

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 010 286**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/6823 (2008.01)
G16B 40/10 (2009.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.04.2019 PCT/KR2019/004780**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2019 WO19203623**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2019 E 19787805 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2025 EP 3781708**

(54) Título: **Método para detectar una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico en una muestra**

(30) Prioridad:

20.04.2018 KR 20180046375

(73) Titular/es:

**SEEGENE, INC. (100.00%)
8FL, 9FL, 91, Ogeum-ro, Songpa-gu
Seoul 05548, KR**

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

02.04.2025

(72) Inventor/es:

**KO, SUNG MOON;
HAN, JI HYE;
KIM, YOUNG WOOK y
PARK, YOUNG YONG**

(74) Agente/Representante:

ARAUJO EDO, Mario

Observaciones:

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

ES 3 010 286 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 una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico en una muestra

5 Antecedentes de la invenciónCampo de la invención

10 La presente invención se refiere a la detección de una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico utilizando un valor de cambio de señal.

Descripción de la técnica relacionada

15 Una PCR en tiempo real es una de las tecnologías basadas en la PCR para la detección de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra en tiempo real (Logan J. et al. (2009). Real-Time PCR: Current Technology and Applications. Caister Academic Press). Para detectar una molécula de ácido nucleico diana, la PCR en tiempo real utiliza composiciones generadoras de señal para generar una señal fluorescente que es detectable de una manera proporcionar a la cantidad de la molécula diana. La generación de señales fluorescentes puede conseguirse mediante la utilización de intercalantes que generan señales al intercalarse entre las cadenas del ADN u oligonucleótidos de doble cadena portadores de moléculas informadoras e inhibidoras fluorescentes. Las señales fluorescentes cuyas intensidades son proporcionales a la cantidad de la molécula diana se detectan en cada ciclo de amplificación y se representan frente a ciclos de amplificación, obteniendo de esta manera una curva de amplificación o curva de perfil de amplificación.

20 25 Para la detección de secuencias diana de ácido nucleico, se utilizan ampliamente métodos de detección en tiempo real para detectar secuencias diana de ácido nucleico con seguimiento de la amplificación de la diana en tiempo real. Los métodos de detección en tiempo real generalmente utilizan sondas o cebadores etiquetados que se hibridan específicamente con secuencias diana de ácido nucleico. Como enfoques alternativos, se han propuesto métodos de detección en tiempo real utilizando duplas (dúplex) formadas en dependencia de la presencia de secuencias diana de ácido nucleico.

30 35 40 45 Las tecnologías convencionales de detección en tiempo real descritas anteriormente detectan las señales generadas por los marcas fluorescentes a una temperatura de detección seleccionada en un procedimiento de amplificación de la señal asociado o no a la amplificación de la diana. En el caso de que se detecte una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico utilizando un único tipo de marcaje en un único tubo de reacción de acuerdo con las tecnologías convencionales de detección en tiempo real, las señales generadas para las secuencias diana de ácido nucleico no están diferenciadas unas de otras. Por lo tanto, las tecnologías convencionales de detección en tiempo real generalmente utilizan diferentes tipos de marcas para detectar una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico. El análisis de fusión utilizando la diferencia de la T_f permite detectar una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico incluso de un solo tipo de marcaje. Sin embargo, el análisis de fusión adolece de graves desventajas en que su tiempo de realización es más prolongado que el de las tecnologías en tiempo real y el diseño de sondas con diferentes valores de la T_f se vuelve más difícil al incrementarse el número de la secuencia diana. Además, el análisis de fusión adolece de una limitación en la aplicación de cuantificación, ya que no proporciona valores de C_t , al contrario que el método de detección en tiempo real.

50 55 Se están desarrollando nuevos métodos y enfoques que no son dependientes del análisis de fusión para detectar una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico utilizando marcas que presentan una propiedad de señal idéntica en un único recipiente de reacción.

55 60 La publicación n.º WO 2015/147412 describe un método para detectar una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico en una muestra utilizando diferentes temperaturas de detección. El método se caracteriza por la medición de señales a temperaturas de detección cuyo número es igual al número de secuencias diana de ácido nucleico que van a detectarse. El método presenta la ventaja de utilizar un número pequeño de temperaturas de detección por cada secuencia diana de ácido nucleico, aunque deben seleccionarse temperaturas de detección separadas relativamente distantes para cumplir los requisitos de la temperatura de detección.

65 70 La publicación de patente US n.º WO 2005/0053950 describe un método para detectar secuencias diana de ácido nucleico utilizando amplicones de las mismas y un pigmento intercalante. El método adopta la diferencia entre los valores T_f de los amplicones para la detección. Sin embargo, resulta difícil ajustar los valores T_f de los amplicones para las diferentes secuencias diana de ácido nucleico. Además, los amplicones presentan una longitud de nucleótidos relativamente larga, lo que los restringe a inducir suficientes cambios de señal en un cambio de temperatura estrecho de las temperaturas de detección.

75 80 La patente US n.º 8.039.215 describe un método para llevar a cabo un análisis de fusión en cada ciclo y la representación gráfica de los picos de fusión de las diana en cada ciclo para producir curvas de amplificación para las dianas. El análisis de fusión en cada ciclo provoca que el procedimiento requiera un tiempo excesivo.

A lo largo de toda la presente solicitud se hace referencia a diversas patentes y publicaciones y las citas se proporcionan entre paréntesis.

- 5 El documento n.º US 2017/247750 A1 describe un método para detectar dos secuencias diana de ácido nucleico en una muestra utilizando diferentes temperaturas de detección, que comprende: incubar la muestra con dos medios generadores de señal para la detección de las dos secuencias diana de ácido nucleico en un único recipiente de reacción, y detectar una señal generada mediante la utilización de un único tipo de detector, en donde cada una de las secuencias diana de ácido nucleico se detecta mediante medios correspondientes generadores de señal, en donde los medios generadores de señal para cada una de las secuencias diana de ácido nucleico son medios generadores de señal para generar una señal de una manera dependiente de la formación de una dupla, en donde la dupla extendido proporciona una señal diana y detectar la dupla extendido mediante medición de la señal diana a una temperatura predeterminada a la que la dupla extendido mantiene su forma de doble cadena, de manera que la presencia de la dupla extendido indica la presencia de la secuencia diana de ácido nucleico.
- 10
- 15
- El documento n.º US 8 364 415 B1 describe un método de análisis de curva de fusión para el análisis de si está presente o no un pico en por lo menos uno de un intervalo de temperatura predeterminada relativamente alta y un intervalo de temperatura predeterminada relativamente baja, en donde los dos intervalos corresponden a las temperaturas de fusión de los dos polinucleótidos diana, mediante la detección de cambios de señal a temperaturas específicas y determinar que el valor del diferencial de señal es un pico que identifica el polinucleótido diana cuando se incluye una temperatura (t_1) que indica el valor del diferencial de señal en un intervalo de temperatura que es cualquiera del intervalo de temperatura predeterminada relativamente alta y el intervalo de temperatura predeterminada relativamente baja.
- 20
- 25
- El documento n.º US 2012/010821 A1 describe un método en el que se mide la relación de abundancias de ácidos nucleicos mediante una señal de detección en los diferentes intervalos de temperatura de una curva de fusión para una mezcla de ácidos nucleicos que presentan una o más temperaturas de fusión.
- 30
- El documento n.º JP 2005 058107 A describe un método para el análisis de curvas de fusión que comprende incrementar la temperatura de la solución que contiene el híbrido de la sonda de ácido nucleico y el ácido nucleico diana, medir la señal que cambia debido a la fusión del híbrido y determinar el ácido nucleico diana a partir del cambio en la señal y que comprende elevar y reducir continuamente la temperatura para disociar y formar el híbrido.

Descripción resumida de la invención

- 35 Los presentes inventores han llevado a cabo intensas investigaciones para desarrollar nuevos métodos para detectar una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico utilizando una etiqueta que presenta una propiedad de señal idéntica en un único recipiente de reacción. Como resultado, los presentes inventores han encontrado que un valor de cambio de señal calculado a partir de valores de señal obtenidos de una dupla (dúplex) que comprende un oligonucleótido etiquetado a dos temperaturas permite determinar la presencia o ausencia de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico.
- 40

45 De acuerdo con lo anterior, es un objetivo de la presente invención proporcionar un método para detectar una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico utilizando un valor de cambio de señal.

- 50 Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un medio de almacenamiento legible por ordenador que contiene instrucciones para configurar un procesador para llevar a cabo un método para determinar la presencia de una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico utilizando un valor de cambio de señal.
- 55

- 55 Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar un método para detectar secuencias diana de ácido nucleico utilizando un valor de cambio de señal.
- 60 Es un objetivo todavía adicional de la presente invención proporcionar un medio de almacenamiento legible por ordenador que contiene instrucciones para configurar un procesador para llevar a cabo un método para determinar la presencia de una secuencia diana de ácido nucleico utilizando un valor de cambio de señal.
- 65

65 Otros objetivos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente, considerada junto con las reivindicaciones adjuntas y los dibujos.

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico según la presente invención.

5 La fig. 2 ilustra una realización de tres intervalos de temperatura de detección para tres secuencias diana de ácido nucleico.

10 La fig. 3 ilustra una realización de valores de cambio de señal calculados mediante valores de señal en las dos temperaturas de detección de referencia para cada una de las tres secuencias diana de ácido nucleico.

10 La fig. 4 ilustra una realización de selección de dos temperaturas de referencia a partir de una pluralidad de temperaturas de detección.

15 La fig. 5 ilustra otra realización de selección de dos temperaturas de referencia a partir de una pluralidad de temperaturas de detección.

La fig. 6 ilustra un método de separación de variables.

20 La fig. 7 representa curvas de amplificación obtenidas mediante la representación de conjuntos de datos de ciclo/valor de cambio de señal para una única secuencia diana de ácido nucleico.

Las figs. 8 a 12 representan curvas de amplificación obtenidas mediante la representación gráfica de conjuntos de datos de ciclo/valor de cambio de señal para múltiples secuencias diana de ácido nucleico.

25 Descripción detallada de la presente invención

En el caso de que una pluralidad de duplas que presentaban diferentes valores T_f , que contienen marcas que proporcionan señales con la misma propiedad de señal (p. ej., la misma banda de longitudes de onda), estén presentes en un único recipiente de reacción, el valor de señal detectado en una temperatura de detección particular puede incluir una combinación de señales generadas a partir de las duplas.

Para cada uno de las duplas para las secuencias de ácido nucleico diana, existe un intervalo de temperaturas en el que la intensidad de los valores de señal varía con la temperatura, que depende del valor de T_f de cada dupla. Los valores de señal a temperaturas dentro del intervalo de temperaturas en los que la intensidad de la señal de una secuencia diana de ácido nucleico varía con la temperatura y los valores de otras secuencias diana de ácido nucleico en los que no varía, pueden incluir señales de las demás secuencias diana de ácido nucleico. La intensidad de las señales contribuidas por las demás secuencias diana de ácido nucleico son prácticamente constantes en el intervalo de temperatura. El cálculo de un valor de cambio de señal de valores de señal a dos temperaturas dentro del intervalo de temperatura hace posible obtener únicamente el valor de cambio de señal proporcionado por la secuencia diana de ácidos nucleicos, mientras que los valores de señal proporcionados por las demás secuencias diana de ácido nucleico son eliminados durante el cálculo. En otras palabras, el valor del cambio de señal entre dos temperaturas dentro del intervalo de temperatura puede proporcionarse mediante un cambio de la cantidad de la dupla para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente, lo que indicaría la presencia de la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente.

45 Los presentes inventores han encontrado que la utilización de una dupla que contiene un oligonucleótido etiquetado, en particular una dupla formada de una manera dependiente de la escisión que implica un oligonucleótido de mediación que permite la detección de una secuencia diana de ácido nucleico por un valor de cambio de señal entre temperaturas de intervalos relativamente estrechos, p. ej., a intervalos de temperaturas de entre aproximadamente 2 °C y 5 °C (particularmente, entre aproximadamente 2 °C y 4 °C), junto con un control sofisticado de los valores T_f de las duplas y con creciente disociación de duplas o sensibilidad de hibridación a los cambios de temperatura. Además, también se ha encontrado que la utilización de temperaturas de intervalos estrechos permite detectar un mayor número de secuencias diana de ácido nucleico con un riesgo reducido de falsos positivos. Además, los presentes inventores han adoptado un método de selección de las temperaturas de referencia que van a utilizarse en el cálculo del valor de cambio de señal para cada reacción con el fin de resolver el problema de que un valor de T_f de la dupla puede diferir de un valor de T_f en el medio actual de reacción. Dicho enfoque puede proporcionar resultados más exactos y fiables, y resultados más tolerantes a variaciones entre reacciones.

60 *I. Detección de una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico en una muestra utilizando un valor de cambio de señal a dos temperaturas.*

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico en una muestra, que comprende:

65 poner en contacto en un único recipiente de reacción la muestra a composiciones generadoras de señal para detectar la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico, en donde las composiciones generadoras de señal forman una

pluralidad de duplas (dúplex) para la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico, cada uno de la pluralidad de duplas proporciona una señal que indica la presencia de cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente y la pluralidad de duplas presenta valores T_f diferentes entre sí,

5 llevar a cabo una reacción en por lo menos dos ciclos para (i) la formación de la pluralidad de duplas y (ii) la disociación de las duplas,

10 obtener en todos o parte de los ciclos de los valores de señal de reacción a por lo menos dos temperatura de detección en cada uno de una pluralidad de intervalos de temperatura de detección asignados a la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico, en donde cada uno de la pluralidad de intervalos de temperatura de detección comprende un intervalo de temperatura en el que ha cambiado la cantidad de una dupla para cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente, *mientras que la cantidad de duplas de las demás secuencias diana de ácido nucleico se mantiene sin cambios,*

15 obtener un valor de cambio de señal de valores de señal entre dos temperaturas de referencia seleccionadas de entre por lo menos dos temperaturas de detección en cada uno de la pluralidad de intervalos de temperatura de detección, de manera que se obtiene un conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal para cada una de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico, y

20 determinar la presencia o la ausencia de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico en la muestra a partir del conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal para cada una de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico.

25 La fig. 1 es un diagrama de flujo para el presente método. En referencia a la fig. 1, la presente invención se describirá en mayor detalle a continuación:

Etapa: puesta en contacto de la muestra con composiciones generadoras de señal (110).

30 La muestra que va a analizarse se pone en contacto con composiciones generadoras de señal para la detección de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico en un único recipiente de reacción.

35 La expresión utilizada en el presente documento "composición generadora de señal" en el presente documento se refiere a una composición que genera una señal indicadora de la presencia o ausencia de la secuencia diana de ácido nucleico. Alternativamente, la expresión utilizada en el presente documento "composición generadora de señal" en el presente documento se refiere a cualesquiera materiales utilizados para generar una señal detectable de una manera dependiente de la presencia de la secuencia diana de ácido nucleico mediante un procedimiento biológico, bioquímico o químico. En particular, la expresión utilizada en el presente documento "composición generadora de señal" en el presente documento se refiere a cualesquiera materiales utilizados en la generación de una señal detectable de una manera dependiente de la formación de una dupla.

40 En una realización de la presente invención, una composición generadora de señal comprende materiales utilizados en la formación de una dupla para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente.

45 Cada una de las secuencias diana de ácido nucleico puede detectarse mediante una composición generadora de señal correspondiente. La primera composición generadora de señal puede representar los materiales utilizados para la detección de la primera secuencia diana de ácido nucleico y la segunda composición generadora de señal puede representar los materiales utilizados para la detección de la segunda secuencia diana de ácido nucleico y similares.

50 La dupla para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente formada por la composición generadora de señal correspondiente proporciona una señal indicativa de la presencia o ausencia de la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente.

55 La expresión utilizada en el presente documento "una señal indicativa de la presencia" puede utilizarse intercambiablemente con "una señal indicativa de la presencia o ausencia", a menos que se indique lo contrario.

60 Una composición generadora de señal para una secuencia diana de ácido nucleico puede comprender uno o más oligonucleótidos. El oligonucleótido u oligonucleótidos puede comprender uno o más oligonucleótidos etiquetados. Una composición generadora de señal para una secuencia diana de ácido nucleico puede comprender uno o más oligonucleótidos etiquetados que participan en la formación de una dupla.

65 En una realización, una o más cadenas de una dupla son un oligonucleótido etiquetado. Según una realización, la dupla comprende por lo menos una etiqueta en por lo menos su única cadena.

- La expresión utilizada en el presente documento "oligonucleótido de detección" es un oligonucleótido que participa en la generación de la señal que va a detectarse. Según una realización, el oligonucleótido de detección incluye un oligonucleótido que participa en la generación actual de la señal. Según una realización, el oligonucleótido de detección comprende por lo menos una etiqueta. Según una realización, el oligonucleótido etiquetado que participa en la formación de la dupla y que genera una señal es un oligonucleótido de detección.
- Según una realización de la presente invención, las composiciones generadoras de señal del presente método generan una señal de una manera dependiente de la formación de una dupla.
- 10 Se conocen diversos métodos de generación de una señal de una manera dependiente de la formación de una dupla y las composiciones generadoras de señal del presente método pueden contener materiales requeridos para llevar a cabo los métodos.
- 15 La expresión utilizada en el presente documento "generar una señal de una manera dependiente de la formación de una dupla" junto con composiciones generadoras de señal se refieren a que la señal que va a detectarse se proporciona en dependencia de asociación o disociación de dos moléculas de ácido nucleico. La expresión incluye que proporcione una señal una dupla (p. ej., un oligonucleótido de detección con una etiqueta y una secuencia de ácido nucleico) formado en dependencia de la presencia de una secuencia diana de ácido nucleico. Además, la expresión incluye que se proporcione una señal mediante la inhibición de la hibridación de una dupla (p. ej., un oligonucleótido de detección con una etiqueta y una secuencia de ácido nucleico), en donde la inhibición es causada por la formación de otro duplas.
- 20 La expresión utilizada en el presente documento "la formación de una dupla" incluye la formación de una dupla mediante la producción de una o más cadenas comprendidas en la dupla durante una reacción, así como la formación de una dupla mediante hibridación de dos cadenas presentes antes de una reacción en una condición de hibridación.
- 25 Una de las características más destacadas de la presente invención se caracteriza por la adopción de una dupla que incluye un oligonucleótido etiquetado, en lugar de la utilización de un amplicón, un producto de amplificación de una secuencia diana de ácido nucleico.
- 30 30 La presente invención utiliza el valor de T_f de la dupla que contiene un oligonucleótido etiquetado, no el valor de T_f del amplicón de la secuencia diana de ácido nucleico.
- 35 Resulta relativamente difícil ajustar un valor de T_f de un amplicón a un valor deseado de T_f . Además, los intervalos de temperatura disponibles para detectar una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico son limitadas, ya que los valores T_f de los amplicones es probable que se encuentren en un intervalo de temperaturas relativamente altas. Además, el pigmento intercalante utilizado para marcar el amplicón de las secuencias diana de ácido nucleico se incorpora en un producto no específico, que causa una señal falsa. Según una realización, la presente invención no utiliza un pigmento intercalante.
- 40 40 Las duplas formadas por las composiciones generadoras de señal del presente método pueden ser: (i) una dupla formada mediante hibridación entre la secuencia diana de ácido nucleico y un oligonucleótido etiquetado, (ii) una dupla formada mediante hibridación entre un oligonucleótido que comprende una secuencia hibridante complementaria a la secuencia diana de ácido nucleico y un oligonucleótido etiquetado complementario a por lo menos una parte de la secuencia hibridante, o (iii) una dupla formada de una manera dependiente de la escisión que implica un oligonucleótido de mediación, en el que el oligonucleótido de mediación se hibrida con la secuencia diana de ácido nucleico.
- 45 50 Particularmente, se forma una dupla entre una secuencia diana de ácido nucleico y un oligonucleótido etiquetado que se hibrida específicamente con la secuencia diana de ácido nucleico.
- 55 55 La formación de una dupla entre una secuencia diana de ácido nucleico y el oligonucleótido etiquetado puede generarse mediante diversos métodos, incluyendo el método de Scorpion (Whitcombe et al., Nature Biotechnology 17:804-807 (1999)), el método Sunrise (o Ampifluor (Nazarenko et al., Nucleic Acids Research, 25(12):2516-2521 (1997), y la patente US n.º 6.117.635), el método Lux (patente US n.º 7.537.886), el método Plexor (Sherrill C.B. et al., Journal of the American Chemical Society, 126:4550-45569 (2004)), método de baliza molecular (Tyagi et al., Nature Biotechnology, v. 14, marzo de 1996), método HyBeacon (French DJ et al., Mol. Cell Probes, 15(6):363-374 (2001), el método de sonda de hibridación contigua (Bernard, P.S. et al., Anal. Biochem., 273:221 (1999)) y el método de LNA (patente US n.º 6.977.295).
- 60 60 Particularmente, se forma una dupla mediante hibridación entre un oligonucleótido que comprende una secuencia hibridante complementaria a la secuencia diana de ácido nucleico y un oligonucleótido etiquetado complementario a por lo menos una parte de la secuencia hibridante.
- 65 65 La dupla puede formar una dupla en ausencia de la secuencia diana de ácido nucleico. Sin embargo, la presencia de la secuencia diana de ácido nucleico puede bloquear la hibridación de la dupla o causar la escisión de uno o más

