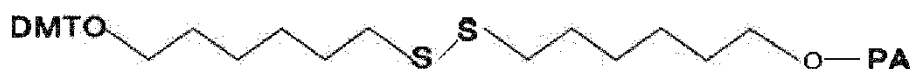
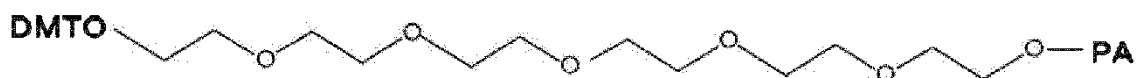
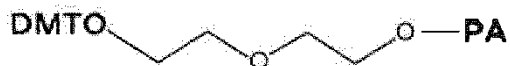
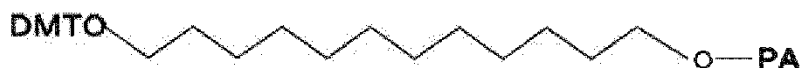
En el segundo cebador, la región de unión a un marcador, el sitio enlazador y la segunda secuencia de reconocimiento, se disponen preferentemente en este orden desde el extremo 5'. Con esta configuración, cuando una cadena de ADN amplificada por el segundo cebador se transforma en una cadena molde para la amplificación por el primer cebador, la reacción de extensión se detiene o inhibe adicionalmente hacia el extremo 5' desde el sitio enlazador derivado del segundo cebador en la cadena molde, o en otras palabras, adicionalmente hacia el extremo 3' en la nueva cadena de ADN extendida por la ADN polimerasa. Esto da como resultado un fragmento amplificado de ADN que tiene como su extremo 5' una base que se empareja con una base (o una base cerca de una base) de un nucleótido adyacente al extremo 3' del grupo enlazador derivado del segundo cebador en la cadena molde, y que carece de una cadena complementaria a la (secuencia de bases de) la región de unión al marcador en el segundo cebador (**figura 1B, figura 2B**);

Una secuencia no relacionada con la región de unión a un marcador o la segunda secuencia de reconocimiento también puede incluirse cerca del sitio enlazador, o en otras palabras, en el lado 3' o 5' del sitio enlazador. Esto hace posible reducir o impedir el efecto de promover o detener involuntariamente la reacción de extensión de ADN con respecto a la región de unión a un marcador o a la segunda secuencia de reconocimiento en la cadena extendida debido a la presencia del sitio enlazador cuando el segundo cebador se transforma en una cadena molde.

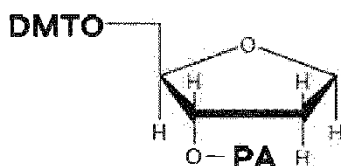
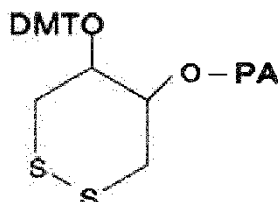
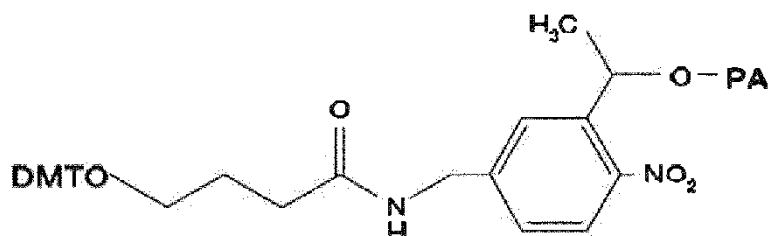
Dicho cebador puede sintetizarse según métodos habituales de síntesis de oligonucleótidos. Por ejemplo, el sitio enlazador puede sintetizarse utilizando un reactivo de fosoramidita que tiene una cadena de alqueno. Dichos reactivos son muy conocidos y pueden obtenerse, por ejemplo, en GlenResearch o en compañías similares. Como ejemplos se incluye el siguiente reactivo. En las siguientes fórmulas, DMT representa un grupo dimetoxitritilo típico como un grupo protector de hidroxilo, pero este también puede ser otro grupo protector de hidroxilo conocido. En las siguientes fórmulas PA representa un grupo de fosoramidita.

[C3]





5



10 La amplificación de ácido nucleico se realiza utilizando estos cebadores. Como se ha explicado anteriormente, para la amplificación de ácido nucleico pueden aplicarse varios métodos conocidos, pero son típicos varios tipos de PCR, tales como la PCR múltiple. Cuando se realiza la etapa de amplificación de ácido nucleico, la composición de la solución, el control de la temperatura y similar puede establecerlos apropiadamente un experto en la materia.

15 Como se ha explicado anteriormente, cuando un primer cebador tiene una secuencia identificadora, un sitio enlazador y una primera secuencia de reconocimiento en ese orden desde el extremo 5' y un segundo cebador que tiene una región de unión a un marcador, se utiliza un sitio enlazador y una segunda secuencia de reconocimiento en ese orden desde el extremo 5' para realizar la PCR en una muestra que puede contener un ácido nucleico diana, las cadenas molde derivadas del primer y segundo cebador y que contienen esos cebadores se forman mediante una reacción de extensión de ADN con una ADN polimerasa como se muestra en (a) a (c) de la figura 1B.

20 Después, se realiza de nuevo una reacción de extensión de ADN con una ADN polimerasa, utilizando un segundo cebador y un primer cebador diferentes de los cebadores de los que se derivaron las cadenas molde. Como se muestra en (d) y (e) de la figura 1B, en una reacción de extensión de ADN utilizando una ADN polimerasa en las cadenas molde comenzando con el segundo cebador e incluyendo el primer cebador, la extensión de ADN se inhibe o detiene en el lado 5' del sitio enlazador derivado del primer cebador en las cadenas molde, o en otras palabras, hacia el

25

extremo 3' del sitio enlazador en la cadena extendida.

Además, como se muestra en (d) y (e) de **la figura 1B**, en una reacción de extensión de ADN utilizando una ADN polimerasa en las cadenas molde comenzando con el primer cebador e incluyendo el segundo cebador, la extensión de ADN se inhibe o detiene en el lado 5' del sitio enlazador derivado del segundo cebador en las cadenas molde, o en otras palabras, hacia el extremo 3' del sitio enlazador en la cadena extendida.

Como se muestra en **la figura 2B**, el fragmento amplificado resultante es un fragmento de ADN bicatenario que tiene una secuencia identificadora monocatenaria y una región de unión a un marcador que sobresale en el extremo 5', y que tiene una parte bicatenaria que incluye la primera secuencia de reconocimiento y la segunda secuencia de reconocimiento. Es decir, en este fragmento de ADN bicatenario, la secuencia identificadora sobresale como una sola cadena en el lado 5' de una cadena de ADN, y la región de unión a un marcador sobresale en el lado 5' de la otra cadena de ADN.

Cuando el segundo cebador utilizado tiene un marcador unido por adelantado a la región de unión a un marcador como se muestra en **la figura 2A**, esto da como resultado un fragmento de ADN bicatenario que tiene el marcador en el extremo 5' de una cadena de ADN y la secuencia identificadora que sobresale en el lado 5' de la otra cadena de ADN, junto con una doble cadena que incluye la primera y la segunda secuencia de reconocimiento.

Además, como se muestra en **la figura 2C**, esto da como resultado un fragmento de ADN bicatenario que tiene el marcador en los sitios de extensión de la cadena de ADN y una secuencia identificadora que sobresale en el lado 5' de una cadena de ADN, con la primera y segunda secuencia de reconocimiento incluidas en una doble cadena.

(Etapa de hibridación)

A continuación, se realiza la etapa de hibridación como se muestra en **las figuras 2A a 2C**. La etapa de hibridación es una etapa de poner en contacto el fragmento amplificado obtenido en la etapa de amplificación con una sonda de detección para que puedan hibridarse por medio de la secuencia identificadora. En la etapa de hibridación, como se muestra en **las figuras 2A a 2C**, cuando la secuencia identificadora del fragmento de ADN bicatenario obtenido en la etapa de amplificación y la secuencia de reconocimiento de la sonda de detección en el cuerpo en fase sólida son suficientemente complementarias para permitir la hibridación específica en condiciones fijas, se hibridan para formar una doble cadena en una sonda de detección específica en el cuerpo en fase sólida. Después de la etapa de hibridación puede incluirse una etapa de lavado adecuada.

En la etapa de hibridación se suministra un fragmento de ADN bicatenario que corresponde al ácido nucleico diana amplificado específicamente en la etapa de amplificación. Este fragmento tiene una secuencia identificadora específica para la sonda de detección previamente asociada que sobresale como una cadena sencilla. Por lo tanto, después de la etapa de amplificación, puede reaccionar fácilmente con la sonda de detección sin reducirse a una cadena sencilla en una etapa de desnaturalización aplicando calor u otro tipo de desnaturalización. De este modo mejora la eficacia de la hibridación, dando como resultado una mejor sensibilidad y estabilidad. La sensibilidad se mejora preferentemente 5 veces o más o más preferentemente 10 veces o más proporcionando un sitio enlazador en el primer cebador. La velocidad de hibridación también se mejora. Se ha demostrado que el tiempo de hibridación se reduce a aproximadamente 1/10 al proporcionar un sitio enlazador en el primer cebador.

Como se muestra en **la figura 2A**, cuando el fragmento de ADN bicatenario suministrado en la etapa de hibridación tiene una región de unión a un marcador que presenta un marcador directo, no es necesaria una etapa especial de marcaje. Como se muestra en **la figura 2C**, lo mismo se aplica cuando el fragmento de ADN bicatenario presenta un marcador en la etapa de amplificación. Además, como se muestra en **la figura 2B**, cuando la región de unión a un marcador contiene una secuencia de bases que se une con la sonda marcadora, esta parte de secuencia de bases sobresale como una cadena sencilla en el extremo 5' opuesta a la secuencia identificadora. Esto permite una hibridación eficaz con la sonda marcadora y, por tanto, un marcaje rápido, fácil y sensible. Por tanto, no es necesaria una etapa especial de marcaje, y la sonda marcadora se suministra al cuerpo en fase sólida al mismo tiempo que el fragmento de ADN bicatenario en la etapa de hibridación, o también se puede suministrarse al cuerpo en fase sólida antes o después del fragmento de ADN bicatenario (es decir, antes o después de la hibridación).

El fragmento de ADN bicatenario solo se hibrida con una sonda de detección específica basada en su secuencia identificadora. Debido a que la secuencia identificadora y la secuencia de detección de la sonda de detección están diseñadas con un alto grado de selectividad, la hibridación errónea se inhibe fuertemente, y la hibridación inespecífica de fragmentos bicatenarios con sondas de detección se inhibe fuertemente en la etapa de hibridación.

La etapa de hibridación no se limita a un modo de hibridación en **la figura 2** en la que la solución de hibridación se suministra a todo el cuerpo en fase sólida (hibridación por inmersión). Por ejemplo, otra opción es una forma de cromatografía (hibridación en revelado) en la que la solución de hibridación se suministra como una fase móvil a parte del cuerpo en fase sólida, y se expande en una orientación específica con respecto al cuerpo en fase sólida.

(Etapa de detección)

La etapa de detección es una etapa para detectar el producto de hibridación entre el fragmento amplificado y la sonda de detección en el cuerpo en fase sólida.

- 5 La etapa de detección es una etapa en la que se obtienen datos de intensidad de señal para el ácido nucleico diana en función del marcador retenido en el producto de hibridación en el cuerpo en fase sólida después de la hibridación, para así detectar el producto de hibridación. Los datos de intensidad de señal pueden obtenerse detectando una señal marcadora del marcador. Dado que la ubicación de la sonda de detección asociada al ácido nucleico diana en el cuerpo en fase sólida ya se conoce, es posible evaluar la presencia o ausencia y la proporción del ácido nucleico diana detectando la señal marcadora.

10 Para obtener datos de intensidad de señal, pueden seleccionarse métodos convencionales conocidos y aplicarse de manera apropiada según la forma del cuerpo en fase sólida y el tipo de marcador. Normalmente, en primer lugar, los oligonucleótidos y similares que no se han hibridado, se eliminan del cuerpo en fase sólida mediante una operación de lavado o similar, y después, la señal fluorescente del marcador añadido se detecta con un escáner matricial o similar, o se realiza una reacción de quimioluminiscencia en el marcador. Cuando se utilizan perlas como soporte, pueden aplicarse métodos de detección que utilizan citometría de flujo.

15 En esta etapa de detección, la presencia o la ausencia, la proporción y similares, del ácido nucleico diana en la muestra, puede detectarse en función de los datos de intensidad de señal del marcador. Con este método, es posible detectar de un modo fiable el ácido nucleico diana que es el objeto de detección incluso cuando se detectan múltiples ácidos nucleicos diana simultáneamente. En este método, dado que el fragmento de ADN bicatenario obtenido en la etapa de amplificación se adapta a una hibridación y marcaje eficaces, la detección puede ser muy eficaz y sensible, y pueden omitirse etapas complejas de desnaturalización.

20 En este método de detección, los fragmentos amplificados correspondientes a múltiples ácidos nucleicos diana se amplifican preferentemente de una muestra por PCR múltiple, y se detectan de una vez en un cuerpo en fase sólida. Es decir, preferentemente la amplificación de ácido nucleico se realiza utilizando múltiples conjuntos de cebadores, cada uno de los cuales consta de un primer cebador y un segundo cebador, para permitir la detección mediante múltiples sondas de detección previamente asociadas a múltiples ácidos nucleicos diana, los múltiples fragmentos amplificados obtenidos en la etapa de amplificación se ponen en contacto con múltiples sondas de detección en el cuerpo en fase sólida para que se pueda producir la hibridación, y se detectan los productos de hibridación de los múltiples fragmentos amplificados y múltiples sondas de detección en el cuerpo en fase sólida.

25 (Agente de amplificación de ácido nucleico)

30 Como se muestra por el primer cebador y similares en **la figura 1A**, el agente de amplificación de ácido nucleico comprende un derivado de oligonucleótido que contiene, en orden desde el extremo 5', una primera secuencia de bases arbitraria y una primera secuencia de reconocimiento que reconoce una primera secuencia de bases en un ácido nucleico a amplificar, y que tiene un sitio enlazador capaz de inhibir o detener una reacción de ADN polimerasa dispuesto entre la primera secuencia de bases y la primera secuencia de reconocimiento. Dado que este agente de amplificación de ácido nucleico tiene dicho sitio enlazador, cuando el agente de amplificación de ácido nucleico se utiliza como al menos un cebador o similar en un método de amplificación de ácido nucleico, y una cadena de ADN obtenida por una reacción de amplificación y que contiene el agente de amplificación de ácido nucleico se transforma en una cadena molde, el sitio enlazador funciona como un punto de inhibición o detención para la reacción de ADN polimerasa en la cadena extendida, de modo que la cadena molde ya no funciona como tal más allá del sitio enlazador. Como resultado, más allá del sitio enlazador, no se forma ninguna cadena extendida complementaria a la cadena molde. El fragmento de ADN bicatenario obtenido como resultado es un ADN bicatenario que tiene la primera secuencia de bases arbitraria como una sola cadena en un extremo 5' como se muestra en **la figura 1A**.

35 Al igual que el primer cebador, como se muestra en **la figura 1B**, el otro cebador (segundo cebador) también puede ser un derivado de oligonucleótido que contiene, en orden desde el extremo 5', una segunda secuencia de bases arbitraria y una segunda secuencia de reconocimiento que reconoce una segunda secuencia de bases en un ácido nucleico a amplificar, y que también tiene un sitio enlazador capaz de inhibir o detener una reacción de ADN polimerasa, dispuesto entre la segunda secuencia de bases y la segunda secuencia de reconocimiento. Como se muestra en **la figura 1B**, esto da como resultado un ADN bicatenario que tiene la primera secuencia de bases arbitraria y la segunda secuencia de bases arbitraria como cadenas sencillas en el extremo 5', respectivamente.

40 El ADN bicatenario que tiene dichas cadenas sencillas que sobresalen se utiliza para diversas aplicaciones, incluida la hibridación. Normalmente, el agente de amplificación de ácido nucleico puede utilizarse como un cebador en varios métodos de amplificación de ácido nucleico.

45 La primera secuencia de bases arbitraria y/o la segunda secuencia de bases arbitraria puede ser la secuencia identificadora de la divulgación o puede ser una secuencia de bases que tenga un marcador unido o que sea capaz de hibridarse con una sonda marcadora. Cuando la primera secuencia de bases arbitraria se asocia a un marcador de esta manera, esta puede amplificar y marcar simultáneamente un ácido nucleico diana.

Las diversas realizaciones de los sitios enlazadores explicados anteriormente con respecto al método de detección también pueden aplicarse al sitio enlazador en el agente de amplificación de ácido nucleico. Además, diversas realizaciones de la secuencia identificadora y la primera secuencia de reconocimiento y la región de unión a un

- 5 marcador y la segunda secuencia de reconocimiento en el primer cebador y el segundo cebador, como se explicó anteriormente con referencia al presente método de detección, también pueden aplicarse a la primera secuencia de bases arbitraria y a la primera secuencia de reconocimiento del sitio de amplificación del ácido nucleico. Es decir, el agente de amplificación de ácido nucleico incluye el primer cebador y el segundo cebador como realizaciones.
- 10 La presente divulgación también proporciona un kit que incluye uno o dos o más agentes de amplificación de ácido nucleico. Este kit también puede contener un cuerpo en fase sólida para hibridar con fragmentos de ADN obtenidos utilizando el primer cebador y el segundo cebador.

- 15 La divulgación también proporciona un fragmento de ADN bicatenario obtenido en el método de detección, o en otras palabras, un fragmento de ADN bicatenario que tiene una parte monocatenaria en el lado 5' de al menos una cadena junto con una parte bicatenaria formada por emparejamiento de bases, en donde al menos una de las cadenas de ADN tiene una parte enlazadora capaz de inhibir o detener una reacción de ADN polimerasa, dispuesta entre la parte monocatenaria y la parte de unión bicatenaria, y la parte monocatenaria tiene una secuencia identificadora complementaria a la secuencia de bases de la sonda de detección. También proporciona un fragmento de ADN
- 20 bicatenario que también tiene una parte monocatenaria en el lado 5' de la otra cadena, y que tiene un marcador unido a esta parte monocatenaria. Además, dado que dichos fragmentos de ADN bicatenario son adecuados para la hibridación de sondas, la divulgación también proporciona una composición de hibridación de sondas que los contiene. La composición se utiliza en el método anterior.

- 25 La presente divulgación también proporciona un método para amplificar un ácido nucleico diana en una muestra. Es decir, proporciona un método que comprende una etapa de someter la muestra a amplificación de ácido nucleico utilizando al menos un primer cebador que comprende una primera secuencia de bases arbitraria y una primera secuencia de reconocimiento que reconoce una primera secuencia de bases en el ácido nucleico diana, con un sitio enlazador capaz de inhibir o detener una reacción de ADN polimerasa dispuesto entre la primera secuencia de bases
- 30 arbitraria y el primer sitio de reconocimiento. Como se muestra en la figura 1A, el fragmento amplificado obtenido por este método es un fragmento de ADN bicatenario que tiene una primera secuencia de bases arbitraria que sobresale como una cadena sencilla en el extremo 5' de al menos una cadena. Además, en este método de amplificación, es posible utilizar como otro cebador un segundo cebador que contiene una segunda secuencia de bases arbitraria y una segunda secuencia de reconocimiento que reconoce una segunda secuencia de bases en el ácido nucleico diana, con un sitio enlazador capaz de inhibir o detener una reacción de ADN polimerasa dispuesto entre la segunda secuencia de bases arbitraria y el segundo sitio de reconocimiento. En este caso, como se muestra en la figura 1B, es posible obtener un fragmento de ADN bicatenario que tiene secuencias primarias de bases arbitrarias monocatenarias que sobresalen en los extremos 5' de ambas cadenas. En el primer cebador, la primera secuencia de bases arbitraria puede proporcionarse con un marcador, o con una secuencia de bases capaz de unirse con una sonda marcadora.
- 35 Lo mismo se aplica al segundo cebador.
- 40

Las diversas realizaciones del método de detección explicado anteriormente también pueden aplicarse al primer cebador, al segundo cebador y a sitios enlazadores en este método de amplificación.

- 45 Este método de amplificación también puede proporcionarse como un método para producir un fragmento de ADN bicatenario que presenta una cadena sencilla en el extremo 5' de al menos una cadena de ADN. El método de amplificación también puede implementarse como un método de marcaje de ácido nucleico diana. También puede implementarse como un método de detección de ácido nucleico que tiene dicha etapa de marcaje. Es decir, utilizando esta etapa de amplificación (etapa de marcaje) en lugar de las etapas de marcaje del SNP y otros métodos de
- 50 detección desvelados en la publicación de solicitud de patente japonesa N.º 2008-306941, en la publicación de solicitud de patente japonesa N.º 2009-24 y en Analytical Biochemistry 364 (2007), 78-85, es posible eliminar la etapa de desnaturalización posterior y conseguir una hibridación muy eficaz y sensible.

(Método de detección de ácido nucleico diana mediante cromatografía de ácidos nucleicos)

- 55 El método de detección de un ácido nucleico diana mediante cromatografía de ácidos nucleicos (algunas veces denominado simplemente método de detección de acuerdo con este documento) desvelado en esta Descripción, comprende una etapa de hibridación en la que un ácido nucleico parcialmente bicatenario se pone en contacto con una sonda en un soporte de cuerpo en fase sólida en condiciones que permiten la hibridación por cromatografía de
- 60 ácidos nucleicos y una etapa de detección del producto de hibridación producido en la etapa de hibridación. A continuación, primero se explica el ácido nucleico parcialmente bicatenario mostrado en la figura 1A y después se explica la etapa de hibridación y de detección.

(Ácido nucleico parcialmente bicatenario)

- 65 Como se muestra con Detalle en la figura 3, en esta Descripción, el ácido nucleico parcialmente bicatenario 10, es un

ácido nucleico que comprende una primera cadena 12 y una segunda cadena 14, con una parte monocatenaria 20 en el extremo 5' de la primera cadena 12, donde la parte distinta de la parte monocatenaria 20 es una parte bicatenaria 16 formada por enlaces de hidrógeno. En esta Descripción, la parte monocatenaria 20 (o, en otras palabras, la etiqueta 20) de la primera cadena 12 del ácido nucleico parcialmente bicatenario 10, tiene la forma de una cadena colgante que sobresale de la parte bicatenaria 16.

La parte bicatenaria 16 del ácido nucleico parcialmente bicatenario 10, o en otras palabras, la parte bicatenaria 16 formada por emparejamiento de bases entre la primera cadena 12 y la segunda cadena 14, tiene, preferentemente, una estructura que comprende nucleótidos provistos de bases naturales (adenina, guanina, timina y citosina) que pueden proporcionar un sustrato para la reacción de extensión de la cadena de ADN mediante una ADN polimerasa, unidos entre sí por enlaces fosfodiéster. Es decir, la parte bicatenaria 16 tiene, preferentemente, una cadena principal de ribosa-fosfato natural, y también tiene ácidos nucleicos naturales con bases naturales, y más preferentemente consiste solo en ácidos nucleicos naturales. Como se comenta más adelante, se sintetiza preferentemente mediante la reacción de amplificación de ácido nucleico utilizada para obtener el ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 asociado al ácido nucleico diana.

El ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 está asociado a un ácido nucleico diana. En el presente documento, "asociado a un ácido nucleico diana" significa que tiene una parte bicatenaria 16 que contiene al menos parte de la parte bicatenaria del ácido nucleico diana. Esta parte bicatenaria 16 puede obtenerse, por ejemplo, mediante amplificación con un conjunto de cebadores que hibridan específicamente con parte de una secuencia diana en el ácido nucleico diana.

(Parte identificadora)

La misma configuración utilizada para la parte bicatenaria 16 puede adoptarse para la parte identificadora 20 del ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 de modo que pueda sintetizarse mediante una reacción de amplificación de ácido nucleico. Es decir, la parte identificadora 20 puede tener una estructura que comprenda nucleótidos que tengan bases naturales capaces de proporcionar un molde para una reacción de extensión de la cadena de ADN mediante una ADN polimerasa, unidos entre sí por enlaces fosfodiéster, y pueden contener ácidos nucleicos naturales o consistir únicamente en ácidos nucleicos naturales. La parte identificadora 20 también puede ser una cadena oligonucleotídica formada por síntesis no natural, sin una reacción de amplificación de ácido nucleico. Como cadena principal de esta cadena de nucleótidos, se puede adoptar una cadena principal de ribosa-fosfato natural o una cadena principal de PNA (ácido peptidonucleico), una cadena principal de BNA (ácido nucleico puenteado) u otra cadena principal conocida. Para las bases, ya que solo requieren hibridarse específicamente con la sonda, además, es posible incluir L-ADN no natural o similar, siempre y cuando este coincida con la sonda, o las bases pueden consistir únicamente en L-ADN. También se pueden incluir bases no naturales, o las bases pueden consistir únicamente en bases no naturales. Aunque la parte identificadora está asociada con el ácido nucleico diana, no requiere sintetizarse por una reacción de amplificación de ácido nucleico, a diferencia de la parte bicatenaria 16. Por tanto, la parte identificadora 20 puede derivar del cebador en la reacción de amplificación de ácido nucleico.

La parte identificadora 20 del ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 tiene una secuencia identificadora capaz de hibridarse específicamente con una sonda que presenta un soporte de cuerpo en fase sólida. La secuencia identificadora 22 es una secuencia que permite la hibridación con una sonda, y detecta un ácido nucleico diana. Por lo tanto, está diseñada para hibridarse con la secuencia de detección de la sonda para cada ácido nucleico diana. Normalmente, es una secuencia de bases complementaria a la secuencia de detección. Como resultado, una sonda está asociada con un ácido nucleico diana. La longitud de bases de la secuencia identificadora 22 coincide con la longitud de bases de la secuencia de detección de la sonda, y preferentemente tiene una longitud de 20 a 50 bases, o más preferentemente de 20 a 25 bases.

(Sitio enlazador)

Se proporciona un sitio enlazador 30 capaz de inhibir o detener una reacción de extensión de la cadena de ADN por una ADN polimerasa, preferentemente, entre la parte identificadora 20 de la primera cadena 12 y la parte correspondiente a la parte bicatenaria 16 del ácido nucleico parcialmente bicatenario 10. Como se ha comentado anteriormente, proporcionando el sitio enlazador 30 es posible sintetizar un ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 con una parte identificadora 20 mediante una reacción de amplificación de ácido nucleico. Proporcionando dicho sitio enlazador 30 también se mejora la movilidad autónoma de la parte identificadora 20, permitiendo así una hibridación más eficaz con la sonda.

Otros ejemplos del sitio enlazador 30 incluyen secuencias de ácido nucleico que tienen estructuras tridimensionales que inhiben el avance de la polimerasa, tales como fuertes estructuras en horquilla y en seudonudo, así como ácidos nucleicos en forma de L, ácidos nucleicos artificiales y otros ácidos nucleicos naturales, ácidos nucleicos diana, y ARN, cadenas alifáticas y otras estructuras de ácidos no nucleicos. Como ejemplos de ácidos nucleicos artificiales se incluyen ácidos peptidonucleicos, ácidos nucleicos puenteados, azobencenos y similares.

(Marcadores)

Como se ha explicado anteriormente, el ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 presenta un marcador 40 o una sustancia 42 que se une a un marcador. En este método de detección, el ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 se utiliza en cromatografía de ácidos nucleicos, y presenta solo una parte identificadora 20 para hibridarse con la sonda, pero no con una sola cadena para el marcador 40.

El marcador 40 o la sustancia 42 de unión a un marcador, pueden proporcionarse en cualquier parte del ácido nucleico parcialmente bicatenario 10. Por ejemplo, como se muestra en **la figura 3**, se proporciona en el extremo 5' de una cadena. También se puede proporcionar en toda o en parte de la primera cadena 12 y la segunda cadena 14. El marcador 40 o la sustancia 42 de unión a un marcador, se incorporan normalmente en el ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 en la reacción de amplificación de ácido nucleico del ácido nucleico parcialmente bicatenario 10.

(Etapa de amplificación)

El ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 suministrado en la etapa de hibridación se obtiene preferentemente mediante una reacción de amplificación de ácido nucleico. A continuación se explica un ejemplo de una etapa de amplificación de ácido nucleico para obtener el ácido nucleico parcialmente bicatenario 10.

Como se muestra en **la figura 4**, la etapa de amplificación para obtener el ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 se realiza utilizando un primer cebador 50 y un segundo cebador 60. El método de amplificación de ácido nucleico en la etapa de amplificación de ácido nucleico puede ser un método conocido, tal como PCR, en la que se obtiene un fragmento de ADN bicatenario amplificando ADN en una reacción de ADN polimerasa.

(Primer cebador)

El primer cebador 50 es un cebador para obtener la primera cadena 12 de ácido nucleico parcialmente bicatenario 10. Como se ha comentado anteriormente, el primer cebador 50 contiene una secuencia identificadora 22 complementaria a una sonda previamente asociada al ácido nucleico diana, y una primera secuencia de reconocimiento 12a que reconoce una primera secuencia de bases en el ácido nucleico diana. La secuencia identificadora 22 corresponde a la secuencia identificadora 22 de la parte identificadora 20 del ácido nucleico parcialmente bicatenario 10. El primer cebador 50 tiene un sitio enlazador 30 entre la primera secuencia de reconocimiento 12a y la secuencia identificadora 22. El sitio enlazador 30 es como se ha explicado anteriormente.

El primer cebador 50 tiene preferentemente la secuencia identificadora 22, el sitio enlazador 30 y la primera secuencia de reconocimiento 12a en ese orden desde el extremo 5'. De esta manera, como se muestra en **la figura 4**, se obtiene una segunda cadena 14 que tiene como su extremo 3' una base que se empareja con una base de un nucleótido adyacente al lado 3' del sitio enlazador 30 desde el primer cebador 50, o con una base adyacente a esa base, y que carece de una cadena complementaria a la secuencia identificadora 22 del primer cebador 50.

(Segundo cebador)

El segundo cebador 60 es un cebador para obtener la segunda cadena 14 del ácido nucleico parcialmente bicatenario 10. Como se muestra en **la figura 4**, como se ha comentado anteriormente, el segundo cebador 60 contiene una segunda secuencia de reconocimiento 14a que reconoce una segunda secuencia de bases en el ácido nucleico diana.

Como se muestra en **la figura 4**, el segundo cebador 60 puede proporcionarse de antemano con un marcador 40. El propósito del marcador 40 es detectar el ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 unido a la sonda en el soporte de cuerpo en fase sólida. Una sustancia convencionalmente conocida puede seleccionarse apropiadamente y utilizarse como marcador 40. El marcador 40 se proporciona preferentemente en el extremo 5' del segundo cebador 60.

Como se muestra en **la figura 5**, el segundo cebador 60 también puede proporcionarse con una sustancia de unión a un marcador 42. La sustancia de unión a un marcador 42 se proporciona preferentemente en el extremo 5' del segundo cebador 60. Además, como se muestra en **la figura 6**, puede que el segundo cebador 60 no tenga ni marcador 40 ni sustancia de unión a un marcador 42. Esto se debe a que en la etapa de amplificación puede obtenerse un ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 marcado con un marcador 40 introducido o con una sustancia 42 que se une a un marcador en los sitios de extensión de ADN, realizando una reacción de amplificación de ácido nucleico con una composición de trifosfato de nucleósido que contiene un derivado de trifosfato de nucleósido que presenta el marcador 40 o la sustancia 42 que se une a un marcador.

El segundo cebador 60 tiene preferentemente el marcador 40 o la sustancia 42 que se une a un marcador y la segunda secuencia de reconocimiento 14a en ese orden desde el extremo 5'. De esta manera, es posible obtener una segunda cadena 14 que tenga el marcador 40 o la sustancia 42 que se une a un marcador en el extremo 5' (**figuras 4, y 5**).

Además, un ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 de la forma mostrada en **las figuras 4 y 5** (de acuerdo con este documento, un ácido nucleico parcialmente bicatenario de este tipo se denomina ácido nucleico bicatenario 10a) puede obtenerse realizando una etapa de amplificación utilizando el primer cebador explicado anteriormente y los dos

tipos de segundos cebadores I y II explicados a continuación. En **la figura 7** se muestran los cebadores y las etapas de amplificación utilizados.

(Segundo cebador I)

Como se muestra en **la figura 7**, el segundo cebador I 70 comprende una secuencia marcadora 72 y una segunda secuencia de reconocimiento 14a que reconoce la segunda secuencia de bases. La segunda secuencia de reconocimiento 14a es como se explicó anteriormente. La secuencia marcadora 72 es para introducir una nueva secuencia de bases con fines de marcaje en el producto de amplificación obtenido con el segundo cebador I 70, y puede diseñarse sin referencia a la secuencia de bases del ácido nucleico diana o a la sonda de detección. Tampoco es necesario que esté asociada. Por tanto, no es necesario que la secuencia marcadora 72 sea diferente para cada ácido nucleico diana, y puede utilizarse una secuencia de bases normal para todos los ácidos nucleicos diana, pero cuando se utilizan dos o más marcadores o similares, pueden utilizarse diferentes secuencias de bases para los diferentes marcadores. Es decir, la secuencia marcadora 72 puede estandarizarse en lugar de ser única para cada ácido nucleico diana. También puede ser una secuencia de bases completamente artificial diseñada, por ejemplo, para optimizar la reactividad en la reacción de amplificación. El segundo cebador I 70, comprende, preferentemente, la secuencia marcadora 72 y la segunda secuencia de reconocimiento en ese orden desde el extremo 5'.

(Segundo cebador II)

El segundo cebador II 80 contiene el marcador 40 o la sustancia 42 de unión a un marcador y una secuencia marcadora 72. El marcador 40 o la sustancia 42 de unión a un marcador, es como se ha explicado anteriormente. El marcador 40 o la sustancia 42 de unión a un marcador está unido al extremo 5' del segundo cebador II. La secuencia marcadora 72 es como se explica con respecto al segundo cebador I. En el segundo cebador II 80, la secuencia de bases del segundo cebador II 80 con el marcador unido o similar es una secuencia habitual. Por tanto, es posible proporcionar a bajo coste el segundo cebador II 80 con el marcador unido.

Como se muestra en **la figura 7**, se obtiene un ácido nucleico parcialmente bicatenario 90 que tiene la secuencia identificadora 22 como una parte monocatenaria y que tiene la secuencia marcadora 72 junto con su secuencia complementaria 72a como un producto de amplificación realizando una reacción de amplificación de ácido nucleico en un ácido nucleico diana con el primer cebador 50 y el segundo cebador I 70. Una vez obtenido este ácido nucleico parcialmente bicatenario 90, el segundo cebador II 80 se hibrida con una cadena del ácido nucleico parcialmente bicatenario 90 (la cadena que tiene la secuencia 72a complementaria a la secuencia marcadora 72) en lugar del segundo cebador I 70, produciendo una reacción de amplificación de ácido nucleico. Como resultado, como se muestra en **la figura 7**, se produce un ácido nucleico parcialmente bicatenario 10a que tiene un marcador o similar. Si el segundo cebador I 70 está presente en el sistema de reacción de amplificación, el segundo cebador I 70 también actúa sobre el ácido nucleico parcialmente bicatenario 90 y también sintetiza el ácido nucleico parcialmente bicatenario 90.