- oligonucleótidos de la dupla, impidiendo la formación de la dupla. Por lo tanto, la dupla puede proporcionar una señal indicativa de la presencia o ausencia de la secuencia diana de ácido nucleico.
- 5 Un oligonucleótido que comprende una secuencia hibridante complementaria a la secuencia diana de ácido nucleico puede comprender una etiqueta y adoptar un papel de oligonucleótido de detección.
- 10 La dupla entre un oligonucleótido que comprende una secuencia hibridante complementaria a la secuencia diana de ácido nucleico y un oligonucleótido etiquetado complementario a por lo menos una parte de la secuencia hibridante puede generarse mediante diversos métodos, incluyendo los métodos descritos en Li et al., Nucleic Acids Research, vol. 30, n.º 2, e5 (2002).
- 15 Particularmente, se forma una dupla de una manera dependiente de una escisión que implica un oligonucleótido de mediación.
- 20 15 La expresión utilizada en el presente documento "oligonucleótido de mediación" es un oligonucleótido que media en la producción de una dupla que no contiene una secuencia diana de ácido nucleico.
- 25 En una realización, un oligonucleótido de mediación comprende: (i) una parte de direccionamiento que comprende una secuencia de nucleótidos hibridante que es complementaria a la secuencia diana de ácido nucleico, y (ii) una parte de etiqueta que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia diana de ácido nucleico.
- 30 Según una realización, el oligonucleótido de mediación comprende: (i) una parte de direccionamiento 3' que comprende una secuencia de nucleótidos hibridante que es complementaria a la secuencia diana de ácido nucleico, y (ii) una parte de etiqueta 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia diana de ácido nucleico.
- 35 35 El oligonucleótido de mediación puede participar en la provisión de un fragmento de diversas maneras.
- 40 40 En una realización de la presente invención, el oligonucleótido de mediación se hibrida con una secuencia diana de ácido nucleico e induce la liberación de un fragmento, mediando de esta manera en la producción de una dupla.
- 45 En una realización, un oligonucleótido de mediación se hibrida con una secuencia diana de ácido nucleico y la escisión que implica un oligonucleótido de mediación libera un fragmento.
- 50 50 En una realización, la escisión que implica un oligonucleótido de mediación libera un fragmento del oligonucleótido de mediación. Particularmente, el fragmento del oligonucleótido de mediación comprende por lo menos una parte de una parte de etiqueta del oligonucleótido de mediación.
- 55 55 En una realización, una escisión que implica un oligonucleótido de mediación libera un fragmento de un amplicón que contiene un oligonucleótido de mediación. Particularmente, el fragmento del amplicón que contiene el oligonucleótido de mediación comprende una secuencia complementaria a por lo menos una parte de la parte de etiqueta del oligonucleótido de mediación.
- 60 60 En una realización, en una pareja de cebadores que comprende un oligonucleótido de mediación a modo de un cebador se utiliza para amplificar una secuencia diana de ácido nucleico.
- 65 En la presente invención, una hibridación de un oligonucleótido de mediación de por sí no genera una señal y participa un fragmento formado mediante la escisión que implica el oligonucleótido de mediación, en reacciones sucesivas para la formación de la dupla.
- 70 70 En una realización, la dupla formada de una manera dependiente de la escisión que implica el oligonucleótido de mediación es una dupla formada de una manera dependiente de la formación de una cadena extendida que se forma mediante extensión de un fragmento liberado por la escisión que implica el oligonucleótido de mediación.
- 75 75 En una realización, una escisión que implica un oligonucleótido de mediación libera un fragmento y el fragmento se hibrida específicamente con un oligonucleótido de captura y es extendido en el oligonucleótido de captura para formar una cadena extendida.
- 80 80 En una realización, un oligonucleótido de captura comprende, en dirección 3' a 5': (i) una parte de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria al fragmento liberado por la escisión que implica el

oligonucleótido de mediación, y (ii) una parte de molde que comprende una secuencia de molde para la reacción de extensión.

- 5 En una realización, una secuencia de molde para la reacción de extensión en el oligonucleótido de captura se determina de manera independiente de la secuencia diana de ácido nucleico.
- En una realización, una secuencia de molde para la reacción de extensión en el oligonucleótido de captura es no complementaria al oligonucleótido de mediación.
- 10 En una realización, la dupla formada de una manera dependiente de la escisión que implica el oligonucleótido de mediación es una dupla formada mediante hibridación de un fragmento liberado por la escisión que implica el oligonucleótido de mediación con un oligonucleótido correspondiente. En este caso, no hay se produce ninguna reacción de extensión en el oligonucleótido correspondiente.
- 15 En una realización, el oligonucleótido correspondiente no presenta ninguna secuencia para la reacción de extensión del fragmento. Este método no puede ajustar el valor de la T_f de una dupla formada por una reacción de extensión. Según una realización, una escisión que implica un oligonucleótido de mediación libera un fragmento y el fragmento se hibrida específicamente con un oligonucleótido correspondiente.
- 20 En una realización, el oligonucleótido de mediación puede hibridarse con el oligonucleótido correspondiente para formar una dupla. Sin embargo, la escisión del oligonucleótido de mediación proporciona una dupla diferente, es decir, una dupla entre el fragmento y el oligonucleótido correspondiente. Un sistema de marcaje puede permitir que este último duplas genere una señal indicativa de la presencia o ausencia de una secuencia diana de ácido nucleico mediante hibridación y/o disociación de la dupla, mientras que no lo permite para el primero.
- 25 En una realización, la dupla formada de una manera dependiente de la escisión que implica el oligonucleótido de mediación es una dupla formada de una manera dependiente de la formación de una cadena extendida que se forma mediante: (i) hibridación del oligonucleótido de mediación con la secuencia diana de ácido nucleico, (ii) la escisión del oligonucleótido de mediación o del amplicón que contiene el oligonucleótido de mediación por una nucleasa a fin de generar un fragmento, (iii) hibridar el fragmento con un oligonucleótido de captura que comprende una parte de captura 5' para la hibridación con el fragmento y una parte de molde 3', y (iv) llevar a cabo una reacción de extensión del fragmento hibridado con la parte de captura en la parte de molde 3' para formar la cadena extendida.
- 30 En una realización, el amplicón que contiene oligonucleótido de mediación se corta mediante (i) la hibridación de una secuencia diana de ácido nucleico con una pareja de cebadores que comprende un oligonucleótido de mediación a modo de un cebador (ii) produciendo un amplicón que contiene un oligonucleótido de mediación, y (iii) escisión de una parte de una cadena que comprende una secuencia complementaria al oligonucleótido de mediación.
- 35 Particularmente, la parte cortada comprende una secuencia complementaria a por lo menos una parte de una parte de etiqueta del oligonucleótido de mediación, en la que la parte de etiqueta comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia diana de ácido nucleico.
- 40 En una realización, la dupla formado de una manera dependiente de la escisión que implica un oligonucleótido de mediación es una dupla formada por (i) la hibridación del oligonucleótido de mediación con la secuencia diana de ácido nucleico, (ii) la escisión del oligonucleótido de mediación con una nucleasa para generar un fragmento y (iii) hibridar el fragmento con un oligonucleótido correspondiente, en donde el oligonucleótido correspondiente presenta una secuencia complementaria al fragmento.
- 45 En una realización, se utiliza una nucleasa 5' o nucleasa 3' para la escisión de un oligonucleótido de mediación. Según una realización, se utiliza una ácido nucleico polimerasa que presenta actividad de nucleasa 5' o una nucleasa 5' para la escisión de un oligonucleótido de mediación.
- 50 Según una realización, se utiliza un enzima de restricción para la escisión de un amplicón que contiene un oligonucleótido de mediación.
- 55 La dupla formada de una manera dependiente de la formación de la cadena extendida incluye diversos tipos de duplas. La cadena extendida misma puede formar una dupla, generando una señal. Además, la formación de la cadena extendida puede controlar la formación de otros duplas.
- 60 La dupla formada de una manera dependiente de la formación de la cadena extendida puede ser (i) una dupla entre la cadena extendida y el oligonucleótido de captura, (ii) una dupla entre el oligonucleótido de captura y un oligonucleótido hibridante con un oligonucleótido de captura y una cadena de extensión dual desde la cadena extendida capturada hasta el oligonucleótido de captura de la cadena extendida, (iv) una dupla entre la cadena de extensión dual y un oligonucleótido hibridante con una cadena de extensión dual, o (v) una dupla entre el oligonucleótido de captura de cadena extendida y un oligonucleótido que va a hibridarse con el oligonucleótido de captura de la cadena extendida.
- 65

- En una realización, la escisión que implica un oligonucleótido de mediación libera un fragmento y el fragmento se hibrida específicamente con un oligonucleótido de captura y el fragmento se extiende para formar una cadena extendida, resultando en la formación de una dupla extendido entre la cadena extendida y el oligonucleótido de captura, proporcionando una señal que indica la presencia de la secuencia diana de ácido nucleico.
- En una realización, en donde se utilice un oligonucleótido hibridante con una cadena extendida, que comprende una secuencia de nucleótidos hibridante que es complementaria a la cadena extendida del fragmento, la hibridación del oligonucleótido hibridante con la cadena extendida y la cadena extendida forman otro tipo de duplas, proporcionando una señal que indica la presencia de la secuencia diana de ácido nucleico.
- En una realización, en donde se utiliza un oligonucleótido hibridante de un oligonucleótido de captura que comprende una secuencia de nucleótidos hibridante complementaria del oligonucleótido de captura, la formación de una dupla entre el oligonucleótido hibridante de oligonucleótido de captura y el oligonucleótido de captura resulta inhibida por la formación de la dupla entre la cadena extendida y el oligonucleótido de captura, proporcionando de esta manera una señal indicativa de la presencia de la secuencia diana de ácido nucleico.
- En una realización, la cadena extendida del fragmento se hibrida específicamente con un oligonucleótido de captura de cadena extendida y la cadena extendida se extiende para formar una cadena de extensión dual, resultando en la formación de una dupla entre la cadena de extensión dual y el oligonucleótido de captura de la cadena extendida proporciona una señal indicativa de la presencia de la secuencia diana de ácido nucleico.
- En una realización, en donde se utilice un oligonucleótido hibridante de cadena de extensión dual que comprende una secuencia de nucleótidos hibridante que es complementaria a la cadena de extensión dual, la hibridación del oligonucleótido hibridante con la cadena de extensión dual y la cadena de extensión dual forman otro tipo de duplas que proporciona una señal indicativa de la presencia de la secuencia diana de ácido nucleico.
- En una realización, en donde se utiliza un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos hibridante que es complementaria al oligonucleótido de captura de la cadena extendida, se inhibe la formación de una dupla entre el oligonucleótido y el oligonucleótido de captura de la cadena extendida por la formación de la dupla entre la cadena de extensión dual y el oligonucleótido de captura de la cadena extendida, proporcionando de esta manera una señal indicativa de la presencia de la secuencia diana de ácido nucleico.
- En una realización, el fragmento, la cadena extendida, el oligonucleótido de captura, el oligonucleótido hibridante de cadena extendida, el oligonucleótido hibridante de oligonucleótido de captura, la cadena de extensión dual, el oligonucleótido de captura de la cadena extendida, el oligonucleótido hibridante de cadena de extensión dual, el oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos hibridante complementaria al oligonucleótido de captura de cadena extendida o la combinación de los mismos pueden funcionar como el oligonucleótido de detección.
- La dupla formada de una manera dependiente de la formación de una cadena extendida, particularmente acompañado por la escisión del oligonucleótido de mediación puede generarse mediante diversos métodos, incluyendo el método PTOCE (por sus siglas en inglés, escisión y extensión de oligonucleótido de sondeo y etiquetado (PTO, por sus siglas en inglés)) (documento n.º WO 2012/096523), el método PCE-SH (por sus siglas en inglés, hibridación de oligonucleótido de señalización dependiente de escisión y extensión de PTO) (documento n.º WO 2013/115442), el método PCE-NH (por sus siglas en inglés, no hibridación dependiente de escisión y extensión de PTO) (documento n.º PCT/KR2013/012312) y el método PTOCE-E (por sus siglas en inglés, extensión dependiente de la escisión y extensión de PTO) (documento n.º WO2019/066461).
- La dupla formada de una manera dependiente de la formación de una cadena extendida, particularmente que acompaña a la escisión de un amplicón que contiene un oligonucleótido de mediación, puede generarse mediante diversos métodos, incluyendo un método dado a conocer en la publicación de patente n.º WO n.º 2017/188669.
- En referencia a los términos y expresiones descritos en las referencias anteriormente indicadas, los ejemplos correspondientes de los oligonucleótidos son los siguientes: un oligonucleótido de mediación que corresponde a un PTO (oligonucleótido de sondeo y etiquetado), un oligonucleótido de captura de un CTO (por sus siglas en inglés, un oligonucleótido de captura y molde), un oligonucleótido hibridante de cadena de extensión de un SO (por sus siglas en inglés, oligonucleótido de señalización), un oligonucleótido hibridante de oligonucleótido de captura de un HO (por sus siglas en inglés, oligonucleótido de hibridación), una cadena de extensión dual de una segunda cadena extendida, un oligonucleótido de captura de cadena extendida de un segundo CTO. Los SO, HO, CTO, cadenas extendidas o combinaciones de los mismos pueden desempeñar un papel como un oligonucleótido de detección.
- La señal por la dupla formada de una manera dependiente en la escisión del oligonucleótido de mediación incluye la señal proporcionada por la inhibición de la formación de otras duplas por la dupla formada de una manera dependiente de la escisión del oligonucleótido de mediación (p. ej., PCE-NH).

Por ejemplo, en donde la señal por la dupla formada de una manera dependiente de la escisión del oligonucleótido de mediación se genera mediante el método PTOCE, la composición generadora de señal comprende un oligonucleótido cadena arriba y un PTO (oligonucleótido de sondeo y etiquetado) que comprende una secuencia de nucleótidos hibridante complementaria a la secuencia diana de ácido nucleico, un CTO (oligonucleótido de captura y molde), una etiqueta adecuado y un ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que presenta actividad de nucleasa 5'. El PTO comprende (i) una parte de direccionamiento 3' que comprende una secuencia de nucleótidos hibridante que es complementaria al a secuencia diana de ácido nucleico, y (ii) una parte de etiquetado 5' que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia diana de ácido nucleico. El CTO comprende, en dirección 3' a 5', (i) una parte de captura que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la parte de etiquetado 5' o una parte de la parte de etiquetado 5' del PTO, y (ii) una parte de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la parte de etiquetado 5' del PTO, y (ii) una parte de molde que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la parte de etiquetado 5' y la parte de direccionamiento 3' del PTO.

El ejemplo particular de la generación de señales mediante el método PTOCE comprende las etapas siguientes:

(a) hibridar la secuencia diana de ácido nucleico con el oligonucleótido cadena arriba y el PTO, (b) puesta en contacto de los resultado de la etapa (a) con un enzima que presenta una actividad de nucleasas 5' bajo condiciones para la escisión del PTO, en donde el oligonucleótido cadena arriba o su cadena extendida induce la escisión del PTO mediante el enzima que presenta la actividad de nucleasa 5', de manera que la escisión libera un fragmento que comprende la parte de etiquetado 5' o un segmento de la parte de etiquetado 5' del PTO, (c) hibridar el fragmento liberado del PTO con el CTO, en donde el fragmento liberado del PTO se hibrida con la parte de captura del CTO, y (d) llevar a cabo una reacción de extensión utilizando lo resultante del a etapa (c) y una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde, en donde el fragmento hibridado con la parte de captura del CTO se extiende y se forma una dupla extendido, en donde la dupla extendido presenta un valor de T_f ajustable mediante: (i) una secuencia y/o longitud del fragmento, (ii) una secuencia y/o longitud del CTO, o (iii) la secuencia y/o longitud del fragmento y la secuencia y/o longitud del CTO, en donde la dupla extendido proporciona una señal diana mediante (i) por lo menos una etiqueta unido al fragmento y/o al CTO, (ii) una etiqueta incorporado en la dupla extendido durante la reacción de extensión, (iii) una etiqueta incorporado en la dupla extendido durante la reacción de extensión y una etiqueta unido al fragmento y/o el CTO, o (iv) una etiqueta intercalante, y (e) detectar la dupla extendido mediante la medición de la señal diana a una temperatura predeterminada a la que la dupla extendido mantiene su forma de doble cadena, en donde la presencia de la dupla extendido indica la presencia de la secuencia diana de ácido nucleico. En este caso, el método comprende, además, repetir la totalidad o algunas de las etapas (a) a (e), con desnaturización entre ciclos repetidos.

En la expresión "desnaturalización entre ciclos repetidos", el término "desnaturalización" se refiere a separar una molécula de ácido nucleico de doble cadena en una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla.

En la etapa (a) del método PTOCE, puede utilizarse un conjunto de cebadores para la amplificación de la secuencia diana de ácido nucleico en lugar del oligonucleótido cadena arriba. en este caso, el método comprende, además, repetir la totalidad o algunas de las etapas (a) a (e) con desnaturización entre ciclos repetidos.

El método PTOCE puede clasificarse como un procedimiento en el que el fragmento PTO hibridado con el CTO se extiende para formar una cadena extendida y a continuación se detecta la cadena extendida. El método PTOCE se caracteriza porque la formación de la cadena extendida se detecta mediante la utilización de la dupla entre la cadena extendida y el CTO.

Existe otro enfoque para detectar la formación de la cadena extendida. Por ejemplo, la formación de la cadena extendida puede detectarse mediante la utilización de un oligonucleótido hibridado específicamente con la cadena extendida (p. ej., el método PCE-SH). En este método, la señal puede proporcionarse a partir de (i) una etiqueta unido al oligonucleótido hibridado específicamente a la cadena extendida, (ii) una etiqueta unido al oligonucleótido hibridado específicamente con la cadena extendida y una etiqueta unido al fragmento PTO, (iii) una etiqueta unido al oligonucleótido hibridado específicamente a la cadena extendida y una etiqueta incorporado en la cadena extendida durante la reacción de extensión, o (iv) una etiqueta unido al oligonucleótido hibridado específicamente a la cadena extendida y un pigmento intercalante. Alternativamente, la señal puede ser proporcionada por (i) una etiqueta unido a la cadena extendida o (ii) un pigmento intercalante.

Alternativamente, la detección de la formación de la cadena extendida se lleva a cabo mediante otro método en el que se detecta la inhibición de la hibridación entre el CTO y un oligonucleótido que es hibridable específicamente con el CTO (p. ej., el método PCE-NH). Dicha inhibición se considera que es indicativa de la presencia de una secuencia diana de ácido nucleico. La señal puede ser proporcionada por (i) una etiqueta unido al oligonucleótido que es hibridable con el CTO, (ii) una etiqueta unido al CTO, (iii) una etiqueta unido al oligonucleótido que es hibridable con el CTO y una etiqueta unido al CTO, o (iv) una etiqueta intercalante.

En una realización, el oligonucleótido que es específicamente hibridable con el CTO presenta una secuencia solapante con el fragmento de PTO.

En una realización, el oligonucleótido de detección incluye el oligonucleótido que es específicamente hibridable con la cadena extendida (p. ej., el método PCE-SH) y el oligonucleótido que es específicamente hibridable con el CTO (p. ej., el método PCE-NH). En una realización, el oligonucleótido de detección incluye la cadena extendida que es producida durante una reacción o CTO.