El uso del segundo cebador I 70 y del segundo cebador II 80 en lugar del segundo cebador 60, produce una reacción de amplificación de ácido nucleico eficaz, dando como resultado una buena sensibilidad de detección. Es decir, dependiendo de la secuencia de bases del ácido nucleico diana, en algunos casos, la coincidencia entre el segundo cebador 60 y el ácido nucleico diana puede ser pobre y puede que la reacción de amplificación del ácido nucleico no avance bien, dando como resultado una sensibilidad de detección pobre. Incluso en dichos casos, si el ácido nucleico parcialmente bicatenario 90 puede obtenerse una vez con el conjunto de cebadores que consta del primer cebador 50 y del segundo cebador I 70, el segundo cebador II 80 actúa después sobre la cadena que tiene la cadena complementaria a la secuencia marcadora 72 en el ácido nucleico 100 parcialmente bicatenario, y se puede obtener una reacción de amplificación de ácido nucleico eficaz con el primer cebador 50 y el segundo cebador II 80.

El orden en el que se suministra el primer cebador 60, el segundo cebador I 70 y el segundo cebador II 80, puede determinarse adecuadamente. Por ejemplo, pueden suministrarse simultáneamente para actuar sobre el ácido nucleico diana en el sistema de reacción de amplificación de ácido nucleico, o por ejemplo, el primer cebador 60 y el segundo cebador I 70 pueden suministrarse primero, seguido por el segundo cebador II 80. También pueden suministrarse simultáneamente al sistema de reacción de amplificación de ácido nucleico.

Al incluir el segundo cebador II 80 en exceso sobre el segundo cebador I 70, es posible sintetizar un ácido nucleico parcialmente bicatenario 110 con alta eficacia. Por ejemplo, el segundo cebador II 80 se suministra al sistema de reacción en una cantidad de 1 a 10 veces o preferentemente de 1 a 5 veces la cantidad del segundo cebador I.

Además, como se muestra en **la figura 8**, se puede obtener un equivalente del ácido nucleico parcialmente bicatenario 10a, utilizando una sonda marcadora 100 que presenta el marcador 40 o la sustancia 42 de unión al marcador que se muestra a continuación, sin utilizar el segundo cebador II 80. Es decir, también puede obtenerse realizando una reacción de amplificación de ácido nucleico en el ácido nucleico diana utilizando el primer cebador 50 y el segundo cebador I 70 en presencia de la sonda marcadora 100. En **la figura 8** se muestran los cebadores y las sondas utilizados y las etapas de amplificación.

(Sonda marcadora)

Como se muestra en **la figura 8**, la sonda marcadora 120 presenta una cadena complementaria 72a capaz de hibridarse específicamente con la secuencia marcadora 72 del segundo cebador I 70, y también con un marcador 40 o sustancia 42 de unión a un marcador en el extremo 3'. La propia secuencia marcadora 72 no es específica ni está asociada al ácido nucleico diana, y dado que puede ser una secuencia corriente independientemente del ácido nucleico diana, la secuencia complementaria 72a también constituye una secuencia corriente por las mismas razones. Por tanto, la sonda marcadora 100 también puede suministrarse a bajo coste como en el caso del segundo cebador II 80.

Como se muestra en **la figura 8**, se realiza una etapa de amplificación en el ácido nucleico diana utilizando el primer cebador 50 y el segundo cebador I 70 en presencia de la sonda marcadora 100. Como en **la figura 7**, se sintetiza un ácido nucleico parcialmente bicatenario 90 que tiene la secuencia identificadora 22 como una parte monocatenaria, y que tiene la secuencia complementaria 72a en el extremo 3' de la cadena de ADN que incluye la secuencia identificadora 22. En la reacción de amplificación posterior, el primer cebador 50 actúa sobre la cadena sencilla que sirve como molde (que tiene la secuencia marcadora 72 en el extremo 5'), al extender el ADN. Durante esta reacción de extensión de ADN, la sonda marcadora 100 se hibrida con la secuencia marcadora 72 en el extremo 5' de la cadena molde a través de la secuencia complementaria 72a de la misma manera que la primera sonda 50 se hibrida con la cadena molde. Como resultado, en la reacción de extensión de ADN, la reacción de la ADN polimerasa se inhibe o detiene en el extremo 5' de la cadena molde, o en otras palabras, en el sitio de hibridación de la sonda de marcaje 100, y se inhibe o detiene la extensión de ADN.

Por tanto, como se muestra en **la figura 8**, se sintetiza un ácido nucleico parcialmente bicatenario 92 que tiene la secuencia identificadora 22 como una cadena sencilla en el extremo 5' de una cadena, y la secuencia marcadora 72 como una cadena sencilla en el extremo 5' de la otra cadena. Al mismo tiempo, la sonda marcadora 100 se hibrida con la secuencia marcadora 72 en el ácido nucleico 92 parcialmente bicatenario. Como resultado, el producto de amplificación obtenido a partir de la reacción de amplificación de ácido nucleico se transforma en compuesto 110 que comprende la sonda marcadora 100 hibridada con el ácido nucleico parcialmente bicatenario 92. La estructura de este compuesto 110 como producto de amplificación difiere de la del ácido nucleico parcialmente bicatenario 10a, pero conserva el marcador 40 o la sustancia 42 de unión a un marcador en el otro extremo de la parte monocatenaria que tiene la secuencia identificadora 22. Por tanto, funciona de la misma manera que el ácido nucleico parcialmente bicatenario 10a en la hibridación posterior.

El producto de amplificación puede marcarse de manera eficaz si en lugar del segundo cebador II 80 se utiliza la sonda marcadora 100. Como resultado mejora la sensibilidad de la detección.

La ADN polimerasa utilizada en la etapa de amplificación mostrada en **la figura 8** es, preferentemente, una en la que se suprime o falta la actividad exonucleasa 3'-5'. Esto sirve para impedir o inhibir la descomposición de la sonda marcadora 100.

La etapa de amplificación se realiza con estos cebadores. Como se explicó anteriormente, como método de amplificación de ácido nucleico, pueden aplicarse varios métodos conocidos, aunque normalmente se utiliza PCR, PCR múltiple u otro método de PCR. La composición de la solución, el control de la temperatura y similar, para realizar la etapa de amplificación de ácido nucleico, puede configurarla adecuadamente un experto en la materia.

(Etapa de hibridación)

La etapa de hibridación es una etapa de poner el ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 (incluido el 10a) o su equivalente, el compuesto 110 (denominado ácido nucleico parcialmente bicatenario y similares de acuerdo con este documento), en contacto con la sonda 220 en el soporte de cuerpo en fase sólida 210, en condiciones que permitan la hibridación por cromatografía de ácidos nucleicos. La unidad de cromatografía 200 utilizada en la etapa de hibridación, que es un cuerpo en fase sólida que comprende el soporte de cuerpo en fase sólida 210 con la sonda 220 fijada en el soporte de cuerpo en fase sólida 210, se explica en primer lugar.

(Unidad de cromatografía)

Como se muestra en **la figura 9**, la unidad de cromatografía 200 presenta el soporte de cuerpo en fase sólida 210 y una o dos o más sondas 220 fijadas al soporte de cuerpo en fase sólida 210. El soporte de cuerpo en fase sólida 210 no está particularmente limitado, y puede adoptarse un portador convencional conocido donde se puede mover un líquido por acción capilar. Por ejemplo, para el soporte de cuerpo en fase sólida 210, puede utilizarse un material poroso que conste principalmente de un polímero tal como polietersulfona, nitrocelulosa, nailon, polifluoruro de vinilideno o polímeros similares. Preferentemente, también puede utilizarse un material de celulosa, tal como papel de filtro. La unidad de cromatografía 200 no tiene que estar necesariamente configurada con un solo soporte de cuerpo en fase sólida 210. Se pueden unir múltiples portadores de cuerpo en fase sólida 210 siempre que toda la unidad pueda mover el medio de revelado por acción capilar. La forma global de la unidad de cromatografía 200 no está particularmente limitada. Puede estar en forma de una lámina, de una barra fina u otra forma que permita el revelado y la dispersión de la solución de cromatografía por acción capilar. Preferentemente tiene una forma alargada y fina, un extremo cuya dirección longitudinal se pone en contacto con el medio de revelado para cromatografía.

La sonda 220 incluye una secuencia de detección 222 capaz de hibridarse específicamente con la secuencia identificadora 22 de un ácido nucleico parcialmente bicatenario o similar asociado al ácido nucleico diana. La secuencia de detección 222 tiene preferentemente una secuencia de bases que es complementaria y, preferentemente, completamente complementaria a, la secuencia identificadora 22 del ácido nucleico parcialmente bicatenario o similar.

Dado que la secuencia de detección 222 solo necesita ser capaz de hibridarse específicamente con la secuencia identificadora 22 unida al ácido nucleico parcialmente bicatenario o similar, esta puede diseñarse independientemente del ácido nucleico diana.

La longitud de la secuencia de detección 222 no está particularmente limitada. Por ejemplo, puede tener una longitud de aproximadamente 20 a 50 bases. Esto es porque dentro de este intervalo, la eficacia de la hibridación generalmente se puede asegurar al mismo tiempo que se asegura la especificidad de cada secuencia de detección. Por ejemplo, una secuencia de detección de esta longitud de bases puede ser una secuencia de 46 bases obtenida combinando dos secuencias de 23 bases seleccionadas de las secuencias de bases de las SEQ ID NO: 1 a 100 a continuación y sus secuencias complementarias, o una secuencia de bases obtenida por adición, eliminación o similar, de bases adecuadas en estas secuencias de bases combinadas. Más preferentemente, tiene una longitud de 20 a 25 bases. Por ejemplo, una secuencia de detección de esta longitud de bases puede ser una de las secuencias de 23 bases de las SEQ ID NO: 1 a 100 a continuación o una secuencia complementaria de las mismas, o una secuencia obtenida por adición, eliminación o similar, de bases adecuadas en estas secuencias de bases.

Dado que en el primer cebador 50, la secuencia identificadora 22 y el ácido nucleico parcialmente bicatenario o similar están emparejados con la secuencia de detección 122, la secuencia identificadora 22 tiene preferentemente la misma longitud de bases que la secuencia de detección.

Una o dos o más sondas 220 están fijadas a un solo soporte de cuerpo en fase sólida 210. El modo de fijación no está particularmente limitado. Puede utilizarse un método de fijación conocido. Este puede realizarse, por ejemplo, mediante una interacción estática aparte entre la sonda 220 y la superficie del soporte de cuerpo en fase sólida 210, o mediante unión covalente o similar entre grupos funcionales dentro del material del soporte de cuerpo en fase sólida (incluidos grupos funcionales preexistentes). y grupos funcionales añadidos para fines de fijación) y grupos funcionales dentro de la sonda 220.

Como se muestra en la figura 10, las regiones (regiones sonda) 230 en el soporte de cuerpo en fase sólida 210 con las sondas 220 fijadas a estas, se forman en un patrón arbitrario. Las regiones sonda 230 pueden tener cualquier configuración, por ejemplo, estas regiones pueden tener una forma de punto o línea o pueden estar formadas en otras configuraciones. Normalmente, múltiples regiones sonda 230 están dispuestas a intervalos adecuados en la dirección de revelado, con cada región formada como una línea perpendicular en la dirección de revelado del medio de revelado de cromatografía. Preferentemente, una región sonda 230 corresponde a un tipo de sonda.

Como se muestra en la figura 10, cuando se proporcionan regiones sonda 230 para 3 o más sondas 220, las tres o más regiones sonda 230 también pueden formarse como líneas paralelas. En este caso, los intervalos entre las tres o más regiones sonda 230 se determinan de manera apropiada. Por ejemplo, si hay 7 regiones sonda, estas pueden dividirse en un grupo de 2 regiones sonda 230 más hacia arriba en la dirección de revelado, en un grupo de 3 regiones sonda 230 hacia abajo y en un grupo de 2 regiones sonda 230 más hacia abajo. En este caso, se pueden establecer intervalos específicos entre regiones sonda 230 individuales dentro de cada grupo de regiones múltiples 230 en cada parte del soporte de cuerpo en fase sólida 210. Por ejemplo, los intervalos pueden determinarse para que sean iguales.

Como se muestra en la figura 10, el soporte de cuerpo en fase sólida 210 también puede presentar una o dos o más regiones marcadoras de posición 240. Las regiones marcadoras de posición 240 están diseñadas preferentemente como regiones que pueden detectarse visualmente en las etapas de hibridación y detección. Normalmente, están compuestas por un pigmento o colorante que es insoluble en el medio de revelado. También se forman preferentemente como líneas perpendiculares a la dirección de revelado del medio de revelado. Además, las propias regiones marcadoras de posición 240 pueden estar compuestas por una combinación de uno o dos o más seleccionados del grupo que conste de letras, símbolos, números y gráficos. Asimismo, la tinción de las regiones marcadoras de posición 240 no está particularmente limitada. Las regiones marcadores de posición 240 múltiple pueden ser del mismo color, o pueden asignarse colores diferentes. Preferentemente, son de un tono diferente al de la tinción de las regiones sonda 230.

Las ubicaciones de las regiones marcadoras de posición 240 se determinan de manera apropiada, pero preferentemente hay dos o más. Por ejemplo, como se muestra en la figura 10, entre dos regiones marcadoras de posición 240 se proporciona, preferentemente, un número adecuado de regiones sonda 230, tal como 2, 3 o 4 o más. Esto facilita la identificación de múltiples regiones sonda 230 sin errores. También pueden proporcionarse 1, 2 o 3 o más regiones sonda 230 hacia arriba desde la región marcadora de posición 240, y 1, 2, o 3 o más regiones sonda 230 hacia abajo desde la región marcadora de posición 240. Esto facilita la identificación eficaz de regiones sonda 230 múltiples utilizando dos regiones marcadoras de posición 240.

Quando el total de las 1 o 2 o más regiones sonda 230 y las regiones marcadoras de posición 240 dispuestas en el soporte de cuerpo en fase sólida 210 es de 3 o más, sus intervalos entre ellas pueden ser iguales. Proporcionar los mismos intervalos facilita la especificidad de las posiciones de las regiones sonda 230. Es particularmente apropiado tener tres regiones sonda 230 entre dos marcadores de posición 240. Por tanto, es posible determinar de un vistazo si una región sonda 230 teñida está más cerca de una u otra de las dos regiones marcadoras de posición 240, o si está ubicada exactamente entre las dos regiones marcadoras de posición. Cuando hay 5 regiones sonda 230, y las dos regiones sonda 230 adicionales están dispuestas fuera de los respectivos marcadores de posición, pueden diferenciarse fácilmente hasta 5 ubicaciones al determinar de un vistazo si una región sonda está fuera de los marcadores de posición 240 en lugar de las 3 ubicaciones. Desde esta perspectiva, el número de regiones sonda 230 fácilmente distinguible puede aumentar aumentando el número de regiones marcadoras de posición 240.

Como se muestra en **la figura 10**, la unidad de cromatografía 200 puede presentar una parte de contacto líquida 250 para poner en contacto un extremo de la unidad con un medio de revelado para la cromatografía de ácidos nucleicos. La unidad de cromatografía 100 está, preferentemente, en forma de una tira fina alargada, y un extremo en la dirección longitudinal es la parte de contacto líquido 250. Dicha parte de contacto líquido 250 es particularmente deseable cuando el medio de revelado está dispuesto en la parte inferior de la unidad de cromatografía 200 y el medio de revelado se mueve hacia arriba hacia la parte superior de la unidad.

La forma de la parte de contacto líquido 250 no está particularmente limitada siempre que pueda sumergirse en el medio de revelado. Por ejemplo, puede tener una forma que se estrecha hacia la punta. Esto hace posible sumergir o poner en contacto la parte de contacto líquido 250 de la unidad de cromatografía 200 con un medio de revelado suministrado a un tubo con fines de ensayo. A la inversa, cuando el objetivo es aumentar la velocidad de revelado, la parte de contacto líquido 250 puede recibir un área o una capacidad más grande que otras áreas. Por ejemplo, cuando la unidad de cromatografía 200 adopta una forma de barra, esta puede tener una parte de contacto de líquido 250 estrechada que es más ancha hacia la parte inferior que la parte en forma de barra.

La parte de contacto líquido 250 puede tener una forma específica de antemano, pero la parte de contacto líquido 250 también puede formarse haciendo que la punta de la unidad de cromatografía 200 tenga una forma específica en el momento del contacto con el medio de revelado. Por ejemplo, como se muestra en **las figuras 11A a 11C**, puede proporcionarse un marcador 260 de formación de parte de contacto líquido para formar la parte de contacto líquido 250 con una forma específica. El marcador 260 de formación de parte de contacto líquido puede ser un marcador que muestre un sitio de corte para cortar la unidad de cromatografía 200 con tijeras o similar para formar una parte de contacto líquido 250 con una forma específica. Por ejemplo, como se muestra en **la figura 11A**, un punto de inicio de corte y un punto de final de corte se pueden mostrar con líneas visibles. Como alternativa, como se muestra en **la figura 11B**, la propia línea de corte se puede mostrar con una línea visible. Asimismo, como se muestra en **la figura 11C**, también se puede indicar la parte que se va a eliminar. También es posible no mostrar el corte en absoluto, o mostrar la parte que se debe dejar.

El marcador 260 de formación de parte de contacto líquido también puede ser débil para permitir que la unidad de cromatografía 200 se corte para formar la parte de contacto líquido 250. En el presente documento "débil" significa debilidad o fragilidad de la unidad de cromatografía 200 suficiente para guiar o promover el corte o la eliminación con las manos o los dedos. Debilidad puede significar debilidad química o similar, o debilidad física o similar. Por ejemplo, el marcador 260 de formación de parte de contacto líquido puede formarse proporcionando perforaciones en el sitio de corte deseado, o reduciendo el grosor del sitio de corte deseado, para facilitar la concentración de tensión en el sitio de corte deseado. Proporcionar el marcador 260 es una manera de permitir que la unidad de cromatografía 200 se corte a lo largo del marcador 260 para que la parte de contacto líquido 250 pueda formarse fácilmente con una forma específica.

La unidad de cromatografía 200 también puede presentar una región marcadora distinta o similar para indicar cuándo se ha expandido lo suficiente el medio de revelado. También puede presentar una parte de sujeción para el marcador 40 con el fin de unir el marcador 40 con la sustancia 42 de unión a un marcador cuando el ácido nucleico parcialmente bicatenario o similar tiene una sustancia 42 de unión a un marcador. Al igual que la región sonda y similares, todos estos sitios están formados por materiales porosos que en sí mismo son capaces de mover el medio de revelado, y están configurados para no inhibir el revelado continuo del medio de revelado en cada sitio. También puede proporcionarse una parte de absorción de agua para absorber el medio de revelado después de finalizar el revelado hacia abajo desde la región de sonda.

Quando un ácido nucleico parcialmente bicatenario o similar se obtiene como el producto de amplificación de una etapa de amplificación antes de la etapa de hibridación, se puede preparar un medio de revelado que comprende una solución de reacción de amplificación que contiene este producto de amplificación. Cuando el ácido nucleico parcialmente bicatenario o similar tiene un marcador 40, no es necesario añadir un marcador 40 distinto al medio de revelado.

La unidad de cromatografía 200 explicada anteriormente también puede proporcionarse como un kit junto con un conjunto de cebadores adaptados a la sonda 220 del soporte de cuerpo en fase sólida 210. También se puede incluir en el kit un reactivo para el marcador 40. Por ejemplo, en el conjunto de cebadores puede incluirse un cebador que

tenga el marcador 40, o también puede incluirse dNTP provisto con el marcador 40 o con la sustancia 42 de unión a un marcador, utilizados en la reacción de amplificación de ácido nucleico. También puede incluirse un marcador 40 para unirse a una sustancia 42 de unión a un marcador.

5 (Medio de revelado)

El medio de revelado es un líquido que se dispersa y se mueve por acción capilar en el soporte de cuerpo en fase sólida 110 de la unidad de cromatografía 100, y es un medio para mover el ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 en el soporte de cuerpo en fase sólida 110. El medio de revelado es un medio acuoso, El medio acuoso no está particularmente limitado, y puede ser agua, un disolvente orgánico soluble en agua, o una mezcla de agua y 1 o 2 o más de dichos disolventes orgánicos. Los disolventes orgánicos solubles en agua son muy conocidos por los expertos en la materia, y como ejemplos se incluyen alcoholes inferiores con 1 a 4 átomos de carbono, DMSO, DMF acetato de metilo, acetato de etilo y otros ésteres, y acetonas y similares. Preferentemente, el medio de revelado consiste principalmente en agua.

El medio de revelado puede incluir componentes para conservar un pH constante. Esto es, para garantizar un intervalo de pH para conservar una condición, estabilidad y ambiente de revelado deseables para el ácido nucleico parcialmente bicatenario 10. Las sales del tampón difieren dependiendo del pH deseado, que normalmente es de 6,0 a 8,0, siendo más deseable de 7,0 a 8,0. Los componentes para obtener dicho pH pueden ser, por ejemplo, ácido acético y acetato de sodio (tampón de acetato), ácido cítrico y citrato de sodio (tampón citrato), ácido fosfórico y fosfato de sodio (tampón fosfato) y similares. Otro ejemplo es la solución salina tamponada con fosfato (PBS) o similar. La solución de reacción de amplificación también puede utilizarse como medio de revelado. La solución de reacción de amplificación también puede utilizarse como medio de revelado después de que su composición o concentración se haya ajustado mediante la adición de un disolvente adicional u otro componente, como un tensioactivo o sales adecuadas o similares.

Cuando el ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 está provisto de la sustancia 42 de unión a un marcador, el marcador 40 puede añadirse de antemano en la etapa de amplificación antes de realizar la reacción de amplificación. Por tanto es posible obtener un ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 provisto de un marcador 40 como compuesto del marcador 40 unido a la sustancia 42 de unión a un marcador. De manera similar, se puede obtener un compuesto añadiendo el marcador 40 al ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 en la solución de reacción de amplificación después de finalizar la reacción. También puede obtenerse un compuesto similar añadiendo el marcador 40 al líquido para el medio de revelado (el líquido añadido se denomina líquido para el medio de revelado cuando la solución de reacción de amplificación se utiliza como medio de revelado) y después mezclando la solución de reacción de amplificación con el líquido para el medio de revelado.

Cuando en la etapa de hibridación se suministra una solución de reacción de amplificación que contiene el ácido nucleico parcialmente bicatenario 10, preferentemente, el medio de revelado se prepara en un recipiente, un tubo u otra cavidad que se utilice en la etapa de amplificación, o en otras palabras, en una cavidad que contenga la solución de reacción de amplificación, y la etapa de hibridación se realiza poniendo el medio de revelado en contacto con la unidad de cromatografía dentro de la cavidad. De esta manera, se puede lograr una detección muy fiable con un bajo riesgo de contaminación sin tener que recoger la solución de reacción de amplificación con una pipeta o similar y suministrarla a la etapa de hibridación. También pueden reducirse errores operativos.

Por ejemplo, normalmente, la PCR u otra etapa de amplificación se realiza en un recipiente en forma de tubo. La hibridación puede realizarse añadiendo en este recipiente en forma de tubo el marcador 40, según sea necesario, y después suministrando el recipiente en forma de tubo a la unidad de cromatografía 100. Por ejemplo, cuando el ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 presenta biotina como sustancia 42 de unión a un marcador, como marcador 40 pueden utilizarse partículas de látex o similares teñidas, recubiertas con estreptavidina o similar.

A continuación se explican las etapas para realizar la hibridación entre el ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 y la sonda 120 utilizando el medio de revelado y la unidad de cromatografía 100.

La realización de la cromatografía de ácidos nucleicos no está particularmente limitada cuando se realiza la etapa de hibridación. El objetivo puede ser lograr el revelado en un estado casi horizontal. En este caso, normalmente, la cromatografía se realiza, por ejemplo, empapando una cantidad fija del medio de revelado sobre un contacto líquido 150. La forma de la cromatografía también puede diseñarse para lograr un revelado casi perpendicular. En este caso, normalmente, la cromatografía se realiza sujetando la unidad de cromatografía 100 en una dirección casi perpendicular, y sumergiendo la parte de contacto líquido 50 en el extremo de la unidad 100 en el medio de revelado.

Dependiendo de la forma de la cromatografía, el medio de revelado puede dispersarse a través del soporte de cuerpo en fase sólida 210 y expandirse a la región de sonda 230 cuando la unidad de cromatografía 200 se pone en contacto con el medio de revelado.

Cuando el medio de revelado contiene un ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 que tiene una parte identificadora 20 para hibridarse con una sonda 220 en una región de sonda 230, el ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 se hibrida con la sonda 220, formando un producto de hibridación. De este modo se obtiene una señal correspondiente

al marcador 40 del ácido nucleico parcialmente bicatenario 10. Cuando el marcador 40 muestra luminiscencia o tinción que puede detectarse a simple vista, el marcador previamente asociado con el ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 puede detectarse rápidamente.

- 5 Cuando hay múltiples regiones sonda 230, y otro ácido nucleico parcialmente bicatenario 10 para hibridarse con otra sonda 220, se forma un producto de hibridación en la región de sonda correspondiente 230.

- 10 No hay limitaciones particulares sobre las condiciones para la etapa de hibridación, la cual puede realizarse en aire a una temperatura de 5 °C a 40 °C, por ejemplo, o preferentemente, de 15 °C a 35 °C. La cromatografía comienza en la unidad de cromatografía 100, por ejemplo, impregnando parte de (la parte inferior o la parte de suministro) una unidad de cromatografía en forma de lámina con una anchura de 2,0 mm a 8,0 mm y una altura (o longitud) de 20 mm a 100 mm con aproximadamente de 10 µl a 60 µl de medio de revelado. El tiempo necesario para que el medio de revelado pase completamente a través de las regiones de sonda 130 es de aproximadamente 2 a 50 minutos.

- 15 (Etapa de detección)

- La etapa de detección es una etapa para detectar el producto de hibridación final basado en el marcador 40. De manera más específica, es una etapa de confirmación de la tinción y la posición de una región de sonda 230 con una sonda 220 fijada en ella. El método de detección de la señal del marcador 40 puede seleccionarse apropiadamente según el tipo de marcador 40. Cuando se requiere una reacción de tinción utilizando una reacción de unión o enzima específicas, estas operaciones se realizan según sea necesario. En este método de cromatografía, la etapa de detección se realiza preferentemente tal cual sin lavar el soporte del cuerpo en fase sólida.

- 25 Cuando el marcador 40 es un marcador tal como partículas de látex, partículas de oro coloidal o partículas de plata coloidal que muestran tinción o luminiscencia detectables a simple vista, la presencia y la cantidad (en función de la concentración de color o similar) del ácido nucleico diana se puede detectarse directamente a simple vista. Esto permite una detección aún más rápida.

[Ejemplos]

- 30 La presente divulgación se explica con detalle a continuación con ejemplos, pero estos ejemplos no limitan la presente divulgación. En los siguientes ejemplos, todos los porcentajes (%) representan porcentajes en masa.

[Ejemplo 1]

- 35 En los siguientes ejemplos, el ácido nucleico diana se detectó mediante los siguientes procedimientos en el método de detección de la presente divulgación. Los procedimientos se explican a continuación en el siguiente orden.

- 40 (1) Preparación de micromatriz de ADN
(2) Preparación y amplificación de ácido nucleico diana y cebadores
(3) Hibridación
(4) Detección utilizando escáner

- 45 (1) Preparación de micromatrices de ADN Como sondas de detección, soluciones acuosas de oligo-ADN sintético disuelto (Nihon Gene Research Laboratories, Inc.) modificado con grupos amino en los extremos 3', se aplicaron con un aplicador Geneshot® de NGK Insulators, Ltd. Para las secuencias de oligo-ADN sintético, se seleccionaron las siguientes 33 secuencias de las SEQ ID NO: 1 a 100, con capacidad de hibridarse rápidamente.

[Tabla 3]

Nombre	Sec(5→3')	SEQ.ID.
D1-001	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC	1
D1-002	TGGAAGTGGGAACGCTTTAGATG	2
D1-003	TTCGCTTCGTTGTAATTTGCGAC	3
D1-005	TAGCCAGTGATTTATGACATGC	5
D1-006	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT	6
D1-010	GAGTAGCAGGCAAATACCCTAGA	10
D1-012	AGTCATACAGTGAGGACCAAATG	12
D1-014	TGCTCACTTACATTACGTCCATG	14
D1-016	AGGTCCGGTAGTAATTTAGGTGC	16
D1-020	TATTCTACCAACGACATCACTGC	20
D1-023	CATCTCCAAGAATTGACCCACCA	23
D1-025	GAAGGATCGCTTTTATCTGGCAT	25
D1-026	CATTTGTCAGGTACAGTCCACTT	26
D1-027	GCCCACACTCTTACTTATCGACT	27

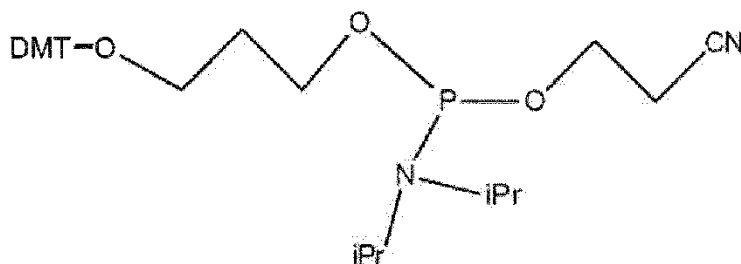
Nombre	Sec(5→3')	SEQ.ID.
D1-030	CCGTCTGGGTTAAAGATTGCTAG	30
D1-035	ATGCCGTTGTCAAGAGTTATGGT	35
D1-038	CGCGACATTTAGTCCAGGAGATG	38
D1-040	AGACAATTAGAATCAGTGCCCCCT	40
D1-041	GCATTGAGGTATTGTTGCTCCCA	41
D1-044	GAGTCCGCAAAAATATAGGAGGC	44
D1-045	GCCTCACATAACTGGAGAAACCT	45
D1-050	GGGATAGGTATTATGCTCCAGCC	50
D1-052	GCCTATATGAACCAAGCCACTGC	52
D1-062	CTAGCACAAATTAATCAATCCGCC	62
D1-064	GCCTATAGTGTCGATTGTCCTCG	64
D1-065	CGATCACGGATTAATGTCACCCC	65
D1-077	CGCAGTTTGCAAGAACGAACAAA	77
D1-084	CCGTGTGTATGAGTATGACAGCA	84
D1-089	GAGTCGAAGACCTCCTCCTACTC	89
D1-090	ATGCCAATATGTACTCGTGACTC	90
D1-095	TGCCGGTTATACCTTTAAGGACG	95
D1-097	CGCGGTACTATTAGAAAGGGCTA	97
D1-100	TGCAGTGTAAGCAACTATTGTCT	100

Después de la aplicación, esto se horneó a 80 °C durante una hora. A continuación, el oligo-ADN sintético se fijó siguiendo los procedimientos descritos más adelante. Es decir, se lavó durante 15 minutos con 2 x SSC/SDS al 0,2 % y después se lavó durante 5 minutos con 2 x SSC/SDS al 0,2 % a 95 °C y a continuación se lavó tres veces (sacudiendo hacia arriba y hacia abajo 10 veces) con agua esterilizada. Después, se eliminó el agua mediante centrifugación (1 000 rpm x 3 min).

(2) Amplificación de ácido nucleico diana

- 10 Utilizando ADN humano como ADN genómico para la amplificación, se prepararon los cebadores P1-1 a P1-6 (Nihon Gene Research Laboratories, Inc.), P2-1 a P2-6 (Nihon Gene Research Laboratories, Inc.) y P3-1 a P3-6 (Nihon Gene Research Laboratories, Inc.) mostrados en la siguiente **tabla**, específicos para 6 ácidos nucleicos diana ((1) a (6)) en el genoma humano. Cada serie se configuró de la siguiente manera (se muestra de 5' a 3'). La parte de propileno de los cebadores P3 se sintetizó según métodos normales de síntesis de oligonucleótidos, utilizando fosforoamidita C3
- 15 espaciadora, una fosforamidita de GlenResearch con la siguiente fórmula.

[C4]



- 20 Cebadores P1: F, R: contienen secuencias de bases para ácidos nucleicos diana (1) a (6) específicos en el ADN humano
 Cebadores P2: F: secuencias de unión para sondas marcadoras (secuencias identificadoras) + secuencias de bases para ácidos nucleicos diana de la serie P1
 R: secuencias identificadoras que constan de secuencias de bases idénticas a las secuencias de bases de las sondas oligonucleotídicas sintéticas + secuencias de bases para ácidos nucleicos diana de la serie P1 (dado que
- 25 las cadenas complementarias de las secuencias de bases complementarias a estas secuencias identificadoras también se amplifican cuando se utilizan los cebadores P2, las cadenas complementarias se hibridan con las sondas y pueden detectar los fragmentos amplificados).
- Cebadores P3: F: secuencias de unión para sondas marcadoras + sitios enlazadores X (cadenas de propileno) + secuencias de bases para ácidos nucleicos diana de la serie P1
- 30 R: secuencias identificadoras que constan de secuencias de bases complementarias a secuencias de bases de sondas oligonucleotídicas sintéticas + sitios enlazadores X (cadenas de propileno) + secuencias de bases para

ácidos nucleicos diana de la serie P1

[Tabla 4]

Nombre		Sec(5'→3')
P1-1	F	ACCAAAGAATATGGCTGAATTTAGTAGTGTTTTAAATAATTTTAA
	R	ACCTGCTAATGAGATGATCCCTTATTTTGAAAACAACCTATTCCTA
P1-2	F	AGCCTAGATTCATTATTCAAAGATATGAAATTTTAAAATGCATA
	R	CTAGAGATACTACAGAGCCTGTCCGTCCAAGGTCATA
P1-3	F	CATTTTAATATTGGGTAGAAAAATCAAGAATGCATTGCTCATA
	R	TGTTAATCTTATTAAGGTTGCTCAGCTCTAAGATTCTATA
P1-4	F	CATTCATATATTTATGCATTCTCCATTCAAAAGATCTTATT
	R	GTTTAAGTAAAGGATACAGAGGTTTATAAAAGTTTGAAAAC
P1-5	F	TCTGTGGCAATAAGATCCCTATGACTGAAGATGCC
	R	GGATAAACCTTAATATAGAAGGAATTAGAGCTGCCACAGC
P1-6	F	GAGAACCTTTGAGGCATCCCTGCTGTTCTCGAGATA
	R	AAACATGTGAGGCGTTACAGAAAGGGTTCAGGAA

[Tabla 5]

Nombre		Sec(5' →3')
P2-1	F	AGGTTTTCTAGAGTGGACACGGACCAAGAAATATGGCTGAATTTAGTAGTGTTTTAAATAATTTTAA
	R	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGCACCTGCTAATGAGATGATCCCTATTTTGAAAACAACATATTCCTA
P2-2	F	AGGTTTTCTAGAGTGGACACGGAGCCTAGATTCAATTATTCAAAGATATGAATTTTAAATGCATA
	R	TGGAACCTGGGAACGCTTTAGATGCTAGAGATACTACAGAGCCTGTCGGTCCAAGGTCATA
P2-3	F	AGGTTTTCTAGAGTGGACACGGCATTTTAATATTGGGTAGAAAAATCAAGAAATGCATTGCTCATA
	R	TTGCTTCGTTGTAATTTGGGACTGTTAATCTTATTAAAGTTGCTCAGCTCTAAGATTCTATA
P2-4	F	AGGTTTTCTAGAGTGGACACGGCATTTCATATATTTATGCATTCCCTCCATTCAAAAGATCTTATT
	R	AGGCATCCTAAGAAATCGCTACTGTTTAAGTAAAGGATACAGAGGTTTATAAAAGTTTGAANAAC
P2-5	F	AGGTTTTCTAGAGTGGACACGGTCTGTGGCAATAAGATCCCTATGACTGAAGATGCC
	R	TAGCCCAAGTGATTTATGACATGCGGATAAACCTTAATATAGAAGGAATTAGAGCTGCCACAGC
P2-6	F	AGGTTTTCTAGAGTGGACACGGGAGAACCTTTGAGGGCATCCCTGCTGTTCTCGAGATA
	R	GGCTCTGGTTACTATTGGACGTTAAACATGTGAGGCGTTACACAGAAAGGGTTCAGGAA

[Tabla 6]

Nombre		Sec(5'→3')
P3-1	F	AGGTTTTCTAGAGTGGACACGGXACCAAGAATATGGCTGAATTTAGTAGTGTCTTTAAATAATTTTAA
	R	GCAGATTCAATTGGTCAGAGAACAXACC'TGCTAATGAGATGATCCCTTATTTTGAAAAACAAC'TATTCCTA
P3-2	F	AGGTTTTCTAGAGTGGACACGGXAGCC'TAGATTCAATTATTCAAAAGATATGAAAATTTTAAAAATGCATA
	R	CATCTAAAGCGTTCCAGTTCACXCTAGAGATACTACAGAGCC'TGTCGTCCTCCAAAGGTCATA
P3-3	F	AGGTTTTCTAGAGTGGACACGGXCATTTTAATATTGGGTAGAAAAATCAAGAATGCAATTGCTCATA
	R	GTCCGAAATTACAACGAAGCGAAXTGTTAATCTTATTAAAGGTTGCTCAGCTCTAAGATTCTATA
P3-4	F	AGGTTTTCTAGAGTGGACACGGXCATTTCATATATTTATGCATTCTCCATTCAAAAAGATCTTATT
	R	AGTAGCGATTTCTTAGGATGCCTXGTTTTAAGTAAAGGATACAGAGGTTTATAAAAAGTTTGAAAAAC
P3-5	F	AGGTTTTCTAGAGTGGACACGGXTCTGTGGCAATAAGATCCCTATGACTGAAGATGCC
	R	GCATGTCATAAATCACTGGGCTAXGGATAAACCTTAATATAGAAGGAATTAGAGCTGCCACAGC
P3-6	F	AGGTTTTCTAGAGTGGACACGGXGAGAACCTTTTAGGCGATCCCTGCTGTTCTCGAGATA
	R	AACGTCCAATAGTAACCCAGAGCGXAAACATGTGAGGCGTTCACAGAAAGGGTTCAGGAA

A continuación, el ADN genómico se amplificó de la siguiente manera utilizando estos cebadores. Como reactivo de amplificación de muestras, se utilizó mezcla maestra de PCR múltiple de QIAGEN. Como termociclador, se utilizó un sistema de PCR GeneAmp 9700 de Applied Biosystems.

- 5 En primer lugar, se prepararon los siguientes reactivos para cada muestra individual.

(Preparación del reactivo)

dH ₂ O	4,0 µl
mezcla maestra de PCR múltiple 2×	5,0 µl
Mezcla de cebadores (500 nM de cada uno)	0,5 µl
ADN genómico (50 ng/µl)	0,5 µl
Total	10,0 µl

- 10 A continuación, los reactivos de amplificación se transfirieron a placas de termociclado y se realizó una reacción de termociclado (15 minutos a 95 °C; 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 segundo a 80 °C, 6 minutos a 64 °C, y después la temperatura disminuyó a 10 °C). Las muestras amplificadas se purificaron después con un kit de purificación de PCR MinElute de QIAGEN, y la amplificación de la longitud prevista se confirmó mediante electroforesis en agarosa. Los resultados se muestran en **la figura 12**. Los resultados de la electroforesis se muestran en la parte superior de **la**
- 15 **figura 12** y en la parte inferior de la misma, se muestran las cantidades amplificadas calculadas a partir de la intensidad de fluorescencia.

(3) Hibridación

- 20 Para hibridar las muestras amplificadas, obtenidas en el punto (2), con sondas de detección fijadas en una micromatriz, se prepararon las siguientes soluciones Hybri y control de Hybri y a partir de estas se prepararon reactivos de hibridación. La mezcla de cebadores contiene 25 µm de la sonda marcadora (unida al lado 5' F de los cebadores P2 y P3, que son oligonucleótidos fluorescentes modificados). El Alexa555-rD1_100 utilizado para el control de Hybri era una secuencia complementaria a una secuencia correspondiente a D1_100, marcada en el extremo 5' con Alexa555.

25

(Control de Hybri)	
Alexa555-rD1_100(100 nM)	10 µl
TE(pH8,0)	390 µl
Total	400 µl

(Solución Hybri)	
20×SSC	2,0 ml
SDS 10 %	0,8 ml
Formamida 100 %	12,0 ml
EDTA 100 mM	0,8 ml
milliQ	24,4 ml
合計	40,0 ml

30

(Reactivo de hibridación)	
Hybri de control	1,5 µl
Mezcla de cebadores	1,0 µl
Solución Hybri	9,0 µl
Subtotal	10,5 µl
Muestra amplificada	3,0 µl
Total	18,0 µl

- A un área de aplicación de la micromatriz, se añadieron 9 µl de cada uno de los reactivos de hibridación preparados (soluciones de muestra marcadas) sin calentar para la desnaturalización o similar, y se realizó una reacción de hibridación dejándolo en reposo durante 30 minutos a 37 °C utilizando un portaobjetos de bloque térmico Comfort/plus (Eppendorf) para impedir que se secase.
- 35

(Lavado)

- 40 Una vez finalizada la reacción de hibridación, la placa de micromatriz se sumergió en una cubeta de tinción de vidrio cargada con una solución de lavado que tenía la siguiente composición, y se sacudió hacia arriba y hacia abajo durante 5 minutos, después de lo cual la placa de micromatriz se transfirió a una cubeta de tinción de vidrio cargada con agua esterilizada, se sacudió hacia arriba y hacia abajo durante 1 minuto y se centrifugó durante 1 minuto a 2 000 rpm para

eliminar la humedad restante de la superficie de la placa de micromatriz.

(Solución de lavado)	
milliQ	188,0 ml
20XSSC	10,0 ml
SDS 10 %	2,0 ml
Total	200,0 ml

5 (4) Detección utilizando escáner

Las imágenes fluorescentes se obtuvieron utilizando un ArrayWoRx de Applied Precision Co, ajustando los tiempos de exposición apropiadamente. En **las figuras 13 y 14** se muestran los resultados de las placas de plástico.

- 10 Como se muestra en la parte superior de **la figura 12**, el ácido nucleico diana en el ADN genómico se amplificó tanto si la secuencia identificadora estaba presente como si no lo estaba. Además, como se muestra en la parte inferior de **la figura 12**, no hubo una gran diferencia en la cantidad de amplificación dependiendo de si la secuencia identificadora se ligaba directamente a la secuencia de reconocimiento, o de si se ligaba a través de un sitio enlazador que contenía un grupo de propileno.

- 15 Además, como se muestra en **las figuras 13 y 14**, utilizando los cebadores P2 (secuencia identificadora + secuencia de reconocimiento) y los cebadores P3 (secuencia identificadora + sitio enlazador + secuencia de reconocimiento), se observó claramente una fluorescencia más o menos uniformemente intensa independientemente de la secuencia identificadora individual en los resultados de hibridación con fragmentos de ADN obtenidos mediante amplificación utilizando los cebadores P3. Por el contrario, en los resultados de hibridación utilizando los cebadores P2, apenas se observó fluorescencia en ningún caso.

- 20 Además, en los resultados de hibridación obtenidos con la concentración de la muestra diluida 10 veces, todavía se observaba fluorescencia utilizando los cebadores P3. Utilizando placas de vidrio, también se confirmaron resultados similares a los obtenidos anteriormente utilizando placas de plástico.

- 25 Estos resultados demuestran que, utilizando los cebadores P3, la sensibilidad de la detección mejora al menos 10 veces o más. En los ejemplos anteriores, las muestras amplificadas se aplicaron a las matrices sin una etapa de desnaturalización, y como se muestra en **la figura 12**, las cantidades sintetizadas de las muestras amplificadas fueron equivalentes a las obtenidas con los cebadores P2. Esto demuestra que, utilizando los cebadores P3, los fragmentos bicatenarios pueden hibridarse de manera eficaz y con buena eficacia de marcaje.

[Ejemplo 2]

- 35 En este ejemplo, al igual que en el ejemplo 1 para detectar el ácido nucleico diana, se realizaron los siguientes procedimientos (1) preparación de la micromatriz de ADN, (2) preparación y amplificación del ácido nucleico diana y cebadores, (3) hibridación y (4) detección utilizando escáner, excepto que en la preparación de las micromatrices de ADN en el punto (1) del Ejemplo 1, se utilizaron placas de vidrio (Toyo Kohan Co. geneslide) en lugar de las placas de plástico, las 33 secuencias mostradas en la siguiente **tabla** se seleccionaron como las secuencias de bases de las sondas de detección, y como reactivo de hibridación en el punto (3) de hibridación, se utilizó un reactivo que tenía la siguiente composición. Al igual que en el ejemplo 1, las señales de hibridación obtenidas utilizando los cebadores P3 (secuencia identificadora + sitio enlazador X + secuencia de reconocimiento) fueron obviamente al menos 10 veces más intensas que las obtenidas utilizando los cebadores P2 (secuencia identificadora + secuencia de reconocimiento), incluso sin etapa de desnaturalización.

45

(Reactivo de hibridación)	
Hybri de control	1,5 ml
Mezcla de cebadores	3,5 µl
Solución Hybri	9,0 µl
Subtotal	14,0 ml
Muestra amplificada	4,0 µl
Total	18,0 ml

[Tabla 7]

Nombre	Sec(5'→3')
D1-001	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC

(continuación)

Nombre	Sec(5'⇒3')
D1-002	TGGAAGTGGGAACGCTTTAGATG
D1-003	TTCGCTTCGTTGTAATTTCCGAC
D1-004	AGGCATCCTAAGAAATCGCTACT
D1-005	TAGCCCAAGTGATTTATGACATGC
D1-006	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT
D1-007	TAGCCAACTCTAAATAACGGACG
D1-008	TTCGGTTGTCGATATGAGGATCT
D1-009	GGGGGGTACTTCATACAAGATGC
D1-010	GAGTAGCAGGCAAATACCCTAGA
D1-011	GCCTATTAAGGTCTACGTCATCG
D1-012	AGTCATACAGTGAGGACCAAATG
D1-013	CATTGACATAAGCTGTTGATGC
D1-014	TGCTCACTTACATTACGTCCATG
D1-015	TACACCTATCAACTCGTAGAGCA
D1-016	AGGTCCGGTAGTAATTTAGGTGC
D1-017	TGCACTCTGATATATACAGGCCA
D1-018	GCAGCCCTTATAGATAACGGGAC
D1-019	GAAGCCATGATACTGTTCAAGGT
D1-020	TATTCTACCAACGACATCACTGC
D1-021	CCATCAGTTATTCGGAGGGACTC
D1-022	CCATATCCGATTATTAGCGACGG
D1-023	CATCTCCAAGAATTGACCCACCA
D1-024	CCGTCTGTGTTATTAAGACCCCT
D1-025	GAAGGATCGCTTTTATCTGGCAT
D1-026	CATTTGTCAGGTACAGTCCACTT
D1-027	GCCCACACTCTTACTTATCGACT
D1-028	CGCTGTTACTGTAAGCGTACTAG
D1-029	CGCGATTCTTATTGATTGATCCC
D1-030	CCGTCTGGGTAAAGATTGCTAG
D1-031	AGTCAGTCCAAATCTCAGGATGG
D1-032	CGCCTAAATGAACTCACTCTGC
D1-100	TGCAGTGTAAAGCAACTATTGTCT

[Ejemplo 3]

- 5 En este ejemplo, los ácidos nucleicos diana se detectaron mediante los siguientes métodos.

(1) Preparación de micromatrices de ADN de tipo membrana

- 10 Las soluciones de sonda de ADN de captura que comprendían las secuencias de bases mostradas en la siguiente **tabla** se aplicaron en placas de membrana Hi-Flow Plus de Merck Millipore (60 mm x 600 mm), utilizando un aplicador Geneshot® de NGK Insulators, Ltd. con la unidad de descarga (método de inyección de tinta) descrita en la publicación de solicitud de patente japonesa N° 2003-75305. Para las secuencias de oligo-ADN sintético, como sondas se utilizaron las 44 secuencias de las 100 secuencias D1_1 a D1_100 mostradas en la siguiente **tabla**, descritas en la **tabla** 1 complementaria de la bibliografía (Analytical Biochemistry 364 (2007) 78-85) y se dispusieron como se muestra en la **figura** 15. Las secuencias se modificaron con grupos amino en el extremo 3' de los oligonucleótidos para su uso como sondas.

[Tabla 8]

Nombre	Sec(5'⇒3')
D1-001	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC
D1-002	TGGAAGTGGGAACGCTTTAGATG
D1-003	TTCGCTTCGTTGTAATTTCCGAC
D1-005	TAGCCCAAGTGATTTATGACATGC
D1-006	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT
D1-009	GGGGGGTACTTCATACAAGATGC

(continuación)

Nombre	Sec(5'→3')
D1-010	GAGTAGCAGGCAAATACCCTAGA
D1-011	GCCTATTAAGGTCTACGTCATCG
D1-012	AGTCATACAGTGAGGACCAAATG
D1-014	TGCTCACTTACATTACGTCCATG
D1-015	TACACCTATCAACTCGTAGAGCA
D1-016	AGGTCCGGTAGTAATTTAGGTGC
D1-020	TATTCTACCAACGACATCACTGC
D1-023	CATCTCCAAGAATTGACCCACCA
D1-025	GAAGGATCGCTTTTATCTGGCAT
D1-026	CATTTGTCAGGTACAGTCCACTT
D1-027	GCCCACACTCTTACTTATCGACT
D1-030	CCGTCTGGGTAAAGATTGCTAG
D1-032	CGCCTAAATGAACTCACTCTGC
D1-035	ATGCCGTTGTCAAGAGTTATGGT
D1-037	GCACCTCATACCTTCATAGAGCA
D1-038	CGCGACATTTAGTCCAGGAGATG
D1-040	AGACAATTAGAATCAGTGCCCCT
D1-041	GCATTGAGGTATTGTTGCTCCCA
D1-044	GAGTCCGCAAAAATATAGGAGGC
D1-045	GCCTCACATAACTGGAGAAACCT
D1-049	CGCGTCGAATTACTTAATCACCA
D1-050	GGGATAGGTATTATGCTCCAGCC
D1-051	CGCCATTATACAACGGTTCATGC
D1-052	GCCTATATGAACCAAGCCACTGC
D1-053	CGCCGTCAGTACTTGTATAGATG
D1-062	CTAGCACAAATTAATCAATCCGCC
D1-064	GCCTATAGTGTCGATTGTCCTCG
D1-065	CGATCACGGATTAATGTCACCCC
D1-077	CGCAGTTTGCAAGAACGAACAAA
D1-079	GGGGTGTGAGAGCTTTTAGACG
D1-081	ACCACTATGATTGAGGAAACGCG
D1-084	CCGTGTGTATGAGTATGACAGCA
D1-089	GAGTCGAAGACCTCCTCCTACTC
D1-090	ATGCCAATATGTACTCGTGACTC
D1-094	CTAGGTACAACACCAACTGTCTC
D1-095	TGCCGGTTATACCTTTAAGGACG
D1-097	CGCGGTACTATTAGAAAGGGCTA
D1-100	TGCAGTGTAAAGCAACTATTGTCT

Después de aplicar las sondas, estas se fijaron por exposición a luz UV a aproximadamente de 200 a 500 mJ/cm² utilizando un dispositivo de irradiación de UV Spectrolink Co. (XL-1 500 UV Crosslinker).

5 (2) Amplificación de genes de muestra.

Utilizando ADN humano como ADN genómico para la amplificación, la amplificación se realizó utilizando cebadores P2 con las secuencias mostradas a continuación en la **tabla 9** y cebadores P3 con las secuencias mostradas a continuación en la siguiente **tabla 10**. Cada uno de los cebadores se configuró de la siguiente manera.

- 10 Cebadores P2: F: secuencias de unión para sondas marcadoras + secuencias de bases para ácidos nucleicos diana de la serie R de P1: secuencias identificadoras que constan de secuencias de bases idénticas a las secuencias de bases de las sondas oligonucleotídicas sintéticas + secuencias de bases para ácidos nucleicos diana de la serie P1 (dado que las cadenas complementarias de las secuencias de bases complementarias a estas secuencias identificadoras también se amplifican cuando se utilizan los cebadores P2, las cadenas complementarias se hibridan con las sondas y pueden detectar los fragmentos amplificados).
- 15 Cebadores P3: F: secuencias de unión para sondas marcadoras + sitios enlazadores X (cadenas de propileno) + secuencias de bases para ácidos nucleicos diana de la serie P1
- 20 R: secuencias identificadoras que constan de secuencias de bases complementarias a secuencias de bases de sondas oligonucleotídicas sintéticas + sitios enlazadores X (cadenas de propileno) + secuencias de bases para

ácidos nucleicos diana de la serie P1.

[Tabla 9]

Nombre		Sec(5'⇒3')
P2-1	F	AGGTTTTTCTAGAGTGGACACGGACCCAAAGAATATGGCTGAATTTAGTAGTGTTTTAAATAATTTTAA
	R	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGCACCTGCTAATGAGATGATCCCTTATTTTGAACAACAACTATTCCTA
P2-2	F	AGGTTTTTCTAGAGTGGACACGGAGCCTAGATTCAATTTCAAAGATATGAAATTTTAAAAATGCATA
	R	TGGAAC TGGGAACGCTTTAGATGCTAGAGATACTACAGAGCCTGTCCGTCCAAGGTCATA

[Tabla 10]

Nombre		Sec(5'⇒3')
P3-1	F	AGGTTTTTCTAGAGTGGACACGGXACCAAGAATATGGCTGAATTTAGTAGTGTTTTAAATAATTTTAA
	R	GCAGATTCAATTGGTCAGAGAACACXACCTGCTAATGAGATGATCCCTTATTTTGAAAAACAACACTATTCCTA
P3-2	F	AGGTTTTTCTAGAGTGGACACGGXAGCCTAGATTTCATTATTCAAAGATATGAAATTTTAAAAATGCATA
	R	CATCTAAAGCGTTCCTCCAGTTCXACTAGAGATACTACAGAGCCTGTCCGTCCTCAAGGTCATA

Al igual que en el ejemplo 1, los sitios enlazadores se sintetizaron mediante métodos habituales de síntesis de oligonucleótidos, utilizando fosforoamidita C3 espaciadora de Glen Research.

- 5 A continuación, el ADN genómico se amplificó de la siguiente manera utilizando estos cebadores. Como reactivo de amplificación de muestras, se utilizó mezcla maestra de PCR múltiple de QIAGEN. Como termociclador, se utilizó un sistema de PCR GeneAmp 9700 de Applied Biosystems.

(Preparación del reactivo)	
dH ₂ O	4,0 µl
Mezcla maestra de PCR múltiple 2x	5,0 µl
Mezcla de cebadores (500 nM de cada uno)	0,5 µl
ADN genómico (50 ng/µl)	0,5 µl
Total	10,0 µl

- 10 A continuación, los reactivos de amplificación se transfirieron a placas de termociclado y se realizó una reacción de termociclado (15 minutos a 95 °C; 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 segundo a 80 °C, 6 minutos a 64 °C, y después la temperatura disminuyó a 10 °C). Las muestras amplificadas se purificaron después con un kit de purificación de PCR MinElute de QIAGEN, y la amplificación de la longitud prevista se confirmó mediante electroforesis en agarosa.

- 15 (3) Detección utilizando micromatriz de ADN de tipo membrana.

La reacción en la micromatriz de ADN de tipo membrana utilizando las muestras amplificadas en el punto (2) y los procedimientos de detección fueron los siguientes.

(Muestra de hibridación)	
Solución Hybri* (Tween20 0,5 % - BSA-PBS 1 %)	200,0 µl
OligoADN marcado con biotina complementario a la secuencia de unión a un marcador del 4,0 µl	
cebador F' (25 µM)	
Muestra	4,0 µl
Total	208,0 µl

- 20 (Hibridación y reacción de tinción).

Micromatrices de ADN de tipo membrana se cortaron a un tamaño para su inserción en tubos de 0,2 ml y se colocaron en los tubos. Se añadieron 200 µl de cada muestra hibridada preparada sin calentar para la desnaturalización o similar, y se realizó una reacción de hibridación durante 30 minutos a una temperatura de bloque térmico de 37 °C.

- 30 Una vez finalizada la reacción de hibridación, cada micromatriz de ADN de tipo membrana se transfirió a un tubo de 0,2 ml cargado con líquido de lavado ((Tween 20 0,1 % - EDTA-TBS 1 mM)) y se lavó en un bloque térmico a 37 °C (37 °C durante 1 min, 37 °C durante 10 min, 37 °C durante 1 min).

Cada micromatriz de ADN de tipo membrana lavada, se transfirió a un tubo de 0,2 ml cargado con una mezcla de biotina-HRP y estreptavidina, y se hizo reaccionar durante 20 minutos a temperatura ambiente.

- 35 Después de finalizar la reacción, cada micromatriz de ADN de tipo membrana se transfirió a un tubo de 0,2 ml cargado con líquido de lavado (Tween 20 0,1 % - EDTA-TBS 1 mM) y se lavó (temperatura ambiente durante 1 min, temperatura ambiente durante 10 min., temperatura ambiente durante 1 min).

La micromatriz de ADN de tipo membrana lavada se sometió a una reacción de tinción durante aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente utilizando un kit de sustrato de TMB, 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina, con Peroxidasa de Vector Laboratories.

- 40 (Valoración de la detección)

La tinción de la matriz después del secado se confirmó visualmente. En **la figura 16** se muestran los resultados. Como se muestra en **la figura 16**, aunque en ambas muestras solo se detectó una ligera tinción mediante métodos convencionales utilizando los cebadores P2, se observó una tinción oscura con el método de la divulgación utilizando los cebadores P3. Esto muestra que la sensibilidad de la detección mejora utilizando los cebadores P3. También muestra que la hibridación es posible sin tener que desnaturalizar aplicando calor.

- 50 **[Ejemplo 4]**

En este ejemplo, los ácidos nucleicos diana se detectaron mediante los siguientes métodos.

- (1) Preparación de micromatrices de ADN de tipo membrana

55

Las soluciones de sonda de ADN de captura que comprendían las secuencias de bases mostradas en la siguiente **tabla 11**, se aplicaron en las placas de membrana Hi-Flow Plus (60 mm x 600 mm) de Merck Millipore, utilizando un aplicador Geneshot® de NGK Insulators, Ltd. con la unidad de descarga (método de inyección de tinta) descrita en la publicación de solicitud de patente japonesa N° 2003-75305. Para las secuencias de oligo-ADN sintético, como sondas se utilizaron las 4 secuencias de las 100 secuencias D1_1 a D1_100 mostradas en la siguiente **tabla**, descritas en la **tabla 1** complementaria de la bibliografía (Analytical Biochemistry 364 (2007) 78-85). Las secuencias se modificaron con grupos amino en el extremo 3' de los oligonucleótidos para su uso como sondas. Como se muestra en la **figura 17**, estos ADN se dispusieron en líneas de tipo corriente. En la matriz mostrada en la **figura 17**, la solución de fijación de sonda se tiñó con un colorante y se aplicó en corrientes para mostrar claramente las regiones de fijación de la sonda. En las matrices mostradas en la **figura 18**, un líquido que contenía un pigmento se aplicó en corrientes (bandas) cerca de las regiones de fijación de la sonda para facilitar la búsqueda de las regiones de fijación de la sonda donde se detectan los productos de hibridación.

[Tabla 11]

Nombre	Sec(5'⇒3')
D1-001	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC
D1-002	TGGAAGTGGGAACGCTTTAGATG
D1-003	TTCGCTTCGTTGTAATTTCCGAC
D1-005	TAGCCAGTGATTTATGACATGC

Después de aplicar las sondas, estas se fijaron por exposición a luz UV a aproximadamente de 200 a 500 mJ/cm² utilizando un dispositivo de irradiación de UV Spectroline Co. (XL-1 500 UV Crosslinker).

(2) Amplificación de genes de muestra

Utilizando ADN humano como ADN genómico para la amplificación, la amplificación se realizó utilizando cebadores P2 con las secuencias mostradas en la **tabla 9** del Ejemplo 3 y cebadores P3 con las secuencias mostradas en la **tabla 10** del ejemplo 3. Al igual que en el ejemplo 3, se realizó una reacción de amplificación en ADN genómico utilizando estos cebadores. Las muestras amplificadas se purificaron después con un kit de purificación de PCR MinElute de QIAGEN, y la amplificación de la longitud prevista se confirmó mediante electroforesis en agarosa.

(3) Detección utilizando micromatriz de ADN de tipo membrana.

Los procedimientos de reacción y detección en la micromatriz de ADN de tipo membrana utilizando las muestras amplificadas en el punto (2) fueron los siguientes. La solución de revelado y la solución de látex procedían de AMR Inc. La solución de látex consistía en oligo-ADN con una secuencia complementaria a la secuencia de unión a la sonda marcadora de cada cebador F, fijado a perlas de látex de poliestireno que contenía un colorante azul, y diluido a una concentración de 100 nM con solución de revelado. El oligo-ADN se fijó a las perlas formando enlaces covalentes entre el oligo-ADN modificado en el extremo 5' con grupos amino y grupos carboxilo en la superficie del látex. Como solución de revelado se utilizó solución salina tamponada con fosfato.

(Muestra de hibridación)

Solución de revelado *	35,0 µl
Solución de látex*	5,0 µl
Muestra	10,0 µl
Total	50,0 µl

(Hibridación)

Se añadieron 50 µl de cada una de las muestras de hibridación a un tubo de 0,2 ml sin calentar para la desnaturalización o similar, y la hibridación por cromatografía comenzó insertando la micromatriz de ADN de tipo membrana. Al cabo de aproximadamente 20 minutos, se había absorbido todo el líquido de la muestra y la reacción había finalizado. Después de finalizar la reacción, la micromatriz de ADN de tipo membrana se secó al aire.

(Evaluación de la detección)

La presencia o ausencia de tinción en las matrices de ADN de tipo membrana después del secado, se evaluó visualmente. Los resultados se muestran en la **figura 18**. Como se muestra en la **figura 18**, con el método convencional que utiliza los cebadores P2, no se observa tinción, pero con el método que utiliza los cebadores P3, se observa tinción oscura. Esto muestra que, independientemente del modo de hibridación, la sensibilidad de la detección de la hibridación mejora utilizando los cebadores P3. También muestra que la hibridación es posible con los cebadores P3 incluso sin tener que desnaturalizar aplicando calor.

[Ejemplo 5]

(1) Preparación de cromatografía de ADN de tipo membrana

Las soluciones de sonda de ADN que comprendían las secuencias de bases mostradas en la siguiente **tabla** se aplicaron en placas de membrana Hi-Flow Plus (60 mm x 600 mm) de Merck Millipore y se dispusieron como se muestra en **la figura** 19, utilizando un aplicador Ltd. Geneshot® de NGK Insulators con la unidad de descarga (método de inyección de tinta) descrita en la publicación de solicitud de patente japonesa N° 2003-75305. Para las secuencias de oligo-ADN sintético, como sondas se utilizaron las 8 secuencias de las 100 secuencias D1_1 a D1_100 mostradas en la siguiente **tabla**, descritas en **la tabla** 1 complementaria de la bibliografía (Analytical Biochemistry 364 (2007) 78-85). Las secuencias se modificaron con grupos amino en el extremo 3' de los oligonucleótidos para su uso como sondas.

Además, como se muestra en **la figura** 19, se formaron tres regiones marcadoras de posición utilizando pigmento rojo.

[Tabla 12]

Nombre	Sec(5'⇒3')
D1-001	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC
D1-002	TGGAAGTGGGAACGCTTTAGATG
D1-003	TTGCTTCGTTGTAATTTCCGAC
D1-005	TAGCCAGTGATTTATGACATGC
D1-006	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT
D1-009	GGGGGGTACTTCATACAAGATGC
D1-010	GAGTAGCAGGCAAATACCCTAGA
D1-011	GCCTATTAAGGTCTACGTCATCG

Después de aplicar las sondas, se fijaron mediante exposición a luz UV a aproximadamente 300 mJ/cm² utilizando un dispositivo de irradiación UV Spectroline Co. (XL-1 500 UV Crosslinker) y se obtuvieron unidades de cromatografía que comprendían las regiones de sonda de 8 sondas diferentes junto con 3 regiones marcadoras de posición diferentes.

(2) Amplificación de ácido nucleico diana

Para la amplificación se utilizó ADN humano (producto comercial de Cosmo Bio) como ADN genómico. Como cebadores se utilizaron conjuntos de cebadores que consistían en las secuencias de bases mostradas a continuación en **la tabla** 13. Es decir, cada cebador R presentaba una secuencia identificadora complementaria a una sonda (D1-001, 002, 003 y 005), un sitio enlazador X y una primera secuencia de reconocimiento, y cada cebador F presentaba biotina, un sitio enlazador X y una segunda secuencia de reconocimiento, y la amplificación se realizó utilizando estos. Con estos conjuntos de cebadores, fue posible obtener ADN parcialmente bicatenario (de tipo monocatenario sencillo) que tenía una secuencia identificadora como una sola cadena. Como ejemplo comparativo, se realizó una reacción de amplificación de ácido nucleico similar utilizando conjuntos de cebadores que consistían en las secuencias de bases mostradas en **la tabla** 14. Con estos conjuntos de cebadores, es posible obtener ADN parcialmente bicatenario (de tipo monocatenario doble) que tiene, como cadenas sencillas, una secuencia identificadora y una secuencia marcadora con capacidad de unirse a una sonda marcadora.

[Tabla 13]

Nombre		Sec(5'→3')	
monocatenario sencillo 1 F			GCAGATTTCATTGGTCAGAGAACACXCCTGACTAGCATATAGAAGCTTTTCAGCAAGTGCAGACTA
	R		[biotina]-ATTTTTCATCGTAAGCAAAAATGATTGGTTGAACATGAA
monocatenario sencillo 2	F		CATCTAAAGCGTTCCAGTTCACXGCTTGCCCTGGCTTTTATAAGTCGTCACGGAGA
	R		[biotina]-CAAAATTTGAGACGGCTCCAACCTCAGTAATCTTTTCCAAA
monocatenario sencillo 3	F		GTCCGAAATTACAACGAAGCGAAXGAAATGGGTTCCCTGGTTGTCAGCCTCTGCGAAGTA
	R		[biotina]-AACCGGCCAGCTTCGACGGTATCCTCTACTACTA
monocatenario sencillo 4	F		GCATGTCATAAATCACTGGGCTAXCATAGCAAGTTGTTCAATTGTTGTAACCCCTGGTACCTG
	R		[biotina]-TTTAAGTGCAAATTTATTTTCGCCTCCAAAGGGACCTCCCA

Todos los cebadores mostrados en **la tabla 13** tienen secuencias identificadoras complementarias a las sondas respectivas (D1-001, 002, 003 y 005) junto con sitios enlazadores X y primera y segunda secuencias de reconocimiento. Todos estos cebadores procedían de Nihon Gene Research Laboratories, Inc.

5

[Tabla 14]

Nombre	Sec(5'→3')	
	F	R
monocatenario doble 1	F	GCAGATTTCATTGGTTCAGAGAACACXCCCTGACTAGCATATAAGAAAGCTTTTCAGCAAGTGCAGACTA
monocatenario doble 2	R	AGGTTTTTCTAGAGTGGACACGCGXATTTTTTGCAATCGTAAGCAAAAATGATTGGTTGAACATGAA
	F	CATCTAAAGCGTTCCAGTCCAGTCCAGXGCTTGCCCTGGGCTTTTATAAGTCGTCACGGAGA
monocatenario doble 3	R	AGGTTTTTCTAGAGTGGACACGCGXCAAAATTTGAGACGGCTCCAACTCAGTAATCTTTTCCAAA
	F	GTCCGAAATTACAAAGCGAAGCGAAXGAAATGGGTTCCCTGGTTGTCAGCCTCTGCCGAAGTA
monocatenario doble 4	R	AGGTTTTTCTAGAGTGGACACGCGXAAACCGGCCAGCTTCGACGGTATCCTCTACTACTA
	F	GCATGTCATAAATCACTGGGCTAXCATAGCAAGTTGTTTCATTGTTGTAACCCCTGGTACCTG
	R	AGGTTTTTCTAGAGTGGACACGCGXTTAAAGTGCAAAATTTATTTGCGCCTCCAAAGGGACCTCCCA

Los sitios enlazadores X son cadenas de óxido de propileno, introducidos con fosforoamidita (fosforoamidita C3 espaciadora, Glen Research).

5

La composición en la reacción de amplificación fue la siguiente, y las condiciones de termociclado fueron 15 minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos, cada uno de los cuales comprendía 30 segundos a 95 °C, 1 segundo a 80 °C y 6 minutos a 64 °C; seguido de enfriamiento a 10 °C.

(Composición)	
mezcla maestra de PCR múltiple Qiagen 2×	5,0 µl
Mezcla de cebadores (500 nM de cada uno)	0,5 µl
dH ₂ O	4,0 µl
ADN genómico	0,5 µl
Total	10,0 µl

En la **tabla 13** se muestran las mezclas de los conjuntos de cebadores para cada uno de los productos de amplificación 1 a 4 individuales y se preparó una mezcla de todos los conjuntos de cebadores para los productos 1 a 4 sencillos, para un total de 5 mezclas. De manera similar, se preparó un total de 5 mezclas de cebadores para los productos de amplificación 1 a 4 dobles mostrados en la **tabla 14**.

Los productos de amplificación obtenidos por amplificación se purificaron con un kit de purificación de PCR MinElute de QIAGEN, y la amplificación de los fragmentos de la longitud deseada se confirmó mediante electroforesis en agarosa. También se confirmó el rendimiento de cada producto de amplificación después de la purificación. En las figuras 20 y 21 se muestran los resultados. En las **figuras 20 y 21**, cada uno de los números dentro de un círculo representa el número de un conjunto de cebadores para obtener un ácido nucleico monocatenario sencillo o monocatenario doble parcialmente bicatenario.