- 5 Los métodos basados en PTOCE normalmente implican la formación de la cadena extendida en dependencia con la presencia de una secuencia diana de ácido nucleico. La expresión "método basado en PTOCE" se utiliza en el presente documento para referirse a que comprende diversos métodos para proporcionar señales que comprenden la formación de una cadena extendida mediante la escisión y extensión de PTO.
- 10 El ejemplo de generación de señales mediante los métodos basados en PTOCE comprende las etapas siguientes: (a) hibridar la secuencia diana de ácido nucleico con el oligonucleótido cadena arriba y el PTO, (b) poner en contacto lo resultante de la etapa (a) con un enzima que presenta una actividad de nucleasa 5' bajo condiciones para la escisión del PTO, en donde el oligonucleótido cadena arriba o su cadena extendida induce la escisión del PTO por el enzima que presenta la actividad de nucleasa 5', de manera que la escisión libera un fragmento que comprende la parte de etiquetado 5' o una parte de la parte de etiquetado 5' del PTO, (c) hibridar el fragmento liberado a partir del PTO con el CTO, en donde el fragmento liberado a partir del PTO se hibrida con la parte de captura del CTO, (d) llevar a cabo una reacción de extensión utilizando lo resultante de la etapa (c) y una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde, en donde el fragmento hibridado con la parte de captura del CTO se extiende para formar una cadena extendida, y (e) detectar la formación de la cadena extendida mediante la detección de la señal generada en dependencia de la presencia de la cadena extendida. En la etapa (a), puede utilizarse un conjunto de cebadores para la amplificación de la secuencia diana de ácido nucleico en lugar del oligonucleótido cadena arriba. En este caso, el método comprende, además, repetir la totalidad o algunas de las etapas (a) a (e) con desnaturización entre ciclos repetidos.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- En una realización, la señal generada por la formación de una dupla incluye señales inducidas por la hibridación de la dupla (p. ej., la hibridación de la dupla de por sí, o la hibridación de un oligonucleótido hibridante de la cadena extendida) o mediante inhibición de la hibridación de un oligonucleótido hibridante del oligonucleótido de captura debido a la formación de una dupla.
- En una realización, el oligonucleótido de detección puede estar compuesto de por lo menos un oligonucleótido. En una realización, en donde el oligonucleótido de detección está compuesto de una pluralidad de oligonucleótidos, puede marcarse de diversas maneras. Por ejemplo, un oligonucleótido de una pluralidad de oligonucleótidos puede presentar por lo menos una etiqueta, la totalidad de una pluralidad de oligonucleótidos puede presentar por lo menos una etiqueta, o una parte de oligonucleótidos puede presentar por lo menos una etiqueta y la otra parte puede no presentar una etiqueta.
- La dupla formada mediante hibridación del fragmento con un oligonucleótido correspondiente puede generarse mediante diversos métodos, incluyendo la publicación de patente US n.º 2018/0073056.
- En una realización, las duplas comprenden oligonucleótidos etiquetados que comprenden una etiqueta que presenta la misma propiedad de señal. La expresión utilizada en el presente documento "una etiqueta que presenta la misma propiedad de señal" se refiere a que la etiqueta presenta propiedades de señal idénticas o sustancialmente idénticas (p. ej., propiedades ópticas, longitud de onda de emisión y señal eléctrica). Por ejemplo, FAM y CAL Fluor 610 proporcionan diferentes propiedades de señal (p. ej., diferentes intervalos de longitud de onda de emisión) y FAM/Alexa Fluor 488, HEX/Alexa Fluor 532 y rojo de Texas/Alexa Fluor 594 puede considerarse que presentan las mismas propiedades de señal, respectivamente, debido a sus longitudes de onda de emisión sustancialmente idénticas.
- Las señales de las duplas que contienen una etiqueta que presenta las mismas propiedades de señal pueden detectarse mediante el mismo detectar o el mismo canal de detección. Sin embargo, las señales no pueden diferenciar adicionalmente qué duplas proporcionan las señales, de acuerdo con las tecnologías convencionales.
- La expresión utilizada en el presente documento "un detector o un canal de detección que presenta las mismas propiedades de señal" significa que el detector puede detectar propiedades de señal idénticas o sustancialmente idénticas.
- La pluralidad de duplas presenta valores T_f diferentes entre sí. El término utilizado en el presente documento " T_f " se refiere a una temperatura de fusión a la que la mitad de una población de moléculas de ácido nucleico de doble cadena se disocia en moléculas de cadena sencilla. El valor de T_f se determina a partir de la longitud y contenido de G/C de los nucleótidos hibridados. El valor de T_f puede calcularse mediante métodos convencionales, tales como la regla de Wallace (R.B. Wallace et al., Nucleic Acids Research, 6:3543-3547 (1979)) y el método del vecino más próximo (SantaLucia J. Jr. et al., Biochemistry, 35:3555-3562 (1996); Sugimoto N. et al., Nucleic Acids Res., 24:4501-4505 (1996)).

El valor de T_f de una dupla formada puede obtenerse empíricamente utilizando una secuencia diana de ácido nucleico estándar y una composición correspondiente generadora de señal. El valor actual de T_f de una dupla formada en una muestra puede medirse durante el análisis de la muestra.

- 5 La etiqueta útil en la presente invención incluye diversos marcas conocidos de la técnica. Por ejemplo, la etiqueta útil en la presente invención incluye un único marcate, una etiqueta dual interactivo, un pigmento intercalante y una etiqueta de incorporación. Por ejemplo, la etiqueta útil en la presente invención incluye una etiqueta fluorescente, una etiqueta luminiscente, una etiqueta quimioluminiscente, una etiqueta electroquímico y una etiqueta metal.
- 10 La etiqueta individual incluye, por ejemplo, una etiqueta fluorescente, una etiqueta luminiscente, una etiqueta quimioluminiscente, una etiqueta electroquímico y una etiqueta metal. En una realización, la etiqueta individual proporciona una señal diferente (p. ej., diferentes intensidades de señal) dependiendo de su presencia en una doble cadena o una cadena sencilla. En una realización, la etiqueta individual es una etiqueta fluorescente. Los tipos preferentes y sitios de unión de marcas fluorescentes individuales utilizados en la presente invención se dan a conocer en las patentes US n.º 7.537.886 y n.º 7.348.141.
- 15

Por ejemplo, la etiqueta fluorescente individual incluye JOE, FAM, TAMRA, ROX y marcate basado en la fluoresceína. La etiqueta individual puede unirse a oligonucleótidos mediante diversos métodos. Por ejemplo, la etiqueta se une a sondas mediante un espaciador que contiene átomos de carbono (p. ej., un espaciador de 3 carbonos, un espaciador de 6 carbonos o un espaciador de 12 carbonos).

Como representante del sistema de marcate interactivo, el sistema de marcate FRET (por sus siglas en inglés, transferencia por resonancia de fluorescencia) incluye una molécula informadora fluorescente (molécula donante) y una molécula inhibidora (molécula aceptora). En FRET, el donante de energía es fluorescente, pero el acceptor de energía puede ser fluorescente o no fluorescente. En otra forma de sistemas de marcate interactivo, el donante de energía es no fluorescente, p. ej., un cromóforo, y el acceptor de energía es fluorescente. En todavía otra forma de sistemas de marcate interactivo, el donante de energía es luminiscente, p. ej., bioluminiscente, quimioluminiscente, electroquimioluminiscente y el acceptor es fluorescente. El sistema de marcate interactivo incluye una etiqueta dual basado en "inhibición mediada por el contacto" (Salvatore et al., Nucleic Acids Research, 2000 (30), n.º 21 e122, y Johansson et al., J. Am. Chem. Soc. 2002 (124), páginas 6950 a 6956). El sistema de marcate interactivo incluye cualquier sistema de marcate en el que el cambio de señal sea inducido por la interacción entre por lo menos dos moléculas (p. ej., pigmentos).

35 La molécula informadora y la molécula inhibidora útiles en la presente invención pueden incluir cualesquier moléculas conocidas de la técnica. Son ejemplos de ellas: Cy2™ (506), YO-PRO™-1 (509), YOYO™-1 (509), calceína (517), FITC (518), Fluor X™ (519), Alexa™ (520), rodamina-110 (520), Oregon Green™ 500 (522), Oregon Green™ 488 (524), RiboGreen™ (525), Rhodamine Green™ (527), Rhodamine 123 (529), Magnesium Green™ (531), Calcium Green™ (533), TO-PRO™-1 (533), TOTO1 (533), JOE (548), BODIPY530/550 (550), Dil (565), BODIPY TMR (568), BODIPY558/568 (568), BODIPY564/570 (570), Cy3™ (570), Alexa™ 546 (570), TRITC (572), Magnesium Orange™ (575), ficoeritrina R&B (575), rodamina faloidina (575), Calcium Orange™ (576), pironina-Y (580), rodamina-B (580), TAMRA (582), Rhodamine Red™ (590), Cy3.5™ (596), ROX (608), Calcium Crimson™ (615), Alexa™ 594 (615), rojo Texas (615), rojo del Nilo (628), YO-PRO™-3 (631), YOYO™-3 (631), R-fiocianina (642), C-fiocianina (648), TO-PRO™-3 (660), TOTO3 (660), DiD DilC(5) (665), Cy5™ (670), tiadicarbocianina (671), Cy5.5 (694), HEX (556), TET (536), Biosearch Blue (447), CAL Fluor Gold 540 (544), CAL Fluor Orange 560 (559), CAL Fluor Red 590 (591), CAL Fluor Red 610 (610), CAL Fluor Red 635 (637), FAM (520), fluoresceína (520), fluoresceína-C3 (520), Pulsar 650 (566), Quasar 570 (667), Quasar 670 (705) y Quasar 705 (610). Los números entre paréntesis son de longitud de onda máxima de emisión, en nanómetros. Preferentemente, la molécula informadora y la molécula inhibidora incluyen JOE, FAM, TAMRA, ROX y marcate basado en fluoresceína.

40

45

50

55

60

65

En el sistema de señalización que comprende las moléculas de informador e inhibidor, el informador comprende un donador de FRET y el inhibidor comprende la otra pareja (aceptor) de FRET. Por ejemplo, se utiliza un pigmento fluoresceína como el informador y un pigmento rodamina como el inhibidor.

- 5 La etiqueta dual interactivo puede unirse a una cadena de una dupla. En donde la cadena que contiene la etiqueta dual interactivo sale en un estado de cadena sencilla, forma una horquilla o estructura de hélice aleatoria para inducir la inhibición entre la etiqueta dual interactivo. Donde la cadena forma una dupla, se alivia la inhibición.
- 10 Alternativamente, donde la etiqueta dual interactivo está unido a nucleótidos ubicados contiguamente en la cadena, ocurre la inhibición entre la etiqueta dual interactivo. Donde la cadena forma una dupla y después es cortada, se alivia la inhibición.
- 15 Cada uno de los marcas de los marcas interactivos puede estar unido a cada una de las dos cadenas de la dupla. La formación de la dupla induce la inhibición, y la desnaturalización de la dupla induce la desinhibición. Alternativamente, en donde se corta una de las dos cadenas, puede inducirse la desinhibición.
- 20 La etiqueta de incorporación puede utilizarse en n procedimiento para generar señales mediante la incorporación de una etiqueta durante la extensión del cebador (p. ej., el método Plexor, Sherrill C.B. et al., Journal of the American Chemical Society, 126:4550-45569 (2004)). La etiqueta de incorporación puede utilizarse, además, en la generación de una señal por una dupla formada de una manera dependiente de la escisión de un oligonucleótido de mediación hibridado con la secuencia diana de ácido nucleico.
- 25 La etiqueta de incorporación puede unirse generalmente a nucleótidos. También puede utilizarse el nucleótido que presenta una base no natural.
- 30 La expresión utilizada en el presente documento "base no natural" se refiere a derivados de bases naturales, tales como adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U), que son capaces de formar pares de bases de enlace de hidrógeno. La expresión utilizada en el presente documento "base no natural" incluye ases que presentan patrones de apareamiento de bases diferentes de los de las bases naturales como compuestos madre, tal como se describe en, pro ejemplo, las patentes US n.º 5.432.272, n.º 5.965.364, n.º 6.001.983 y n.º 6.037.120. El apareamiento de bases entre bases no naturales implica dos o tres enlaces de hidrógeno como bases naturales. El apareamiento de bases entre bases no naturales también se forma de una manera específica. Entre los ejemplos específicos de bases no naturales se incluyen las bases siguientes en combinaciones de pares de bases: iso-C/iso-G, iso-dC/iso-dG, K/X, H/J y M/N (ver la patente US n.º 7.422.850).
- 35 Donde la señal se genera mediante el método PTOCE, un nucleótido incorporado durante la reacción de extensión puede presentar una primera base no natural y el CTO puede presentar un nucleótido que presenta una segunda base no natural con una afinidad de unión específica para la primera base no natural.
- 40 La expresión utilizada en el presente documento "ácido nucleico diana", "secuencia diana de ácido nucleico" o "secuencia diana" se refiere a una secuencia de ácido nucleico de interés para la detección o cuantificación. La secuencia diana de ácido nucleico comprende una secuencia en una única cadena, así como en una doble cadena. La secuencia diana de ácido nucleico comprende una secuencia presente inicialmente en una muestra de ácido nucleico, así como una secuencia nuevamente generada en reacciones.
- 45 La secuencia diana de ácido nucleico puede incluir cualquier ADN (ADNg y ADNc), moléculas de ARN y sus híbridos (ácido nucleico químérico). La secuencia puede encontrarse en forma de doble cadena o de cadena sencilla. En donde el ácido nucleico como material de partida es de doble cadena, resulta preferente convertir las dos cadenas a una forma de cadena sencilla o parcialmente de cadena sencilla. Entre los métodos conocidos para separar cadenas se incluyen, aunque sin limitación, el calentamiento, y el tratamiento con álcali, formamida, urea y glicoxal, los métodos enzimáticos (p. ej., la acción de helicasas) y las proteínas de unión. Por ejemplo, la separación de cadenas puede llevarse a cabo mediante calentamiento a temperaturas comprendidas entre 80 °C y 105 °C. Los métodos generales para llevar a cabo dicho tratamiento se proporcionan en Joseph Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001).
- 50 En donde se utiliza un ARNm como material de partida, resulta necesaria una etapa de transcripción inversa anterior a la realización de la etapa de apareamiento; se proporcionan detalles de la misma en Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), y Noonan, K.F. et al., Nucleic Acids Res. 16:10366 (1988). Para la transcripción inversa, puede utilizarse un cebador oligonucleótido dT hibridable con la cola poli-A del ARNm, cebadores aleatorios o cebadores específicos de diana.
- 55 La secuencia diana de ácido nucleico incluye cualquier ácido nucleico natural procariótico, eucariótico (por ejemplo, de protozoos y parásitos, hongos, levaduras, plantas superiores, animales inferiores y superiores, incluyendo mamíferos y seres humanos), víricos (por ejemplo, virus herpes, VIH, virus influenza, virus de Epstein-Barr, virus de la hepatitis, virus polio, etc.) o ácido nucleico viroides. La molécula de ácido nucleico también puede ser cualquier molécula de ácido nucleico que ha sido o puede producirse recombinantemente o sintetizarse químicamente. De esta manera, la secuencia de ácido nucleico puede encontrarse o no en la naturaleza. La secuencia diana de ácido nucleico puede incluir secuencias conocidas o no conocidas.
- 60

- El término "muestra" se refiere a cualquier material que contiene o se supone que contiene un ácido nucleico de interés o que es en sí mismo un ácido nucleico. Más particularmente, el término "muestra" tal como se utiliza en el presente documento incluye muestras biológicas (p. ej., células, tejidos y líquidos de un origen biológico) y muestras no biológicas (p. ej., alimento, agua y suelo). Las muestras biológicas incluyen, aunque sin limitación, virus, bacterias, 5 tejidos, células, sangre, suero, plasma, linfa, esputo, hisopo, aspirado, líquido de lavado broncoalveolar, leche, orina, heces, líquido ocular, saliva, semen, extractos cerebrales, líquido cefalorraquídeo (LCR), extractos tisulares de apéndice, bazo y amígdala, líquido amniótico y líquido ascítico. La muestra puede someterse a pretratamientos, tales como la lisis y el calentamiento, o a un procedimiento de extracción de ácidos nucleicos conocidos de la técnica para reacciones de amplificación eficientes (ver Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3a edición, 10 Cold Spring Harbor (2001)). El procedimiento de extracción de ácidos nucleicos puede variar dependiendo del tipo de muestra. Además, en el caso de que el ácido nucleico extraído sea ARN, se lleva a cabo además una transcripción inversa para sintetizar ADNc a partir del mismo (ver anteriormente).
- Una composición generadora de señal puede incluir enzimas para la escisión de los oligonucleótidos y/o para una 15 polimerización de ácido nucleico, tal como una nucleasa 5', una nucleasa 3', una nucleasa FEN, un enzima de restricción, una polimerización de ácido nucleico y una polimerasa de ácidos nucleicos que presenta actividad de nucleasa 5', una polimerasa de ácidos nucleicos que presenta actividad de nucleasa 3'.
- Las composiciones generadoras de señal para las diferentes dianas pueden incluir componentes comunes, tales como 20 una polimerasa de ácidos nucleicos.
- El número de las secuencias diana de ácidos nucleicos que van a detectarse mediante duplas que incluyen propiedades de señales idénticas dla etiqueta en un único recipiente de reacción incluye más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 25 9 y 10 secuencias diana de ácido nucleico en el único recipiente de reacción.
- Un control interno puede contarse como una secuencia diana de ácido nucleico detectada mediante el presente método. 30
- A menos que se indique lo contrario, "una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico" en la expresión utilizada en el presente documento "detectar una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico en una muestra en un único recipiente de reacción" puede referirse a secuencias diana de ácido nucleico que van a detectarse mediante una etiqueta que presenta la misma propiedad de señal. Pueden estar presentes otras secuencias diana de ácido nucleico en el recipiente de reacción idéntico que pueden detectarse por diferentes marcas que presentan diferentes 35 propiedades de señal.
- En el recipiente de reacción único, puede detectarse una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico mediante la utilización de por lo menos dos tipos de marcas, cada uno de los cuales presente una propiedad de señal diferente. Cada marca que presenta una propiedad de señal diferente puede utilizarse para detectar una o más secuencias diana de ácido nucleico, respectivamente. En una realización, las duplas que contienen una propiedad de señal 40 idéntica a la dla etiqueta presentan valores Tf diferentes. Las señales de marcas que presentan una propiedad de señal diferente se detectan mediante detectores diferentes, por ejemplo, diferentes canales de detección.
- Por ejemplo, algunas duplas para algunas secuencias diana de ácido nucleico se marcan con FAM y otras duplas para 45 otras secuencias diana de ácido nucleico, con Cal red 610. Se utilizan dos tipos de detectores (es decir, dos canales de detección) para detectar dos luces de emisión diferentes. Pueden utilizarse por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete tipos de marcas en un único recipiente de reacción.
- El número de secuencias diana de ácido nucleico que van a detectarse incluye más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 50 18, 20, 25 y 30 secuencias diana de ácido nucleico en el recipiente de reacción único.
- Etapa: reacción durante por lo menos dos ciclos (120).*
- Se lleva a cabo una reacción en por lo menos dos ciclos para (i) la formación de la pluralidad de duplas y (ii) la 55 disociación de las duplas. Los materiales de las composiciones generadoras de señal pueden participar en la reacción, proporcionando duplas correspondientes de manera dependiente de la presencia o ausencia de secuencias diana de ácido nucleico.
- En una realización, la reacción se lleva a cabo bajo condiciones que permiten la formación de las duplas y la generación de señal a partir de las duplas. Entre tales condiciones se incluyen la temperatura, las concentraciones 60 salinas y el pH de las soluciones.
- En una realización de la presente invención, durante la reacción, se incrementa el número de duplas de una secuencia diana de ácido nucleico y se amplifica la intensidad de la señal del tipo de duplas.
- 65 La posición dla etiqueta en una dupla puede proporcionar diferentes patrones de temperatura vs. señal. Por ejemplo, en donde une la etiqueta dual interactivo (p. ej., una molécula informadora fluorescente y una molécula inhibidora) a

una cadena de una dupla, a medida que se incrementa la temperatura, puede reducirse la intensidad de señal del grupo de las duplas. Alternativamente, en donde se une una de la molécula informadora fluorescente y una molécula inhibidora a una cadena y el otro marcaje se une a la otra cadena de la dupla, la intensidad de señal del grupo de las duplas puede incrementarse con la temperatura.

- 5 La reacción del presente método puede denominarse "procedimiento generador de señal". La expresión utilizada en el presente documento "procedimiento generador de señal" se refiere a cualquier procedimiento capaz de generar señales de una manera dependiente de la presencia o ausencia de una secuencia diana de ácido nucleico en una muestra.
- 10 10 El procedimiento de generación de señal se ve acompañado por un cambio de señal. El término "señal" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un resultado medible.
- 15 15 El progreso de la reacción generadora de señal se evalúa mediante la medición de la señal. Un valor de la señal o un cambio de la señal puede servir de indicador que indique una propiedad del analito diana, en particular cualitativa o cuantitativamente la presencia o la ausencia del analito diana. El cambio de señal puede comprender una reducción de la señal, así como un incremento de la señal.
- 20 20 Entre los ejemplos de indicadores útiles se incluyen la intensidad de fluorescencia, la intensidad de luminiscencia, la intensidad de quimioluminiscencia, la intensidad de bioluminiscencia, la intensidad de fosforescencia, la transferencia de carga, el voltaje, la corriente, la potencia, la energía, la temperatura, la viscosidad, la dispersión lumínica, la intensidad radioactiva, la reflectividad, la transmitancia y la absorbancia. El indicador más ampliamente utilizado es la intensidad de fluorescencia.
- 25 25 La expresión utilizada en el presente documento "generación de señal" incluye la aparición o desaparición de señales y el incremento o disminución de señales. En particular, la expresión "generación de señal" se refiere al incremento de señales.
- 30 30 En una realización, el procedimiento generador de señal es un procedimiento de amplificación de señal.
- 35 35 La expresión utilizada en el presente documento "reacción de amplificación" se refiere a una reacción para incrementar o disminuir las señales.
- 40 40 En una realización, la reacción de amplificación se refiere a un incremento (o amplificación) de una señal generada dependiendo de la presencia de la secuencia diana de ácido nucleico mediante la utilización de la composición generadora de señal. En una realización, la reacción de amplificación se refiere a un incremento (o amplificación) de señal por el incremento del número de una dupla para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente. La reacción de amplificación se acompaña o no de una amplificación de la secuencia diana de ácido nucleico. Más particularmente, la reacción de amplificación de la presente invención se refiere a una reacción de amplificación de señal realizada con una amplificación de la secuencia diana de ácido nucleico.
- 45 45 El conjunto de datos obtenido de una reacción de amplificación comprende un ciclo de amplificación o número de ciclo.
- 50 50 50 El término utilizado en el presente documento "ciclo" se refiere a una unidad de cambios de condiciones en una pluralidad de mediciones acompañada de cambios de condiciones. Por ejemplo, los cambios de condiciones se refiere a un incremento o disminución de la temperatura, tiempo de reacción, número de reacción, concentración, pH y/o número de replicación de un sujeto medido (p. ej., molécula diana de ácido nucleico). Por lo tanto, el ciclo puede referirse a un tiempo o a un ciclo del procedimiento, a un ciclo operativo de una unidad y a un ciclo reproductor.
- 55 55 En otro ejemplo, en el caso de que se lleve a cabo una amplificación isotérmica de ácidos nucleicos, la señales de una única muestra se miden múltiples veces a un intervalo regular de veces bajo condiciones isotérmicas. En esta reacción, el tiempo de reacción puede corresponder a los cambios de condiciones y una unidad del tiempo de reacción puede corresponder a un ciclo.
- 60 60 Particularmente, en el caso de que se repita una serie de reacciones o se repita una reacción en un intervalo de tiempo, el término "ciclo" se refiere a una unidad de la repetición.
- 65 65 Por ejemplo, en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), un ciclo se refiere a una unidad de reacción que comprende la desnaturalización de una molécula diana de ácido nucleico, el apareamiento (hibridación) entre la molécula diana de ácido nucleico y cebadores, y la extensión de los cebadores. Los incrementos en la repetición de las reacciones pueden corresponder a los cambios de condiciones y una unidad de la repetición puede corresponder a un ciclo.
- 65 65 Un conjunto de datos obtenido de un procedimiento generador de señal comprende una pluralidad de puntos de datos que comprende números de ciclo y valores de señal.

- En una realización, la reacción de amplificación para amplificar señales indicativa de la presencia de la molécula diana de ácido nucleico se lleva a cabo de manera que se amplifican las señales simultáneamente a la amplificación de la molécula diana de ácido nucleico (p. ej., PCR en tiempo real). Alternativamente, la reacción de amplificación se lleva a cabo de tal manera que se amplifican señales sin ninguna amplificación de la molécula diana de ácido nucleico.
- En la presente invención, el número de una dupla que genera una señal puede amplificarse simultáneamente a la amplificación de la diana. Alternativamente, el número de una dupla que genera una señal puede amplificarse sin amplificación de la diana.
- En una realización, la composición generadora de señal comprende por lo menos una pareja de cebadores para amplificar la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico y la reacción de duplas se ve acompañada por la amplificación de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico.
- Las secuencias diana de ácido nucleico pueden amplificarse mediante diversos métodos. Por ejemplo, se conoce una multitud de métodos para la amplificación de un analito diana, incluyendo, aunque sin limitación, PCR (reacción en cadena de la polimerasa), LCR (por sus siglas en inglés, reacción en cadena de la ligasa; ver las patentes US n.º 4683195 y n.º 4683202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., editores, 1990), SDA (por sus siglas en inglés, amplificación por desplazamiento de cadena) (Walker et al., Nucleic Acids Res. 20(7):1691-6 (1992); Walker, PCR Methods Appl. 3(1):1-6 (1993)), amplificación mediada por transcripción (Phyffer et al., J. Clin. Microbiol. 34:834-841 (1996); Vuorinen et al., J. Clin. Microbiol. 33:1856-1859 (1995), NASBA (por sus siglas en inglés, amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos; ver Compton J., Nature 350(6313):91-2 (1991), amplificación por círculo rodante, RCA, por sus siglas en inglés) (Lisby, Mol. Biotechnol. 12(1):75-99 (1999); Hatch et al., Genet. Anal. 15(2):35-40 (1999), o Q-beta (replicasa Q-beta) (Lizardi et al., Bio/Tecnology 6:1197 (1988)).
- En una realización, la reacción de amplificación puede amplificar señales simultáneamente con la amplificación del analito diana, particularmente la molécula diana de ácido nucleico. En una realización, la reacción de amplificación se lleva a cabo de acuerdo con una PCR o una PCR en tiempo real.
- La polimerasa de ácidos nucleicos útil en la presente invención es una ADN polimerasa termoestable obtenida de una variedad de especies bacterianas, incluyendo *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavius*, *Thermococcus literalis*, *Thermus antranikianii*, *Thermus caldophilus*, *Thermus chilarophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus igniterrae*, *Thermus lacteus*, *Thermus oshimai*, *Thermus ruber*, *Thermus rubens*, *Thermus scotoductus*, *Thermus silvanus*, *Thermus species Z05*, *Thermus species ssp 17*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosipho africanus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus barossi*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosipho africanus*, *Pyrococcus woesei*, *Pyrococcus horikoshii*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrodictium occultum*, *Aquifex pyrophilus* y *Aquifex aeoleus*. Particularmente, la ADN polimerasa termoestable es la polimerasa Taq.
- En una realización, la amplificación de la secuencia diana de ácido nucleico se lleva a cabo mediante una PCR asimétrica. La proporción de cebadores puede seleccionarse considerando la escisión o la hibridación de los oligonucleótidos situados cadena abajo.
- En una realización, se lleva a cabo una reacción durante por lo menos 2 ciclos, por lo menos 5 ciclos, por lo menos 10 ciclos, por lo menos 20 ciclos, por lo menos 30 ciclos, por lo menos 40 ciclos, por lo menos 45 ciclos o por lo menos 50 ciclos. En una realización, se lleva a cabo una reacción durante como máximo 100 ciclos, como máximo 90 ciclos, como máximo 80 ciclos, como máximo 70 ciclos o como máximo 60 ciclos.
- Etapa: obtención de valores de señal (130).*
- Se obtienen valores de señal en todos o una parte de los ciclos de la reacción a por lo menos dos temperaturas de detección en cada uno de una pluralidad de intervalos de temperatura de detección asignados a la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico. Cada uno de la pluralidad de intervalos de temperatura de detección comprende un intervalo de temperaturas en el que ha cambiado la cantidad de una dupla para cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente.
- Durante la reacción, las señales pueden medirse a una pluralidad de temperaturas de detección.
- Las dos o más temperaturas de detección se utilizan para la detección de una única secuencia diana de ácido nucleico.
- Para cada secuencia diana de ácido nucleico, las dos o más temperaturas de detección a las que deben obtenerse los valores de señal pueden predeterminarse a partir de cada intervalo de temperatura de detección.
- A modo de un ejemplo, las dos o más temperaturas de detección pueden determinarse para cada secuencia diana de ácido nucleico y después combinarse para determinar finalmente todas las temperaturas de detección para toda la

reacción. A modo de otro ejemplo, pueden determinarse todas las temperaturas de detección para la reacción entera y después asignarse a las dos o más temperaturas de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico.

- 5 El intervalo de temperatura de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico puede ser un intervalo de temperatura del que se seleccionan por lo menos dos temperaturas de detección para una secuencia diana de ácido nucleico correspondiente. Alternativamente, el intervalo de temperaturas de detección puede ser uno que se forma o posiciona a partir de las dos o más temperaturas de detección asignadas a cada secuencia diana de ácido nucleico.
- 10 En una realización, el intervalo de temperatura de detección asignado a cada secuencia diana de ácido nucleico está sujetos a los requisitos.
- 15 En una realización de la invención, las dos o más temperaturas de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico se determinan de manera que satisfagan los requisitos para como mínimo las temperaturas de detección, así como los requisitos para el intervalo de temperatura de detección.
- 15 Las dos o más temperaturas de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico (o el intervalo de temperatura de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico) puede seleccionarse considerando el cambio en el valor de señal con las temperaturas, para una dupla derivado de cada secuencia diana de ácido nucleico.
- 20 Las temperaturas que afectan a la hibridación/disociación de una dupla pueden dividirse del modo siguiente: (i) un intervalo de temperatura en el que la dupla se encuentra en un estado hibridado, (ii) un intervalo de temperatura en el que la dupla está cambiando de un estado hibridado a un estado disociado (es decir, un intervalo de temperatura en el que ocurre la disociación de la dupla, o en el que ocurre la hibridación de la dupla, y (iii) un intervalo de temperatura en el que la dupla se encuentra en un estado disociado.
- 25 La morfología de la dupla en dichos intervalos de temperatura pretende indicar la dominancia probabilística de la misma, aunque no está absolutamente limitada a esa morfología.
- 30 En el caso de que esté presente una pluralidad de duplas, la mayoría de las duplas se encuentran en un estado hibridado a cualquier temperatura inferior al intervalo de temperatura en el que la dupla está cambiando de un estado hibridado a un estado disociado (es decir, el intervalo de temperatura en que ocurre la disociación), no causando de esta manera ningún cambio sustancial de la cantidad de las duplas; la mayoría de las duplas se encuentra en estado disociado a cualquier temperatura superior al intervalo de temperatura en el que la dupla está cambiando de un estado hibridado a un estado disociado (es decir, el intervalo de temperatura en que ocurre la disociación), no causando de esta manera ninguna cambio sustancial en la cantidad de las duplas. Por otra parte, para el intervalo de temperatura en el que está cambiando la dupla de un estado hibridado a un estado disociado (es decir, el intervalo de temperatura en que ocurre la disociación), tiene lugar más disociación a temperaturas más altas, causando de esta manera un cambio en la cantidad de duplas con las temperaturas.
- 35
- 40 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "un [el] intervalo de temperatura en el que no cambia sustancialmente la cantidad de una dupla" se refiere a un intervalo de temperatura en el que el cambio en la cantidad de una dupla por unidad de temperatura dentro del intervalo de temperatura es no superior a 10 %, 8 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 %.
- 45 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "una [la] cantidad de una dupla" se refiere a la cantidad o número de dos cadenas hibridadas entre sí, que constituyen una dupla.
- 50 En el caso de que la dupla proporcione un valor de señal dependiendo de la formación de la dupla, la dupla puede proporcionar una curva de fusión que muestra el cambio en el valor de señal con las temperaturas.
- 55 La FIG. 2 muestra las curvas de fusión de tres duplas con diferentes valores T_f .
- 60 En la FIG. 2, las duplas muestran un patrón en el que la señal disminuye a medida que se incrementa la temperatura. En la FIG. 2, cada uno de las duplas presenta una etiqueta, de manera que proporciona una señal con la hibridación de dos cadenas de los mismos y no proporciona una señal con la disociación de las dos cadenas de los mismos. Por ejemplo, cada uno de las duplas presenta una etiqueta dual interactivo unido a cualquiera de las dos cadenas de los mismos. En el caso de que cada uno de las duplas presente una etiqueta de manera que no proporcione una señal con la hibridación de las dos cadenas de los mismos pero proporcione una señal con la disociación de las dos cadenas de los mismos, la señal se incrementará a medida que se incremente la temperatura.
- 65 En una realización de la presente invención, el intervalo de temperatura de detección (ver la FIG. 2; primer intervalo de temperatura de detección, segundo intervalo de temperatura de detección o tercer intervalo de temperatura de detección) comprende un intervalo de temperatura en el que ha cambiado la cantidad de una dupla para cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente.

En una realización, por lo menos una temperatura de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente se encuentra comprendida dentro de un intervalo de temperatura en el que ha cambiado la cantidad de una dupla para cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente.

5 La totalidad o parte del intervalo de temperatura en el que ocurre la disociación de la dupla puede ser el intervalo de temperatura en el que ha cambiado la cantidad de una dupla para cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente.

10 En una realización, el intervalo de temperatura de detección puede comprender, además, un intervalo de temperatura en el que se mantiene sin cambios la cantidad de una dupla para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente. Por ejemplo, el intervalo de temperatura de detección es un intervalo de temperatura en el que la mayor parte de las duplas para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente se encuentran en un estado hibridado o en un estado disociado. En una realización, por lo menos una temperatura de detección para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente se encuentra comprendida dentro de un intervalo de temperatura en el que la mayoría de las duplas se encuentran en un estado hibridado o en un estado disociado.

15 El intervalo de temperatura de detección es un intervalo de temperatura en el que la cantidad de una dupla para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente ha cambiado, pero en que se mantiene sin cambios la cantidad de duplas para otras secuencias diana de ácido nucleico.

20 La FIG. 2 ilustra tres intervalos de temperatura de detección para tres secuencias diana de ácido nucleico. Cada uno de la pluralidad de intervalos de temperatura de detección corresponde a cada una de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico. Por ejemplo, el primer intervalo de temperatura de detección es un intervalo de temperatura para detectar la primera secuencia diana de ácido nucleico, el segundo intervalo de temperatura de detección para detectar la segunda secuencia diana de ácido nucleico, y el tercer intervalo de temperatura de detección para la tercera secuencia diana de ácido nucleico.

25 En la FIG. 2, el primer intervalo de temperatura de detección es un intervalo de temperatura en el que cambia la cantidad de una dupla para la primera secuencia diana de ácido nucleico; el segundo intervalo de temperatura de detección es un intervalo de temperatura en el que cambia la cantidad de una dupla para la segunda secuencia diana de ácido nucleico, y el tercer intervalo de temperatura de detección es un intervalo de temperatura en el que cambia la cantidad de una dupla para la tercera secuencia diana de ácido nucleico. Particularmente, cada uno de los intervalos de temperatura de detección es un intervalo de temperatura en el que se mantiene sin cambios la cantidad de duplas para las demás secuencias diana de ácido nucleico.

30 35 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "un [el] intervalo de temperatura en el que ha cambiado la cantidad de una dupla para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente, pero se mantiene sin cambios la cantidad de duplas para las demás secuencias diana de ácido nucleico" pretende comprender un intervalo de temperatura en el que la cantidad de duplas para otras secuencias diana de ácido nucleico no cambia en absoluto, así como un intervalo de temperatura en el que la cantidad de duplas para otras secuencias diana de ácido nucleico cambia muy poco. En una realización, cada uno de la pluralidad de intervalos de temperatura de detección se selecciona de un intervalo de temperatura en el que la proporción entre la cantidad de cambio de señal generada por las duplas para las demás secuencias diana de ácido nucleico y la cantidad de cambio de señal generada por la dupla para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente es no superior a 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 2 % o 1 %.

40 45 Por ejemplo, en el caso de la presencia de una primera secuencia diana de ácido nucleico, una segunda secuencia diana de ácido nucleico y una tercera secuencia diana de ácido nucleico en una muestra, el primer intervalo de temperatura de detección es un intervalo de temperatura en el que la señal para la primera secuencia diana de ácido nucleico ha cambiado pero las señales para la segunda y tercera secuencias diana de ácido nucleico se mantienen sustancialmente sin cambios. El segundo intervalo de temperatura de detección es un intervalo de temperatura en el que la señal para la segunda secuencia diana de ácido nucleico ha cambiado, pero las señales para la primera y la tercera secuencia diana de ácido nucleico se mantienen sustancialmente sin cambios. El tercer intervalo de temperatura de detección es un intervalo en el que la señal para la tercera secuencia diana de ácido nucleico ha cambiado, pero las señales para la primera y la segunda secuencia diana de ácido nucleico se mantienen sustancialmente sin cambios.

50 55 60 65 Según una realización, el intervalo de temperatura de detección para una secuencia diana de ácido nucleico puede comprender una parte limitada de un intervalo de temperatura en el que la cantidad de duplas para las demás secuencias diana de ácido nucleico no ha cambiado. Por ejemplo, la cantidad de cambio para las señales generadas por las duplas para las demás secuencias diana de ácido nucleico en el intervalo de temperatura solapado puede ser no superior a 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % de la cantidad total de cambio de las señales generadas. Por ejemplo, un intervalo de temperatura para una secuencia diana de ácido nucleico puede solaparse con los intervalos de temperatura para otras secuencias diana de ácido nucleico en 10 °C, 5 °C, 4 °C, 3 °C, 2,5 °C, 2 °C, 1,5 °C o 1 °C.

En una realización, el intervalo de temperatura de detección comprende un intervalo de temperatura en el que la cantidad de una dupla para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente ha cambiado y no comprende, o comprende una parte, de un intervalo de temperatura en el que ha cambiado la cantidad de los demás duplas.

- 5 En una realización, el intervalo de temperatura de detección para cada una de las secuencias diana de ácido nucleico puede determinarse de manera que no se solape con los intervalos de temperatura de detección para las demás secuencias diana de ácido nucleico.
 - 10 La gran diferencia en los valores T_f entre los diferentes duplas puede permitir que los intervalos de temperatura de detección no se solapen entre sí. Incluso cuando la diferencia en los valores T_f entre los diferentes duplas es pequeña, los intervalos de temperatura de detección pueden no solaparse entre sí mediante el ajuste del número o el espaciado de las temperaturas de detección.
 - 15 En una realización, el intervalo de temperatura de detección para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente puede solaparse con los intervalos de temperatura de detección para las demás secuencias diana de ácido nucleico. En particular, el intervalo de temperatura solapante es no superior a 10 °C, 5 °C, 4 °C, 3 °C, 2,5 °C, 2 °C, 1,5 °C o 1 °C.
 - 20 En una realización, la pluralidad de composiciones generadoras de señal están diseñadas de manera que las T_f de las duplas proporcionados por las composiciones generadoras de señal están suficientemente espaciados entre sí con el fin de evitar que se solapen entre sí los intervalos de temperatura en los que la cantidad de una dupla para cada una de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico se mantiene sin cambios. En el caso de que haya un solapamiento entre algunos de los intervalos de temperatura en los que ha cambiado la cantidad de una dupla para cada una de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico, se fijan los intervalos de temperatura de detección para minimizar su solapamiento.
 - 25 En una realización, cada uno de los intervalos de temperatura de detección se fija para cubrir el valor esperado de T_f de una dupla para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente.
 - 30 En una realización, el intervalo de temperatura de detección para cada una de las secuencias diana de ácido nucleico es inferior a 20 °C, 15 °C, 10 °C, 6 °C, 5 °C, 4 °C o 3 °C.
 - 35 En una realización, el intervalo de temperatura de detección puede representarse mediante el intervalo entre la temperatura de detección más alta y la temperatura de detección más baja.
 - 40 En una realización, el intervalo de temperatura de detección para cada una de las secuencias diana de ácido nucleico es $T_f \pm 10$ °C, $T_f \pm 8$ °C, $T_f \pm 5$ °C, $T_f \pm 3$ °C, $T_f \pm 2$ °C, $T_f \pm 1,5$ °C o $T_f \pm 1$ °C, en donde T_f indica el valor de T_f de la dupla correspondiente.
 - 45 Los valores de señal se obtienen a por lo menos dos temperaturas de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico.
 - 50 En una realización, los valores de señal se obtienen a dos temperaturas de detección dentro del intervalo de temperatura de detección asignado a cada secuencia diana de ácido nucleico.
 - 55 En una realización particular de la presente invención, los valores de señal se obtienen a tres (3), cuatro (4), cinco (5), seis (6), siete (7), ocho (8), nueve (9) o diez (10) temperaturas de detección dentro del intervalo de temperatura de detección asignado a cada secuencia diana de ácido nucleico.
 - 60 En una realización, los valores de señal se obtienen a no menos de dos, tres, cinco, diez o quince temperaturas de detección dentro de un intervalo de temperatura de detección asignado a cada secuencia diana de ácido nucleico.
 - 65 En una realización, los valores de señal se obtienen a no más de 100, 70, 50, 40, 30, 20 o 10 temperaturas dentro del intervalo de temperatura de detección asignado a cada secuencia diana de ácido nucleico.
- En una realización, dos o más de las temperaturas de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico son temperaturas de detección a las que la dupla correspondiente proporciona valores de señal sustancialmente diferentes. Por ejemplo, en el caso de que se utilicen dos temperaturas de detección, las dos temperaturas de detección se espacian una de otra de manera que la dupla correspondiente proporcione diferentes valores de señal a las dos temperaturas de detección. Por ejemplo, las dos temperaturas de detección se espacian una de otra por no más de 0,1 °C, 0,2 °C, 0,5 °C o 1 °C. Alternativamente, las dos temperaturas de detección no se seleccionan de un intervalo de temperatura en el que la dupla se encuentra en un estado hibrido, o las dos temperaturas de detección no se seleccionan de un intervalo de temperatura en el que la dupla se encuentra en un estado disociado.