Como se muestra en las **figuras 20 y 21**, los productos de amplificación monocatenarios sencillos tenían mayores cantidades amplificadas y mayores rendimientos después de la purificación que los ejemplos comparativos. En otras palabras, con un ácido nucleico parcialmente bicatenario que tiene una sola hebra en una sola cadena, se puede obtener una mejor eficacia de amplificación que con un ácido nucleico parcialmente bicatenario que tiene hebras sencillas en ambas cadenas.

(3) Detección utilizando una unidad de cromatografía

Se llevaron a cabo una reacción de hibridación y de detección mediante cromatografía de ácidos nucleicos utilizando el ADN parcialmente bicatenario amplificado en el punto (2). Las operaciones fueron las siguientes para los monocatenarios sencillos y los monocatenarios dobles, respectivamente.

(Solución de revelado para monocatenarios sencillos)	
PBS	30,0 µl
Solución de látex	5,0 µl
Solución de reacción de amplificación	10,0 µl
Agua Milipore	5,0 µl
Total	50 µl

La solución de revelado se preparó mezclando PBS (solución salina tamponada con fosfato) con una solución de látex y una solución de reacción de amplificación (5 tipos). Para la solución de conservación de látex, perlas de látex de poliestireno que contenían un colorante azul se recubrieron con avidina (estreptavidina) y se prepararon con PBS a una concentración específica.

(Solución de revelado de monocatenarios dobles)	
PBS	30,0 µl
Solución de látex	5,0 µl
Solución de reacción de amplificación	10,0 µl
Agua Milipore	5,0 µl
Total	50 µl

La solución de revelado se preparó mezclando PBS (solución salina tamponada con fosfato) con una solución de látex y la solución de reacción de amplificación (5 clases), y después mezclando en agua Millipore. Para la solución de conservación de látex utilizada en las soluciones de revelado de los monocatenarios dobles, ADN enlazador con una secuencia complementaria a la secuencia marcadora del cebador R se fijó a perlas de látex de poliestireno que contenían un colorante azul, y se preparó con PBS a una concentración similar a la de los monocatenarios sencillos. El ADN enlazador se modificó con un grupo amino en el extremo 5' y se fijó formando enlaces covalentes entre los grupos amino y los grupos carboxilo en la superficie del látex.

(Etapa de hibridación)

A un tubo de 0,2 ml se añadieron 50 µl de cada una de las soluciones de revelado anteriores y para iniciar una reacción de hibridación por cromatografía, se insertaron los extremos inferiores de cada una de las unidades de cromatografía (tipo 8 y tipo 4). Toda la solución de revelado se absorbió en aproximadamente 20 minutos, y la reacción de hibridación por cromatografía finalizó. Después de finalizar la reacción, las unidades de cromatografía se secaron al aire y los

sitios de reacción se confirmaron a simple vista y se fotografiaron.

(Etapas de detección)

- 5 Después del secado, se confirmó la presencia o ausencia de tinción en la matriz. Los resultados se muestran en **la figura 22**. Como se muestra en **la figura 22**, aunque también se confirmó tinción en los productos de amplificación de tipo monocatenario doble, se observó una tinción más oscura en los productos de amplificación de tipo monocatenario sencillo, lo que confirma la eficacia del presente método utilizando un ácido nucleico parcialmente bicatenario de tipo monocatenario sencillo en la cromatografía de ácidos nucleicos en lugar de un ácido nucleico parcialmente bicatenario de tipo monocatenario doble.

[Ejemplo 6]

(1) Preparación de cromatografía de ADN de tipo membrana

- 15 Las soluciones de sonda de ADN que comprendían las secuencias de bases mostradas en la siguiente **tabla**, se aplicaron en placas de membrana Hi-Flow Plus (60 mm x 600 mm) de Merck Millipore y se dispusieron como se muestra en **la figura 19**, utilizando un aplicador Ltd. Geneshot® de NGK Insulators con la unidad de descarga (método de inyección de tinta) descrita en la publicación de solicitud de patente japonesa N° 2003-75305. Para las secuencias de oligo-ADN sintético, como sondas se utilizaron las 8 secuencias de las 100 secuencias D1_1 a D1_100 mostradas en la siguiente **tabla**, descritas en **la tabla 1** complementaria de la bibliografía (Analytical Biochemistry 364 (2007) 78-85). Las secuencias se modificaron con grupos amino en el extremo 3' de los oligonucleótidos para su uso como sondas. Además, como se muestra en **la figura 19**, se formaron tres regiones marcadoras de posición utilizando pigmento rojo.

[Tabla 15]

Nombre	Sec(5'→3')
D1-001	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC
D1-002	TGGAAGTGGGAACGCTTTAGATG
D1-003	TTCGCTTCGTTGTAATTCGGAC
D1-005	TAGCCCAAGTGATTTATGACATGC
D1-006	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT
D1-009	GGGGGGTACTTCATACAAGATGC
D1-010	GAGTAGCAGGCAAATACCCTAGA
D1-011	GCCTATTAAGGTCTACGTCATCG

- 30 Después de aplicar las sondas, se fijaron mediante exposición a luz UV a aproximadamente 300 mJ/cm² utilizando un dispositivo de irradiación UV Spectroline Co. (XL-1 500 UV Crosslinker) y se obtuvieron unidades de cromatografía que comprendían las regiones de sonda de 8 sondas diferentes junto con 3 regiones marcadoras de posición diferentes.

(2) Amplificación de ácido nucleico diana

- 35 Para la amplificación se utilizó ADN humano (producto comercial de Cosmo Bio) como ADN genómico. Como cebadores se utilizaron conjuntos de cebadores que consistían en las secuencias de bases mostradas en la siguiente **tabla 16**. Es decir, cada cebador R presentaba una secuencia identificadora complementaria a una sonda (D1-001, 002, 003 y 005), un sitio enlazador X y una primera secuencia de reconocimiento, y cada cebador F presentaba una segunda secuencia de reconocimiento, y la amplificación se realizó utilizando esto. Durante la amplificación, se añadió biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) además de dNTP bruto para que la biotina se incorporase en el ADN bicatenario después de la amplificación, dando como resultado un ADN parcialmente bicatenario (de tipo monocatenario sencillo) que tiene una secuencia identificadora como una cadena sencilla. Como ejemplo comparativo, se realizó una reacción de amplificación de ácido nucleico similar utilizando conjuntos de cebadores que consistían en las secuencias de bases mostradas en **la tabla 17**. Al igual que antes, se añadió biotina-16-dUTP (Roche Applied Science) además de dNTP bruto para obtener ADN parcialmente bicatenario (de tipo monocatenario doble) que tiene secuencias marcadoras capaces de unirse a la secuencia identificadora y a la sonda marcadora, respectivamente, como cadenas sencillas.

[Tabla 16]

Nombre		Sec(5'→3')
monocatenario sencillo©	F	GCAGATTTCATTGGTCAGAGAACACXCCCTGACTAGCATATAGAAGCTTTTCAGCAAGTGCAGACTA
	R	ATTTTGCATCGTAAGCAAAAAATGATTGGTTGAACATGAA
monocatenario sencillo©	F	CATCTAAAGCGTTCCAGTTCACXGCTTGCCCTGGGCTTTTATAAGTCGTACACGGAGA
	R	CAAAATTTGAGACGGCTCCAACTCAGTAATCTTTTCCAAA
monocatenario sencillo©	F	GTCCGAAATTACAACGAAGCGAAXGAAATGGGTCCCTGGTTGTCAGCCTCTGCCGAAGTA
	R	AACCGGCCAGCTTCGACGGTATCCTCTACTACTA
monocatenario sencillo©	F	GCATGTCATAAATCACTGGGCTAXCATAGCAAGTTGTTTCATTGTTGTAACCCCTGGTACCTG
	R	TTTAAGTGCAAAATTTATTTGCGCTCCAAAGGGGACCTCCCA

Todos los cebadores mostrados en **la tabla 16** tienen secuencias identificadoras complementarias a las sondas respectivas (D1-001, 002, 003 y 005) junto con sitios enlazadores X y primeras secuencias de reconocimiento. Todos

5

[Tabla 17]

Nombre	Sec(5'⇒3')	
	F	R
monocatenario doble①	GCAGATTTCATTGGTCAGAGAACACCTGACTAGCATATAAGAAGCTTTCAGCAAGTGCAGACTA	ATTTTGCATCGTAAGCAAAAATGATTGGTTGAACATGAA
monocatenario doble②	F	CATCTAAAGCGTTCCAGTTCAGCTTGCCCTGGGCTTTTATAAGTCGTCACGGAGA
	R	CAAAATTTGAGACGGCTCCAACTCAGTAATCTTTTCCAAA
monocatenario doble③	F	GTCCGAAATTACAACGAAGCGAAGAAATGGGTTCCCTGGTTGTCAGCCCTCTGCGAAGTA
	R	AACCGGCCAGCTTCGACGGTATCCTCTACTACTA
monocatenario doble④	F	GCATGTCATAAATCACTGGGCTACATAGCAAGTTGTTTCATTGTTGTAACCCCTGGTACCTG
	R	TTTAAGTGCAAAATTTATTTGCGCTCCAAAGGGACCTCCCA

Los sitios enlazadores X son cadenas de óxido de propileno, introducidos con fosforoamidita (fosforoamidita C3 espaciadora, Glen Research).

- 5 La composición en la reacción de amplificación fue la siguiente, y las condiciones de termociclado fueron 15 minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos, cada uno de los cuales comprendía 30 segundos a 95 °C, 1 segundo a 80 °C y 6 minutos a 64 °C; seguido de enfriamiento a 10 °C.

(Composición)	
mezcla maestra de PCR múltiple Qiagen 2×	5,0 µl
Mezcla de cebadores (500 nM de cada uno)	0,5 µl
Biotina-16-dUTP (1 mM)	0,5 µl
dH ₂ O	3,5 µl
ADN genómico	0,5 µl
Total	10,0 µl

5 En la **tabla** 16 se muestran las mezclas de los conjuntos de cebadores para cada uno de los productos de amplificación 1 a 4 sencillos y se preparó una mezcla de todos los conjuntos de cebadores para los productos 1 a 4 sencillos, para un total de 5 mezclas. De manera similar, se preparó un total de 5 mezclas de cebadores para el doble producto de amplificación 1 a 4 mostrado en la **tabla** 17.

10 Los productos de amplificación obtenidos por amplificación se purificaron con un kit de purificación de PCR MinElute de QIAGEN, y la amplificación de los fragmentos de la longitud deseada se confirmó mediante electroforesis en agarosa. También se confirmó el rendimiento de cada producto de amplificación después de la purificación. En las **figuras** 23 y 24 se muestran los resultados.

15 Como se muestra en las figuras 23 y 24, no hubo una gran diferencia entre el tipo monocatenario sencillo y el tipo bicatenario sencillo en cuanto a la cantidad amplificada del producto de amplificación o al rendimiento después de la purificación.

(3) Detección utilizando una unidad de cromatografía

20 Se llevaron a cabo una reacción de hibridación y de detección mediante cromatografía de ácidos nucleicos utilizando el ADN parcialmente bicatenario amplificado en el punto (2). Las operaciones fueron las siguientes para los monocatenarios sencillos y los bicatenarios sencillos, respectivamente.

(Solución de revelado para monocatenarios sencillos)	
PBS	30,0 µl
Solución de látex	5,0 µl
Solución de reacción de amplificación	10,0 µl
Agua Milipore	5,0 µl
Total	50 µl

25 La solución de revelado se preparó mezclando PBS (solución salina tamponada con fosfato) con una solución de látex y una solución de reacción de amplificación (5 tipos). Para la solución de conservación de látex, perlas de látex de poliestireno que contenían un colorante azul se recubrieron con avidina (estreptavidina) y se prepararon con PBS a una concentración específica.

(Solución de revelado para bicatenarios sencillos)	
PBS	30,0 µl
Solución de látex	5,0 µl
Solución de reacción de amplificación	10,0 µl
Agua Milipore	5,0 µl
Total	50 µl

35 La solución de revelado se preparó mezclando PBS (solución salina tamponada con fosfato) con una solución de látex y la solución de reacción de amplificación (5 clases) y después mezclando la solución de biotina. Para la solución de conservación de látex utilizada en las soluciones de revelado de los monocatenarios dobles, ADN enlazador con una secuencia complementaria a la secuencia marcadora del cebador R se fijó a perlas de látex de poliestireno que contenían un colorante azul, y se preparó con PBS a una concentración similar a la de los monocatenarios sencillos.

(Etapa de hibridación)

40 A un tubo de 0,2 ml se añadieron 50 µl de cada una de las soluciones de revelado anteriores y para iniciar una reacción de hibridación por cromatografía, se insertaron los extremos inferiores de cada una de las unidades de cromatografía (tipo 8 y tipo 4). Toda la solución de revelado se absorbió en aproximadamente 20 minutos, y la reacción de hibridación por cromatografía finalizó. Después de finalizar la reacción, las unidades de cromatografía se secaron al aire y los

45 sitios de reacción se confirmaron a simple vista y se fotografiaron.

(Etapa de detección)

La presencia o ausencia de tinción en la matriz después del secado se confirmó visualmente. Los resultados se muestran en **la figura 25**. Como se muestra en **la figura 25**, aunque la tinción no se confirmó en los productos de amplificación de tipo bicatenario sencillo, se observó una tinción oscura en los productos de amplificación de tipo monocatenario sencillo, lo que confirma la eficacia del presente método utilizando un ácido nucleico parcialmente bicatenario de tipo monocatenario sencillo.

[Ejemplo 7]

(1) Preparación de cromatografía de ADN de tipo membrana

Las soluciones de sonda de ADN que comprendían las secuencias de bases mostradas en la siguiente **tabla**, se aplicaron en placas de membrana Hi-Flow Plus (60 mm x 600 mm) de Merck Millipore y se dispusieron como se muestra en **la figura 19**, utilizando un aplicador Ltd. Geneshot® de NGK Insulators con la unidad de descarga (método de inyección de tinta) descrita en la publicación de solicitud de patente japonesa N° 2003-75305. Para las secuencias de oligo-ADN sintético, como sondas se utilizaron las 8 secuencias de las 100 secuencias D1_1 a D1_100 mostradas en la siguiente tabla, descritas en **la tabla 1** complementaria de la bibliografía (Analytical Biochemistry 364 (2007) 78-85). Las secuencias se modificaron con grupos amino en el extremo 3' de los oligonucleótidos para su uso como sondas. Además, como se muestra en **la figura 19**, se formaron tres regiones marcadoras de posición utilizando pigmento rojo.

[Tabla 18]

Nombre	Sec(5'→3')
D1-001	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC
D1-002	TGGAAGTGGGAACGCTTTAGATG
D1-003	TTCGCTTCGTTGTAATTTTCGGAC
D1-005	TAGCCCAAGTGATTTATGACATGC
D1-006	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT
D1-009	GGGGGGTACTTCATACAAGATGC
D1-010	GAGTAGCAGGCAAATACCCTAGA
D1-011	GCCTATTAAGGTCTACGTCATCG

Después de aplicar las sondas, se fijaron mediante exposición a luz UV a aproximadamente 300 mJ/cm² utilizando un dispositivo de irradiación UV Spectroline Co. (XL-1 500 UV Crosslinker) y se obtuvieron unidades de cromatografía que comprendían las regiones de sonda de 8 sondas diferentes junto con 3 regiones marcadoras de posición diferentes.

(2) Amplificación de ácido nucleico diana

Para la amplificación se utilizó ADN humano (producto comercial de Cosmo Bio) como ADN genómico. Como cebadores se utilizaron conjuntos de cebadores que consistían en las secuencias de bases mostradas más adelante en **la tabla 19**. Es decir, cada cebador R presentaba una secuencia identificadora complementaria a una sonda (D1-001, 002, 003 y 005), un sitio enlazador X y una primera secuencia de reconocimiento, y cada cebador F presentaba una secuencia identificadora y una segunda secuencia de reconocimiento, y la amplificación se realizó utilizando esto. Durante la amplificación, para que la biotina se incorporase en los extremos de ADN bicatenario después de la amplificación, se añadió un cebador (cebador R'; **tabla 20**) modificado con biotina en el extremo 5' de la secuencia identificadora en el cebador R, además de los dos tipos de cebadores mencionados anteriormente, dando como resultado un ADN parcialmente bicatenario que tiene una secuencia identificadora como una cadena sencilla.

[Tabla 19]

Nombre		Sec(5'→3')
Fragmento-1	F	GCAGATTTCATTGGTCAGAGAACACXCCCTGACTAGCATATATAAGAAAGCTTTTCAGCAAGTGCAGACTA
	R	AGGTTTTTCTAGAGTGGACACGGATTTTTTGCAATCGTAAGCAAAAAATGATTGGTTGAACATGAA
Fragmento-2	F	CATCTAAAGCGTTCCCAGTCCAXGCTTGCCCCCTGGGCTTTTATAAGTCGTCACGGAGA
	R	AGGTTTTTCTAGAGTGGACACGGCAAAATTGAGACGGCTCCAACTCAGTAATCTTTTCCAAA
Fragmento-3	F	GTCCGAAATTACAAACGAAGCGAAXGAAATGGGTTCCCTGGTTGTCAGCCTCTGCGAAGTA
	R	AGGTTTTTCTAGAGTGGACACGGAAACCGGCCAGCTTCGACGGTATCCTCTACTACTA
Fragmento-4	F	GCATGTCATAAATCACTGGGCTAXCATAGCAAGTTGTTTCATTGTTGTAACCCCTGGTACCTG
	R	AGGTTTTTCTAGAGTGGACACGGTTTAAGTGCAAAATTTATTTCCGCTCCAAAGGGACCTCCCA

[Tabla 20]

Nombre	Sec(5'⇒3')
cebador R'	[biotina]-AGGTTTTTCTAGAGTGGACACGG

Los sitios enlazadores X son cadenas de óxido de propileno, introducidos con fosforoamidita (fosforoamidita C3 espaciadora, Glen Research).

La composición en la reacción de amplificación fue la siguiente, y las condiciones de termociclado fueron 15 minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos, cada uno de los cuales comprendía 30 segundos a 95 °C, 1 segundo a 80 °C y 6 minutos a 64 °C; seguido de enfriamiento a 10 °C.

(Composición)	
mezcla maestra de PCR múltiple Qiagen 2×	5,0 µl
Mezcla de cebadores (F, R, 500 nM de cada uno)	0,5 µl
cebador R' (2 µM)	0,5 µl
dH ₂ O	3,0 µl
ADN genómico	0,5 µl
Total	10,0 µl

Se prepararon mezclas de los conjuntos de cebadores para cada uno de los productos de amplificación individuales 1 a 4 mostrados en la **Tabla 19** y una mezcla de todos los conjuntos de cebadores para los individuales 1 a 4, para un total de 5 mezclas.

Los productos de amplificación obtenidos por amplificación se purificaron con un kit de purificación de PCR MinElute de QIAGEN, y la amplificación de los fragmentos de la longitud deseada se confirmó mediante electroforesis en agarosa. También se confirmó el rendimiento de cada producto de amplificación después de la purificación. Los resultados se muestran en la **tabla 26** y en la **figura 27**.

Como se muestra en las **figuras 26** y **27**, no hubo una gran diferencia entre el tipo monocatenario sencillo y el tipo bicatenario sencillo en cuanto a la cantidad amplificada del producto de amplificación o al rendimiento después de la purificación.

(3) Detección utilizando una unidad de cromatografía

Se llevaron a cabo una reacción de hibridación y de detección mediante cromatografía de ácidos nucleicos utilizando el ADN parcialmente bicatenario amplificado en el punto (2). Las operaciones fueron las siguientes para los monocatenarios sencillos y los bicatenarios sencillos, respectivamente.

(Solución de revelado para monocatenarios sencillos)	
PBS	30,0 µl
Solución de látex	5,0 µl
Solución de reacción de amplificación	10,0 µl
Agua Millipore	5,0 µl
Total	50 µl

La solución de revelado se preparó mezclando PBS (solución salina tamponada con fosfato) con una solución de látex y una solución de reacción de amplificación (5 tipos). Para la solución de conservación de látex, perlas de látex de poliestireno que contenían un colorante azul se recubrieron con avidina (estreptavidina) y se prepararon con PBS a una concentración específica.

(Etapas de hibridación)

A un tubo de 0,2 ml se añadieron 50 µl de cada una de las soluciones de revelado anteriores y para iniciar una reacción de hibridación por cromatografía, se insertaron los extremos inferiores de cada una de las unidades de cromatografía (tipo 8 y tipo 4). Toda la solución de revelado se absorbió en aproximadamente 20 minutos, y la reacción de hibridación por cromatografía finalizó. Después de finalizar la reacción, las unidades de cromatografía se secaron al aire y los sitios de reacción se confirmaron a simple vista y se fotografiaron.

(Etapas de detección)

La presencia o ausencia de tinción en la matriz después del secado se confirmó visualmente. En la **figura 28** se muestran los resultados. Como se muestra en la **figura 28**, se observó una tinción oscura en el sitio previsto para cada producto de amplificación, lo que confirma los efectos de este método.

[Ejemplo 8]**(1) Preparación de cromatografía de ADN de tipo membrana**

- 5 Las soluciones de sonda de ADN que comprendían las secuencias de bases mostradas en la siguiente **tabla** se aplicaron en placas de membrana Hi-Flow Plus (60 mm x 600 mm) de Merck Millipore y se dispusieron como se muestra en **la figura 19**, utilizando un aplicador Ltd. Geneshot® de NGK Insulators con la unidad de descarga (método de inyección de tinta) descrita en la publicación de solicitud de patente japonesa N° 2003-75305. Para las secuencias de oligo-ADN sintético, como sondas se utilizaron las 8 secuencias de las 100 secuencias D1_1 a D1_100 mostradas
- 10 en la siguiente **tabla**, descritas en **la tabla 1** complementaria de la bibliografía (Analytical Biochemistry 364 (2007) 78-85). Las secuencias se modificaron con grupos amino en el extremo 3' de los oligonucleótidos para su uso como sondas. Además, como se muestra en **la figura 19**, se formaron tres regiones marcadoras de posición utilizando pigmento rojo.

15 **[Tabla 21]**

Nombre	Sec(5'⇒3')
D1-001	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC
D1-002	TGGAAGTGGGAACGCTTTAGATG
D1-003	TTTCGCTTCGTTGTAATTTCCGAC
D1-005	TAGCCCAGTGATTTATGACATGC
D1-006	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT
D1-009	GGGGGGTACTTCATACAAGATGC
D1-010	GAGTAGCAGGCAAATACCCTAGA
D1-011	GCCTATTAAGGTCTACGTCATCG

- Después de aplicar las sondas, se fijaron mediante exposición a luz UV a aproximadamente 300 mJ/cm² utilizando un dispositivo de irradiación UV Spectroline Co. (XL-1 500 UV Crosslinker) y se obtuvieron unidades de cromatografía que comprendían las regiones de sonda de 8 sondas diferentes junto con 3 regiones marcadoras de posición diferentes.
- 20

(2) Amplificación de ácido nucleico diana

- Para la amplificación se utilizó ADN humano (producto comercial de Cosmo Bio) como ADN genómico. Como
- 25 cebadores se utilizaron conjuntos de cebadores que consistían en las secuencias de bases mostradas más adelante en **la tabla 22**. Es decir, cada cebador R presentaba una secuencia identificadora complementaria a una sonda (D1-001, 002, 003 y 005), un sitio enlazador X y una primera secuencia de reconocimiento, y cada cebador F presentaba una secuencia identificadora y una segunda secuencia de reconocimiento, y la amplificación se realizó utilizando esto.
- 30 Durante la amplificación, un cebador (cebador R'; **tabla 23**) modificado con biotina en el extremo 3' de la secuencia identificadora complementaria en el cebador R, además de los dos tipos de cebadores mencionados anteriormente para que la biotina se incorpore en los extremos de ADN bicatenario después de la amplificación, dando como resultado un ADN parcialmente bicatenario que tiene una secuencia identificadora como una cadena sencilla.

[Tabla 22]

Nombre		Sec(5→3')
Fragmento-1	F	GCAGATTTCATTGGTCAGAGAACACXCCTGACTAGCATATAAGAAGCTTTTCAGCAAGTGCAGACTA
	R	AGGTTTTTCTAGAGTGGACACGGATTTTTGCATCGTAAGCAAAAATGATTGGTTGAACATGAA
Fragmento-2	F	CATCTAAAGCGTCCCAGTTCACXGCTTGCCCCCTGGGCTTTTATAAGTCGTCACGGAGA
	R	AGGTTTTTCTAGAGTGGACACGGCAAAATTTGAGACGGCTCCAACTCAGTAATCTTTTTCCAAA
Fragmento-3	F	GTCCGAAATTACAACGAAGCGAAXGAAATGGGTTCCCTGGTTGTCAGCCTCTGCCAAGTA
	R	AGGTTTTTCTAGAGTGGACACGGAACCGGCCAGCTTCGACGGTATCCTCTACTACTA
	R	AGGTTTTTCTAGAGTGGACACGGAACCGGCCAGCTTCGACGGTATCCTCTACTACTA
Fragmento-4	F	GCATGTCATAAAATCACTGGGCTAXCATAGCAAGTTGTTTCATTGTTGTAACCCCTGGTACCTG
	R	AGGTTTTTCTAGAGTGGACACGGTTTAAGTGCAAAATTTATTTCCGCTCCAAAGGGACCTCCCA

[Tabla 23]

Nombre	Sec(5⇒3')
cebador R'	CCGTGTCCACTCTAGAAAAACCT-[biotina]

Los sitios enlazadores X son cadenas de óxido de propileno, introducidos con fosforoamidita (fosforoamidita C3 espaciadora, Glen Research).

La composición en la reacción de amplificación fue la siguiente, y las condiciones de termociclado fueron 15 minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos, cada uno de los cuales comprendía 30 segundos a 95 °C, 1 segundo a 80 °C y 6 minutos a 64 °C; seguido de enfriamiento a 10 °C.

(Composición)		
10×TITANIO Taq ADN Polimerasa		0,2 µl
Mezcla de dNTP 50x		0,2 µl
10×tampón de PCR TITANIO Taq		1,0 ml
Mezcla de cebadores (F, R, 500 nM de cada uno)		0,5 µl
cebador R' -(2 µM)		0,5 µl
dH ₂ O		7,1 µl
ADN genómico,		0,5 µl
Total		10,0 µl

En la **tabla 22** se muestran las mezclas de los conjuntos de cebadores de cada uno de los productos de amplificación 1 a 4 sencillos y se preparó una mezcla de todos los conjuntos de cebadores para los productos 1 a 4 sencillos, para un total de 5 mezclas.

Los productos de amplificación obtenidos por amplificación se purificaron con un kit de purificación de PCR MinElute de QIAGEN, y la amplificación de los fragmentos de la longitud deseada se confirmó mediante electroforesis en agarosa. También se confirmó el rendimiento de cada producto de amplificación después de la purificación. Los resultados se muestran en **las figuras 29 y 30**.

Como se muestra en **las figuras 29 y 30**, no hubo una gran diferencia entre el tipo monocatenario sencillo y el tipo bicatenario sencillo en cuanto a la cantidad amplificada del producto de amplificación o al rendimiento después de la purificación.

(3) Detección utilizando una unidad de cromatografía

Se llevaron a cabo una reacción de hibridación y de detección mediante cromatografía de ácidos nucleicos utilizando el ADN parcialmente bicatenario amplificado en el punto (2). Las operaciones fueron las siguientes para los monocatenarios sencillos y los bicatenarios sencillos, respectivamente.

(Solución de revelado para monocatenarios sencillos)	
PBS	30,0 µl
Solución de látex	5,0 µl
Solución de reacción de amplificación	10,0 µl
Agua Millipore	5,0 µl
Total	50 µl

La solución de revelado se preparó mezclando PBS (solución salina tamponada con fosfato) con una solución de látex y una solución de reacción de amplificación (5 tipos). Para la solución de conservación de látex, perlas de látex de poliestireno que contenían un colorante azul se recubrieron con avidina (estreptavidina) y se prepararon con PBS a una concentración específica.

(Etapa de hibridación)

A un tubo de 0,2 ml se añadieron 50 µl de cada una de las soluciones de revelado anteriores y para iniciar una reacción de hibridación por cromatografía, se insertaron los extremos inferiores de cada una de las unidades de cromatografía (tipo 8 y tipo 4). Toda la solución de revelado se absorbió en aproximadamente 20 minutos, y la reacción de hibridación por cromatografía finalizó. Después de finalizar la reacción, las unidades de cromatografía se secaron al aire y los sitios de reacción se confirmaron a simple vista y se fotografiaron.

(Etapa de detección)

La presencia o ausencia de tinción en la matriz después del secado se confirmó visualmente. Los resultados se muestran en **la figura 31**. Como se muestra en la figura 31, se observó una tinción oscura en el sitio previsto para

cada producto de amplificación, lo que confirma los efectos de este método.

[Ejemplo 9]

- 5 En los siguientes ejemplos, se realiza un análisis de secuencia de bases (secuenciación de un paso) en 18 productos amplificados obtenidos en el Ejemplo 1. El análisis de secuencia de bases se realizó como se explica a continuación.

Ambas cadenas de cada muestra amplificada se sometieron a un análisis de secuencia de bases (secuenciación de un paso) en Takara Bio, y se obtuvieron los resultados de la secuencia de bases, incluidas las secuencias del cebador.

- 10 Los resultados se muestran en **las tablas** 24 a 26 más adelante (solo una hebra).

[Tabla 24]

Producto amplificado	Resultados (Caperuzas: idénticas a la secuencia del cebador o complementarias a estas)	longitud (pb)
P1-1	ACCAAAGAATATGGCTGAATTTAGTAGTGTTTTAAATAATTTTAAgtgataatgtcagtaacttagtagatgctgtgctaagggatcatgattttatcacaaatatggtaaatcatatacccaaaatagaacacaaaagcatgtccactctcaaatgaagccaaagccagaactgctcactctgtctcatcaaattgtaaaactctgggctgtctaaagtgtcctgtattttcattaagggtacttagcaagcgctgtgtaaatactgttgattaaattacctgagataaacacacctgacactgtcaatctttccttgacaggcagctcaaatgtttctgtgacaactaatccaatgtgtgcttctcactcaaggaattcaattcattgagaaaaacctgcccagggtgcaacatctagattcacaatgaacttctgattttgtattcatttattccagctctgtcatccTAGGAATAGTTGTTTTCAAAATAAGGGATCATCTCATTAGCAGGT	523
P1-2	AGCCTGAGATTCATTATTCAAAGATATGAAATTTTAAAATGCATAgcattacttttaaaaaatagcaaatggctattaaatatctgttctccaaacctcactttcttattccaacacaaactttaaaaaatagatcagtttctaaaaattacatgctagcttaactgtctttcatcagggggaagtgaaaatgctaaatgagaagtacatttaggtgtctaaatcagtatgcttcttcttctttttcccaaaaaatgaagaataaggactctgaggctatttaggtatttgcagaacctgggtaaaaatttacttaagaagtagtgtgggcaggcgcggtgtctcacgactatgtcccactacttgggaggcttggcctacatggtgaaacccatctctactaaaaatacaaaaacaaaaacaaaaacaaaaataaatagtatgcagtgagagaactaaggggatcattgatttaagaactgcagtactgtttacacaaacataactgactgatgagatatactatcctcccagctcctgtccgaagactggatctgcatggagaaaaactgttacctattttctcgggctcatttaactgggaaaaagaccaagagaagtgtctgtcttfgatgtccaagtgtgctgaataataatagcacagctgactgttgtagtgcattgttgggtggagtagttggtgatagggaataatctggtttaaactgtcactggagggaattctgtttgagagccaaaagtctgtttttagcttagtctgacccaattttgtTATGACCTTGGACGGACAGGCTCTGTAGTATCTCTAG	867
P1-3	CATTTTAATATTGGGTAGAAAAATCAAGAATGCATTGCTCATAAAAaaaaaaatcttaccctgagttcagttccgtctgctagattgtaattaaaggtgacaccaagttcaaaaacaaacttcaatgttgcgaaaagtgtgattcttctgactgtgaatttatttcttctgtgtaattgtcagcttcaaattgtcatgagctgcaagcttcttttactatattaacacctgtaaaaggtaagacaatggagaaaaataagtcaaatcccatagggaagtgtttattttccaagttatgtttgttttatttttgagggtgggaagaaaactcggtagcattgcccittgcacaagaacattcagattgtcttcacagaagttcagggtcaatcagatcaagagaactgtattaaagtgtttttccataacttgagaaaaattaagtagagtagacaagtTATAGAATCTTAGAGCTGAGCAACCTTAATAAGATTAACA	504
P1-4	CATTCATATATTTATGCATTCCCTCATTCAAAGATCTTATTtagcatctcctgcccattaaaaataaatacatggctctgtaatgaaagatgtgtattcctgtacttatgtccacattaaattgtcttgggtactggtgaccggtgtcaccagtgctatctgtagcattcctggtgaagaaaagtgtgttatctctgtagctcccctactcatgcccactctccttcttgggaagcatttattgaaaacatacagtgggagaaacactgacctgtttatcacttcagcacccttatgggtgtctcccactttcccactgtatcagggttgcatttcaacactttcctccccttatggattcctgttttcttctgctgaagactgatattctactcataaacaatacttcagtatattctggatgtattgagataagatcatcttcttcaattatttaactacaatttctcactaagtggcataacatgtgagtgcagagggtgaagaagaatgggaagacattctcacaaaaaggaaatcctcttctcagaggcatcagaggggaggggtgcggcagagaccaaagaacacttgccactgaagtgtactccagcacagacaaagaaaatagtgaaggggctcttcatttagagggtgaacatagactatgtttaaaagtaaggagtggtgcagatatactgcactgtgagggaaatcagtcactgtgaagacgtgacaagcctagctccactgaggcctgggaaaacagggtgagttaataggttaactcaggaaagcagcatgtgacatctgtgattggacaggaaattgctaagacgtcacccctggaagagtctcatacactgtcccactgtgcaagagcctgcacatcctgcaatgtagaaGTTTTCAAACTTTTATAAACCTCTGTATCCTTTACTTTAAAC	953

(continuación)