- En una realización, las dos o más temperaturas de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico son temperaturas de detección a las que la dupla correspondiente proporciona valores de señal sustancialmente diferentes.
- 5 En una realización, las dos o más temperaturas de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico comprenden por lo menos dos temperaturas seleccionadas de un intervalo de temperatura en el que ha cambiado la cantidad de una dupla para el ácido nucleico diana correspondiente.
- 10 La FIG. 3 ilustra la selección de dos temperaturas de selección de un intervalo de temperatura en el que ha cambiado la cantidad de la dupla correspondiente.
- 15 En una realización, algunas de las dos o más temperaturas de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico se seleccionan de un intervalo de temperatura en el que ha cambiado la cantidad de una dupla para una secuencia diana de ácido nucleico correspondiente, y el resto se selecciona de un intervalo de temperatura en el que se mantiene sin cambios la cantidad de una dupla para la secuencia diana de ácido nucleico.
- 20 En una realización, algunas de las dos o más temperaturas de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico puede seleccionarse de un intervalo de temperatura en el que la dupla se encuentra en un estado hibrido y las demás pueden seleccionarse de un intervalo de temperatura en el que la dupla se encuentra en un estado disociado.
- 25 En una realización, las dos o más temperaturas de detección se seleccionan de manera que un valor de T_f esperado de la dupla para cada secuencia de ácido nucleico correspondiente se encuentra comprendida entre la temperatura de detección más alta y la temperatura de detección más baja de las dos o más temperaturas de detección.
- 30 En una realización, el espaciado de las temperaturas de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico era no superior a 5 °C, 4 °C, 3 °C, 2,5 °C, 2 °C, 1,5 °C, 1 °C, 0,5 °C o 0,1 °C.
- 35 En una realización, las dos o más temperaturas de detección comprenden una temperatura de detección más alta y una temperatura de detección más baja entre las cuales no hay una diferencia superior a 20 °C, superior a 15 °C, superior a 10 °C, superior a 8 °C, superior a 7 °C, superior a 6 °C, superior a 5 °C, superior a 4 °C o superior a 3 °C.
- 40 En una realización, las dos o más temperaturas de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico son $T_f \pm 10$ °C, $T_f \pm 8$ °C, $T_f \pm 5$ °C, $T_f \pm 2$ °C o $T_f \pm 1,5$ °C, en donde T_f indica un valor de T_f de la dupla correspondiente.
- 45 En una realización, las dos o más temperaturas de detección para diferencias secuencias diana de ácido nucleico pueden solaparse. En particular, en el caso de la selección de dos de la pluralidad de temperaturas detectadas a modo de las temperaturas de referencia de acuerdo con el presente método, puede ocurrir un solapamiento entre las temperaturas de detección.
- 50 En una realización, el número de temperaturas de detección solapadas para dos secuencias diana de ácido nucleico diferentes puede ser uno (1), dos (2), tres (3), cuatro (4) o cinco (5).
- 55 En una realización, las dos o más temperaturas de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico no se solapan con las temperaturas de detección para las demás secuencias diana de ácido nucleico.
- 60 En una realización, los valores de señal se detectan en todos o parte de los ciclos. Por ejemplo, para un total de 45 ciclos realizados, pueden detectarse valores de señal en todos los ciclos entre el 1º ciclo y el 45º ciclo.
- 65 En una realización, los valores de señal pueden obtenerse en ciclos impares. Por ejemplo, para un total de 45 ciclos realizados, pueden detectarse valores de señal en el 1º, 3º, 5º, 7º ... 45º ciclo.
- 70 En una realización, los valores de señal pueden obtenerse en ciclos pares. Por ejemplo, para un total de 45 ciclos realizados, pueden detectarse valores de señal en el 2º, 4º, 6º, 8º ... 44º ciclo. Además, los valores de señal pueden detectarse adicionalmente en el 45º ciclo, considerando que el 45º ciclo es el ciclo final en la reacción.
- 75 En una realización, los valores de señal pueden obtenerse en uno o más ciclos predeterminados por un usuario. Por ejemplo, uno o más ciclos en los que van a detectarse valores de señal pueden determinarse antes de llevar a cabo el ciclo o ciclos de reacción. Por ejemplo, los ciclos entre el 10º ciclo y el 45º ciclo pueden estar predeterminados, o los ciclos entre el 10º ciclo y el 40º ciclo pueden estar predeterminados. Los ciclos predeterminados pueden ser consecutivos o no consecutivos, y pueden encontrarse a intervalos regulares o irregulares. En una realización, los valores de señal podrían no obtenerse en ciclos tempranos. Por ejemplo, los ciclos tempranos podrían encontrarse entre el 1º ciclo y el 5º ciclo. Debido a que pueden detectarse señales de baja intensidad en los ciclos tempranos, pero no se espera que el valor del cambio de señal sea significativo, puede omitirse la detección superflua en los ciclos tempranos. Tal omisión de la detección de los valores de señal en los ciclos tempranos puede reducir el tiempo global de los ciclos de reacción.

- 5 En una realización, los valores de señal obtenidos a las dos o más temperaturas de detección pueden someterse a interpolación, rindiendo un valor de señal esperado a otra temperatura. El valor de señal esperado que se obtiene mediante interpolación puede denominarse "valor de señal interpolado" y la temperatura de detección correspondiente puede denominarse "temperatura interpolada" o "temperatura de detección interpolada".
- 10 En una realización de la invención, la temperatura interpolada es cualquier temperatura entre las temperaturas de detección.
- 15 La interpolación puede llevarse a cabo mediante interpolación lineal, interpolación lineal doble, interpolación parabólica, interpolación polinómica, o interpolación *spline*, y más particularmente, la interpolación lineal.
- 20 A menos que se indique lo contrario, la expresión utilizada en el presente documento "temperatura de detección" comprende temperaturas de detección generadas mediante interpolación, así como temperaturas de detección a las que se mide instrumentalmente una señal.
- 25 A menos que se indique lo contrario, la expresión utilizada en el presente documento "valor de señal" comprende valores de señal generados mediante interpolación, así como valores de señal obtenidos mediante medición instrumental.
- 30 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "valor de señal" se refiere a un valor de señal realmente medido en un ciclo de la reacción generadora de señal, particularmente la reacción de amplificación o su modificación, que se cuantifica a una escala determinada. La modificación puede comprender un valor matemáticamente procesado del valor de señal realmente medido. Entre los ejemplos del valor matemáticamente procesado del valor de señal actualmente medido (es decir, el valor de señal de un conjunto de datos en bruto) se pueden incluir, aunque sin limitarse a ellos, un valor logarítmico del valor de señal medido, o un derivado del valor e señal medido.
- 35 *Etapa: obtención de un conjunto de datos de valor de ciclo/cambio de señal (140).*
- 40 Un valor de cambio de señal de valores de señal entre dos temperaturas de referencia seleccionadas de entre por lo menos dos temperaturas de detección en cada uno de la pluralidad de los intervalos de temperatura de detección se obtiene de manera que se obtiene un conjunto de datos de valor de ciclo/cambio de señal para cada una de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico.
- 45 *Selección de temperaturas de referencia*
- 50 Las temperaturas de referencia se seleccionan de las dos o más temperaturas de detección en cada uno de la pluralidad de intervalos de temperatura de detección.
- 55 Las temperaturas de referencia que van a seleccionarse de las dos o más temperaturas de detección pueden estar predeterminadas. Alternativamente, las temperaturas de referencia pueden seleccionarse de las dos o más temperaturas de detección mediante el análisis de los valores de señal obtenidos a las temperaturas de detección.
- 60 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "selección de temperaturas de referencia" comprende seleccionar temperaturas de referencia predeterminadas de dos o más temperaturas de detección, así como la selección de temperaturas de referencia de dos o más temperaturas de detección basándose en determinados criterios de ejecución del método.
- En una realización, en el caso de que haya dos temperaturas de detección en el intervalo de temperatura de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico, se seleccionan las dos temperaturas de detección a modo de las dos temperaturas de referencia.
- En una realización, en el caso de que haya tres o más temperaturas de detección en el intervalo de temperatura de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico, se seleccionan dos de las tres o más temperaturas de detección como las temperaturas de referencia.

- En una realización, en el caso de que haya tres o más temperaturas de detección en el intervalo de temperatura de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico, se selecciona una temperatura de detección más baja y una temperatura de detección más alta como las dos temperaturas de referencia.
- 5 En una realización, los valores de señal a cualquier temperatura entre las dos temperaturas de referencia también pueden utilizarse para generar un valor de cambio de señal utilizando las temperaturas de referencia.
- 10 En una realización, en el caso de que haya tres o más temperaturas de detección en el intervalo de temperatura de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico y las temperaturas de detección incluyan una o más temperaturas de detección interpoladas, las temperaturas de referencia se seleccionan de (i) las temperaturas de detección, (ii) las temperaturas interpoladas, o (iii) las temperaturas de detección y la temperatura o temperaturas de detección interpoladas.
- 15 En una realización de la invención, las dos temperaturas de referencia para la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico no se solapan entre sí. En otras palabras, las dos temperaturas de referencia para la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico podrían no solaparse entre sí. En una realización de la invención, las dos temperaturas de referencia para una secuencia diana de ácido nucleico no se solapan con otras temperaturas de referencia para otras secuencias diana de ácido nucleico. Las dos temperaturas de referencia para cada secuencia diana de ácido nucleico pueden seleccionarse de manera que no se solapen entre sí, debido a que se utilizan para obtener un valor de cambio de señal para determinar la presencia o la ausencia de la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente.
- 20 En una realización de la invención, las dos temperaturas de referencia para una secuencia diana de ácido nucleico son diferentes de las de otra secuencia diana de ácido nucleico.
- 25 En una realización, las dos temperaturas de referencia para una secuencia diana de ácido nucleico se encuentran comprendidas dentro de un intervalo de temperaturas en el que la cantidad de una dupla para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente ha cambiado.
- 30 En una realización, las dos temperaturas de referencia para una secuencia diana de ácido nucleico se seleccionan para estar espaciadas a intervalos regulares. Por ejemplo, las dos temperaturas de referencia están espaciadas por 5 °C, 4 °C, 3 °C, 2 °C o 1 °C.
- 35 En una realización, las dos temperaturas de referencia para una secuencia diana de ácido nucleico se seleccionan para espaciarlas a intervalos regulares en torno a la T_f de una dupla.
- 40 En una realización, las dos temperaturas de referencia para cada secuencia diana de ácido nucleico se seleccionan para estar espaciadas a intervalos regulares en torno a la T_f de una dupla para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente. En este caso, los valores de C_t obtenidos mediante aplicación de un valor umbral idéntico a los conjuntos de datos de valor de ciclo/cambio de señal pueden compararse entre sí.
- 45 Por otra parte, al analizar una muestra desconocida, un valor real de T_f de reacción de una dupla para una secuencia diana de ácido nucleico en una muestra puede diferir de un valor de T_f esperado, dependiendo de los componentes contenidos en la muestra o las condiciones experimentales. En este caso, la selección de dos temperaturas de referencia basándose en la T_f esperada puede causar inexactitud del método. La presente invención permite la medición de valores de señal en una pluralidad de temperaturas de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico y la selección de dos temperaturas de referencia adecuadas de la pluralidad de temperaturas de detección.
- 50 La selección de dos temperaturas de referencia a partir de una pluralidad de temperaturas de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico puede llevarse a cabo mediante diversos métodos.
- 55 En una realización, las dos o más temperaturas de detección son no menos de 3 en número; el método comprende, además, el análisis de los valores de señal a las tres o más temperaturas de detección para seleccionar las dos temperaturas de referencia.
- 60 En una realización, las dos o más temperaturas de detección son no menos de 3; los valores de cambio de señal se calculan mediante la utilización de valores de señal a las tres o más temperaturas de detección para seleccionar las dos temperaturas de referencia.
- 65 En una realización, las dos o más temperaturas de detección son no menos de 3; los valores de cambio de señal se calculan mediante la utilización de valores de señal a las tres o más temperaturas de detección y las dos temperaturas de referencia se seleccionan de manera que se incluye entre las dos temperaturas de referencia un valor de cambio de señal más alto entre los valores de cambio de señal calculados.

En una realización, los valores de cambio de señal se asignan a temperaturas entre las temperaturas de detección utilizadas para calcular el valor correspondiente de cambio de señal.

5 En una realización, el valor de cambio de señal más alto se asigna a una temperatura entre las temperaturas de detección utilizadas para calcular el valor de cambio de señal más alto.

10 Por ejemplo, se calculan valores de cambio de señal mediante la utilización de valores de señal entre temperaturas de detección inmediatamente contiguas, y las dos temperaturas de referencia se seleccionan de manera que se incluye entre las dos temperaturas de referencia el valor de cambio de señal más alto de entre los valores de cambio de señal calculados.

15 La FIG. 4 ilustra la selección de dos temperaturas de referencia de acuerdo con una realización de la presente invención. En particular, la FIG. 4 ilustra un procedimiento de selección de dos temperaturas de referencia basado en valores de cambio de señal calculados a partir de valores de señal entre temperaturas de detección inmediatamente contiguas.

La FIG. 4 muestra un ejemplo de selección de T2 y T4 como temperaturas de referencia.

20 En un ejemplo, los valores de señal en por lo menos un ciclo se utilizan para la selección de las temperaturas de referencia. Los valores de señal en los ciclos 1 a 80, los ciclos 1 a 50, los ciclos 1 a 30, los ciclos 5 a 80, los ciclos 5 a 50 y los ciclos 5 a 30, se utilizan para la selección de las temperaturas de referencia.

25 En un ejemplo, los valores de señal en el ciclo final se utilizan para la selección de las temperaturas de referencia. Por ejemplo, en el caso de que el ciclo final sea el 45º ciclo, los valores de señal detectados en el 45º ciclo pueden utilizarse para seleccionar las temperaturas de referencia.

30 En un ejemplo, los valores de señal en los ciclos tardíos se utilizan para la selección de las temperaturas de referencia. Por ejemplo, en el caso de que el ciclo final sea el 45º ciclo, los valores de señal detectados en los 41º a 45º ciclo (5 ciclos) pueden utilizarse para seleccionar las temperaturas de referencia. Los ciclos tardíos consisten en el ciclo final y los ciclos contiguos (circundantes) al ciclo final.

35 La FIG. 4 ejemplifica la selección de temperaturas de referencia basada en los valores de señal en un ciclo. En el caso de que se seleccionan temperaturas de referencia basándose en los valores de señal en los ciclos tardíos (por lo menos dos ciclos), pueden seleccionarse las temperaturas de referencia basándose en la media de los valores de cambio de señal calculados en el ciclo tardío. En otras palabras, los valores de cambio de señal se calculan en primer lugar en cada ciclo, y a continuación se calcula la media de los valores de cambio de señal a la misma temperatura, generando los valores promedio de cambio de señal. Una vez se han generado los valores promedio de cambio de señal, se seleccionan las temperaturas de referencia basándose en la magnitud del valor medio de cambio de señal.

40 En otro ejemplo, pueden seleccionarse temperaturas de referencia basándose en los valores promedio de cambio de señal calculados a partir de los valores promedio de señal en los ciclos tardíos. Se calcula la media de los valores de señal a la misma temperatura en los ciclos tardíos para generar los valores promedio de señal y a continuación se calcula un valor de cambio de los valores promedio de señal a fin de generar el valor promedio de cambio de señal.

45 Puede calcularse un valor de cambio de señal a partir de los valores de señal en dos temperaturas de detección consecutivas. Una vez se han obtenido los valores de señal a cinco temperaturas de detección en un ciclo, se calculan cuatro valores de cambio de señal a partir de los valores. Las temperaturas correspondientes a los cuatro valores de cambio de señal pueden considerarse temperaturas interpoladas entre dos temperaturas de detección consecutivas. Los valores de cambio de señal pueden calcularse como la diferencia en los valores de señal respecto a la diferencia en las temperaturas detectadas.

50 Una vez se han calculado los valores de cambio de señal, pueden seleccionarse las temperaturas de referencia basándose en la magnitud de los valores de cambio de señal. En un ejemplo, pueden seleccionarse las temperaturas de referencia para que comprendan el valor de cambio de señal más alto. Las temperaturas de referencia pueden seleccionarse para que comprendan el valor de cambio de señal más alto y cualquiera de los dos valores de cambio de señal contiguos al valor de cambio de señal más alto, en donde cualquiera de los dos valores de cambio de señal contiguo al valor de cambio de señal más alto está comprendido como la temperatura de referencia mediante el cálculo de la diferencia entre dos valores de cambio de señal cualesquiera entre el valor de cambio de señal más alto y dos valores de cambio de señal contiguos.

55 60 En una realización, los valores de cambio de señal se asignan a temperaturas entre las temperaturas de detección utilizadas para calcular valores de cambio de señal correspondientes; el valor de cambio de señal más alto entre los valores de cambio de señal se asigna como un valor de primer cambio, un valor de cambio de señal más alto y un valor de cambio de señal más bajo de entre dos valores de cambio de señal contiguos al valor de cambio de señal más alto se asignan como segundo valor de cambio de señal y tercer valor de cambio de señal, respectivamente; en el caso de que la proporción entre (i) la diferencia entre el segundo valor de cambio de señal y el tercer valor de cambio

de señal y (ii) la diferencia entre el primer valor de cambio de señal y el tercer valor de cambio de señal, excede un valor umbral, se asigna el valor de cambio de señal más alto a una mediana de temperatura entre la temperatura para el primer valor de cambio de señal y la temperatura del segundo valor de cambio de señal, y dos temperaturas separadas de la mediana de temperatura se seleccionan como las dos temperaturas de referencia.

5 En una realización, dos temperaturas separadas de la mediana de temperatura en el mismo intervalo se seleccionan en ambas direcciones como las dos temperaturas de referencia.

10 La FIG. 4 ilustra un ejemplo en el que la proporción entre la diferencia entre el segundo valor de cambio de señal y el tercero valor de cambio de señal, y la diferencia entre el primer valor de cambio de señal y el tercero valor de cambio de señal, excede un valor umbral de 0,4. El valor umbral puede fijarse en un valor no inferior a 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 o 0,6.

15 Tal como se muestra en la FIG. 4, debido a que la proporción excede el valor umbral, el valor de cambio de señal más alto se asigna a una mediana de temperatura entre la temperatura para el primer valor de cambio de señal y la temperatura para el segundo valor de cambio de señal, y las temperaturas T2 y T4 que están separadas de la mediana de temperatura en el mismo intervalo se seleccionan en ambas direcciones como las dos temperaturas de referencia.

La FIG. 5 ilustra la selección de temperaturas de referencia de acuerdo con otra realización de la presente invención.

20 En una realización, los valores de cambio de señal se asignan a temperaturas entre las temperaturas de detección utilizadas para calcular los valores de cambio de señal correspondientes; se asigna un valor de cambio de señal más alto entre los valores de cambio de señal como un valor de primer cambio, un valor de cambio de señal más alto y un valor de cambio de señal más bajo entre dos valores de cambio de señal contiguos al valor de cambio de señal más alto se asignan como un segundo valor de cambio de señal y un tercero valor de cambio de señal, respectivamente; en el caso de que la proporción entre (i) la diferencia entre el primer valor de cambio de señal y el tercero valor de cambio de señal, y (ii) la diferencia entre el segundo valor de cambio de señal y el tercero valor de cambio de señal no sea superior a un valor umbral, el valor de cambio de señal más alto se asigna a la temperatura para el primer valor de cambio de señal y las dos temperaturas separadas de la temperatura para el primer valor de cambio de señal se seleccionan como las dos temperaturas de referencia.

30 En una realización, se seleccionan dos temperaturas separadas de la temperatura para el primer valor de cambio de señal en el mismo intervalo, en ambas direcciones, como las dos temperaturas de referencia.

35 La FIG. 5 ilustra un ejemplo en el que la proporción entre la diferencia entre el segundo valor de cambio de señal y el tercero valor de cambio de señal, y la diferencia entre el primer valor de cambio de señal y el tercero valor de cambio de señal, es no superior a un valor umbral de 0,4. Tal como se muestra en la FIG. 5, debido a que la proporción no excede el valor umbral, se asigna el valor de cambio de señal más alto a la temperatura para el primer valor de cambio de señal y dos temperaturas. Se seleccionan estas dos temperaturas, que están separadas de la temperatura para el primer valor de cambio de señal en el mismo intervalo. En este caso, se seleccionan temperaturas interpoladas entre T1 y T2, y entre T4 y T5.

40 Por ejemplo, si T2, T3, T4 y T5 son 70 °C, 72 °C, 74 °C y 76 °C, respectivamente, entonces la temperatura interpolada entre T2 y T3 es 71 °C; la temperatura interpolada entre T3 y T4 es 73 °C, y la temperatura interpolada entre T4 y T5 es 75 °C. Por lo tanto, las temperaturas de referencia se seleccionan como 71 °C y 75 °C.

45 El valor de cambio de señal entre temperaturas detectadas puede calcularse de diversas maneras.

50 En una realización, el valor de cambio de señal de los valores de señal entre dos temperaturas de detección inmediatamente contiguas puede calcularse mediante una resta, una proporción o una frecuencia de cambio.

55 Otro método de seleccionar temperaturas de referencia utilizando valores de señal a una pluralidad de temperaturas de detección para una secuencia diana de ácido nucleico correspondiente comprende utilizar los valores de señal en la pluralidad de temperaturas de detección para determinar la T_f de reacción real y seleccionar las temperaturas de referencia para la secuencia de ácido nucleico para incluir la T_f medida.

60 La expresión “ T_f de reacción real” se refiere a un valor de T_f que es realmente mostrado por una dupla formada durante el análisis de la muestra para una secuencia diana de ácido nucleico correspondiente. La T_f de reacción real puede depender del entorno de reacción (p. ej., la temperatura, la concentración salina, la concentración de cationes divalentes, la concentración de oligosacáridos, el pH, etc.).

65 La expresión “ T_f esperada” se refiere a un valor de T_f que se espera que sea mostrado por una dupla formada durante el análisis de la muestra para una secuencia diana de ácido nucleico correspondiente. La T_f esperada puede obtenerse mediante un experimento utilizando un estándar para la secuencia diana de ácido nucleico. Alternativamente, la T_f esperada puede obtenerse mediante la utilización de un programa de análisis de T_f conocido de la técnica.

En una realización, el presente método comprende, además, calcular un valor de T_f de reacción real de la dupla para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente con los valores de señal a las tres temperaturas de detección.