Producto amplificado	Resultados (Caperuzas: idénticas a la secuencia del cebador o complementarias a estas)	longitud (pb)
P1-5	TCTGTGGCAATAAGATCCCTATGACTGAAGATGCCcacacagttgatagccacttg gcagggggctatacatcacatttaagccttcatTTTTtagactagattatgtctaaagactTTTTcaattttatttaa aaaatagagacagaggttctactatgttgcacaggctgtttcgagctctgggtcaagtgattctctgcctc aacctctcaaagtctaggattacagacatgggtcacggcacctggcctaagacattttaaaactagtatt ctatggttctccattccttgatggggggaaaaacatgtcttgcctgattgaaatacagggaaaataattggc cacattgatatgaggacaaggagaacagagtggtggcagtgatgtgaattccaggaagaacagtgagg cccaacagataaaatattgagagggttaaaagtgtagaaGCTGTGGCAGCTCTAATTCCTTC TATATTAAGGTTTATCC	502
P1-6	GAGAACCCTTTGAGGCATCCCTGCTGTTCTCGAGATAccagcctggctgagggctc cctgcgcgcggccctgtggcccccgtggcgcgccttctgcgccagagcgggttctctgtggttctac ctcaggaccctcacatgggtggcctgtcctctggagcatcccccctctccttagctccagaccctctc attctccaggcccccagtgagggctcctgtgtgagggcccccctccctcccccctgttggctgtggccact tcccctgtttcatccccacctctgtctgcccgttctgtgtgtgtgtgtctttagaggcgcctcccc gagggcagggcactgcacagccaacaacagttcaatggcctctgtctgtggagaccctgggcttgg tcacctctgcagcagggagggccggggagctgttctgtggcagtgacagcctgggggctcagggccc ggcgtgtctgggaacggaggtgtgagcgcgagcgggctctcctggggcccagggcactccctgggct gaagggaggggtcaggggaaggatgagggccctctgtcccagctccctgggcaccactgagaggcct ctggccacccctgtccctcaacattggccacgcccacagcctgtgtgttctgtctccaccaggcctctccc cgggcgctgtgtgtctgtctgtgctcaagacgggtgtctctctgtggacactcgagaggctgccagggt gtcccaaacacgcacacatgtgagcctcttctcgcctacgtgcccacactgtcccaccccaggag agggctgcatgcccgtgccccagcccagggctctctgcggctgggtgtgtcTTCCTGAAC CCTTCTGTGAACGCCTCACATGTT	940

[TABLA 25]

Producto amplificado	Resultados (Caperuzas: idénticas a la secuencia del cebador o complementarias a estas)	longitud (pb)
P2-1	AGGTTTTCTAGAGTGGACACGGACCAAGAATATGGCTGAATTTAGTAG TGTTTTAAATAATTTTAAgtgataatgtcagtaacttaggatagctgtgtaagggatcatgattt tatcaaaatagtgtaataatctataccaaaatagaacaaaagcatgtccattctcaatgaagccaa aggccagaactgtctactctgtctcatcaaatgttaaactctggcctgtctaaagtgtcctgtattttcattaag ggtagcttagcaagcgctgtgtaatactgttgtaataattacctgagataaaccacactgacactgtcaatc tttctctgacaggcagctcaaatgttctgtgacaactaatccaatgtgtgccttactcaaggaattcaattcat tgagaaaacctgcccaggtgcaacatctagattcacaatgaacttctgatttgtattcatttccagctctg tcatccTAGGAATAGTTGTTTTCAAAATAAGGGATCATCTCATTAGCAGGTG CAGATTCATTGGTCAGAGAACA	569
P2-2	AGGTTTTCTAGAGTGGACACGGAGCCTAGATTCATTATTCAAAGATATG AAATTTTAAATGCATAgcattacttttaaaaatagcagaatggctattaaatatgttctcccaac cctcatttcttatttccaaacacaactttaaaaatagatcagtttctaaattacatgctagcttaactgttttc atcaggggaagtgaataatgctaaatgagaagtacatttaggtgtctaaaatcagatgtcttcttcttctttttt ccccaaaaatgaagaaataaggactctgaggtatttaggtattgcagaacctgggttaaatttacttaag aagtagtgtggcagggcgcggtgtctcacgactatagctccactacttgggaggcttggcctacatggtg aaaccccatcttactaaaaatacaaaaaacaaaaacaaaaataaatagatgcacgtgagag aactaaggggatcattgatttaagaactgcagtactgtttcacaaaacataactgactgatgagatact atcctccagctcctgtcgcgaagactggatctggcatggagaaaactgttacctatttctcgggctcattt aactgggaaaagagccaagagaagtgtgtcttggatgccaagttgctgaaaataatagcacagctga tctggtgagtggtcatgatatgttgggtggagattgtgtgatagggaataatctgttttaactgtcact ggaggaaattctgttgagagccaaatgtctgttttttagcttagctgtatcccaattttgtTATGACCT TGGACGGACAGGCTCTGTAGTATCTCTAGCATCTAAAGCGTCCAGTT CCA	913
P2-3	AGGTTTTCTAGAGTGGACACGGCATTTTAATATTGGGTAGAAAAATCAA GAATGCATTGCTCATAAAAaaaaaattctaccctgagttcagttccgtctgtagattgaattaa aggtgacaccaagttcaaaaacaactcaatgttgcgaagtgcttattcttgcagtggaattatttcttctt gtgaattgtcagcttcaaatgtcatgagctgaagcttcttctcattatataacacctgtaaaaggtaagac aatggagaaaaataaagtcaaatcccataggaagtgttttttccaagttatgttgggtttattttgaggggtg ggaagaaaaactcgttagcattgccttgcacaagaacattcagattgtctacagaagttcaggttcaatca gatcaagagaactgattaaagtgttttccataacttgagaaaaataagtagagtacagaatTATAGA ATCTTAGAGCTGAGCAACCTTAATAAGATTAACAGTCCGAAATTACAACG AAGCGAA	550

(continuación)

Producto amplificado	Resultados (Caperuzas: idénticas a la secuencia del cebador o complementarias a estas)	longitud (pb)
P2-4	AGGTTTTCTAGAGTGGACACGGCATTTCATATATTTATGCATTCTCCATT CAAAAGATCTTATTtagcatctcctgccattaaaataacatggctctgtaagaaagatgtat tctgtacttatgtccacattaaattgtcttggtactgtgacgggtgcaccagtgctatctgtagcattcctgg taagaaaagttggttatctctgtagctcccactcatgcccactctccttctggaagcatttattgaaac atacagtgaggaaacactgacctgtttatcacttcagcaccttatgggtgtctcccacttcccactgtatcag gtttgttttcaacacttctccccttatggattcctgttttcttctgctgcaagactgatcttactcataaacaat acttcagtatatcttgattgattgagataagtcatactcttctaattttaaactacaatttctcatctaagtggc ataacatgtgagttcaagagggtaagaagaatgggaagacattctcacaanaaggaaatcctctctcag aggcatcagagggaggggtgcggcagagaccaaagaacacttgcactgaagtactccagcacagac aaagaaaatagtgaaggggtctctcatattagagggtaacatagactatgtttaaaagtaaggagtg gcagataactcagctgtgagggaaatcagtcactgtgaagacgtgacaagcctagctccactgaggcctg ggaaacaagggtgagtaaatggttaactcaggaaagcagcatgtgaccatctgtgattggacaggaaatt gcctaagacgtcaccctggaagagtctcatacactgtcccatctggaagacgtgcacatctgcaatgta gaaGTTTTCAAACCTTTATAACCTCTGTATCCTTTACTTAAACAGTAGCGA TTTCTTAGGATGCCT	999
P2-5	AGGTTTTCTAGAGTGGACACGGTCTGTGGCAATAAGATCCCTATGACTG AAGATGCCcacacagttgatagccacttggcaggggctatacatcacatttaagcctcatttttagact agattatgtctaaagacttttcaaattttttaaaaaatagagacagaggttctactatgttcccaggctggtt tcgagctctgggctcaagtattctcctgctcaacctctcaaagtctaggattacagacatgggtcacggc acctggcctaagacattttaaactagtattctatggtctccattccttgatgggggaaaaaccatgtcttg tctgtattgaatacagggaaaatattggccacattgatatgaggacaaggagaacagagtggtggcagt gatgtgaattccaggaagaaacagtgaggcccaacagataaaatattgagaggttaaaagtgtagaaG CTGTGGCAGCTCTAATTCCTTCTATATTAAGGTTTATCCGCATGTCATAAA TCACTGGGCTA	548
P2-6	AGGTTTTCTAGAGTGGACACGGGAGAACCTTTGAGGCATCCCTGCTGT TCTCGAGATAccagcctcggtgaggggtccctgcgcgcggccctgtggcccccctgggcccgcgc cttctgcgccagagccggttctctgtgtctacctcaggaccctcacatgggtggtgctcctcctggag catccacccctctccttagcctccagaccctctcattctccaggcccaggtgagggctccttggtgaggcc ccctccctcccccctcgtgttggtgctggccacttccctgctttccatccccacactctgtctgcccgttctctg ctggtggtgtgtctcttagaggccgctcccgagggcagggcactgcacagccaacaacagttcaatg gcctcttctcgtctggagaccctggcctgtgtcacctctcagcagggaggggcccgggagctgtctgt tggcacagtgcagcctgggggctcaggcccggtgctgtctgggaacggaggtgtgagcgcgagcggtg gctctcctgggcccagggccactccctgggctgaaggaggggtcaggggaaggatgaggccctcgt tccccagctccctgggcaccactgagaggcctctggccacctcgtccctcaacattggccacgcccacag cctgctgtgttctgtctcaccagggcctctccccgggcgctctgtgctgctcctgctggctcaagacgggtgct tctctctggacactcagaggtgcccaggggtctcccaaacacgcacacattgtgagcctcttctcgcgc ctacgtgccccatcctgccccatcccaggaggggtgcatgccccgtgccccagcccaggggtctct cggtggtgggtgctgtcTTCCTGAACCTTTCTGTGAACGCCTCACATGTTTAAAC GTCCAATAGTAACCAGAGCG	986

[TABLA 26]

Producto amplificado	Resultados (Caperuzas: idénticas a la secuencia del cebador o complementarias a estas)	longitud (pb)
P3-1	ACCAAGAATATGGCTGAATTTAGTAGTGTTTTAAATAATTTTAAgtgataatgt cagtaactttaggatagtctgtgtaagggtatcatgattttatcacaatatggaatgaatctatacccaaaa tagaaacaaaagcatgtccatcttcaaatgaagccaaaggccagaactgctcactctgtctcatcaaatgt aaactctgggctgtctaaagtgtcctgtattttcattaagggtacttagcaagcgctggttaaatactgtgatt aaattacctgagataaaaccacacctgacactgtcaatctttccttgacaggcagctcaaatgttctgtgaca actaatccaatgtgtccttcaactcaaggaaattcaattcattgagaaaacctgcccaggtgcaacatctagatt cacaatgaactttctgattttgtattcattatccagctctgtcatccTAGGAATAGTTGTTTTCAA ATAAGGGATCATCTCATTAGCAGGT	523

(continuación)

Producto amplificado	Resultados (Caperuzas: idénticas a la secuencia del cebador o complementarias a estas)	longitud (pb)
P3-2	AGCCTAGATTTCATTATTCAAAGATATGAAATTTTAAAATGCATAgcattacttttta aaaatagcagaatggctattaaatatctgttctcccaaccctcactttcttttccaacacaactttaaaaaat agatcagtttctaaaattacatgctagcttaactgtctttcatcagggaagtgaagtgaatgagaagt acatttaggttgctaaaaatcagatgctttctttctttttttcccaaaaaatgaagaaataaggactctgagg ctatttaggtattgcagaacctgggtaaaatttacttaagaagtagtggtggcaggggcggtgtctcaaga ctatagctccactactttggagggttgccctacatggtgaaccccatctctactaaaaatacaaaaacaa aaacaaaaacaaaaataaatagatgcacgtgagagaactaagggaatcattgatttaagaactgcagta ctgctttacacaaacataactgactgatgagatatactctccagctcctgtccgcaagactggatctg gcatggagaaaactgttactatttctcgggtcatttaactgggaaaagagccaagagaagtgtgtctt tgatgccaagtgtgaaaaataatagcacagctgatctggtgagtggtcatggaattgttgggtggagta ttggtgatagggaataatctggttaactgtcactggaggaaattctgttgagagccaaaatgtctgttttt agcttagctgatcaccaatttgtTATGACCTTGGACGGACAGGCTCTGTAGTATCT CTAG	867
P3-3	CATTTTAATATTGGGTAGAAAAATCAAGAATGCATTGCTCATAAAAaaaaaa ttctaacctgagttcagttcgtctgctagattgaattaaaggtagaccaagtcaaaaacaaactcaatgtt tcgaaaagtgtctgattcttgactgtgaatttcttctgtgtaattgcagctcaaatgtcatgagctgcaa gcttcttttactatattaacacctgtaaaaggaagacaatggagaaaaataaagtcaaatcccataggaa gtgtttattttccaagtattgtttgttttttttgggtgggaagaaaactcggtagcattgaccttgacaaag aacattcagattgctctacagaagttcagggtcaatcagatcaagagaactgattaaagtgttttccataact tgagaaaaattaagtagagtacagaatTATAGAATCTTAGAGCTGAGCAACCTTAATA AGATTAACA	504
P3-4	CATT CATATATTTATGCATTCTCCATTCAAAAGATCTTATTtagcatctcctgccc attaaaaataacataggtctgtaaatgaagatgtgtattcctgtactatgttccacattaaattgtctgggta ctggtgaccgggtgcaccagtgctatctgtagcattcctggtaagaaaagtgtgttactctgtagctccctac tcatgccccactctcctcctggaagcatttattgaaaacatacagtggaagaaactgacctgtttatcact cagcaccttatgtgtctccaccttccactgtatcagggttctttcaacacttctcccttatggattcctg tttcttctgctgcaagactgatatctactcataaacaatactcagtatatcttgattgattgagataagtc atccttctaattatttaactacaatttctcatctaatgtggcataacatgtgagttcaagagggtgaagaagaat gggaagacattctcaaaaaggaaatccttctcagaggcatcagaggagggtgctggcagagacc aaagaacacttgccactgaagtgtactccagcacagacaaaagaaatagtgaaagggtctctcatattag agggtgaacatagactatgttttaaaagtaaggagtgagagatactcgactgtgagggaatcagtcac tgtgaagacgtgacaagcctagctcactgaggcctgggaaacaagggtgagtttaattaggttaactcagg aaagcagcatgtgaccatctgtattggacaggaaattgcctaagacgtcacctggaagagctcataca ctgtcccatctggcaagagcctgcacatcctgcaatgtagaaGTTTTCAAACTTTTATAACCT CTGTATCCTTTACTTAAAC	953
P3-5	TCTGTGGCAATAAGATCCCTATGACTGAAGATGCCcacacagttgatagccacttg gcagggggtatacatcacatttaagccttcattttagactagattatgtctaaagacttttcaaatattttaa aaaatagagacagagggttactatgttgcaggctggtttcagctctgggtcaagtgtattcctgctc aacctctcaaaagtctaggattacagacatgggtacggcacctggcctaaagacattttaaactagtatt ctatggttctccattccttgatggggggaaaaaacatgtcttctgctgattgaaatacagggaataattggc cacattgatagaggacaaggagaacagagtggtggcagtgatgtgaattccaggaagaacagtgagg cccaacagataaaatattgagaggtaaaagttagaaGCTGTGGCAGCTCTAATTCCTTC TATATTAAGGTTTATCC	502
P3-6	GAGAACCTTTGAGGCATCCCTGCTGTTCTCGAGATAccagcctcgtgagggtc cctcgcgcggccctctgtggccctctggcgccctctcgcgccagagccggttctcctgtgtctac ctcaggacctcacatgggtgacctgctcctgagcatccacctctccttagacctccagacctctc attctccaggcccggtgagggtctcctgtgaggccctcctcctcctcctggttggctgtggccact tccctgctttccatccccacctgtgtgcccgttctgctggtgtgtgtctttagaggccgctcccc gagggcagggcactgcacagccaacaacagttaattggcctctgtcgtcgtggagacctggccttgg tcacctctcagcaggaggggccggggagtctgttctgtggcacagtgcagcctgggggtcaggcccg ggcgtgtctgggaacggaggtgtgagcgcgaggcgggtctcctgggcccaggccactcctgggct gaaggagggggtcagggaaggatgaggccctcgtcccagctccctgggcacctgagaggcct ctggccacctcctcctcaacattggccacgcccacagcctgctgtgttctgtctccaccaggcctctccc cgggcgctctgtgctcctgtgtgctcaagacgggtgtcctctctctggacactcagagaggtgccagggt gtcccaaacacgcacacctgtgagcctcttctcgcctcagtgcccatcctgcccacccaggag agggtgctcatgcccgtgccccagccacgggtctctcggtgggtgtgtcTTCCTGAAC CCTTTCTGTGAACGCCTCACATGTTT	940

Se confirmó que las cadenas complementarias de las secuencias identificadoras se amplificaron utilizando los cebadores P2. Por otro lado, las cadenas complementarias de las secuencias identificadoras no se amplificaron con los cebadores P3, y en cambio las mismas secuencias que las obtenidas con los cebadores P1 se amplificaron como hebras dobles. Esto confirma que cuando se utilizan cebadores P3, la parte de secuencia identificadora se conserva

como una sola cadena, contribuyendo posiblemente a una hibridación más eficaz.

[Texto libre de **tabla** de secuencias]

5 SEQ ID NO: 1~100: Sondas
[**Tablas** de Secuencias]

LISTADO DE SECUENCIAS

10	<110> NGK INSULATORS, LTD.	
	<120> Método de detección de nucleótidos diana	
	<130> K12-359-PCT	
15	<160> 136	
	<170> PatentIn versión 3.3	
20	<210> 1	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> sonda	
	<400> 1	
30	tggtctctga ccaatgaatc tgc	23
	<210> 2	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> sonda	
	<400> 2	
40	tggaactggg aacgcttag atg	23
	<210> 3	
	<211> 23	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
50	<400> 3	
	ttcgcttcgt tgtaattcg gac	23
	<210> 4	
	<211> 23	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
60	<400> 4	
	aggcatccta agaaatcgct act	23
	<210> 5	
65	<211> 23	
	<212> ADN	

ES 2 736 977 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
5	<400> 5 tagcccagtg atttatgaca tgc	23
10	<210> 6 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> sonda	
	<400> 6 cgctctggtt actattggac gtt	23
20	<210> 7 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> sonda	
30	<400> 7 tagccaactc taaataacgg acg	23
35	<210> 8 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
40	<400> 8 ttcgggtgtc gatatgagga tct	23
45	<210> 9 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
50	<400> 9 gggggggtact tcatacaaga tgc	23
55	<210> 10 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> sonda	
	<400> 10 gagtagcagg caaataccct aga	23
65	<210> 11 <211> 23 <212> ADN	

ES 2 736 977 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
5	<400> 11 gcctattaag gtctacgtca tcg	23
10	<210> 12 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> sonda	
20	<400> 12 agtcatacag tgaggaccaa atg	23
25	<210> 13 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> sonda	
35	<400> 13 cattcgacat aagctgtga tgc	23
40	<210> 14 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> sonda	
50	<400> 14 tgctcactta cattacgtcc atg	23
55	<210> 15 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> sonda	
65	<400> 15 tacacctatc aactcgtaga gca	23
	<210> 16 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
	<400> 16 aggtccggta gtaatttagg tgc	23
	<210> 17 <211> 23 <212> ADN	

ES 2 736 977 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
5	<400> 17 tgcactctga tatatacagg cca	23
10	<210> 18 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> sonda	
20	<400> 18 gcagccctta tagataacgg gac	23
25	<210> 19 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> sonda	
35	<400> 19 gaagccatga tactgttcag ggt	23
40	<210> 20 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> sonda	
50	<400> 20 tattctacca acgacatcac tgc	23
55	<210> 21 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> sonda	
65	<400> 21 ccatcagtta ttcggaggga ctc	23
	<210> 22 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
	<400> 22 ccatatccga ttattagcga cgg	23
	<210> 23 <211> 23 <212> ADN	

ES 2 736 977 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
5	<400> 23 catctccaag aattgacca cca	23
10	<210> 24 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> sonda	
	<400> 24 ccgtcgtgtt attaaagacc cct	23
20	<210> 25 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> sonda	
30	<400> 25 gaaggatcgc tttatctgg cat	23
35	<210> 26 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
40	<400> 26 cattgtcag gtacagtcca ctt	23
45	<210> 27 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
50	<400> 27 gcccacactc ttacttatcg act	23
55	<210> 28 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> sonda	
	<400> 28 cgctgttact gtaagcgtag tag	23
65	<210> 29 <211> 23 <212> ADN	

ES 2 736 977 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
5	<400> 29 cgcgattcct attgattgat ccc	23
10	<210> 30 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> sonda	
	<400> 30 ccgtctgggt taaagattgc tag	23
20	<210> 31 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> sonda	
30	<400> 31 agtcagtcca aatctcagga tgg	23
35	<210> 32 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
40	<400> 32 cgctctaatg aaactcactc tgc	23
45	<210> 33 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
50	<400> 33 ggggtcaaac caacaattga tct	23
55	<210> 34 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> sonda	
	<400> 34 gcccattgat agaattacga ggc	23
65	<210> 35 <211> 23 <212> ADN	

ES 2 736 977 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
5	<400> 35 atgccgttgt caagagttat ggt	23
10	<210> 36 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> sonda	
20	<400> 36 tgccggtat cgtaagtata tgc	23
25	<210> 37 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> sonda	
35	<400> 37 gcacctcata cctcataga gca	23
40	<210> 38 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> sonda	
50	<400> 38 cgcgacattt agtcaggag atg	23
55	<210> 39 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> sonda	
65	<400> 39 ctagtccatt gtaacgaagg cca	23
	<210> 40 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
	<400> 40 agacaattag aatcagtgcc cct	23
	<210> 41 <211> 23 <212> ADN	

ES 2 736 977 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
5	<400> 41 gcattgaggt attgtgctc cca	23
10	<210> 42 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> sonda	
20	<400> 42 cgagagtctg taatagccga tgc	23
25	<210> 43 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> sonda	
35	<400> 43 tgccgtgata ctaactacg cta	23
40	<210> 44 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> sonda	
50	<400> 44 gagtcgcaa aaatatagga ggc	23
55	<210> 45 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> sonda	
65	<400> 45 gcctcacata actggagaaa cct	23
	<210> 46 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
	<400> 46 cgccaatgac aataagttga ggc	23
	<210> 47 <211> 23 <212> ADN	

ES 2 736 977 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
5	<400> 47 cgcgatataa cattaaccga ggc	23
10	<210> 48 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> sonda	
	<400> 48 cacgcctagt tcctacctta ggc	23
20	<210> 49 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> sonda	
30	<400> 49 cgcgtcgaat tacttaatca cca	23
35	<210> 50 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
40	<400> 50 gggataggta ttatgctcca gcc	23
45	<210> 51 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
50	<400> 51 cgccattata caacggttca tgc	23
55	<210> 52 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> sonda	
	<400> 52 gcctatatga accaagccac tgc	23
65	<210> 53 <211> 23 <212> ADN	

ES 2 736 977 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
5	<400> 53 cgccgtcagt actgtatag atg	23
10	<210> 54 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> sonda	
20	<400> 54 gtcggatcg aaaaggctact gca	23
25	<210> 55 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> sonda	
35	<400> 55 aggcagttca acctatatct gcg	23
40	<210> 56 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> sonda	
50	<400> 56 ggcgtgaaca ttgagaggag acg	23
55	<210> 57 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> sonda	
65	<400> 57 ggcgatttat tgctaactgg cta	23
	<210> 58 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
	<400> 58 gcactaccgc taactatacg cta	23
	<210> 59 <211> 23 <212> ADN	

ES 2 736 977 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
5	<400> 59 ggctcgtagt actccttaca tgc	23
10	<210> 60 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> sonda	
	<400> 60 ggctctacaa acttgtgtcc atg	23
20	<210> 61 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> sonda	
30	<400> 61 ggtggagtga atctcactag act	23
35	<210> 62 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
40	<400> 62 ctagcacaat taatcaatcc gcc	23
45	<210> 63 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
50	<400> 63 gcagctgaat tgctatgatc acc	23
55	<210> 64 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> sonda	
	<400> 64 gcctatagtg tcgattgtcc tcg	23
65	<210> 65 <211> 23 <212> ADN	

ES 2 736 977 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
5	<400> 65 cgatcacgga ttaatgtcac ccc	23
10	<210> 66 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> sonda	
	<400> 66 aagagattta acttgagctc gcc	23
20	<210> 67 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> sonda	
30	<400> 67 ttgtgttc gatcaggc gtg	23
35	<210> 68 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
40	<400> 68 gcccgggaat agattataac gca	23
45	<210> 69 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
50	<400> 69 gcatttttag taatccgagc gcc	23
55	<210> 70 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> sonda	
	<400> 70 catggataag tttcaagct gcg	23
65	<210> 71 <211> 23 <212> ADN	

ES 2 736 977 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
5	<400> 71 gagacaggta aaccctcaga gca	23
10	<210> 72 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> sonda	
	<400> 72 tagcaccgt taaaacggaa atg	23
20	<210> 73 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> sonda	
30	<400> 73 tatgttagt tgtgaaccg gcg	23
35	<210> 74 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
40	<400> 74 cgatcagctc tatttcctc cca	23
45	<210> 75 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
50	<400> 75 agtcagttaa tcagacgtga gca	23
55	<210> 76 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> sonda	
	<400> 76 tggcaataca ataacgtatc gcg	23
65	<210> 77 <211> 23 <212> ADN	

ES 2 736 977 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
5	<400> 77 cgcagttgc aagaacgaac aaa	23
10	<210> 78 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> sonda	
	<400> 78 cgcgataatt gataacctacg ggc	23
20	<210> 79 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> sonda	
30	<400> 79 ggggtgtgag agcttttag acg	23
35	<210> 80 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
40	<400> 80 gggatccgta acaagtgtgt tag	23
45	<210> 81 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
50	<400> 81 accactatga ttgaggaaac gcg	23
55	<210> 82 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> sonda	
	<400> 82 cgtctttagt atcaaccctc cgc	23
65	<210> 83 <211> 23 <212> ADN	

ES 2 736 977 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
5	<400> 83 gcatacgaac ttctatatcg gcg	23
10	<210> 84 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> sonda	
	<400> 84 ccgtgtgtat gagtatgaca gca	23
20	<210> 85 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> sonda	
30	<400> 85 tgctgtcttc gtgtttacc tag	23
35	<210> 86 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
40	<400> 86 cgatcatgta aagctaactc gcg	23
45	<210> 87 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
50	<400> 87 tgccgtcatt taaacgtaag ggt	23
55	<210> 88 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> sonda	
	<400> 88 tggcaattac agttgttaac gca	23
65	<210> 89 <211> 23 <212> ADN	

ES 2 736 977 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
5	<400> 89 gagtcgaaga cctcctcta ctc	23
10	<210> 90 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> sonda	
20	<400> 90 atgccaatat gtactcgtga ctc	23
25	<210> 91 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> sonda	
35	<400> 91 gcatatagtg acggaaggc gaa	23
40	<210> 92 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> sonda	
50	<400> 92 gcctcacttg taataagcgg gac	23
55	<210> 93 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> sonda	
65	<400> 93 gtcccaaaag cttcttacgg acg	23
	<210> 94 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
	<400> 94 ctaggtaaa caccaactgt etc	23
	<210> 95 <211> 23 <212> ADN	

ES 2 736 977 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
5	<400> 95 tgccggttat accttaagg acg	23
10	<210> 96 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> sonda	
	<400> 96 ggctgggttaa atgtaaacc gcg	23
20	<210> 97 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> sonda	
30	<400> 97 cgcggtacta ttagaaagg cta	23
35	<210> 98 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
40	<400> 98 agtcgcttaa ttactccga tgg	23
45	<210> 99 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> sonda	
50	<400> 99 cgctgttggt attacctcc tcg	23
55	<210> 100 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> sonda	
	<400> 100 tgcagtgtaa gcaactattg tct	23
65	<210> 101 <211> 45 <212> ADN	

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
5	<400> 101 accaaagaat atggctgaat ttagtagtgt tttaaataat ttaa	45
10	<210> 102 <211> 45 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> Cebador	
	<400> 102 acctgctaag gagatgatcc cttatttga aaacaactat tecta	45
20	<210> 103 <211> 44 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Cebador	
30	<400> 103 agcctagatt cattattcaa agatatgaaa tttaaaatg cata	44
35	<210> 104 <211> 37 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Pr	
40	<400> 104 ctagagatac tacagagcct gtccgtcaa ggtcata	37
45	<210> 105 <211> 43 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Sonda	
50	<400> 105 cattttaata ttgggtagaa aaatcaagaa tgcattgctc ata	43
55	<210> 106 <211> 40 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Cebador	
	<400> 106 tgtaaatctt attaagggtg ctacagctcta agattctata	40
65	<210> 107 <211> 42 <212> ADN	

ES 2 736 977 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
5	<400> 107 cattcatata ttatgcatt cctccattca aaagatctta tt	42
10	<210> 108 <211> 41 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> Cebador	
	<400> 108 gtttaagtaa aggatacaga gggttataaa agtttgaaaa c	41
20	<210> 109 <211> 35 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Cebador	
30	<400> 109 tctgtggcaa taagatccct atgactgaag atgcc	35
35	<210> 110 <211> 40 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador	
40	<400> 110 ggataaacct taatatagaa ggaattagag ctgccacagc	40
45	<210> 111 <211> 36 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador	
50	<400> 111 gagaaccttt gaggcattccc tgctgttctc gagata	36
55	<210> 112 <211> 35 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Cebador	
	<400> 112 aaacatgtga ggcgttcaca gaaaggggtc aggaa	35
65	<210> 113 <211> 68 <212> ADN	

ES 2 736 977 T3

	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
5	<400> 113		
	agggtttttct agagtggaca cggaccaaag aatatggctg aatttagtag tgttttaaat	60	
	aattttaa	68	
10	<210> 114 <211> 68 <212> ADN <213> Artificial		
15	<220> <223> Cebador		
	<400> 114		
	tgttctctga ccaatgaatc tgcacctgct aatgagatga tcccttattt tgaaaacaac	60	
20	tattccta	68	
	<210> 115 <211> 67 <212> ADN <213> Artificial		
25	<220> <223> Cebador		
30	<400> 115		
	agggtttttct agagtggaca cggagcctag attcattatt caaagatatg aaattttaaa	60	
	atgcata	67	
35	<210> 116 <211> 60 <212> ADN <213> Artificial		
40	<220> <223> Cebador		
	<400> 116 tggaactggg aacgcttag atgctagaga tactacagag cctgtccgtc caaggtcata	60	
45	<210> 117 <211> 66 <212> ADN <213> Artificial		
50	<220> <223> Cebador		
	<400> 117		
	agggtttttct agagtggaca cggcatttta atattgggta gaaaaatcaa gaatgcattg	60	
55	ctcata	66	

ES 2 736 977 T3

5	<210> 118		
	<211> 63		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
10	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 118		
	ttcgcttcgt tgtaatttcg gactgttaat ottattaagg ttgctcagct ctaagattct	60	
	ata	63	
15	<210> 119		
	<211> 65		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
20	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 119		
	agggtttttct agagtggaca cggcattcat atatttatgc attcctccat tcaaaagatc	60	
25	ttatt	65	
30	<210> 120		
	<211> 64		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
35	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 120		
	aggcatccta agaaatcgct actgtttaag taaaggatac agaggtttat aaaagtttga	60	
	aaac	64	
40	<210> 121		
	<211> 58		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 121		
	agggtttct agagtggaca cggctgtgg caataagatc cctatgactg aagatgcc	58	
50	<210> 122		
	<211> 63		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 122		

ES 2 736 977 T3

	tagccagtg atttatgaca tgcggataaa ccttaataata gaaggaatta gagctgccac	60
	agc	63
5	<210> 123 <211> 59 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador	
	<400> 123 aggttttct agagtggaca cgggagaacc ttgaggcat ccctgctgtt ctgagata	59
15	<210> 124 <211> 58 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador	
	<400> 124 cgctctgggt actattggac gttaaacaatg tgaggcggtc acagaaaggg ttcaggaa	58
25	<210> 125 <211> 69 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador	
35	<220> <221> misc_feature <222> (24)..(24) <223> parte de conjugación	
	<400> 125	
	aggtttttct agagtggaca cggnaccaaa gaatatggct gaatttagta gtgtttttaa	60
40	taatttttaa	69
45	<210> 126 <211> 69 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador	
50	<220> <221> misc_feature <222> (24)..(24) <223> parte de conjugación	
55	<400> 126	
	gcagattcat tggtcagaga acanacctgc taatgagatg atcccttatt ttgaaaacaa	60
	ctatttccta	69

5	<210> 127 <211> 68 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador	
10	<220> <221> misc_feature <222> (24)..(24) <223> parte de conjugación	
15	<400> 127	
	aggtttttct agagtggaca cggnagccta gattcattat tcaaagatat gaaattttta	60
	aatgcata	68
20	<210> 128 <211> 61 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Cebador	
30	<220> <221> misc_feature <222> (24)..(24) <223> n es a, c, g o t	
	<400> 128	
	catctaaagc gttcccagtt ccanctagag atactacaga gcctgtccgt ccaagggtcat	60
35	a	61
40	<210> 129 <211> 67 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador	
45	<220> <221> misc_feature <222> (24)..(24) <223> parte de conjugación	
50	<400> 129	
	aggtttttct agagtggaca cggn catttt aatattgggt agaaaaatca agaatgcatt	60
	gctcata	67
55	<210> 130 <211> 64 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador	

	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (24)..(24)		
5	<223> parte de conjugación		
	<400> 130		
	gtccgaaatt acaacgaagc gaantgttaa tcttattaag gttgctcagc tctaagattc	60	
	tata	64	
10	<210> 131		
	<211> 66		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador		
	<220>		
20	<221> misc_feature		
	<222> (24) .. (24)		
	<223> parte de conjugación		
	<400> 131		
25	aggtttttct agagtggaca cggncattca tatatttatg cattcctcca ttcaaaagat	60	
	cttatt	66	
	<210> 132		
	<211> 65		
30	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
35	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (24)..(24)		
	<223> parte de conjugación		
40	<400> 132		
	agtagcgatt tcttaggatg cctngtttaa gtaaaggata cagaggttta taaaagtttg	60	
	aaaac	65	
45	<210> 133		
	<211> 59		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
50	<220>		
	<223> Cebador		
	<220>		
55	<221> misc_feature		
	<222> (24) .. (24)		
	<223> parte de conjugación		
	<400> 133		

	aggttttttct agagtggaca cggntctgtg gcaataagat ccctatgact gaagatgcc	59
5	<210> 134 <211> 64 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador	
15	<220> <221> misc_feature <222> (24)..(24) <223> parte de conjugación	
	<400> 134	
	gcatgtcata aatcactggg ctanggataa accttaatat agaaggaatt agagctgcc	60
	cagc	64
20	<210> 135 <211> 60 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Cebador	
30	<220> <221> misc_feature <222> (24)..(24) <223> parte de conjugación	
35	<400> 135 aggtttttct agagtggaca cggngagaac cttgaggca tccctgctgt tctcgagata	60
40	<210> 136 <211> 59 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Cebador	
	<220> <221> misc_feature <222> (24)..(24) <223> parte de conjugación	
50	<400> 136 aacgtccaat agtaaccaga gcgnaaacat gtgaggcgtt cacagaaagg gttcaggaa	59

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar un ácido nucleico diana, comprendiendo el método:

una etapa de hibridación en la que uno o dos o más ácidos nucleicos parcialmente bicatenarios asociados a uno o dos o más ácidos nucleicos diana, se ponen en contacto con una o dos o más sondas que están en un soporte de cuerpo en fase sólida y se asocian a los uno o dos o más ácidos nucleicos diana, en condiciones que permitan la hibridación, en donde la etapa de hibridación se realiza mediante cromatografía de ácidos nucleicos; y una etapa de detección en la que se detecta el producto de hibridación producido en la etapa de hibridación, en donde cada uno de los uno o dos o más ácidos nucleicos parcialmente bicatenarios tienen una parte identificadora monocatenaria solo el extremo 5' de una primera cadena, que consta únicamente de ácidos nucleicos naturales y que es una secuencia identificadora capaz de hibridarse específicamente con una de las sondas y que tiene un marcador o una sustancia de unión a un marcador en el extremo 5' de una segunda cadena, antes de la etapa de hibridación, una etapa de amplificación en la que se obtiene ácido nucleico parcialmente bicatenario como un producto de una reacción de amplificación realizada en un ácido nucleico diana utilizando un primer cebador que tiene la secuencia identificadora y una primera secuencia de reconocimiento que reconoce una primera secuencia de bases en el ácido nucleico diana y que tiene un sitio enlazador capaz de inhibir o detener una reacción de ADN polimerasa dispuesto entre la secuencia identificadora y la primera secuencia de reconocimiento, y un segundo cebador que tiene una segunda secuencia de reconocimiento que reconoce una segunda secuencia de bases en el ácido nucleico diana y el marcador o la sustancia que se une a un marcador; en donde el sitio enlazador comprende una cadena de alquileo opcionalmente sustituida con un número de elementos de 2 a 40, adyacente a un nucleótido en el cebador a través de un enlace fosfodiéster; y en donde el sitio enlazador está representado por la siguiente fórmula:



Fórmula (1)

(donde 5' representa el átomo de oxígeno de un enlace fosfodiéster en el extremo 5', 3' representa el átomo de fósforo de un enlace fosfodiéster en el extremo 3', y m es un número entero de 3 a 12).