- 5 En una realización, las dos temperaturas de referencia se seleccionan de manera que un valor de T_f de reacción real de la dupla para cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente se incluye entre las dos temperaturas de referencia.
- 10 En una realización, puede llevarse a cabo un análisis de fusión de por lo menos ciclos para obtener una T_f de reacción real para la secuencia diana de ácido nucleico. El análisis de fusión puede llevarse a cabo en el ciclo final o en un ciclo intermedio. En una realización, el análisis de fusión se lleva a cabo mediante el incremento o la disminución de la temperatura a un intervalo de 0,5 °C o menos dentro de un determinado intervalo de temperatura a fin de obtener un conjunto de datos de valores Temperatura/señal.
- 15 En el caso de que se seleccionen temperaturas de referencia adecuadas a partir de los resultados de reacción reales, el intervalo de temperatura en el que se espera que cambie la cantidad de una dupla basándose en un valor de T_f esperado puede diferir del intervalo de temperatura en el que realmente ha cambiado la cantidad de una dupla. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "las temperaturas de referencia están comprendidas dentro de un intervalo de temperatura en el que ha cambiado la cantidad de una dupla" pretende comprender las temperaturas de referencia que están comprendidas dentro del intervalo de temperatura en el que se espera que la cantidad de una dupla cambie basándose en la T_f esperada, así como las temperaturas de referencia comprendidas dentro del intervalo de temperatura a las que realmente ha cambiado la cantidad de una dupla.
- 20 En una realización, las temperaturas de referencia para una secuencia diana de ácido nucleico correspondiente pueden seleccionarse para cada recipiente de reacción. En una realización, en el caso de que se detecte la misma secuencia diana de ácido nucleico en diferentes recipientes de reacción (particularmente en el caso de que se utilice una etiqueta que presente la misma propiedad de señal en los recipientes de reacción), se seleccionan temperaturas de referencia para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente para cada uno de los recipientes de reacción, y se determinan temperaturas de referencia representativas para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente a partir de ellas y se aplican a todos los recipientes de reacción. En una realización, en el caso de que se detecte la misma secuencia diana de ácido nucleico en diferentes recipientes de reacción, la información para seleccionar temperaturas de referencia para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente se recoge de cada uno de los recipientes de reacción y se determinan temperaturas de referencia representativas a partir de la información y se aplican a todos los recipientes de reacción.
- 25 En una realización, las temperaturas de referencia se seleccionan a partir de temperaturas a las que puede proporcionarse un valor de cambio de señal indicativo de la presencia de la secuencia diana de ácido nucleico.
- 30 En una realización, las dos temperaturas de referencia para cada secuencia diana de ácido nucleico se seleccionan de un intervalo de temperatura en el que ha cambiado la cantidad de una dupla para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente. En otra realización, se selecciona una de las dos temperaturas de referencia para cada secuencia diana de ácido nucleico a partir de un intervalo de temperatura en el que ha cambiado la cantidad de una dupla para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente, y la otra se selecciona de un intervalo de temperatura en el que se ha mantenido sin cambios la cantidad de una dupla para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente. En una realización, se selecciona una de las dos temperaturas de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico a partir de un intervalo de temperatura en el que la dupla se encuentra en un estado hibrido y la otra se selecciona de un intervalo de temperatura en el que la dupla se encuentra en un estado disociado.
- 35 En una realización de la invención, las dos temperaturas de referencia para cada secuencia diana de ácido nucleico se seleccionan de temperaturas que están comprendidas dentro de un intervalo de temperatura en el que la cantidad de una dupla para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente ha cambiado pero no se encuentra comprendida dentro de un intervalo de temperatura en el que la cantidad de duplas para otras secuencias diana de ácido nucleico se mantiene sustancialmente sin cambios.
- 40 En una realización, por lo menos dos de las temperaturas de detección dentro del intervalo de temperatura de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico comprende aquellas a las que el valor de cambio de señal de la misma puede indicar la presencia de la secuencia diana de ácido nucleico, y las temperaturas de referencia se seleccionan de las dos o más temperaturas.
- 45 En una realización, las dos temperaturas de referencia difieren entre sí en no más de 5 °C, no más de 4 °C, no más de 3 °C, no más de 2 °C o no más de 1 °C. En otras palabras, la diferencia entre la primera y la segunda temperatura de referencia es no superior a 5 °C, no superior a 4 °C, no superior a 3 °C, no superior a 2 °C o no superior a 1 °C.
- 50 En una realización, las dos temperaturas de referencia presentan una diferencia de temperatura no inferior a 0,1 °C, no inferior a 0,5 °C, no inferior a 1 °C, no inferior a 1,5 °C o no inferior a 2 °C.
- 55 En una realización, las dos temperaturas de referencia difieren entre sí en no más de 5 °C, no más de 4 °C, no más de 3 °C, no más de 2 °C o no más de 1 °C. En otras palabras, la diferencia entre la primera y la segunda temperatura de referencia es no superior a 5 °C, no superior a 4 °C, no superior a 3 °C, no superior a 2 °C o no superior a 1 °C.
- 60 En una realización, las dos temperaturas de referencia difieren entre sí en no más de 5 °C, no más de 4 °C, no más de 3 °C, no más de 2 °C o no más de 1 °C. En otras palabras, la diferencia entre la primera y la segunda temperatura de referencia es no superior a 5 °C, no superior a 4 °C, no superior a 3 °C, no superior a 2 °C o no superior a 1 °C.
- 65 En una realización, las dos temperaturas de referencia difieren entre sí en no más de 5 °C, no más de 4 °C, no más de 3 °C, no más de 2 °C o no más de 1 °C. En otras palabras, la diferencia entre la primera y la segunda temperatura de referencia es no superior a 5 °C, no superior a 4 °C, no superior a 3 °C, no superior a 2 °C o no superior a 1 °C.

En una realización, las dos temperaturas de referencia difieren entre sí en 1 °C a 5 °C, 1 °C a 4 °C, 1 °C a 3 °C, 2 °C a 5 °C, 2 °C a 4 °C o 2 °C a 3 °C, particularmente, en 1 °C a 4 °C o 2 °C a 4 °C.

5 Los presentes inventores han encontrado que al detectar una secuencia diana de ácido nucleico mediante la utilización de una dupla que contiene un oligonucleótido etiquetado, en particular, mediante la utilización de una dupla formada de una manera dependiente de una escisión que implica un oligonucleótido de mediación, la secuencia diana de ácido nucleico puede detectarse incluso utilizando dos temperaturas de referencia que presentan una diferencia de 5 °C o inferior. Además, se ha encontrado que la hibridación puede controlarse de una manera sensible al cambio de temperatura mediante la utilización de una dupla de longitud más corta que un amplicón convencional de una secuencia diana de ácido nucleico, y de esta manera, puede proporcionarse una señal detectable, es decir, un valor de cambio de señal significativo, incluso a una diferencia de temperatura pequeña.

10 15 Las temperaturas de referencia constituyen un intervalo de temperatura en el que el cambio en la señal generada por una dupla para otra secuencia diana de ácido nucleico es muy pequeño en comparación con el cambio de la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente. Por ejemplo, el cambio de señal generado a partir de una dupla para otra secuencia diana de ácido nucleico puede ser no superior a 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % en comparación con el cambio en la señal generado a partir una dupla para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente.

20 *Obtención de un valor de cambio de señal.*

Se obtiene un valor de cambio de señal para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente a partir de los valores de señal entre las dos temperaturas de referencia.

25 30 Tal como se utilizan en el presente documento, la expresión "valores de señal entre las dos temperaturas de referencia" pretende comprender no solo valores de señal a dos temperaturas de referencia, sino también valores de señal a todas o algunas temperaturas entre ellas.

35 40 Por ejemplo, en el caso de que las temperaturas de detección para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente sea 60 °C, 61,5 °C, 63 °C, 64,5 °C y 65 °C, se seleccionan 61,5 °C y 64,5 °C como las dos temperaturas de referencia, "los valores de señal entre las dos temperaturas" pueden indicar los valores de señal a 61,5 °C y 64,5 °C; los valores de señal a 61,5 °C, 63 °C y 64,5 °C, o los valores de señal a 61,5 °C y 63 °C.

45 50 En una realización, el valor de cambio de señal se obtiene mediante la utilización de dos valores de señal a las dos temperaturas de referencia.

La expresión "valores de señal entre las dos temperaturas de referencia" puede sustituirse por "valores de señal a cualesquiera temperaturas entre las dos temperaturas de referencia".

55 60 En una realización de la presente invención, "los valores de señal entre las dos temperaturas de referencia" también comprenden, en caso de estar presentes, uno o más valores de señal a una o más temperaturas interpoladas.

65 70 La expresión "obtención de un valor de cambio de señal de valores de señal entre las dos temperaturas de referencia" se refiere a obtener un valor de cambio de señal de todos o algunos valores de señal entre dos temperaturas de referencia de una manera definida.

75 80 El cálculo del valor de cambio de señal a partir de los valores de señal puede definirse de una variedad de maneras. En un ejemplo, el valor de cambio de señal puede obtenerse mediante una resta, una proporción, o una frecuencia de cambio para dos valores de señal. En otro ejemplo, el valor de cambio de señal puede obtenerse mediante una resta, una proporción o una frecuencia de cambio para tres o más valores de señal entre temperaturas de referencia. Específicamente, la resta de tres o valores de señal puede llevarse a cabo mediante la obtención de valores restados entre valores de señal contiguos y la determinación del valor más alto, el valor más bajo, o una media de los valores restados. La proporción para tres o más valores de señal puede conseguirse mediante la obtención de valores de proporción entre valores de señal contiguos y la determinación del valor más alto, el valor más bajo o una media de los valores de proporción. La frecuencia de cambio para tres o más valores de señal puede conseguirse mediante la determinación de una pendiente media de los tres o más valores de señal. En el caso de que haya tres o más valores de señal, pueden utilizarse varios métodos para calcular una resta, una proporción o una frecuencia de cambio de los tres o más valores de señal.

85 90 En una realización, la obtención del valor de cambio de señal a partir de los valores de señal a las dos temperaturas de referencia es mediante la diferencia de los valores de señal.

95 100 En otra realización de la presente invención, la obtención del valor de cambio de señal a partir del valor de señal entre las dos temperaturas de referencia es mediante la diferencia de los valores de señal respecto al valor de cambio de temperatura. El valor de cambio de temperatura puede ser la diferencia de las dos temperaturas de referencia. Por ejemplo, en el caso de que las temperaturas de referencia sean 61 °C y 63 °C, el valor de cambio de temperatura es

2 °C. En el caso de que se detecten 630 URF (unidades relativas de fluorescencia) a 61 °C y se detecten 600 URF a 63 °C, la diferencia de los valores de señal es de 30 URF. En este caso, el valor de cambio de señal es igual a 30 URF/2 °C, es decir, 15 URF/°C.

- 5 En una realización, en el caso de que haya tres o más valores de señal entre las temperaturas de referencia, puede representarse una línea recta ajustada a tres o más valores de señal, y después la pendiente de la línea recta puede considerarse que es el valor de cambio de señal.
- 10 Una vez se han determinado dos temperaturas de referencia para cada secuencia diana de ácido nucleico, se obtiene un valor de cambio de señal para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente utilizando los valores de señal a las dos temperaturas de referencia y el valor de señal en el ciclo interpolado, obteniendo de esta manera un conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal.
- 15 Los conjuntos de datos de ciclo/valor de cambio de señal pueden obtenerse para cada secuencia diana de ácido nucleico. El conjunto de datos de ciclos/valores de cambio de señal incluye un ciclo en el que se mide un valor de señal y un valor de cambio de señal calculado a partir de los valores de señal entre las temperaturas de referencia en el ciclo.
- 20 El conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal comprende puntos de datos.
- 25 La expresión "punto de datos" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un valor de coordenada que comprende un ciclo y un valor de cambio de señal en el ciclo. El término "datos" se refiere a toda la información que constituye un conjunto de datos. Por ejemplo, cada uno de los ciclos y valores de cambio de señal es un dato.
- 30 La expresión "conjunto de datos" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un conjunto de puntos de datos.
- Puede representarse el conjunto de datos, proporcionando una curva de amplificación.
- 35 En una realización, un conjunto de datos para una secuencia diana de ácido nucleico, que se obtiene mediante una reacción generadora de señal, es un conjunto de datos indicativo de la presencia o ausencia de la secuencia diana de ácido nucleico.
- Etapa: determinación de la presencia o ausencia de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico (150).*
- 40 La presencia o ausencia de cada una de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico en la muestra se determina mediante el conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal.
- 45 Debido a que el conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal se generada para cada una de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico, puede utilizarse el conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal para determinar la presencia o ausencia de la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente.
- 50 En una realización, la presencia o ausencia de la secuencia diana de ácido nucleico se determina a partir de si el conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal excede un valor umbral. En el caso de que el conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal excede un valor umbral, se determina que una secuencia diana de ácido nucleico correspondiente al conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal está presente en una muestra. El valor umbral puede fijarse en URF 80, 90, 100, 110, 120, 130 o más.
- 55 En una realización, la presencia o la ausencia de una secuencia diana de ácido nucleico se determina mediante la utilización de una función no lineal ajustada al conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal. En un ejemplo, la función no lineal puede ser una función sigmoidal.
- Por ejemplo, la función sigmoidal puede representarse mediante la Ecuación 1.
- <Ecuación 1>

$$f(x) = a_1 + \frac{a_2 - a_1}{1 + 10^{a_4(a_3-x)}}$$

en la que $f(x)$ es una función sigmoidal; a_1 es el valor más bajo del conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal; a_2 , a_3 y a_4 se determinan mediante el ajuste al conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal.

En una realización de la invención, la presencia o la ausencia de una secuencia diana de ácido nucleico se determina mediante comparación de la pendiente máxima, el valor máximo o la exactitud de ajuste de la función no lineal ajustada al conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal con el valor umbral respectivo. Cuando la totalidad de la pendiente máxima, el valor máximo y la exactitud de ajuste de la función lineal excede el valor umbral respectivo, se determina que la secuencia diana de ácido nucleico está presente. Alternativamente, en el caso de que cualquiera de la pendiente máxima, el valor máximo o la exactitud de ajuste de la función no lineal excede el valor umbral respectivo, se determina que está presente la secuencia diana de ácido nucleico.

5 10 Por ejemplo, el valor umbral para la pendiente máxima puede fijarse en 15, 20, 25, 30, 35, 40 y similar. El valor umbral para el valor máximo puede fijarse en URF 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 o menos.

15 La exactitud de ajuste comprende un valor que indica (a) lo estrechamente que la función no lineal puede predecir el conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal, es decir, la bondad de ajuste, y (b) lo útil que son las variables explicativas para predecir las variables de respuesta.

20 25 La exactitud de ajuste puede indicar el grado de correspondencia entre la función no lineal y el conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal. Además, la exactitud de ajuste representa la diferencia entre la función no lineal y el conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal. La exactitud de ajuste se incrementa como la correspondencia entre la función no lineal y el conjunto de datos de ciclo/incrementos de cambio de señal. Por ejemplo, la exactitud de ajuste puede ser un valor de χ^2 (valor de chi cuadrado) o un valor de R cuadrado.

30 En una realización de la invención, un conjunto de datos de ciclo/valor de señal que consiste en valores de señal en cada uno de todos o algunos de los ciclos se restaura a partir del conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal y se utiliza para determinar la presencia o la ausencia de la secuencia diana de ácido nucleico. El conjunto de datos de ciclo/valor de señal es uno que se genera mediante la detección de valores de señal en cada ciclo. Normalmente, se detectan valores de señal a una temperatura a la que la cantidad de una dupla de la secuencia diana de ácido nucleico se encuentra en su máximo, para generar un conjunto de datos de ciclo/valor de señal. La temperatura a la que la cantidad de la dupla se encuentra en su máximo puede ser una a la que la intensidad de la señal por la dupla se encuentra en su máximo. Según la presente invención, puede derivarse un conjunto de datos de ciclo/valor de señal a partir de un conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal.

Restauración de un conjunto de datos de ciclo/valor de señal.

35 En una realización, los valores de señal pueden restaurarse a partir del conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal para cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente a fin de obtener un conjunto de datos restaurado de ciclo/valor de señal, y la determinación de la presencia o la ausencia de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico en la muestra se lleva a cabo mediante la utilización del conjunto de datos restaurado de ciclo/valor de señal.

40 45 En una realización, los valores de señal restaurados son valores de señal a una temperatura a la que una dupla para cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente genera el valor de señal más alto.

En una realización, el conjunto de datos de ciclo/valor de señal se restaura a partir del ciclo/valor de cambio de señal utilizando la Ecuación 2, a continuación.

45 <Ecuación 2>

CONJUNTO DE DATOS DE CICLO - SEÑAL (FDT, ciclo)

$$= \left[\frac{VS(FDT, CF) - VSF}{\delta VS(TCS, Ciclo)} \right] \times \frac{\delta VS(TCS, Ciclo)}{\delta T} + VSF$$

50 en la que FDT es una determinada temperatura, que puede ser designada por el usuario; CF denota un ciclo final; TCS es una temperatura a la que se detecta un valor de cambio de señal; VSF es un valor de señal de fondo; VS denota un valor de señal, y $\delta VS/\delta T$ denota un valor de cambio de señal.

55 La FDT puede ser una temperatura a la que la señal de la dupla es un máximo. Alternativamente, la FDT puede ser una temperatura determinada dentro del intervalo de temperatura de detección o fuera del intervalo de temperatura de detección. Por ejemplo, en donde el valor de T_f de una dupla generada por una composición generadora de señal es 65 °C, la TCS puede fijarse en 65 °C y la FDT puede fijarse en 60 °C.

60 La Ecuación 2 puede derivarse tal como se muestra en las Ecuaciones 3 a 4 siguientes, mediante el método de separación de variables.

En el método de separación de variables, URF(T, C) puede expresarse con f(T), g(C) y "α". URF(T, C) es una función que representa valores de señal detectados mediante el dispositivo de detección. "T" representa la temperatura y "C" representa el ciclo. Es decir, URF(T, C) representa los valores de señal como función de la temperatura "T" y el ciclo "C". f(T) representa los valores de señal como una función de la temperatura "T" y g(C) representa los valores de señal como una función del ciclo "C". "α" representa una señal de fondo (ver la FIG. 6).

En lo sucesivo en el presente documento, se ilustra cómo puede obtenerse la Ecuación 2 utilizada para restaurar el conjunto de datos de ciclo/valor de señal a 60 °C a partir del conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal a 65 °C.

La Ecuación 3 representa el conjunto de datos de ciclo/valor de señal obtenido a 60 °C y el ciclo "C" según el método de separación de variables. "α" representa el valor de señal de fondo medido en el ciclo 45 y a 85 °C.

<Ecuación 3>

$$URF(60,C) = f(60)g(C) + \alpha$$

En la Ecuación 3, URF(60,C) está representada por la multiplicación de la función f(T) por la función g(C).

La Ecuación 4 representa el conjunto de datos de ciclo/valor de señal a 65 °C y en el ciclo "C" según el método de separación de variables.

La función g(c) es independiente de la temperatura, ya que es una función de solo el ciclo "C". La derivación de ambos lados respecto a la temperatura "T" proporciona la función g(c), que representa los valores de cambio de señal, tales como URF(65,C) y f(65).

<Ecuación 4>

$$\begin{aligned} UFR(65,C) &= f(65)g(C) + \alpha \\ \Rightarrow \frac{\delta UFR}{\delta T}(65,C) &= \frac{df}{dT}(65)g(C) \\ \Rightarrow g(C) &= \frac{\frac{\delta UFR}{\delta T}(65,C)}{\frac{df}{dT}(65)} \end{aligned}$$

La Ecuación 5 representa la ecuación obtenida mediante la sustitución de g(C) de la Ecuación 4 por g(C) de la Ecuación 3.

<Ecuación 5>

$$URF(60,C) = \frac{f(60)}{\frac{df}{dT}(65)} \frac{\delta URF}{\delta T}(65,C) + \alpha$$

La Ecuación 6 representa el valor de señal detectado en el ciclo 45° y a 60 °C. La Ecuación 6 se reorganiza para f(60). En el presente ejemplo, el 45° ciclo es el ciclo final.

<Ecuación 6>

$$\begin{aligned} URF(60,45) &= f(60)g(45) + \alpha \\ \Rightarrow f(60) &= \frac{URF(60,45) - \alpha}{g(45)} \end{aligned}$$

La Ecuación 7 representa una ecuación obtenida mediante derivación de la Ecuación 6 respecto a la temperatura "T". La Ecuación 7 se reorganiza para la derivada de f(65) con respecto a la temperatura "T".

<Ecuación 7>

$$\frac{\delta URF}{\delta T}(65, 45) = \frac{df}{dT}(65)g(45)$$

$$\Rightarrow \frac{df}{dT}(65) = \frac{\frac{\delta URF}{\delta T}(65, 45)}{g(45)}$$

La ecuación 8 representa la Ecuación 5 reexpresada mediante la sustitución de algunos términos por los términos correspondientes en la Ecuación 6 y Ecuación 7.

5

<Ecuación 8>

$$URF(60, C) = \frac{URF(60, 45) - \alpha}{\frac{\delta URF}{\delta T}(65, 45)} \frac{\delta URF}{\delta T}(65, C) + \alpha$$

$$\approx \frac{URF(60, 45) - URF(85, 45)}{\frac{\delta URF}{\delta T}(65, 45)} \frac{\delta URF}{\delta T}(65, C) + URF(85, 45)$$

Los valores de la Ecuación 8 pueden obtenerse mediante detección del valor de señal y el valor de cambio de señal en el ciclo 45, excepto por el valor de cambio de señal a 65 °C en cada ciclo. Por lo tanto, la Ecuación 8 puede simplificarse como la Ecuación 9.

10

<Ecuación 9>

$$URF(60, C) = A \frac{\delta URF}{\delta T}(65, C) + B$$

15

Debido a que A y B pueden obtenerse mediante detección del valor de señal y/o el valor de cambio de señal en el ciclo 45°, estas se expresan mediante constantes.

20

En consecuencia, los valores de señal a 60 °C en cada ciclo pueden generarse mediante una fórmula que comprende (i) el valor de señal a 60 °C y en el ciclo 45°, (ii) el valor de señal a 85 °C y en el ciclo 45°, (iii) los valores de cambio de señal a 65 °C y en cada ciclo, y (iv) el valor de señal a 65 °C y en el ciclo 45°.

25

Generalmente, debido a que la técnica anterior detecta el valor de señal a 60 °C para obtener un conjunto de datos, el conjunto de datos resultante puede comprender una señal generada por una secuencia de ácido nucleico diferente de la secuencia diana de ácido nucleico, conduciendo a falsos positivos.

30

Por otra parte, debido a que la presente invención utiliza valores de cambio de señal a 65 °C para obtener un conjunto de datos de ciclo/valor de señal, el conjunto de datos resultante no comprende una señal generada por la secuencia de ácido nucleico diferente de la secuencia diana de ácido nucleico, a menos que la señal generada por la secuencia de ácido nucleico diferente de la secuencia diana de ácido nucleico cambie a 65 °C. Por lo tanto, la presente invención presenta la ventaja de reducir notablemente los falsos positivos en comparación con la técnica anterior.

35

Al aplicar la Ecuación 9 a dos secuencias diana de ácido nucleico, el valor de señal para la primera secuencia diana de ácido nucleico puede representarse tal como se muestra en la Ecuación 10, y el valor de señal para la segunda secuencia diana de ácido nucleico puede representarse tal como se muestra en la Ecuación 11.

40

<Ecuación 10>

$$URF1(60, Ciclos) = \left[\frac{URF1(60, 45) - \alpha}{\frac{\delta URF1(65, 45)}{\delta T}} \right] \cdot \frac{\delta URF1(65, C)}{\delta T} + \alpha$$

$$= \left[\frac{URF(60, 45) - URF(72, 45) - \alpha}{\frac{\delta URF(65, 45)}{\delta T}} \right] \cdot \frac{\delta URF(65, C)}{\delta T} + \alpha$$

<Ecuación 11>

40

$$\begin{aligned}
 URF2(72, \text{Ciclos}) &= \left[\frac{URF2(72,45) - \alpha}{\delta URF2(77,45)} \right] \cdot \frac{\delta URF2(77,C)}{\delta T} + \alpha \\
 &= \left[\frac{URF(72,45) - \alpha}{\delta URF(77,45)} \right] \cdot \frac{\delta URF(77,C)}{\delta T} + \alpha
 \end{aligned}$$

En las Ecuaciones 10 y 11, URF1 representa el valor de señal para la primera secuencia diana de ácido nucleico y URF2 representa el valor de señal para la segunda secuencia diana de ácido nucleico. URF1 (60, Ciclos) representa un conjunto de datos de ciclo/valor de señal que consiste en ciclos y valores de señal en los ciclos, detectados a 60 °C en la presencia de solo la primera secuencia diana de ácido nucleico. URF2 (72, Ciclos) representa un conjunto de datos de ciclo/valor de señal que consiste en ciclos y valores de señal en los ciclos, detectados a 72 °C en la presencia de solo la segunda secuencia diana de ácido nucleico.

- 5 Además, $\delta URF1(65, C)/\delta T$ representa el valor de cambio de señal a 65 °C y en ciclos en la presencia de solo la primera secuencia diana de ácido nucleico. $\delta URF(65, C)/\delta T$ representa el valor de cambio de señal a 65 °C y en ciclos en la presencia de tanto la primera secuencia diana de ácido nucleico como la segunda secuencia diana de ácido nucleico en un único recipiente. Debido a que el valor de señal para la primera secuencia diana de ácido nucleico ha cambiado, pero el valor de señal para la segunda secuencia diana de ácido nucleico se mantiene sustancialmente sin cambios a 65 °C, puede suponerse que $\delta URF1(65, C)/\delta T$ es igual a $\delta URF(65, C)/\delta T$.

- 10 Además, $\delta URF(77, C)/\delta T$ representa el valor de cambio de señal a 77 °C y en ciclos en la presencia de solo la segunda secuencia diana de ácido nucleico. $\delta URF(77, C)/\delta T$ representa el valor de cambio de señal a 77 °C y en ciclos en la presencia de tanto la primera secuencia diana de ácido nucleico como la segunda secuencia diana de ácido nucleico en un único recipiente. Debido a que el valor de señal para la segunda secuencia diana de ácido nucleico ha cambiado, pero el valor de señal para la primera secuencia diana de ácido nucleico se mantiene sustancialmente sin cambios a 77 °C, puede suponerse que $\delta URF2(77, C)/\delta T$ es igual a $\delta URF(77, C)/\delta T$.

- 15 En consecuencia, el conjunto de datos de ciclo/valor de señal para la primera secuencia diana de ácido nucleico y el conjunto de datos de ciclo/valor de señal para la segunda secuencia diana de ácido nucleico puede simplificarse como en la Ecuación 12.

<Ecuación 12>

$$\begin{aligned}
 URF1(60, \text{Ciclos}) &= C \cdot \frac{\delta URF(65,C)}{\delta T} + D \\
 URF2(72, \text{Ciclos}) &= E \cdot \frac{\delta URF(77,C)}{\delta T} + D
 \end{aligned}$$

- 20 En la Ecuación 12, debido a que C, D y E pueden obtenerse a partir de los valores de señal y/o valores de cambio de señal detectados en el ciclo final, estos se expresan como constantes.

- 25 En conclusión, la presente invención puede restaurar el conjunto de datos de ciclo/valor de señal a partir de valores de cambio de señal para una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico mediante el diseño de oligonucleótidos tales que los intervalos de temperatura para una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico no se solapen entre sí, en donde cada intervalo de temperatura es un intervalo en el que se ha cambiado la señal para la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente.

- 30 Tal como se ilustra anteriormente, la presente invención proporciona un método para restaurar un conjunto de datos de ciclo/valor de señal a una primera temperatura a partir de un conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal a una segunda temperatura, que comprende las etapas siguientes:

- 35 (a) obtener un conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal a una segunda temperatura,
 40 (b) obtener los valores siguientes:

- 45 (i) un valor de señal en un ciclo final y a una primera temperatura,
 50 (ii) un valor de señal de fondo, y
 55 (iii) un valor de señal en un ciclo final y a la segunda temperatura, y

- 50 (c) aplicar los valores obtenidos en la etapa (b) a una ecuación capaz de transformar el conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal a la segunda temperatura en el conjunto de datos de ciclo/valor de señal a la primera temperatura, obteniendo de esta manera el conjunto de datos de ciclo/valor de señal a la primera temperatura.

La ecuación en la etapa (c) puede comprender un coeficiente, ([un valor de señal en un ciclo final y a una primera temperatura menos un valor de señal de fondo] dividido por [un valor de señal en un ciclo final y a la segunda temperatura]).

- 5 Entre los ejemplos de la ecuación en la etapa (c) se incluyen, aunque sin limitación, la Ecuación 2.

Combinación de un método diferente de generación de señal para la detección de dianas.

- 10 En una realización, las composiciones generadoras de señal comprenden una composición que comprende un oligonucleótido etiquetado para generar una señal detectable mediante una reacción dependiente de la presencia de una de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico; el oligonucleótido etiquetado es cortado por una nucleasa en la reacción de duplas, y la obtención de los valores de señal se lleva a cabo a una temperatura a la que todos las duplas para las demás secuencias diana de ácido nucleico de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico están hibridados o disociados a fin de no generar ninguna señal, en donde la etiqueta en el oligonucleótido etiquetado para generar una señal detectable mediante una reacción de escisión presenta la misma propiedad de señal que los marcas en las duplas.

- 15 El presente método descrito anteriormente determina la presencia o la ausencia de secuencias diana de ácido nucleico de interés mediante la formación de duplas para las secuencias diana de ácido nucleico y la obtención de los valores de cambio de señal entre dos temperaturas diferentes a partir de las duplas.

- 20 Las duplas para las diferentes secuencias diana de ácido nucleico incluyen marcas que presentan la misma propiedad de señal. Por lo tanto, las señales detectadas por un detector no pueden diferenciar cuáles son las duplas que generan señal. Sin embargo, las duplas pueden proporcionar valores de cambio de señal indicativos de la presencia de las secuencias diana de ácido nucleico correspondiente, ya que los diferentes duplas presentan diferentes valores T_f .

- 25 En el presente método, uno de una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico puede detectarse mediante la escisión de un oligonucleótido etiquetado de una manera dependiente del a presencia de esa secuencia diana de ácido nucleico y la medición de la señal generada por la escisión a una temperatura. Particularmente, una etiqueta unida al oligonucleótido para generar una señal mediante escisión puede presentar la misma propiedad de señal que los marcas utilizados para las duplas.

- 30 En una realización, la escisión del oligonucleótido de detección induce cambios de señal o libera un fragmento etiquetado que va a detectarse.

- 35 En donde se genera la señal mediante escisión del oligonucleótido etiquetado, la señal de una etiqueta liberada por la escisión puede detectarse a cualquier temperatura. Por lo tanto, puede seleccionarse cualquier temperatura con la condición de que pueda detectarse la señal generada por la escisión de un oligonucleótido de detección.

- 40 En una realización, se detecta una señal generada por la escisión de un oligonucleótido etiquetado a una temperatura a la que todos las duplas para las demás secuencias diana de ácido nucleico de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico están hibridadas o disociadas para no generar ninguna señal.

- 45 Por ejemplo, en donde las duplas etiquetados de manera que las duplas que se disocian y generan cadenas sencillas no producen señal, se detecta la señal generada por la escisión del oligonucleótido etiquetado a una temperatura a la que todos las duplas que se espera que se formen estén suficientemente disociados.

- 50 Por ejemplo, en donde las duplas etiquetados de manera que las duplas hibridados no generan señales, se detecta una señal generada por la escisión del oligonucleótido etiquetado a una temperatura a la que todos las duplas que se espera que se formen estén suficientemente hibridados.

- 55 La intensidad de señal procedente de una etiqueta liberado que se genera mediante escisión del oligonucleótido etiquetado puede cambiar según la temperatura. Dicho fenómeno puede causar resultados falsos positivos al determinar la presencia de las secuencias diana de ácido nucleico mediante la formación de una dupla. El presente método permite aplicar un intervalo de 5 °C o menos, de 4 °C o menos, de 3 °C o menos o de 2 °C o menos entre dos temperaturas de referencia seleccionadas para calcular el valor del cambio de señal, lo que reduce la posibilidad de tales falsos resultados.

- 60 En una realización, se detectan por lo menos dos secuencias diana de ácido nucleico mediante la generación de señales mediante la formación de duplas y se detecta una secuencia diana de ácido nucleico mediante generación de una señal mediante escisión de un oligonucleótido etiquetado. Según una realización, se detecta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 secuencias diana de ácido nucleico mediante la generación de señales mediante formación de duplas y se detecta una secuencia diana de ácido nucleico mediante la generación de una señal mediante la escisión de un oligonucleótido etiquetado.

En una realización, las composiciones generadoras de señal comprenden una composición que comprende un oligonucleótido etiquetado para generar una señal detectable mediante una reacción de escisión dependiente de la presencia de una de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico y el oligonucleótido etiquetado es cortado por una nucleasa en la reacción.

- 5 Particularmente, puede utilizarse una composición generadora de señal, que genera una señal mediante hibridación del oligonucleótido etiquetado con una secuencia diana de ácido nucleico, seguido de la escisión del oligonucleótido etiquetado.
- 10 La señal mediante hibridación del oligonucleótido de detección con una secuencia diana de ácido nucleico y seguidamente la escisión del oligonucleótido de detección pueden generarse mediante diversos métodos, incluyendo el método de sonda TaqMan (patente U.S. n.º 5.210.015 y patente U.S. n.º 5.538.848).
- 15 En donde la señal se genera mediante el método de sonda TaqMan, la composición generadora de señal incluye un conjunto de cebadores para la amplificación de una secuencia diana de ácido nucleico, en donde la sonda TaqMan presenta una etiqueta adecuado (p. ej., una etiqueta dual interactivo) y una ácido nucleico polimerasa que presenta actividad de nucleasa 5'. La sonda TaqMan hibridada con una secuencia diana de ácido nucleico se escinde durante la amplificación de la diana y genera una señal indicativa de la presencia de la secuencia diana de ácido nucleico.
- 20 25 El ejemplo particular de generación de señal mediante el método de sonda TaqMan comprende la etapa de: (a) hibridar el conjunto de cebadores y la sonda TaqMan que presenta una etiqueta adecuado (p. ej., una etiqueta dual interactivo) con la secuencia diana de ácido nucleico, (b) amplificar la secuencia diana de ácido nucleico mediante la utilización de lo resultante de la etapa (a) y una ácido nucleico polimerasa que presenta actividad de nucleasa 5', en donde se escinde la sonda TaqMan para liberar la etiqueta, y (c) detectar una generación de señal a partir de la etiqueta liberado.
- 30 Particularmente, puede utilizarse una composición generadora de señal, que genera una señal mediante escisión del oligonucleótido de detección de una manera dependiente de una escisión que implica un oligonucleótido de mediación.
- 35 En una realización, en donde una escisión que implica un oligonucleótido de mediación libera un fragmento, el fragmento se hibrida específicamente con un oligonucleótido de detección y el fragmento induce la escisión del oligonucleótido de detección.
- 40 En una realización, en donde una escisión que implica un oligonucleótido de mediación libera un fragmento, el fragmento se extiende para escindir un oligonucleótido etiquetado que comprende una secuencia de nucleótidos hibridante que es complementaria al oligonucleótido de captura.
- 45 50 55 60 65 la señal mediante escisión del oligonucleótido de detección de una manera dependiente de la escisión que implica un oligonucleótido de mediación puede generarse mediante diversos métodos, incluyendo el ensayo Invader (patente U.S. n.º 5.691.142), método PCEC (por sus siglas en inglés escisión de PTO y escisión dependiente de extensión) (documento n.º WO 2012/134195), método PCE-SC (escisión de PTO y escisión de oligonucleótido de señalización dependiente de extensión) (documento n.º WO 2013/157821) y un método descrito en la patente U.S. n.º 7.309.573. En particular, el método descrito en la patente U.S. n.º 7.309.573 puede considerarse como uno de los métodos basados en PTOCE que utilizan la generación de señal mediante escisión, y en el método, puede detectarse la formación de la cadena extendida mediante la detección de la escisión de un oligonucleótido hibridado específicamente con CTO mediante la formación de la cadena extendida. El ensayo Invader forma un fragmento mediante escisión de un oligonucleótido de mediación e induce reacciones de escisión sucesivas sin extensión del fragmento.
- 50 En una realización, la combinación de (i) para una secuencia diana de ácido nucleico, una composición generadora de señal para generar una señal de una manera dependiente de la escisión de un oligonucleótido etiquetado (p. ej., el método TaqMan) y (ii) para otra secuencia diana de ácido nucleico, una composición generadora de señal para proporcionar una señal mediante una dupla formada de una manera dependiente de una escisión que implica un oligonucleótido de mediación, particularmente la escisión de un oligonucleótido de mediación, puede inducir los resultados inesperados.
- 55 El método que utiliza la escisión del oligonucleótido de detección generalmente utiliza un enzima que presenta actividad de nucleasa 5' (particularmente, la polimerasa *Taq*) para la escisión del oligonucleótido de detección. En los métodos convencionales para generar señal mediante hibridación directa de sondas de detección (p. ej., método de baliza molecular, método de sonda de hibridación o método Hybeacon), las sondas de detección muy probablemente serán cortadas por el enzima que presenta actividad de nucleasa 5' (particularmente, la polimerasa *Taq*). El corte de las sondas de detección puede causar una reducción de sensibilidad debido al consumo de las sondas de detección (p. ej., el método de sonda de hibridación) o una señal falsa positiva en los métodos con señalización dependiente de la escisión (p. ej., el método de baliza molecular). Aunque los métodos de cebador etiquetado (p. ej., el método Sunrise o el método Scorpion) no sufren de la escisión como sí lo hacen los métodos de sonda, adolecen de desventajas en que el valor de la T_f del amplicón de por sí debe controlarse para ajustar las temperaturas de detección. En contraste, debido a que los métodos que incluyen la etapa de corte de un oligonucleótido de mediación utilizan la escisión del

oligonucleótido de mediación específicamente hibridado con la secuencia diana de ácido nucleico, no resultan afectados por el enzima que presenta actividad de nucleasa 5' (particularmente, la polimerasa *Taq*). Además, los métodos que incluyen la etapa de escisión de un oligonucleótido de mediación, particularmente los métodos basados en PTOCE, pueden ajustar fácilmente el valor de la T_f dla dupla formada para garantizar una selección conveniente de las temperaturas de detección.

- 5 *II. Detección de una secuencia diana de ácido nucleico en una muestra utilizando un valor de cambio de señal.*
- 10 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar una secuencia diana de ácido nucleico en una muestra, que comprende:
- 15 poner en contacto en un recipiente de reacción una muestra con una composición generadora de señal para detectar la secuencia diana de ácido nucleico, en donde la composición generadora de señal forma una dupla para la secuencia diana de ácido nucleico y la dupla proporciona una señal que indica la presencia o la ausencia de la secuencia diana de ácido nucleico,
- 20 llevar a cabo una reacción durante por lo menos dos ciclos para (i) la formación de la dupla y (ii) la disociación dla dupla formada,
- 25 obtener en todos o algunos ciclos de la reacción, valores de señal a por lo menos dos temperaturas de detección en un intervalo de temperatura de detección asignado a la secuencia diana de ácido nucleico; en donde el intervalo de temperatura de detección comprende un intervalo de temperatura en el que ha cambiado la cantidad de la dupla,
- 30 obtener un valor de cambio de señal de los valores de señal entre dos temperaturas de referencia seleccionadas de entre por lo menos dos temperaturas de detección en el intervalo de temperatura de detección, de manera que se obtiene un conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal para la secuencia diana de ácido nucleico, y determinar la presencia o la ausencia de la secuencia diana de ácido nucleico en la muestra mediante el conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal para la secuencia diana de ácido nucleico.
- 35 Debido a que la presente invención sigue en principio el primer aspecto de la presente invención descrito anteriormente, las descripciones comunes a ellas se han omitido a fin de evitar redundancias indebidas que conducirían a una mayor complejidad de la presente especificación.
- 40 En una realización, la composición generadora de señal comprende oligonucleótidos para la formación de las duplas que proporciona la señal indicativa de la presencia de la secuencia diana de ácido nucleico correspondiente, los oligonucleótidos comprenden oligonucleótidos etiquetados, las duplas comprenden un oligonucleótido etiquetado y la hibridación y/o disociación dla dupla formada proporciona una señal detectable.
- 45 En una realización, la dupla es (i) una dupla formada mediante hibridación entre la secuencia diana de ácido nucleico y un oligonucleótido etiquetado, (ii) una dupla formada mediante hibridación entre un oligonucleótido que comprende una secuencia hibridante complementaria a la secuencia diana de ácido nucleico y un oligonucleótido etiquetado complementario a por lo menos una parte de la secuencia hibridante o (iii) una dupla formada de una manera dependiente de una escisión que implica un oligonucleótido de mediación, en donde el oligonucleótido de mediación es uno hibridado con la secuencia diana de ácido nucleico.
- 50 En una realización, la dupla formada de una manera dependiente de la escisión que implica el oligonucleótido de mediación es una dupla formada de una manera dependiente de la formación de una cadena extendida que se forma mediante extensión de un fragmento liberado por la escisión que implica el oligonucleótido de mediación.
- 55 En una realización, la dupla formada de una manera dependiente de una escisión que implica un oligonucleótido de mediación es una dupla formada mediante hibridación de un fragmento liberado por la escisión que implica el oligonucleótido de mediación con un oligonucleótido correspondiente.
- 60 En una realización, las dos o más temperaturas de detección son 2 a 10 en número.
- En una realización, las dos temperaturas de referencia difieren entre sí en no más de 5 °C, no más de 4 °C, no más de 3 °C, no más de 2 °C o no más de 1 °C.

En una realización, las dos o más temperaturas de detección son no menos de 3 en número; el método comprende, además, analizar los valores de señal a las tres o más temperaturas de detección para seleccionar las dos o más temperaturas de referencia.

- 5 En una realización, la muestra comprende una secuencia diana adicional de ácido nucleico y la composición generadora de señal comprende, además, una composición que comprende un oligonucleótido etiquetado para generar una señal detectable mediante una reacción de escisión dependiente de la presencia de las secuencias diana adicionales de ácido nucleico, el oligonucleótido etiquetado es escindido por una nucleasa en la reacción de la dupla, y la obtención de los valores de señal se lleva a cabo a una temperatura a la que la dupla para las demás secuencias diana de ácido nucleico está hibridado o disociado para no generar ninguna señal; en donde la etiqueta en el oligonucleótido etiquetado para generar una señal detectable mediante una reacción de escisión presenta la misma propiedad de señal que los marcas en las duplas.
- 10

15 *III. Medio y dispositivo de almacenamiento para la detección de secuencias diana de ácido nucleico a partir del valor de cambio de señal a las dos temperaturas de referencia.*

Debido a que el medio de almacenamiento, el dispositivo y el programa informático de la presente invención descritos a continuación en el presente documento están destinados a llevar a cabo los presentes métodos en un ordenador, se han omitido las descripciones comunes a ellos, a fin de evitar redundancias indebidas que conducirían a una mayor complejidad de la presente especificación.