2. El método según la reivindicación 1, en donde la etapa de hibridación se realiza preparando una solución de hibridación que contiene los uno o dos o más ácidos nucleicos parcialmente bicatenarios junto con un marcador para unirse a la sustancia de unión a un marcador, y poniendo en contacto esta solución de hibridación con al menos una parte del soporte de cuerpo en fase sólida.

3. El método según la reivindicación 1, en donde la etapa de hibridación se realiza poniendo en contacto una solución de hibridación, que comprende una solución de reacción de amplificación que contiene el producto de amplificación de la etapa de amplificación, con una parte del soporte de cuerpo en fase sólida.

4. El método según la reivindicación 1, en donde la etapa de hibridación se realiza poniendo en contacto la solución de hibridación que comprende la solución de reacción de amplificación, que contiene los uno o dos o más ácidos nucleicos parcialmente bicatenarios como productos de amplificación que llevan el marcador unido de antemano con la sustancia de unión a un marcador, con la parte del soporte de cuerpo en fase sólida.

5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4, en donde la etapa de hibridación se realiza preparando un medio de revelado que comprende una solución de reacción de amplificación que contiene el producto de amplificación de la etapa de amplificación, junto con un marcador para unirse a la sustancia de unión a un marcador, y poniendo en contacto este medio de revelado con al menos una parte del soporte de cuerpo en fase sólida.

6. El método según la reivindicación 5, en donde la etapa de amplificación se realiza en una cavidad, el medio de revelado se prepara suministrando al menos el marcador a la cavidad que contiene la solución de reacción de amplificación, y el medio de revelado se pone en contacto en la cavidad con parte del soporte de cuerpo en fase sólida.

7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la sustancia de unión a un marcador es una o dos o más sustancias seleccionadas del grupo que, en las reacciones de antígeno-anticuerpo, consta de anticuerpos, biotina, digoxigenina y FITC y de otros haptenos, y el marcador está provisto de un sitio capaz de unirse a la sustancia de unión a un marcador, y es un marcador que utiliza uno o dos o más seleccionados de fluorescencia, radioactividad, enzimas, fosforescencia, luminiscencia química y tinción.

8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el segundo cebador tiene un sitio enlazador dispuesto entre la región de unión a un marcador y la segunda secuencia de reconocimiento.

9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el sitio enlazador no contiene bases naturales o derivados de bases naturales que se emparejen con bases naturales.

10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la etapa de amplificación es una etapa de realización de una amplificación de ácido nucleico que utiliza múltiples conjuntos de cebadores, formado cada uno de ellos por el primer cebador y el segundo cebador, para permitir la

detección por una pluralidad de sondas de detección previamente asociadas a una pluralidad de ácidos nucleicos diana,

la etapa de hibridación es una etapa de poner en contacto una pluralidad del fragmento de amplificación obtenido en la etapa de amplificación con la pluralidad de sondas de detección para permitir la hibridación, y

la etapa de detección es una etapa de detección de productos de hibridación entre la pluralidad de fragmentos de amplificación y la pluralidad de sondas de detección en el soporte del cuerpo en fase sólida.

11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la secuencia específica de la sonda de detección se selecciona de las secuencias de bases representadas por las SEC ID NO: 1 a 100 y secuencias complementarias de las mismas.

12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la secuencia específica de la sonda de detección se selecciona de las secuencias de bases representadas por las SEC ID NO de la siguiente **tabla** y secuencias complementarias de las mismas.

[Tabla 27]

Nombre	Sec(5→3')	SEQ.ID.
D1-001	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC	1
D1-002	TGGAACCTGGGAACGCTTTAGATG	2
D1-003	TTCGCTTCGTTGTAATTTCCGAC	3
D1-005	TAGCCCAGTGATTTATGACATGC	5
D1-006	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT	6
D1-010	GAGTAGCAGGCAAATACCCTAGA	10
D1-012	AGTCATACAGTGAGGACCAAATG	12
D1-014	TGCTCACTTACATTACGTCCATG	14
D1-016	AGGTCCGGTAGTAATTTAGGTGC	16
D1-020	TATTCTACCAACGACATCACTGC	20
D1-023	CATCTCCAAGAATTGACCCACCA	23
D1-025	GAAGGATCGCTTTTATCTGGCAT	25
D1-026	CATTTGTCAGGTACAGTCCACTT	26
D1-027	GCCCACACTCTTACTTATCGACT	27
D1-030	CCGTCTGGGTTAAAGATTGCTAG	30
D1-035	ATGCCGTTGTCAAGAGTTATGGT	35
D1-038	CGCGACATTTAGTCCAGGAGATG	38
D1-040	AGACAATTAGAATCAGTGCCCCCT	40
D1-041	GCATTGAGGTATTGTTGCTCCCA	41
D1-044	GAGTCCGCAAAAATATAGGAGGC	44
D1-045	GCCTCACATAACTGGAGAAACCT	45
D1-050	GGGATAGGTATTATGCTCCAGCC	50
D1-052	GCCTATATGAACCAAGCCACTGC	52
D1-062	CTAGCACAAATTAATCAATCCGCC	62
D1-064	GCCTATAGTGTCGATTGTCCTCG	64
D1-065	CGATCACGGATTAATGTCACCCC	65
D1-077	CGCAGTTTGCAAGAACGAACAAA	77
D1-084	CCGTGTGTATGAGTATGACAGCA	84
D1-089	GAGTCGAAGACCTCCTCCTACTC	89
D1-090	ATGCCAATATGTACTCGTGACTC	90
D1-095	TGCCGGTTATACCTTTAAGGACG	95
D1-097	CGCGGTACTATTAGAAAGGGCTA	97
D1-100	TGCAGTGTAAGCAACTATTGTCT	100

13. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la etapa de hibridación es una etapa de suministro de un líquido que contiene el fragmento amplificado como fase móvil en un cuerpo en fase sólida que contiene una pluralidad de la sonda de detección, y de expansión de la fase móvil en el cuerpo en fase sólida.

14. Un kit de amplificación de ácido nucleico, que contiene un primer cebador de amplificación de ácido nucleico que tiene una secuencia identificadora monocatenaria solo en el extremo 5' que consta únicamente de ácidos nucleicos

naturales, una primera secuencia de reconocimiento que reconoce una primera secuencia de bases en un ácido nucleico diana, y un sitio enlazador capaz de inhibir o detener una reacción de ADN polimerasa dispuesto entre la secuencia identificadora y la primera secuencia de reconocimiento, en donde el sitio enlazador comprende una cadena de alquileo opcionalmente sustituida con un número de elementos de 2 a 40, adyacente a un nucleótido en el cebador a través de un enlace fosfodiéster, y en donde el sitio enlazador está representado por la siguiente fórmula:



Fórmula (1)

(donde 5' representa el átomo de oxígeno de un enlace fosfodiéster en el extremo 5', 3' representa el átomo de fósforo de un enlace fosfodiéster en el extremo 3' y m es un número entero de 3 a 12); y un segundo cebador de amplificación de ácido nucleico que tiene una segunda secuencia de reconocimiento que reconoce una segunda secuencia de bases en un ácido nucleico diana y un marcador o una sustancia de unión a un marcador en el extremo 5'.

15. Una composición para la hibridación de sondas, que comprende un fragmento de ADN bicatenario que tiene una parte identificadora monocatenaria en el lado 5' de una primera cadena, que consta únicamente de ácidos nucleicos naturales y que es una secuencia identificadora capaz de hibridarse específicamente con la sonda, una parte bicatenaria formada por emparejamiento de bases, y un marcador o una sustancia de unión a un marcador en el extremo 5' de la segunda cadena, teniendo la primera cadena un sitio enlazador capaz de inhibir o detener una reacción de ADN polimerasa dispuesto entre la secuencia identificadora y la parte bicatenaria; en donde el sitio enlazador comprende una cadena de alquileo opcionalmente sustituida con un número de elementos de 2 a 40, adyacente a un nucleótido en el cebador a través de un enlace fosfodiéster; y en donde el sitio enlazador está representado por la siguiente fórmula:



Fórmula (1)

(donde 5' representa el átomo de oxígeno de un enlace fosfodiéster en el extremo 5', 3' representa el átomo de fósforo de un enlace fosfodiéster en el extremo 3', y m es un número entero de 3 a 12).

16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde m es de 3 a 6.

17. El método según la reivindicación 16 en donde m es 3.

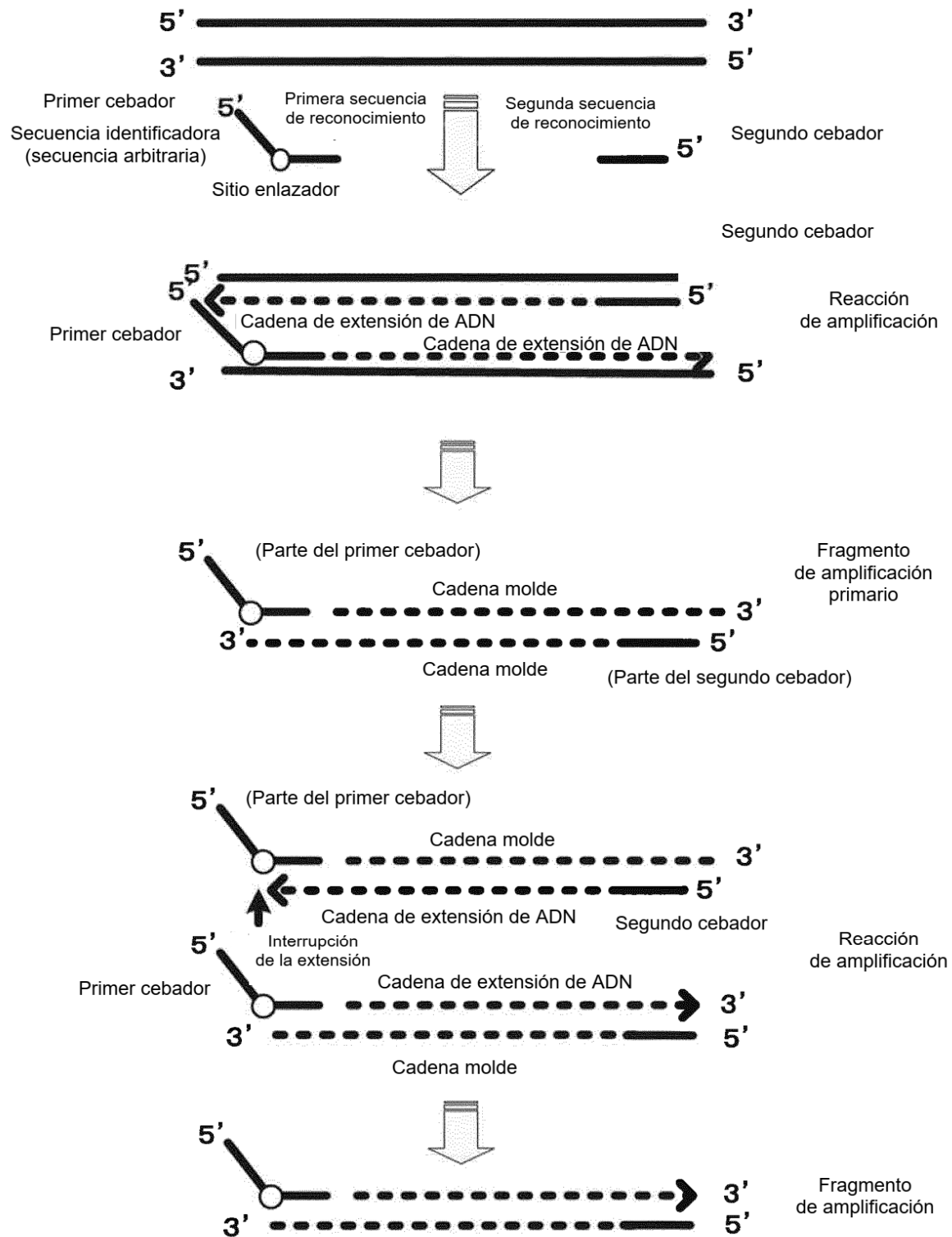


Fig.1A

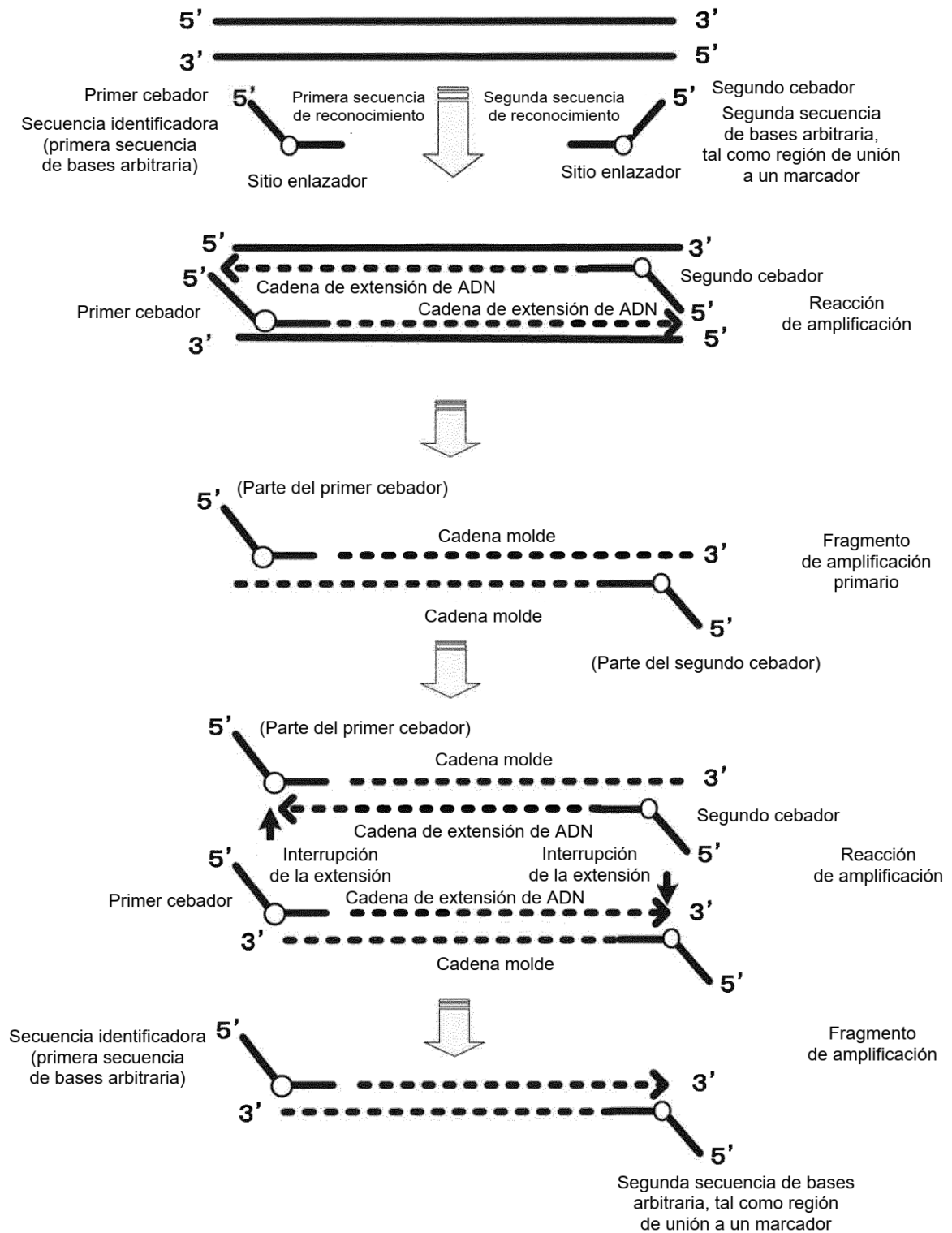


Fig.1B

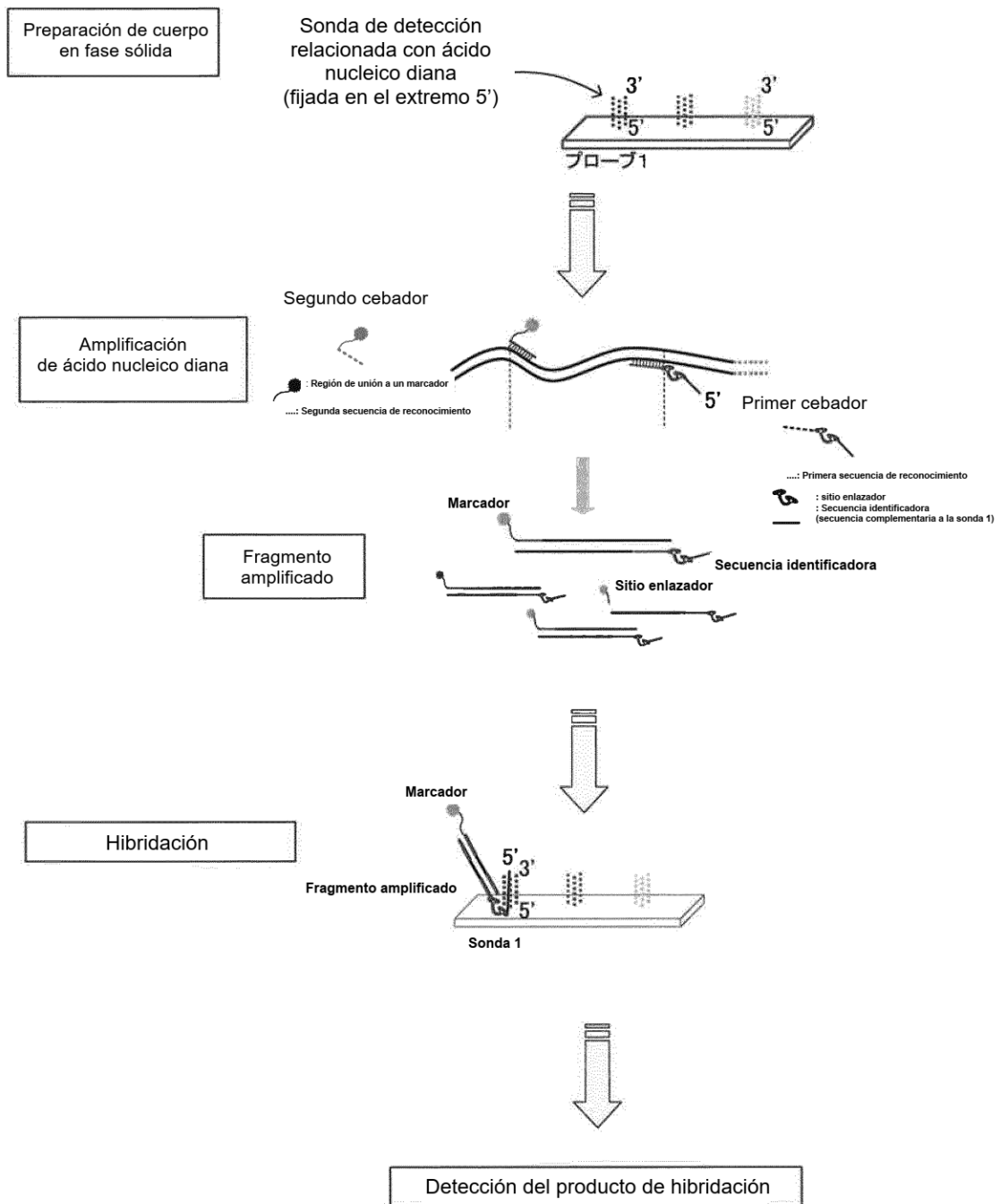


Fig.2A

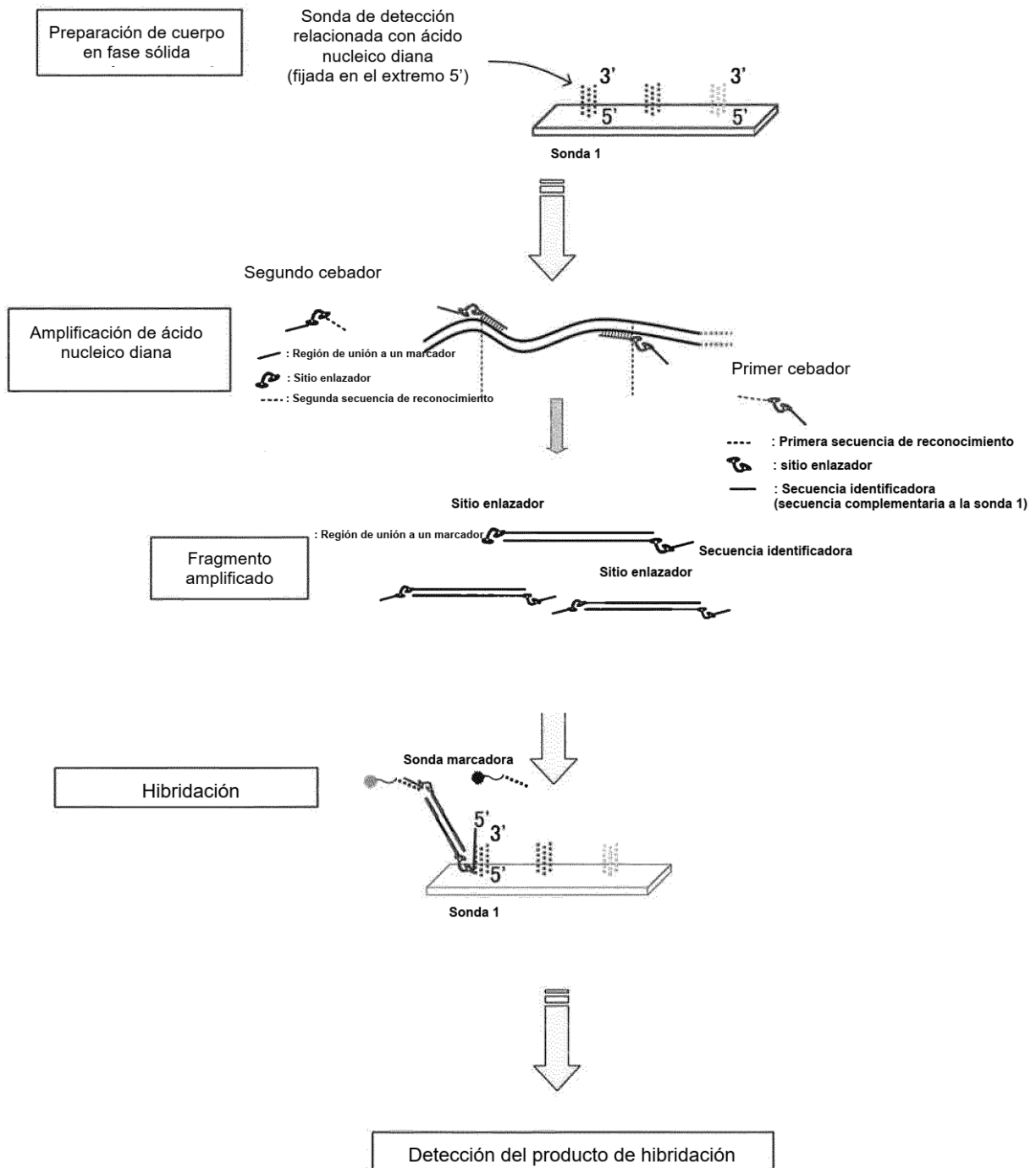


Fig.2B

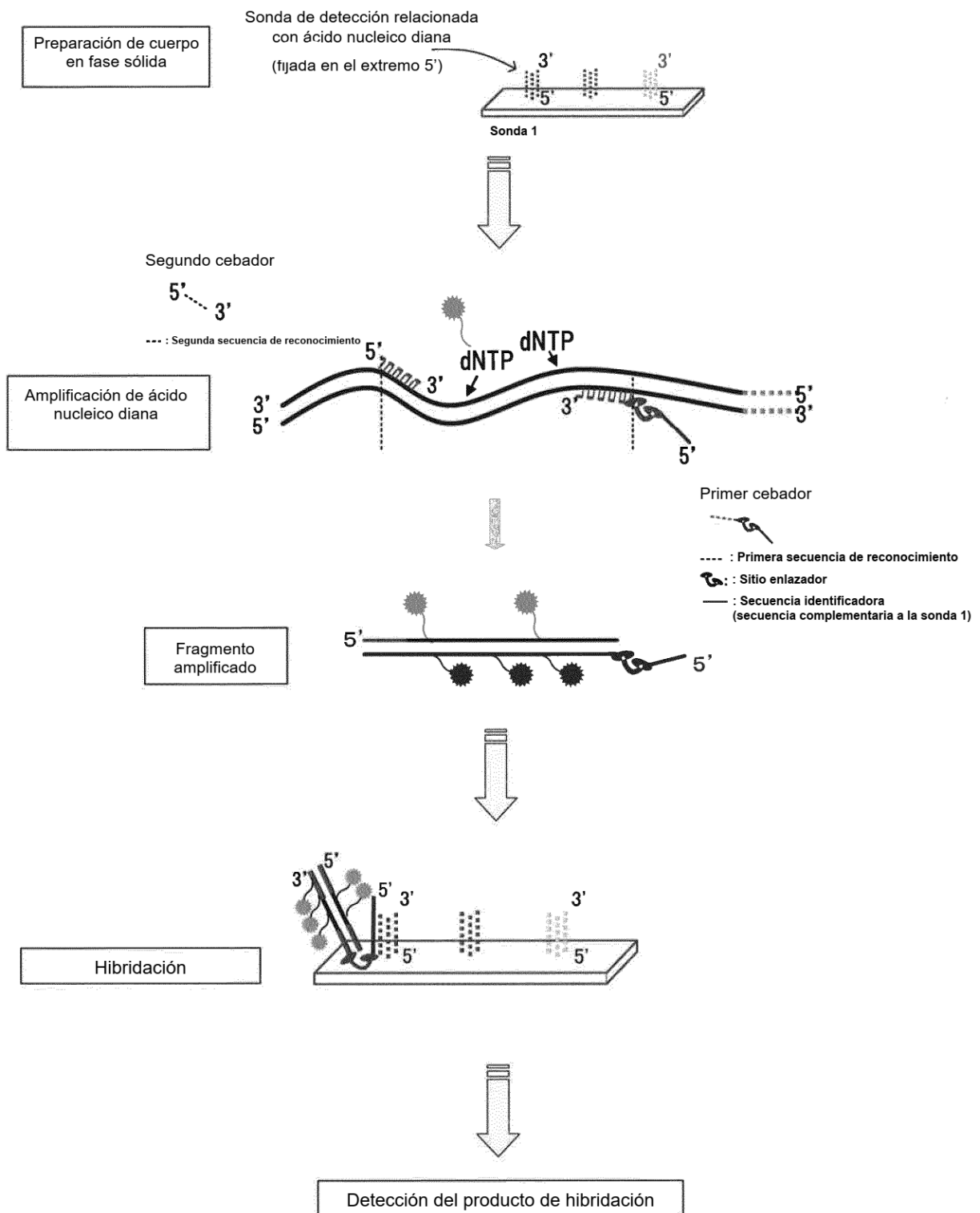


Fig.2C

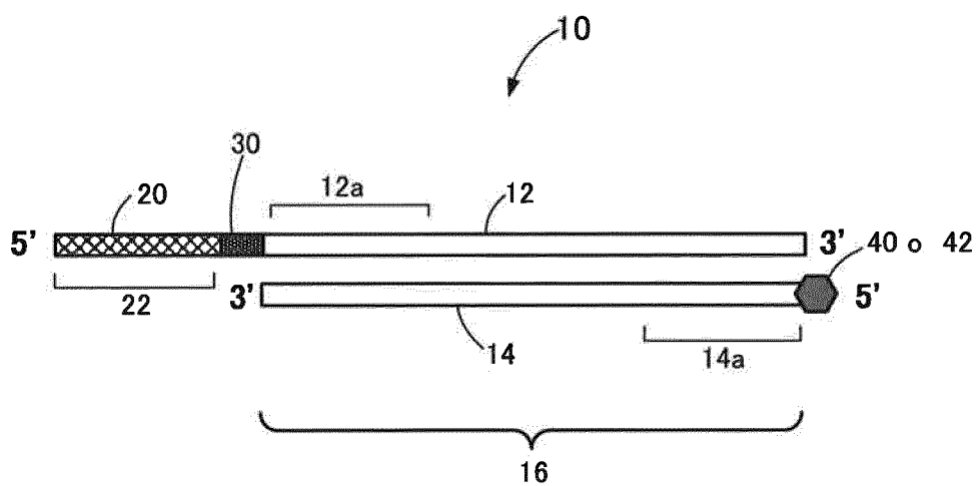


Fig.3

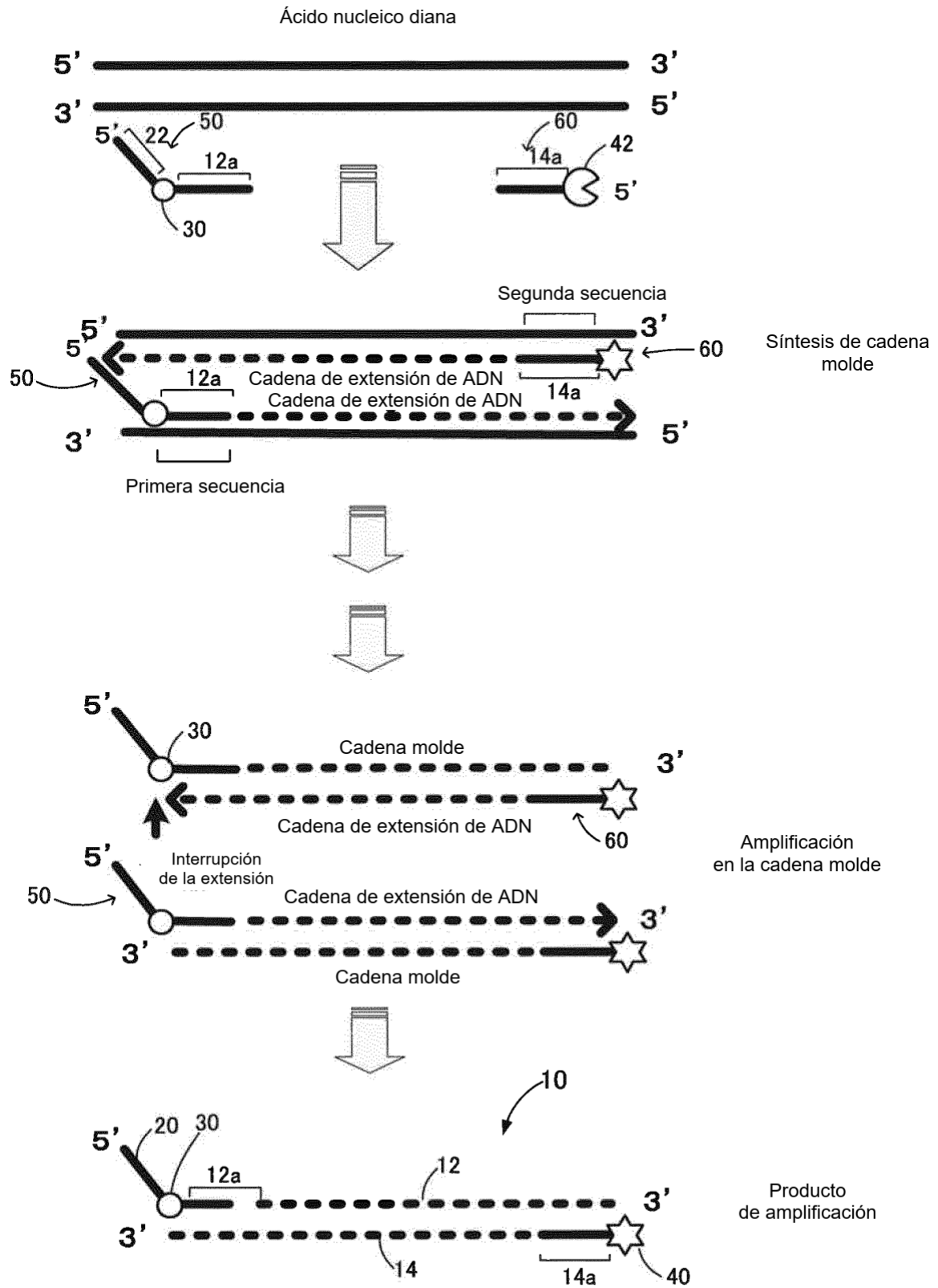


Fig.4

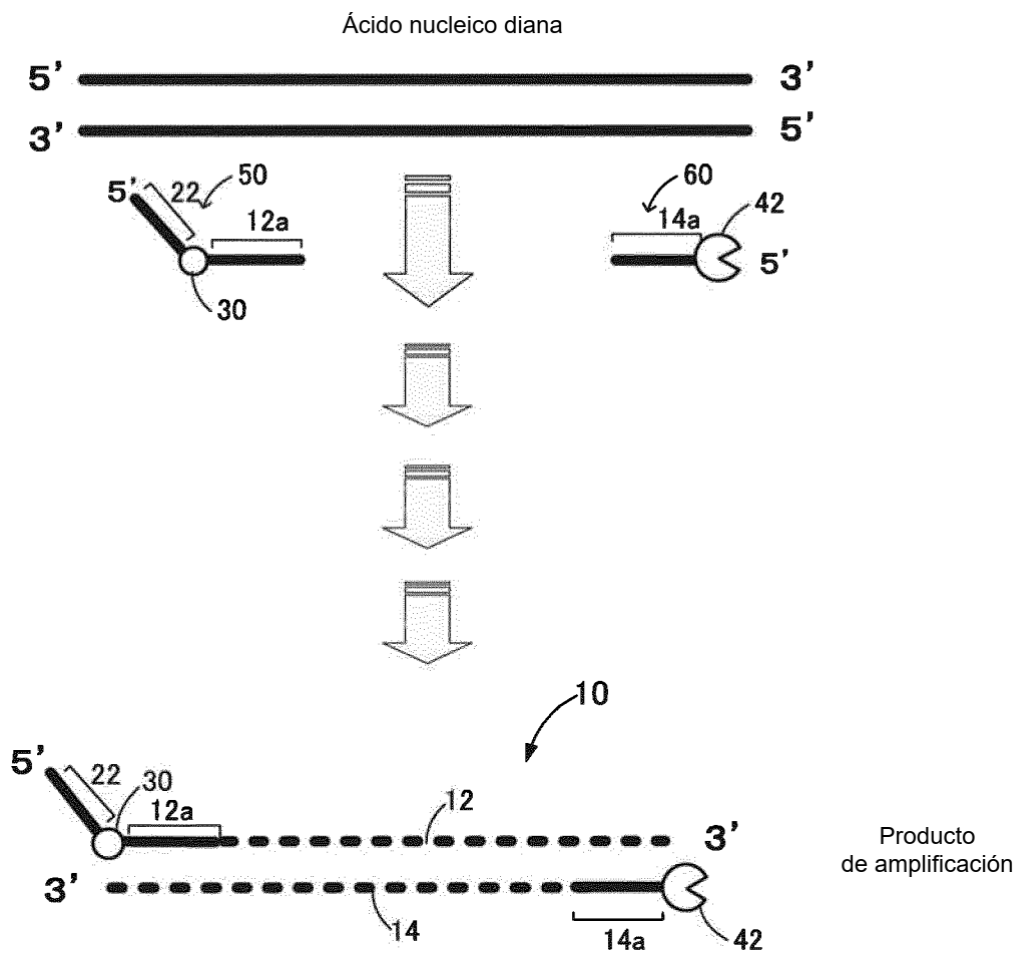


Fig.5

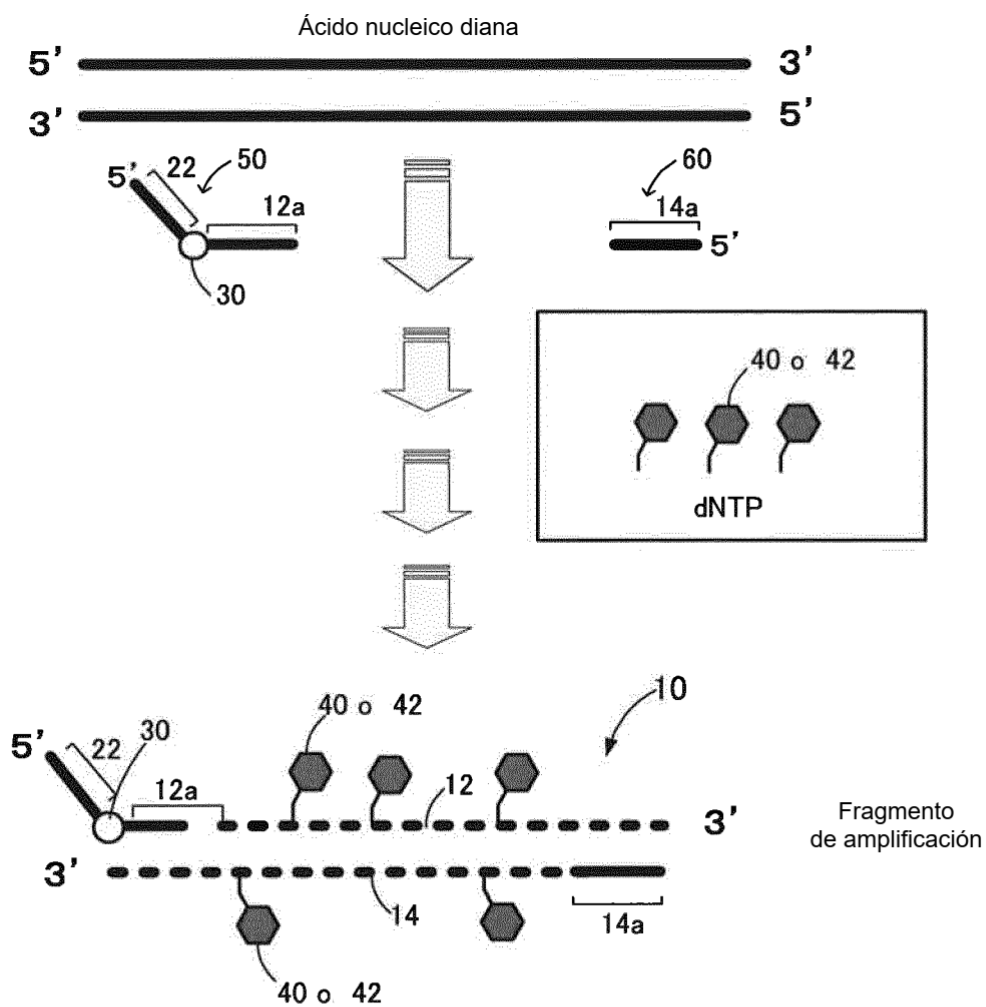


Fig.6

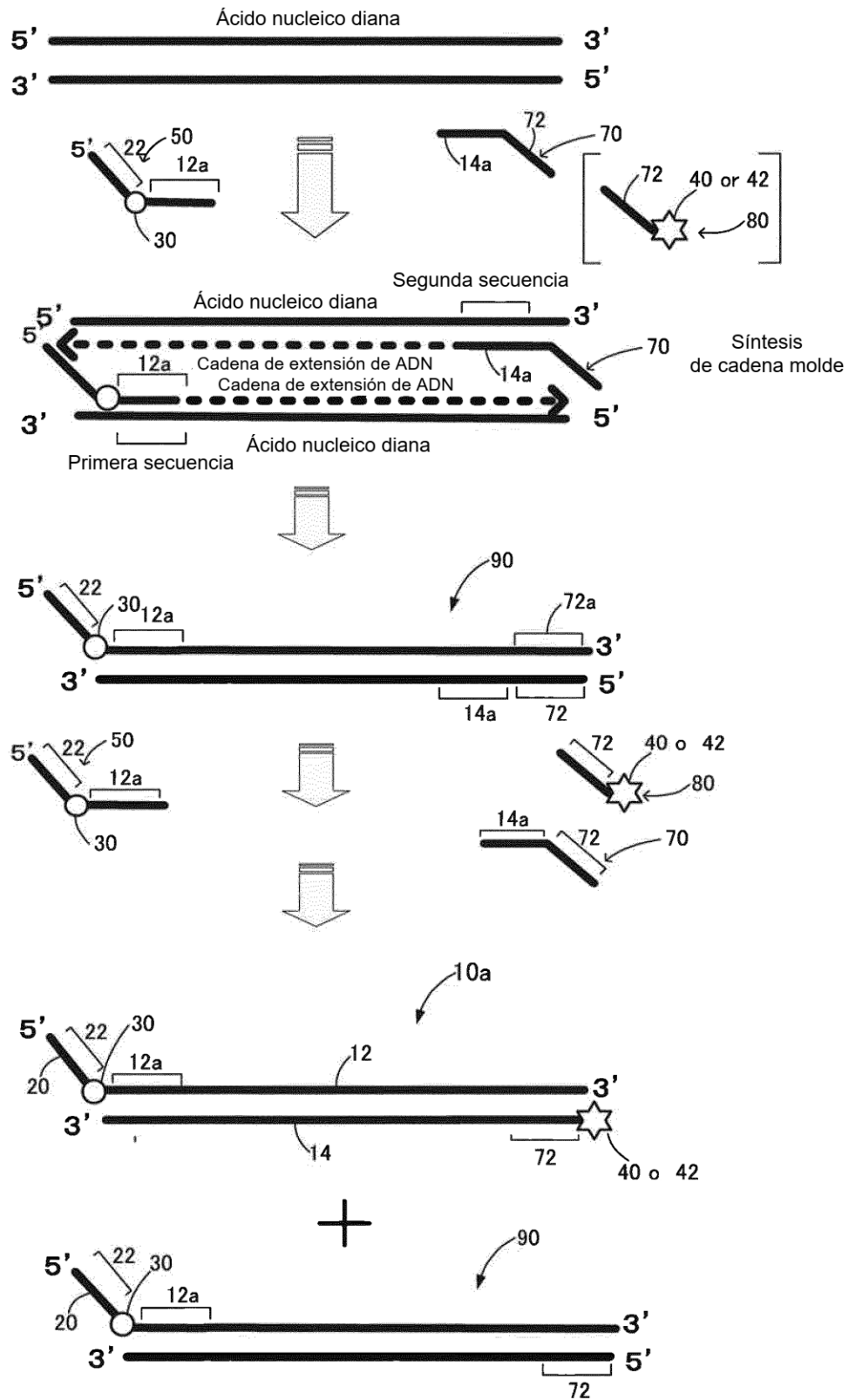


Fig.7

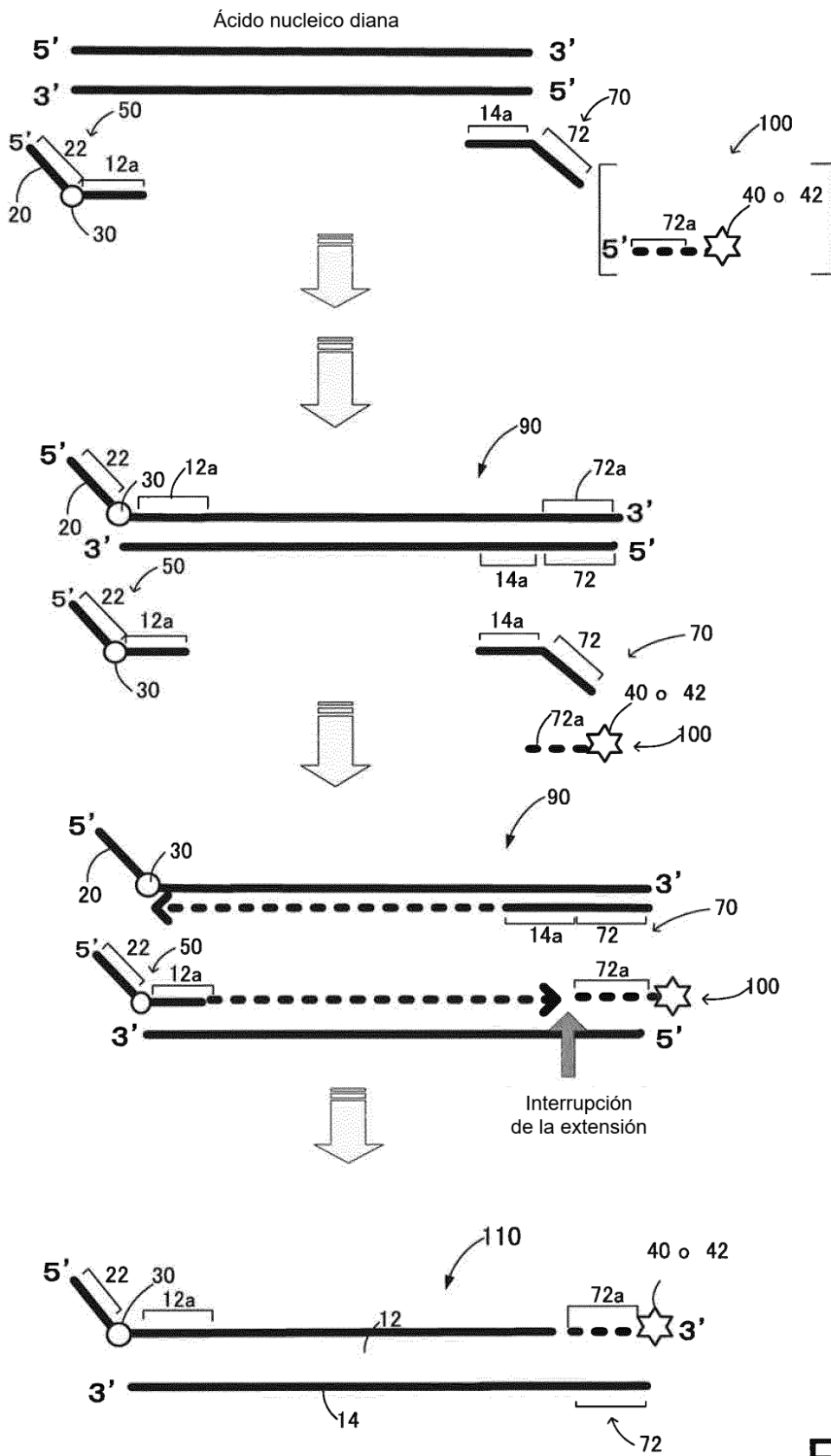


Fig.8

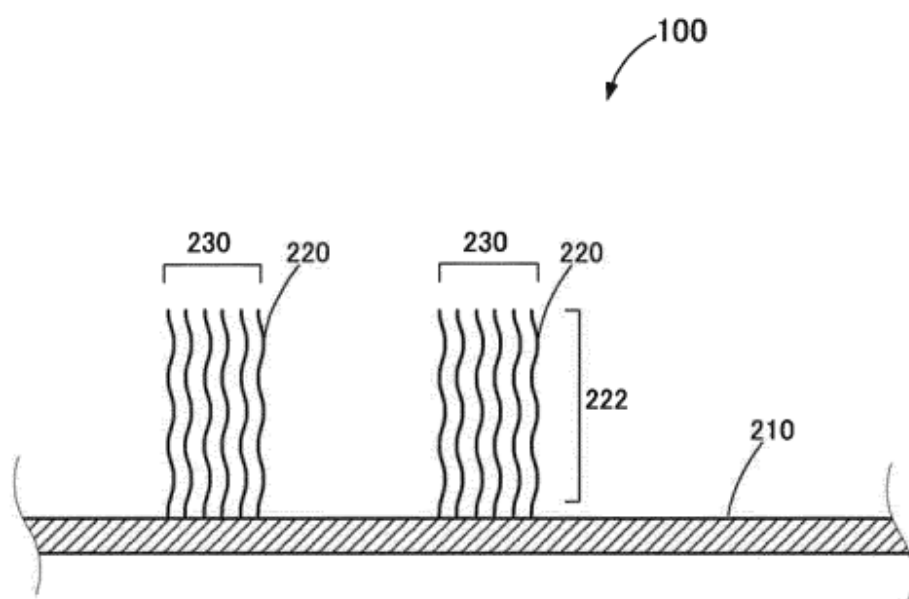


Fig.9

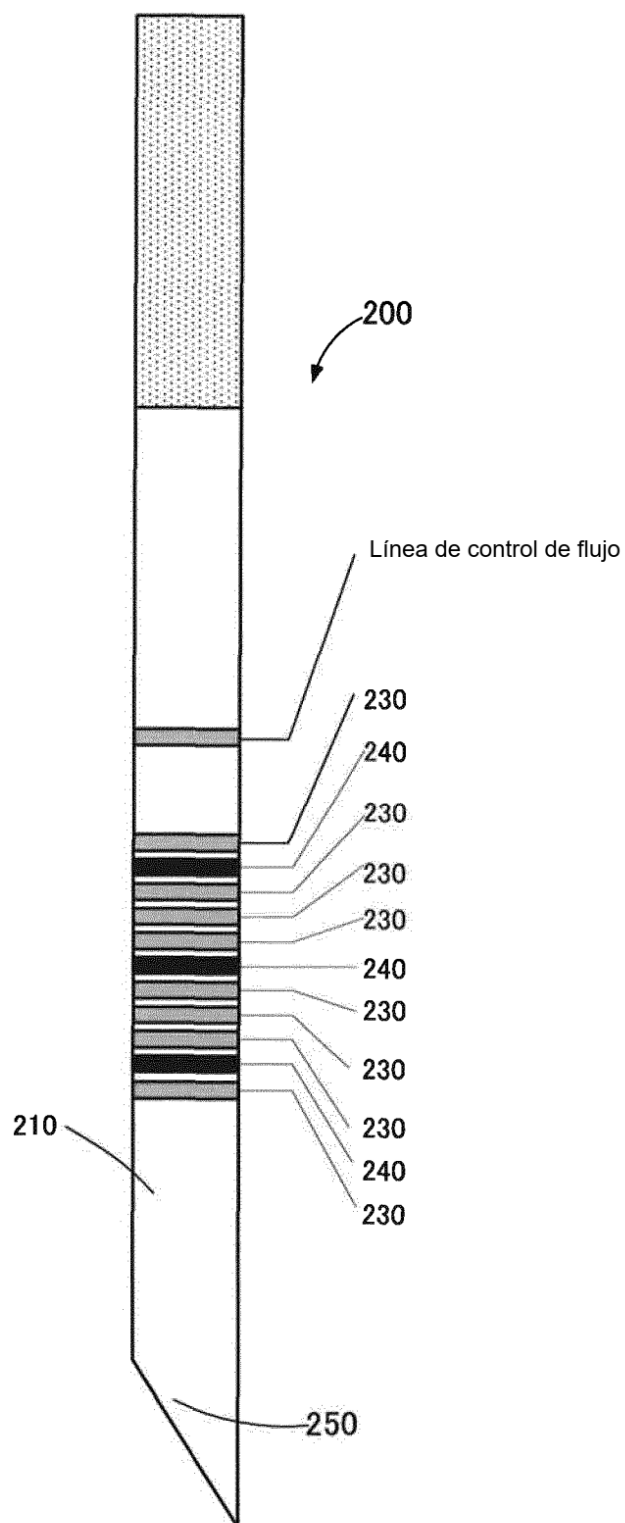


Fig.10

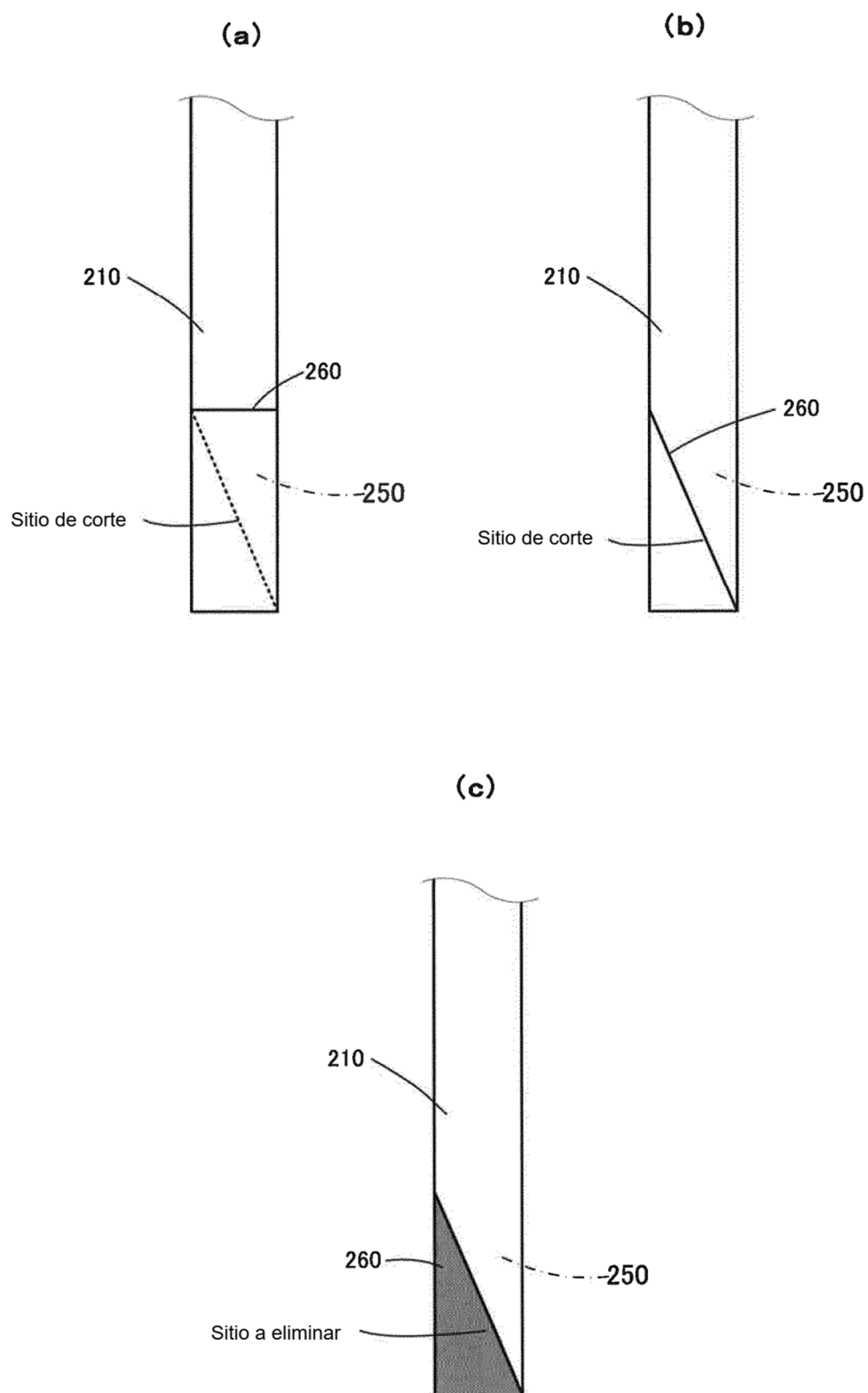
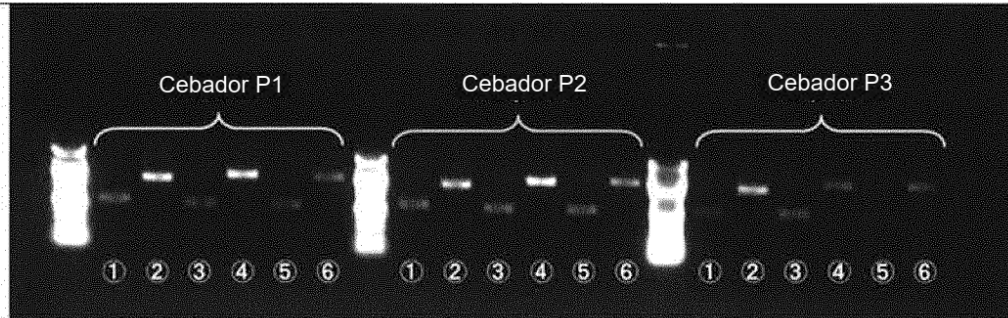


Fig.11

Evaluación del método habitual de unión de una etiqueta a un cebador

Imagen de electroforesis después de amplificación por PCR/purificación en columna



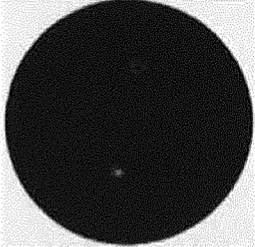
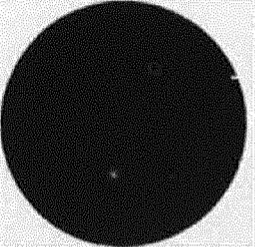
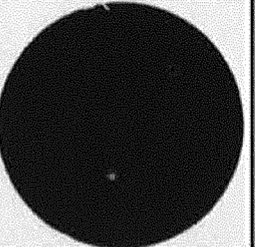
Cantidad de amplificación después de la PCR/purificación en columna (la amplificación comenzó con 25 ng/reacción)

n.º		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
cebador		(SNP01)	(SNP03)	(SNP07)	(SNP08)	(SNP09)	(SNP20)
Sin secuencia identificadora: P1		253	308	134	239	162	219
Con secuencia identificadora	P2	156	205	163	266	134	161
	P3	124	209	178	144	140	104

(Unidad: ng)

Fig.12

Evaluación del método habitual de unión de una etiqueta a un cebador

Etiqueta/método		Con secuencia identificadora/enlazamiento directo		
cebador		(1) + etiqueta01	(2) + etiqueta02	(3) + etiqueta03
Resultado				

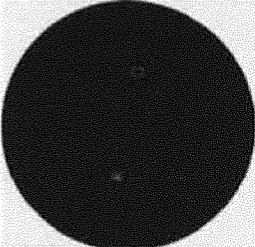
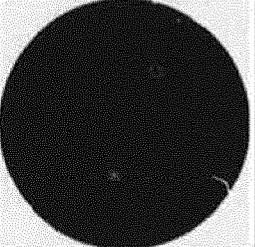
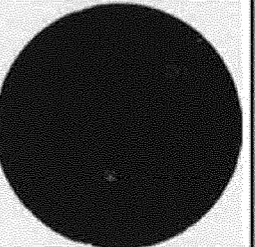
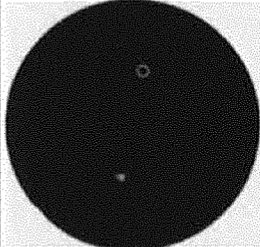
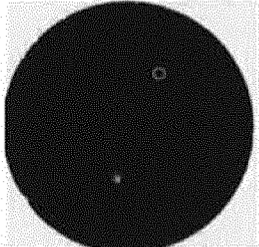
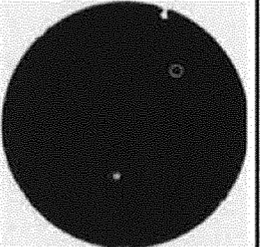
Etiqueta/método		Con secuencia identificadora/enlazamiento mediante sitio enlazador C3		
cebador		(1)+C3 + etiqueta01	(2)+C3 + etiqueta02	(3)+C3 + etiqueta03
Resultado				

Fig.13

Evaluación del método habitual de unión de una etiqueta a un cebador

Etiqueta/método	Con secuencia identificadora/enlazamiento directo		
cebador	(4) + etiqueta04	(5) + etiqueta05	(6) + etiqueta06
Resultado			

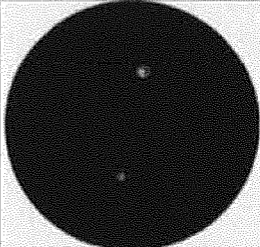
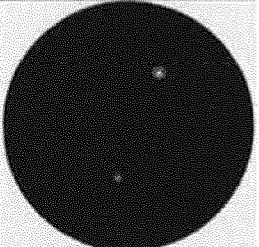
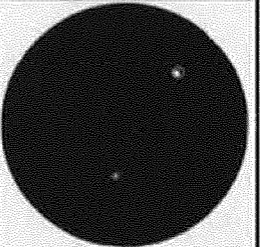
Etiqueta/método	Con secuencia identificadora/enlazamiento mediante sitio enlazador C3		
cebador	(4)+C3 + etiqueta04	(5)+C3 + etiqueta05	(6)+C3 + etiqueta06
Resultado			

Fig.14

D1-100	Muestra 1	Marcador	Muestra 2	D1-100
D1-001	D1-002	D1-003	D1-005	D1-006
D1-009	D1-010	D1-011	D1-012	D1-014
D1-015	D1-016	D1-020	D1-023	D1-025
D1-026	D1-027	D1-030	D1-032	D1-035
D1-037	D1-038	D1-040	D1-041	D1-044
D1-045	D1-049	D1-050	D1-051	D1-052
D1-053	D1-062	D1-064	D1-065	D1-077
D1-079	D1-081	D1-084	D1-089	D1-090
D1-100	D1-094	D1-095	D1-097	D1-100

Fig.15

Método existente resultados	Nuevo método resultados	Sitio de tinción esperado																																																																								
P2-1 producto	P3-1 producto	<table><tr><th>S1</th><th>M</th><th>S2</th></tr><tr><td>D1-000</td><td></td><td>D1-100</td></tr><tr><td>D1-001</td><td>D1-002</td><td>D1-003</td></tr><tr><td>D1-004</td><td>D1-005</td><td>D1-006</td></tr><tr><td>D1-009</td><td>D1-010</td><td>D1-011</td></tr><tr><td>D1-012</td><td>D1-013</td><td>D1-014</td></tr><tr><td>D1-016</td><td>D1-017</td><td>D1-018</td></tr><tr><td>D1-020</td><td>D1-021</td><td>D1-022</td></tr><tr><td>D1-025</td><td>D1-026</td><td>D1-027</td></tr><tr><td>D1-030</td><td>D1-031</td><td>D1-032</td></tr><tr><td>D1-035</td><td>D1-036</td><td>D1-037</td></tr><tr><td>D1-040</td><td>D1-041</td><td>D1-042</td></tr><tr><td>D1-045</td><td>D1-046</td><td>D1-047</td></tr><tr><td>D1-050</td><td>D1-051</td><td>D1-052</td></tr><tr><td>D1-055</td><td>D1-056</td><td>D1-057</td></tr><tr><td>D1-060</td><td>D1-061</td><td>D1-062</td></tr><tr><td>D1-065</td><td>D1-066</td><td>D1-067</td></tr><tr><td>D1-070</td><td>D1-071</td><td>D1-072</td></tr><tr><td>D1-075</td><td>D1-076</td><td>D1-077</td></tr><tr><td>D1-080</td><td>D1-081</td><td>D1-082</td></tr><tr><td>D1-085</td><td>D1-086</td><td>D1-087</td></tr><tr><td>D1-090</td><td>D1-091</td><td>D1-092</td></tr><tr><td>D1-095</td><td>D1-096</td><td>D1-097</td></tr><tr><td>D1-100</td><td>D1-101</td><td>D1-102</td></tr></table>	S1	M	S2	D1-000		D1-100	D1-001	D1-002	D1-003	D1-004	D1-005	D1-006	D1-009	D1-010	D1-011	D1-012	D1-013	D1-014	D1-016	D1-017	D1-018	D1-020	D1-021	D1-022	D1-025	D1-026	D1-027	D1-030	D1-031	D1-032	D1-035	D1-036	D1-037	D1-040	D1-041	D1-042	D1-045	D1-046	D1-047	D1-050	D1-051	D1-052	D1-055	D1-056	D1-057	D1-060	D1-061	D1-062	D1-065	D1-066	D1-067	D1-070	D1-071	D1-072	D1-075	D1-076	D1-077	D1-080	D1-081	D1-082	D1-085	D1-086	D1-087	D1-090	D1-091	D1-092	D1-095	D1-096	D1-097	D1-100	D1-101	D1-102
S1	M	S2																																																																								
D1-000		D1-100																																																																								
D1-001	D1-002	D1-003																																																																								
D1-004	D1-005	D1-006																																																																								
D1-009	D1-010	D1-011																																																																								
D1-012	D1-013	D1-014																																																																								
D1-016	D1-017	D1-018																																																																								
D1-020	D1-021	D1-022																																																																								
D1-025	D1-026	D1-027																																																																								
D1-030	D1-031	D1-032																																																																								
D1-035	D1-036	D1-037																																																																								
D1-040	D1-041	D1-042																																																																								
D1-045	D1-046	D1-047																																																																								
D1-050	D1-051	D1-052																																																																								
D1-055	D1-056	D1-057																																																																								
D1-060	D1-061	D1-062																																																																								
D1-065	D1-066	D1-067																																																																								
D1-070	D1-071	D1-072																																																																								
D1-075	D1-076	D1-077																																																																								
D1-080	D1-081	D1-082																																																																								
D1-085	D1-086	D1-087																																																																								
D1-090	D1-091	D1-092																																																																								
D1-095	D1-096	D1-097																																																																								
D1-100	D1-101	D1-102																																																																								
P2-2 producto	P3-2 producto	<table><tr><th>S1</th><th>M</th><th>S2</th></tr><tr><td>D1-100</td><td></td><td>D1-100</td></tr><tr><td>D1-001</td><td>D1-002</td><td>D1-003</td></tr><tr><td>D1-004</td><td>D1-005</td><td>D1-006</td></tr><tr><td>D1-009</td><td>D1-010</td><td>D1-011</td></tr><tr><td>D1-012</td><td>D1-013</td><td>D1-014</td></tr><tr><td>D1-016</td><td>D1-017</td><td>D1-018</td></tr><tr><td>D1-020</td><td>D1-021</td><td>D1-022</td></tr><tr><td>D1-025</td><td>D1-026</td><td>D1-027</td></tr><tr><td>D1-030</td><td>D1-031</td><td>D1-032</td></tr><tr><td>D1-035</td><td>D1-036</td><td>D1-037</td></tr><tr><td>D1-040</td><td>D1-041</td><td>D1-042</td></tr><tr><td>D1-045</td><td>D1-046</td><td>D1-047</td></tr><tr><td>D1-050</td><td>D1-051</td><td>D1-052</td></tr><tr><td>D1-055</td><td>D1-056</td><td>D1-057</td></tr><tr><td>D1-060</td><td>D1-061</td><td>D1-062</td></tr><tr><td>D1-065</td><td>D1-066</td><td>D1-067</td></tr><tr><td>D1-070</td><td>D1-071</td><td>D1-072</td></tr><tr><td>D1-075</td><td>D1-076</td><td>D1-077</td></tr><tr><td>D1-080</td><td>D1-081</td><td>D1-082</td></tr><tr><td>D1-085</td><td>D1-086</td><td>D1-087</td></tr><tr><td>D1-090</td><td>D1-091</td><td>D1-092</td></tr><tr><td>D1-095</td><td>D1-096</td><td>D1-097</td></tr><tr><td>D1-100</td><td>D1-101</td><td>D1-102</td></tr></table>	S1	M	S2	D1-100		D1-100	D1-001	D1-002	D1-003	D1-004	D1-005	D1-006	D1-009	D1-010	D1-011	D1-012	D1-013	D1-014	D1-016	D1-017	D1-018	D1-020	D1-021	D1-022	D1-025	D1-026	D1-027	D1-030	D1-031	D1-032	D1-035	D1-036	D1-037	D1-040	D1-041	D1-042	D1-045	D1-046	D1-047	D1-050	D1-051	D1-052	D1-055	D1-056	D1-057	D1-060	D1-061	D1-062	D1-065	D1-066	D1-067	D1-070	D1-071	D1-072	D1-075	D1-076	D1-077	D1-080	D1-081	D1-082	D1-085	D1-086	D1-087	D1-090	D1-091	D1-092	D1-095	D1-096	D1-097	D1-100	D1-101	D1-102
S1	M	S2																																																																								
D1-100		D1-100																																																																								
D1-001	D1-002	D1-003																																																																								
D1-004	D1-005	D1-006																																																																								
D1-009	D1-010	D1-011																																																																								
D1-012	D1-013	D1-014																																																																								
D1-016	D1-017	D1-018																																																																								
D1-020	D1-021	D1-022																																																																								
D1-025	D1-026	D1-027																																																																								
D1-030	D1-031	D1-032																																																																								
D1-035	D1-036	D1-037																																																																								
D1-040	D1-041	D1-042																																																																								
D1-045	D1-046	D1-047																																																																								
D1-050	D1-051	D1-052																																																																								
D1-055	D1-056	D1-057																																																																								
D1-060	D1-061	D1-062																																																																								
D1-065	D1-066	D1-067																																																																								
D1-070	D1-071	D1-072																																																																								
D1-075	D1-076	D1-077																																																																								
D1-080	D1-081	D1-082																																																																								
D1-085	D1-086	D1-087																																																																								
D1-090	D1-091	D1-092																																																																								
D1-095	D1-096	D1-097																																																																								
D1-100	D1-101	D1-102																																																																								

Fig.16

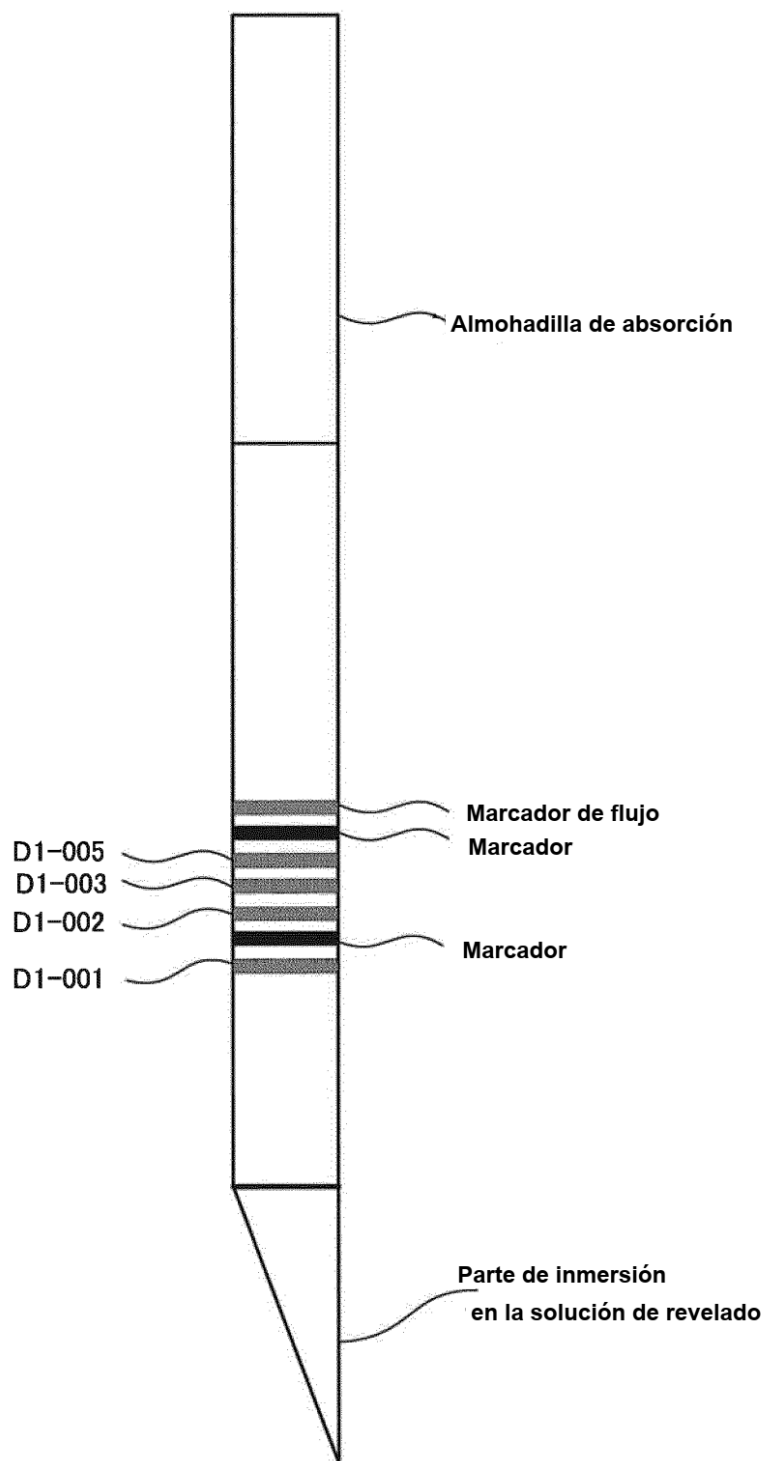


Fig.17

Método existente Resultados	Nuevo método Resultados	Sito de tinción esperado
Fragmento 2-① 	Fragmento 3-① 	 Sitio de tinción (control) Sitio de tinción (esperado) Marcador de línea de corte
Fragmento 2-② 	Fragmento 3-② 	 Sitio de tinción (control) Sitio de tinción (esperado) Marcador de línea de corte

Fig.18

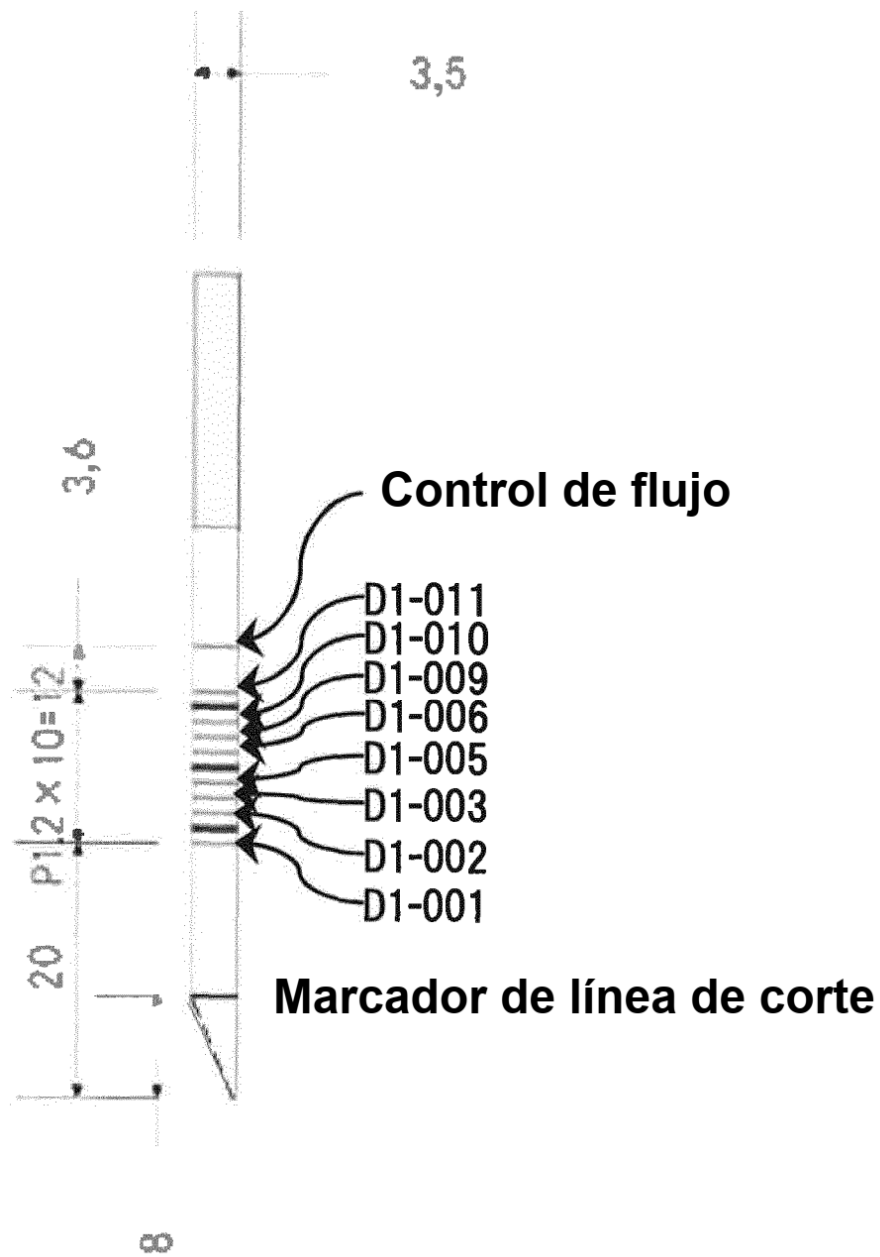


Fig.19

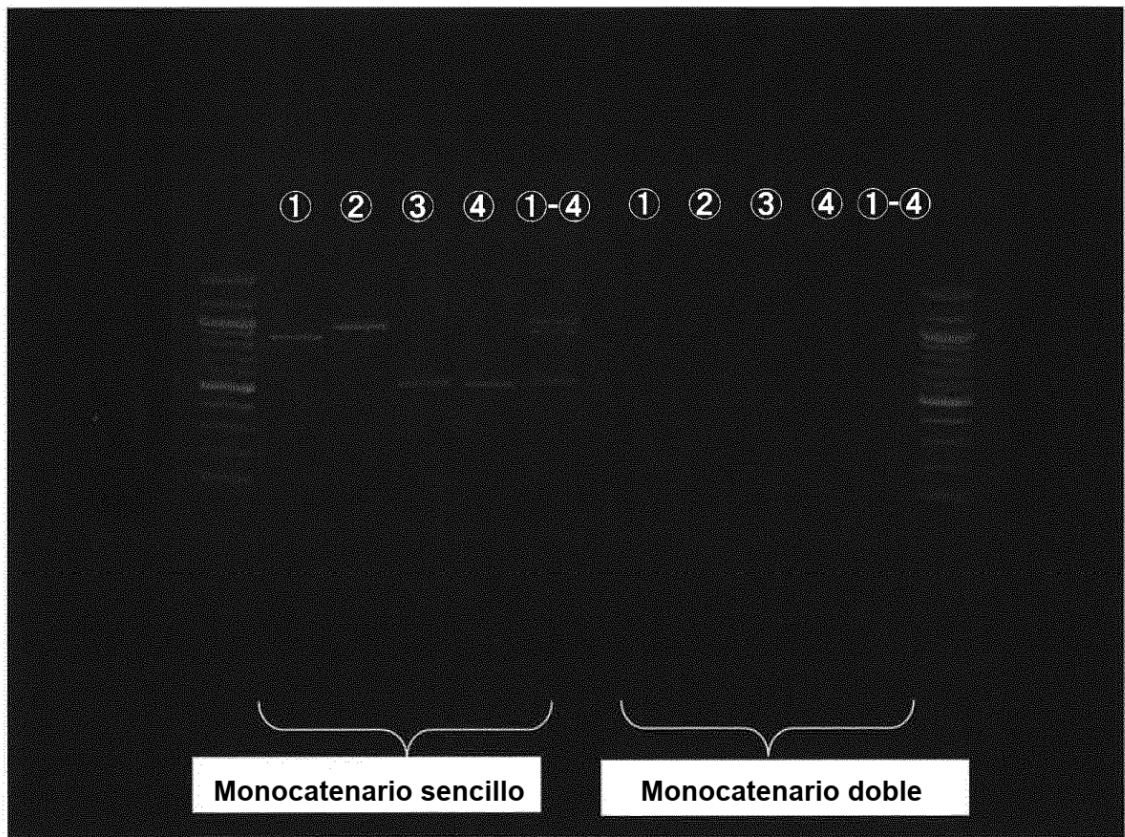


Fig.20

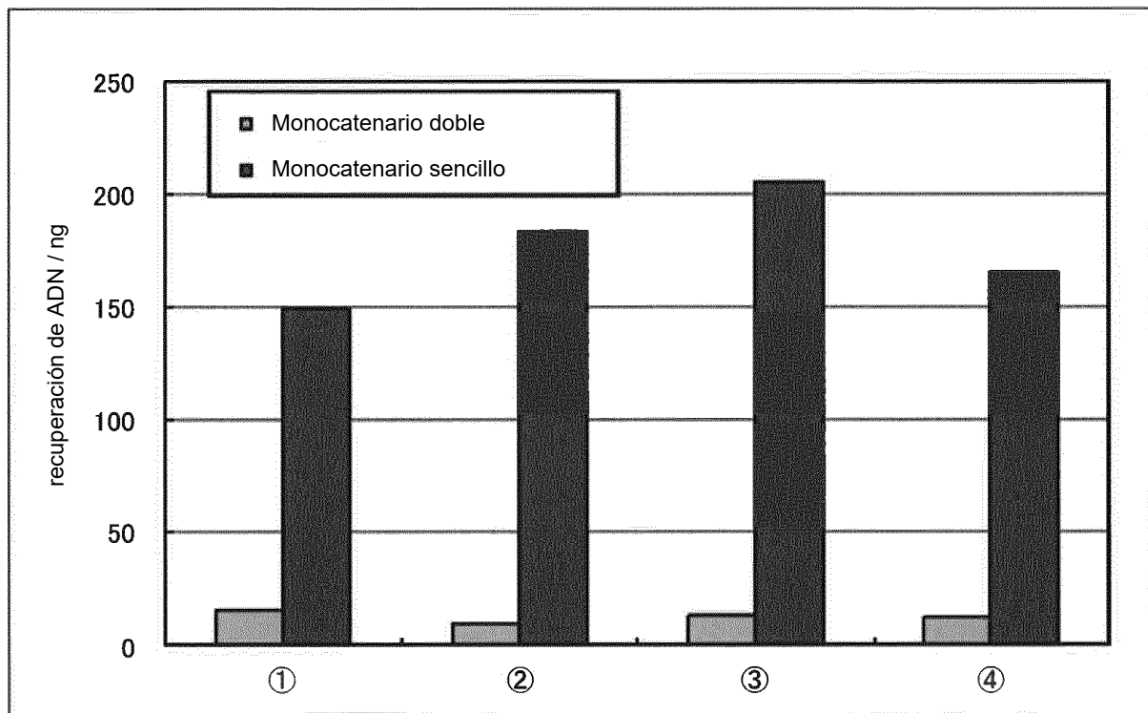


Fig.21

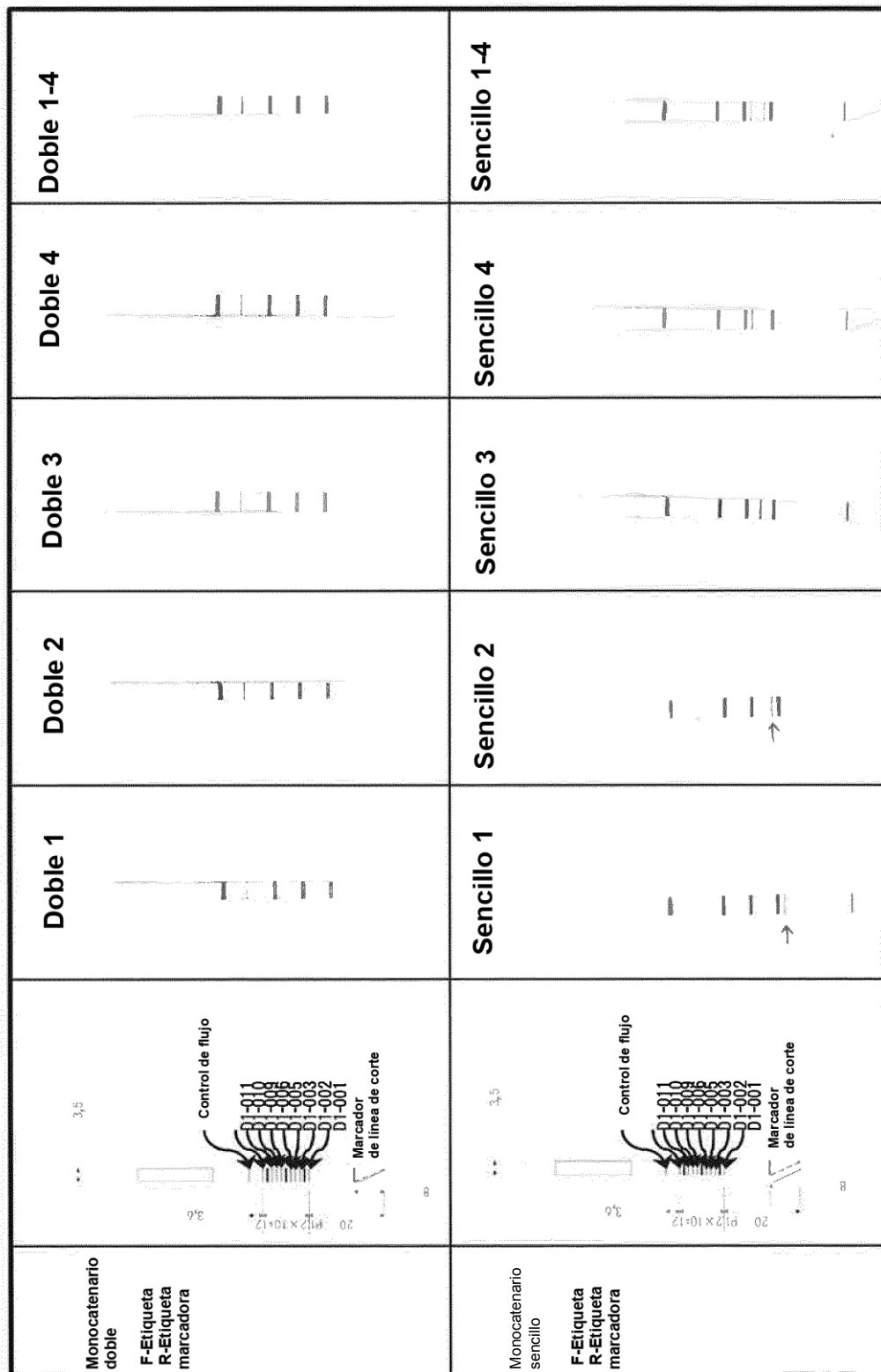


Fig.22

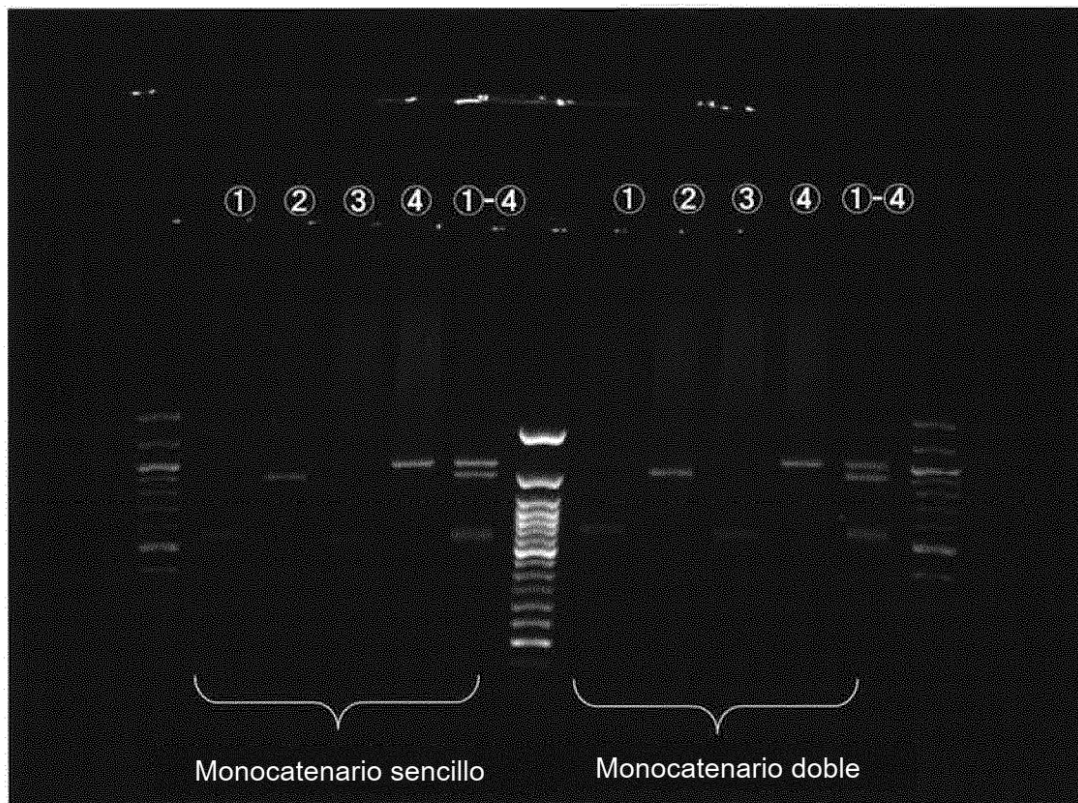


Fig.23

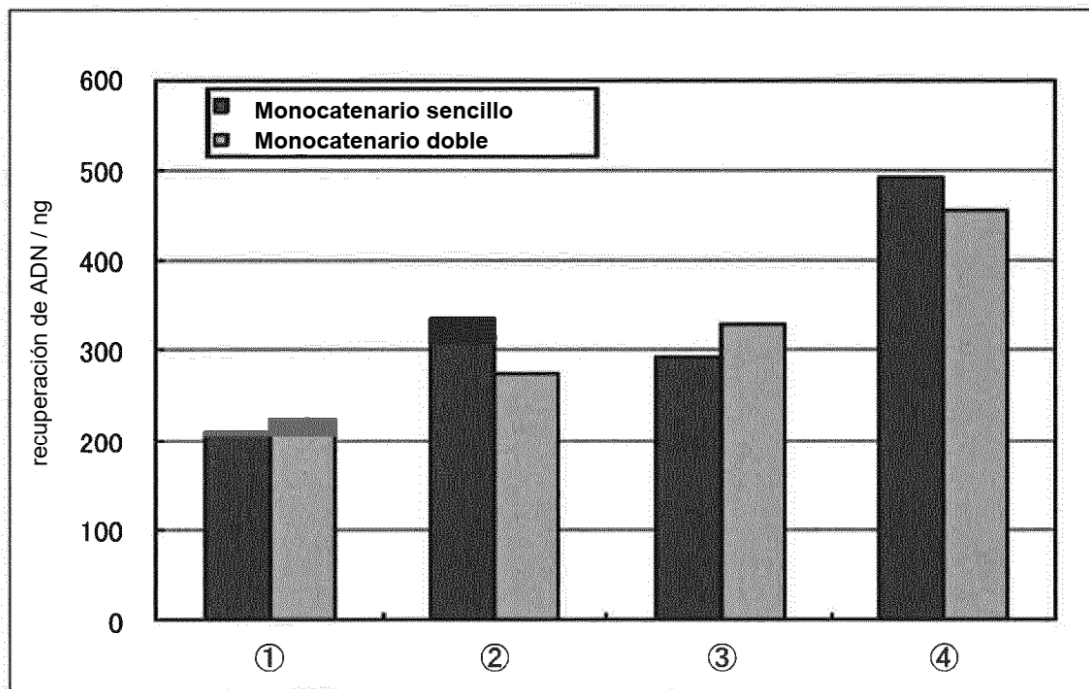


Fig.24

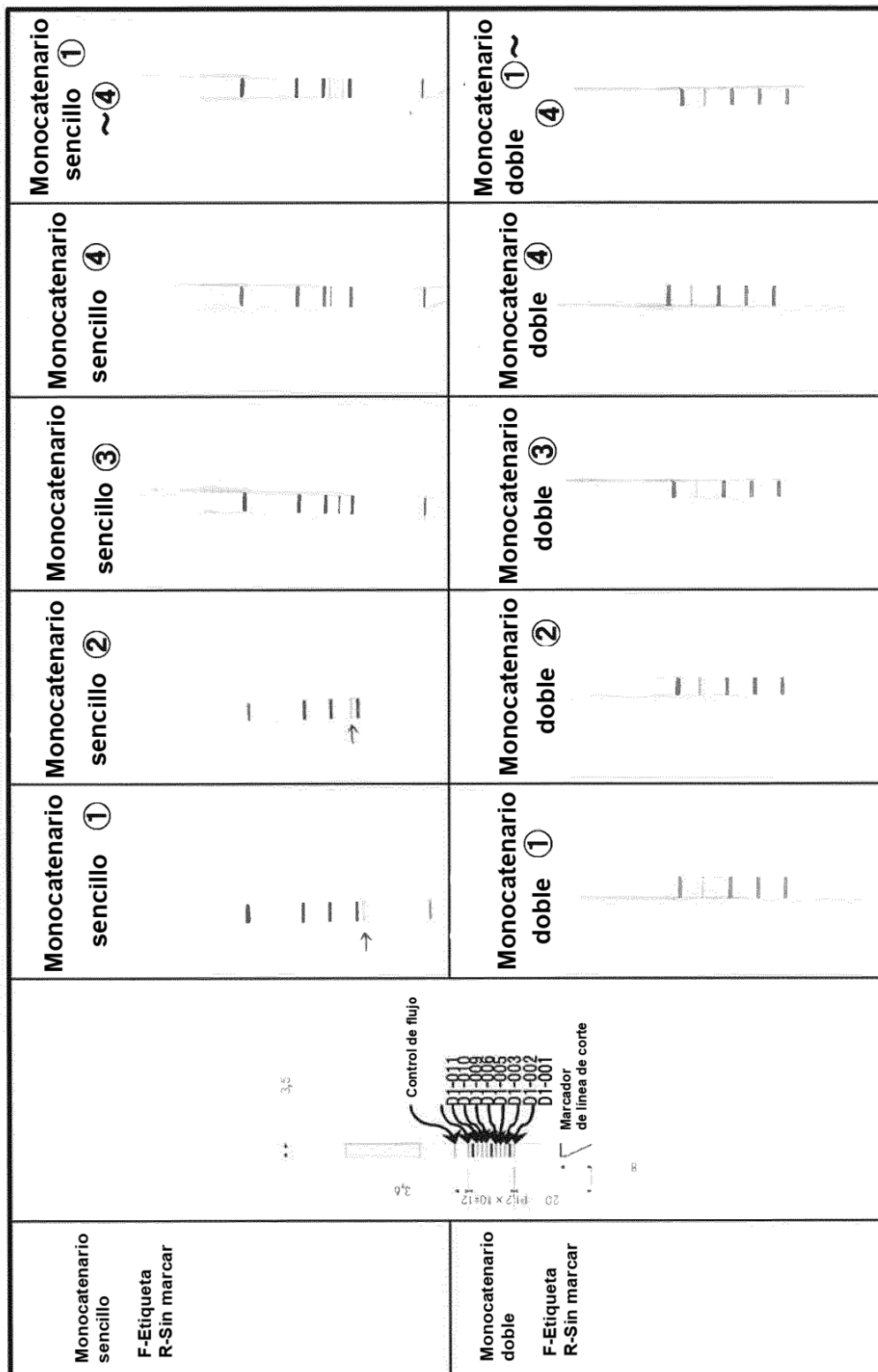


Fig.25

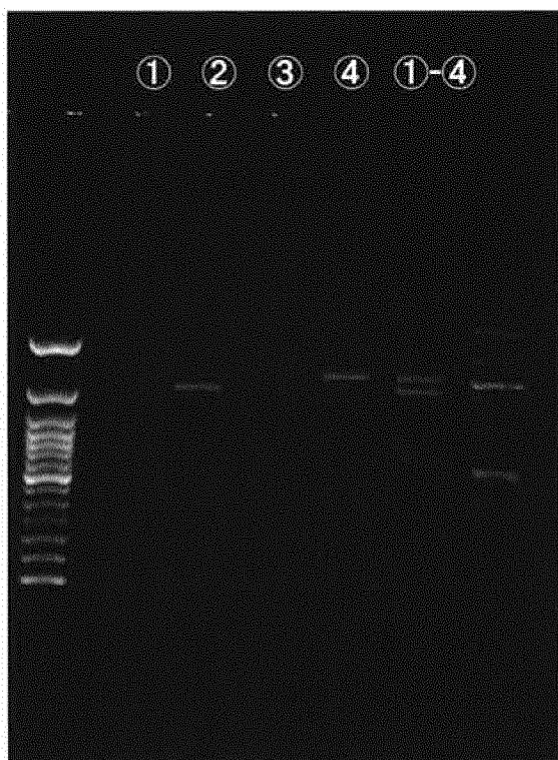


Fig.26

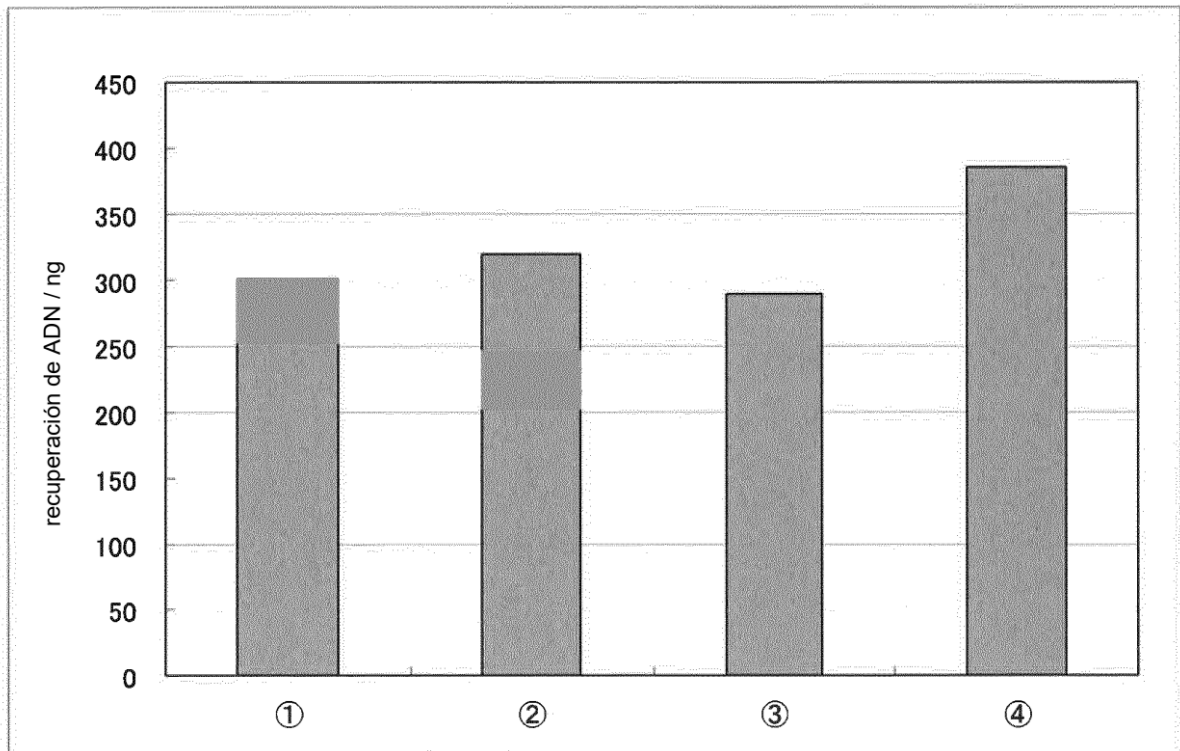


Fig.27

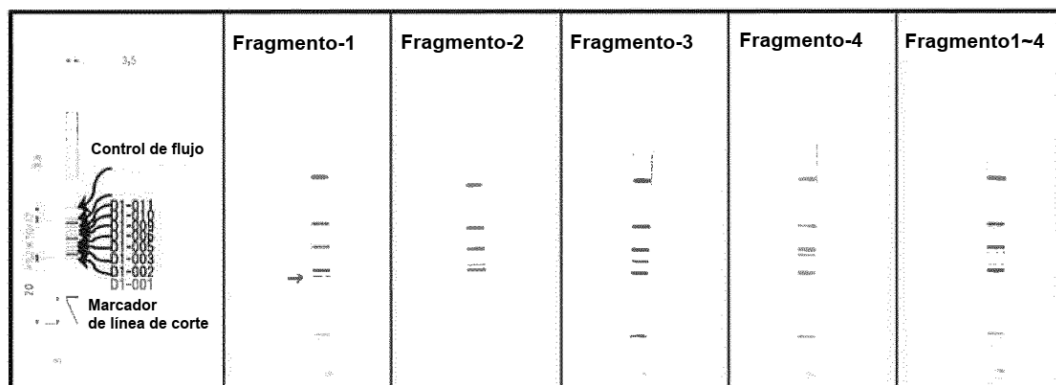


Fig.28



Fig.29

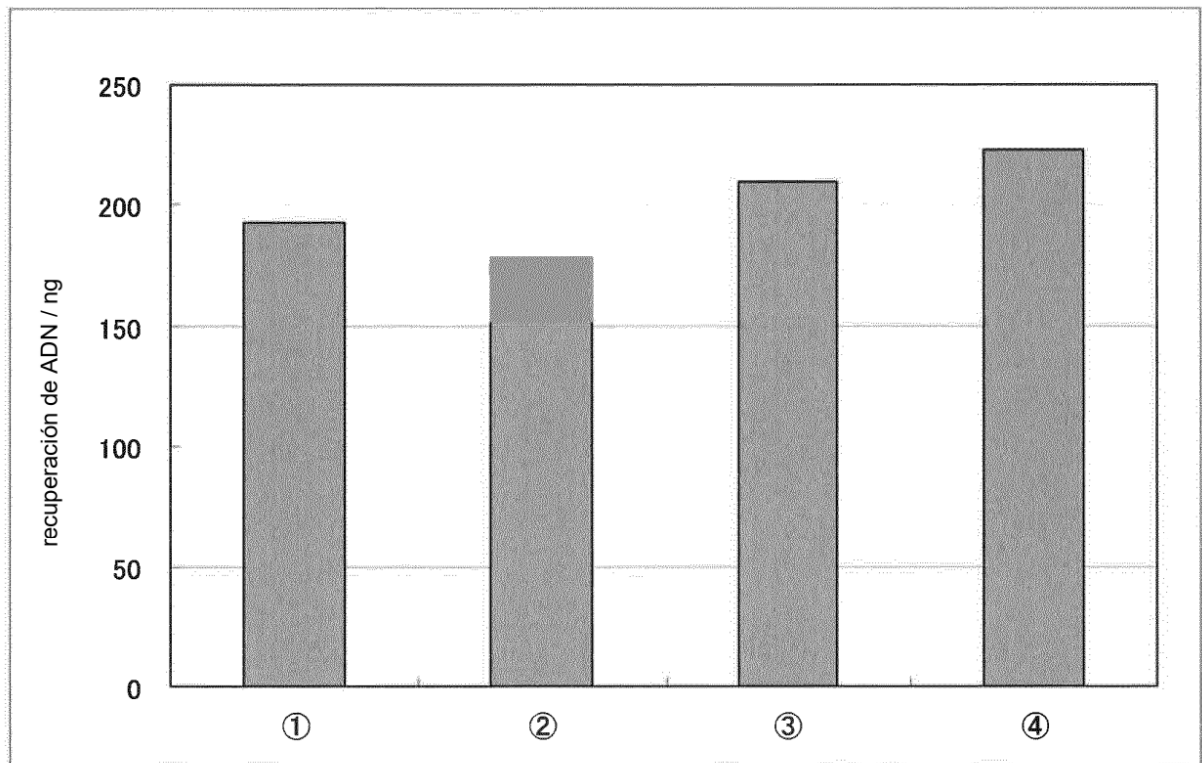


Fig.30

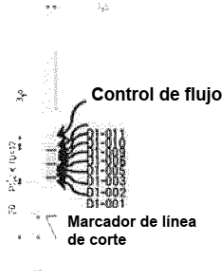
	Fragmento-1	Fragmento-2	Fragmento-3	Fragmento-4	Fragmento1-4
 Control de flujo Marcador de línea de corte					

Fig.31