20 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un medio de almacenamiento legible por ordenador que contiene instrucciones para configurar un procesador para llevar a cabo un método para la detección de una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico en una muestra, en donde el método comprende:

25 recibir valores de señal, en donde los valores de señal se obtienen mediante (i) la puesta en contacto en un único recipiente de reacción de una muestra con composiciones generadoras de señal para la detección de una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico, en donde las composiciones generadoras de señal forman una pluralidad de duplas para la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico, en donde cada una de la pluralidad de duplas proporciona una señal que indica la presencia o la ausencia de cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente y la pluralidad de duplas presenta valores T_f diferentes entre sí, (ii) la realización de una reacción durante por lo menos dos ciclos para la formación de la pluralidad de duplas y la disociación de las duplas, y (iii) la obtención en todos o algunos ciclos de la reacción, de valores de señal a por lo menos dos temperaturas de detección en cada uno de una pluralidad de intervalos de temperatura de detección asignados a la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico, en donde cada uno de la pluralidad de intervalos de temperatura de detección comprende un intervalo de temperatura en el que ha cambiado la cantidad de una dupla para cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente, *pero la cantidad de duplas de las demás secuencias diana de ácido nucleico se mantiene sin cambios,*

30 40 generar un conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal para cada una de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico mediante la obtención de un valor de cambio de señal de los valores de señal entre dos temperaturas de referencia seleccionadas de entre por lo menos dos temperaturas de detección en cada uno de la pluralidad de intervalos de temperatura de detección, y

35 45 determinar la presencia o la ausencia de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico en la muestra mediante el conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal para cada una de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico.

50 En todavía otro aspecto de la presente invención, se proporciona un medio de almacenamiento legible por ordenador que contiene instrucciones para configurar un procesador para llevar a cabo un método que comprende:

55 60 recibir valores de señal, en donde los valores de señal se obtienen mediante (i) la puesta en contacto en un recipiente de reacción de la muestra con una composición generadora de señal para la detección de la secuencia diana de ácido nucleico, en donde la composición generadora de señal forma una dupla para la secuencia diana de ácido nucleico y la dupla proporciona una señal indicativa de la presencia o la ausencia de la secuencia diana de ácido nucleico, (ii) llevar a cabo una reacción durante por lo menos dos ciclos para (i) la formación de la dupla y (ii) la disociación de la dupla formada, y (iii) la obtención en todos o algunos ciclos de la reacción, valores de señal a dos o más temperaturas de detección en un intervalo de temperatura de detección asignado a la secuencia diana de ácido nucleico, en donde el intervalo de temperatura de detección comprende un intervalo de temperatura en el que ha cambiado la cantidad de la dupla,

65 70 generar un conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal para la secuencia diana de ácido nucleico mediante la obtención de un valor de cambio de señal de valores de señal entre dos temperaturas de referencia seleccionadas de las dos o más temperaturas de detección en el intervalo de temperatura de detección, y

determinar la presencia o la ausencia de la secuencia diana de ácido nucleico en la muestra mediante el conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal para la secuencia diana de ácido nucleico.

- 5 En todavía otro aspecto de la presente invención, se proporciona un programa informático almacenado en un medio de almacenamiento legible por ordenador para configurar un procesador para llevar a cabo un método descrito anteriormente.
- 10 El presente método descrito anteriormente se implementa en un procesador, tal como un procesador en un ordenador autónomo, un ordenador conectado a una red o un dispositivo de adquisición de datos, tal como un aparato de PCR en tiempo real.
- 15 Entre los tipos de medio de almacenamiento legible por ordenador se incluyen diversos medios de almacenamiento, tales como CD-R, CD-ROM, DVD, memoria flash, disquete, disco duro, HDD portátil, USB, cinta magnética, MINIDISC, tarjeta de memoria no volátil, EEPROM, disco óptico, medio de almacenamiento óptico, RAM, ROM, memoria de sistema y servidor web. En una realización, el medio de almacenamiento legible por ordenador es un medio de almacenamiento legible por ordenador no transitorio.
- 20 Los datos (p. ej., intensidad, número de ciclos de amplificación y temperatura de detección) asociados a las señales pueden recibirse mediante varios mecanismos. Por ejemplo, los datos pueden ser adquiridos por un procesador residente en un dispositivo de adquisición de datos de PCR. Los datos pueden ser proporcionados al procesador en tiempo real a medida que se están recolectando los datos, o pueden almacenarse en una unidad de memoria o búfer y proporcionarse al procesador después de completar el experimento. De manera similar, el conjunto de datos puede proporcionarse a un sistema separado, tal como un sistema de ordenador de sobremesa mediante una conexión de red (p. ej., LAN, VPN, intranet o Internet) o conexión directa (p. ej., USB u otra conexión directa por cable o inalámbrica) al dispositivo de adquisición, o proporcionarse en un medio portátil, tal como CD, DVD, disquete, HDD portátil o similar a un sistema de ordenador autónomo. De manera similar, el conjunto de datos puede proporcionarse a un sistema de servidor mediante una conexión de red (p. ej., LAN, VPN, intranet, Internet y red de comunicación inalámbrica) a un cliente, tal como un portátil o un sistema de ordenador de sobremesa.
- 25
- 30 Las instrucciones para configurar el procesador para llevar a cabo la presente invención pueden incluirse en un sistema lógico. Las instrucciones pueden descargarse y almacenarse en un módulo de memoria (p. ej., disco duro u otra memoria, tal como RAM o ROM local o asociada), aunque las instrucciones pueden proporcionarse en cualquier medio de almacenamiento de software, tal como un HDD portátil, USB, disquete, CD y DVD. Puede implementarse un código informático para la implementación de la presente invención, en una variedad de lenguajes de programación, tales como C, C++, Java, Visual Basic, VBScript, JavaScript, Perl y XML. Además, en la presente invención puede utilizarse una variedad de lenguajes y protocolos en almacenamiento externo e interno, y transmisión de datos y comandos.
- 35
- 40 En todavía otro aspecto de la presente invención, se proporciona un dispositivo para la detección de una secuencia diana de ácido nucleico en una muestra, que comprende (a) un procesador informático y (b) el medio de almacenamiento legible por ordenador indicado anteriormente, acoplado al procesador informático.
- 45 En una realización, el dispositivo comprende, además, un recipiente de reacción para contener la muestra y composición generadora de señal, medios de control de la temperatura a fin de controlar las temperaturas del recipiente de reacción y/o un detector a fin de detectar señales en números de ciclo.
- 50 El procesador puede prepararse de tal manera que un único procesador puede llevar a cabo varias operaciones. Alternativamente, la unidad de procesador puede estar preparada de manera que varios procesadores ejecuten varias operaciones, respectivamente. En una realización, el procesador puede realizarse mediante la instalación de software en dispositivos convencionales para la detección de secuencias diana de ácido nucleico (p. ej., dispositivo de PCR en tiempo real).
- 55 Un sistema de análisis incluye un dispositivo de amplificación y un dispositivo de análisis. El sistema de análisis puede determinar la presencia o la ausencia de la secuencia diana de ácido nucleico en la muestra y mostrar un resultado al usuario. La presencia de la secuencia diana de ácido nucleico puede expresarse como positiva, y la ausencia, como negativa.
- 60 El dispositivo de amplificación es un dispositivo para llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico, una reacción enzimática o un crecimiento microbiano. Por ejemplo, en el caso de que el dispositivo de amplificación lleve a cabo la reacción de amplificación de ácidos nucleicos, el dispositivo de amplificación puede llevar a cabo repetidamente una operación de incremento o disminución de la temperatura de las muestras. El dispositivo de amplificación puede obtener un conjunto de datos mediante la medición de las señales generadas por las muestras en cada ciclo.
- 65 El dispositivo de amplificación puede estar conectado al dispositivo de análisis por un cable o inalámbricamente. El dispositivo de amplificación transmite el conjunto de datos obtenido al dispositivo de análisis mediante una conexión por cable o inalámbrica.

El dispositivo de análisis obtiene el conjunto de datos a partir del dispositivo de amplificación. El dispositivo de análisis analiza el conjunto de datos para determinar si está presente o ausente una secuencia diana de ácido nucleico en la muestra. En otras palabras, el dispositivo de análisis determina el positivo o negativo para la muestra.

5 El dispositivo de análisis incluye un dispositivo de visualización. El dispositivo de visualización puede mostrar un conjunto de datos o mostrar un conjunto de datos flotantes en forma de un gráfico. El dispositivo de visualización puede mostrar una función sigmoidal, una función escalonada o similar. Además, el dispositivo de visualización puede mostrar si el analito diana está presente o ausente, y un resultado de detección para cada muestra.

10 El aparato de análisis puede leer un conjunto de datos incluido en un medio de almacenamiento. El medio de almacenamiento puede almacenar el conjunto de datos, o puede almacenar programas y similares utilizado en el aparato de análisis. El medio de almacenamiento puede ser un CD, un USB o similar.

15 El aparato de análisis puede ser un ordenador, un teléfono inteligente, una tableta o un dispositivo vestible. El aparato de análisis incluye un procesador, memoria y un dispositivo de visualización.

Las características y ventajas de la presente invención se resumen a continuación:

20 (a) La presente invención permite la detección eficiente de una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico en un canal de detección, mediante la obtención de un conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal, un valor de cambio de señal para una secuencia diana de ácido nucleico correspondiente en un intervalo de temperatura de detección asignado a cada una de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico.

25 (b) La presente invención utiliza la generación de señal de las duplas que contienen un oligonucleótido etiquetado en lugar de la generación de señal a partir de los amplicones de las secuencias diana de ácido nucleico. Estos duplas generalmente presentan una longitud más corta que los amplicones y, de esta manera, son más susceptibles a hibridación o disociación incluso con cambios de temperatura relativamente pequeños. Además, la utilización de una dupla que contiene un oligonucleótido etiquetado permite proporcionar valores de cambio de señal indicativos de la presencia de una secuencia diana de ácido nucleico, incluso con temperaturas de referencia espaciadas 5 °C o menos.

30 (c) La presente invención utiliza una pluralidad de duplas que contienen un oligonucleótido etiquetado. Estos duplas deben diseñarse elaboradamente para presentar diferentes valores T_f . En una realización, la formación de duplas de una manera dependiente de la escisión que implica un oligonucleótido de mediación no resulta afectada por las secuencias diana de ácido nucleico, permitiendo ajustar libremente los valores T_f de las duplas. De esta manera, la formación de duplas por la escisión que implica el oligonucleótido de mediación puede maximizar la utilidad de la presente invención.

35 (d) Los oligonucleótidos etiquetados convencionales, particularmente las sondas marcadas, hibridables con una secuencia diana de ácido nucleico pueden escindirse durante la reacción y competir con cualquiera de las cadenas de una secuencia diana de ácido nucleico de doble cadena, resultando en una reducción en el valor de cambio de señal en el caso de que la ácido nucleico polimerasa presente actividad de nucleasa 5'. En una realización, la formación de duplas dependiente de la escisión de que implica un oligonucleótido de mediación de acuerdo con la presente invención puede evitar dicha reducción del valor de cambio de señal.

40 (e) La invención utiliza dos temperaturas de referencia para cada secuencia diana de ácido nucleico. Debido a que el intervalo entre las dos temperaturas de referencia puede fijarse para que sea relativamente estrecha, p. ej., 5 °C o menos, el método de la presente invención puede eliminar la posibilidad de que los valores de cambio de señal para las demás secuencias diana de ácido nucleico puedan incluirse en los valores de cambio de señal a las dos temperaturas de referencia.

45 (f) La presente invención permite la detección de una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico en un único recipiente de reacción utilizando un único canal de detección.

50 (g) El conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal para cada secuencia diana de ácido nucleico utilizada en la presente invención puede proporcionar una señal de ruido reducida, una variación de la señal entre pocillos o entre instrumentos reducida, o una línea base corregida.

55 (h) La determinación de las temperaturas de referencia basada en un valor de T_f esperado de una dupla para la secuencia diana de ácido nucleico puede resultar inadecuada debido al desplazamiento del valor de T_f en la reacción actual. La presente invención permite la selección de temperaturas de referencia que reflejan una reacción actual a partir de una pluralidad de temperaturas de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico.

60 A continuación, se describe la presente invención en mayor detalle mediante ejemplos. Resultará evidente para el experto en la materia que estos ejemplos pretenden ser más concretamente ilustrativos y que el alcance de la presente invención tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas no se encuentra limitado a o por los ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: detección de secuencia diana de ácido nucleico (diana única).

5 El Ejemplo 1 ejemplifica una realización de la presente invención en la que se determinan dos temperaturas de detección basándose en un valor de T_f esperado de una dupla para una secuencia diana de ácido nucleico y se utilizan como temperaturas de referencia.

10 *Preparación de composición generadora de señal.*

Se mezclaron por separado cuatro muestras con una composición generadora de señal (es decir, mezcla de oligonucleótido y mezcla maestra de enzima) contenida en el kit Allplex™ STI-GU (Seegene Inc., n.º de cat. SD9802X) para detectar *Chlamydia trachomatis* serovars L (CT).

15 La composición generadora de señal contenía una composición para formar una dupla que proporciona una señal detectable para una secuencia diana de ácido nucleico mediante el método PTOCE. En donde está presente la secuencia diana de ácido nucleico en una muestra, el oligonucleótido de mediación (es decir, PTO) hibridado específicamente con la secuencia diana de ácido nucleico es escindido por una polimerasa que presenta actividad de 20 nucleasa 5' y un fragmento de la escisión se hibrida con un oligonucleótido de captura (es decir, CTO) para la extensión, formando de esta manera una dupla extendida que proporciona una señal detectable.

25 La T_f esperada de la dupla extendida en la presencia de CT es 64,5 °C. La parte de molde del CTO presenta una etiqueta dual de Cal Red 610 y BHQ2. Las cuatro muestras contienen ADNp clonado con una secuencia de CT en las cantidades de 10^6 copias/reacción, 10^4 copias/reacción, 10^3 copias/reacción y 10^2 copias/reacción, respectivamente. La mezcla de reacción para una amplificación por PCR en tiempo real se preparó con el kit Allplex™ STI-GU: mezcla de reacción en el volumen final de 20 µl que contenía 5 µl de 4X GU MOM, 5 µl de EM1, 5 µl de agua libre de ARNasa y 5 µl de muestra de ADNp. "MOM" es una mezcla de oligonucleótidos y EM1 es la polimerasa Taq.

30 *Reacción y obtención de valores de señal.*

35 Se llevaron a cabo reacciones de amplificación por PCR en tiempo real utilizando las cuatro mezclas de reacción en CFX96 (ver. 1.6, Bio-Rad, Inc.). Los perfiles de temperatura y tiempo de las reacciones de amplificación se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1

Etapa	Temp.	Tiempo (min:s)	Ciclo	Lectura de placa
1	50,0 °C	4:00	1	-
2	95,0 °C	15:00	1	-
3	95,0 °C	00:30		-
4	60,0 °C	01:00	5	-
5	72,0 °C	00:30		-
6	GOTO 3	4 veces más	-	-
7	95,0 °C	00:10		-
8	60,0 °C	01:00		-
9	63,0 °C	0:01	40	Lectura de placa
10	66,0 °C	0:01		Lectura de placa
11	GOTO 7	40 veces más	-	-
12	55,0 °C	0:30	-	-

40 Se fijaron los períodos de tiempo en los ciclos 1 a 5 (etapas 3 a 6) para que fuesen más largos que los demás ciclos después del ciclo 6, para la activación de una reacción inicial. Se detectaron los valores de señal en los ciclos 1 a 5 y se procesaron como URF 0. Los valores de señal en los ciclos 6 a 45 (etapas 7 a 11) se detectaron a 63 °C y 66 °C. Los valores de señal se midieron en el canal de Cal Red 610.

45 *Obtención de valores de cambio de señal.*

45 Se obtuvieron los valores de cambio de señal mediante la resta de los valores de señal a 66 °C respecto de los valores de señal a 63 °C en cada uno de los ciclos 6 a 45.

50 *Obtención de un conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal.*

50 Utilizando los valores de cambio de señal en los ciclos 6 a 45, se obtuvo un conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal y se representó gráficamente con ciclos frente a valores de cambio de señal.

Determinación de la presencia o la ausencia de la secuencia diana de ácido nucleico.

5 Se determinó la presencia o la ausencia de la secuencia diana de ácido nucleico mediante el ajuste del conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal a una función sigmoidal y aplicando un valor umbral (URF 110) al conjunto de datos ajustado.

10 La FIG. 7 representa las curvas de amplificación obtenidas mediante la representación gráfica de conjuntos de datos de ciclo/valor de cambio de señal para las cuatro muestras. Las líneas de puntos representan los valores de cambio de señal calculados en cada ciclo y las líneas continuas representan los valores ajustados a la función sigmoidalmente utilizando una función sigmoidal de fórmula matemática 1: URF, valor de señal máximo de la función sigmoidal; df, la pendiente máxima de la función sigmoidal; a4, la forma de la función sigmoidal, y Ct, el ciclo en el que la función sigmoidal cruza el valor umbral.

15 En donde la cantidad del ADNp de CT era 10^6 copias/reacción, R², el valor de señal máxima (URF), df, a4 y Ct se estimó que eran de 0,99773, 601,44648, 70,3056, 0,20484 y 17,4272, respectivamente. En donde la cantidad del ADNp de CT era 10^4 copias/reacción, R², el valor de señal máxima (URF), df, a4 y Ct se estimó que eran de 0,99982, 696,38351, 84,569, 0,21059 y 23,5245. En donde la cantidad del ADNp de CT era de 10^3 copias/reacción, R², el valor de señal máxima (URF), df, a4 y Ct se estimó que eran de 0,99933, 576,43263, 69,6769, 0,20955 y 27,3389. En donde la cantidad del ADNp de CT era de 10^2 copias/reacción, R², el valor de señal máxima (URF), df, a4 y Ct se estimó que eran de 0,99946, 354,57686, 47,39, 0,22683 y 31,295.

25 Como resultado, se analizaron las cuatro muestras para que presentasen valores máximos de las curvas ajustadas sigmoidalmente que superasen el valor umbral, URF 110, y por lo tanto, para que fuesen positivos para CT. Además, a medida que se redujeron las cantidades de la secuencia diana de ácido nucleico, se midieron valores mayores de Ct (17,4272, 23,5245, 27,3389 y 31,295).

30 Estos resultados muestran que la presente invención permite determinar la presencia o ausencia de secuencias diana de ácido nucleico de una manera exacta y fiable mediante un conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal obtenidos a partir de un valor de cambio de señal en cada ciclo de amplificación.

Ejemplo 2: detección de secuencia diana de ácido nucleico (múltiples dianas).

35 El Ejemplo 2 ejemplifica una realización de la presente invención en la que se determinaron los temperaturas de detección basándose en el valor de Tf esperado de una dupla para una secuencia diana de ácido nucleico y se utilizaron como temperaturas de referencia.

Preparación de composición generadora de señal.

40 Se mezclaron cinco muestras con composiciones generadoras de señal contenidas en el kit Allplex™ STI-GU (Seegene Inc., n.º de cat. SD9802X) para detectar *Chlamydia trachomatis* serovars L (CT) y *Treponema pallidum* (TP).

45 La Tf esperada de la dupla extendido en la presencia de CT era de 64,5 °C. La parte de molde de CTO para CT presentaba una etiqueta dual de Cal Red 610 y BHQ2. La Tf esperada de la dupla extendido en la presencia de TP era de 76 °C. La parte de molde de CTO para TP también presentaba una etiqueta dual de Cal Red 610 y BHQ2.

Se prepararon las cinco muestras para que contuviesen moléculas de ADNp de CT y TP, tal como en la Tabla 2.

TABLA 2

Dianas	CT (copias/rxn)	CT (copias/rxn)	CT (copias/rxn)
TP (copias/rxn)	CT 10^4 TP 10^4	CT 10^3 TP 10^4	CT 10^2 TP 10^4
TP (copias/rxn)	CT 10^4 TP 10^3	-	-
TP (copias/rxn)	CT 10^4 TP 10^2	-	-

50 La mezcla de reacción para una amplificación mediante PCR en tiempo real se preparó con el kit Allplex™ STI-GU: mezcla de reacción en el volumen final de 20 µl que contenía 5 µl de 4X GU MOM, 5 µl de EM1, 5 µl de agua libre de ARNasa y 5 µl de muestra de ADNp.

55 *Reacción y obtención de valores de señal.*

Se llevaron a cabo reacciones de amplificación mediante PCR en tiempo real utilizando las cinco mezclas de reacción en CFX96 (ver. 1.6, Bio-Rad, Inc.). Los perfiles de temperatura y tiempo de las reacciones de amplificación se resumen en la Tabla 3.

5

TABLA 3

Etapa	Temp.	Tiempo (min:s)	Ciclo	Lectura de placa
1	50,0 °C	4:00	1 5	-
2	95,0 °C	15:00		-
3	95,0 °C	00:30		-
4	60,0 °C	01:00		-
5	72,0 °C	00:30		-
6	GOTO 3	4 más veces		-
7	95,0 °C	00:10	40	-
8	60,0 °C	01:00		-
9	63,0 °C	0:01		Lectura de placa
10	66,0 °C	0:01		Lectura de placa
11	72,0 °C	0:10		-
12	74,5 °C	0:01		Lectura de placa
13	77,5 °C	0:01		Lectura de placa
14	GOTO 7	40 veces más		-
15	55,0 °C	0:30	-	-

10 Se fijaron los periodos de tiempo en los ciclos 1 a 5 (etapas 3 a 6) para que fuesen más largos que los demás ciclos después del ciclo 6 para la activación de una reacción inicial. Los valores de señal en los ciclos 1 a 5 se detectaron y procesaron como URF 0. Los valores de señal en los ciclos 6 a 45 (etapas 7 a 14) se detectaron a las temperaturas de detección. Para la detección de CT, se midieron los valores de señal a 63 °C y a 66 °C, y para la detección de TP, se midieron los valores de señal a 74,5 °C y a 77,5 °C.

15 *Obtención de valores de cambio de señal.*

20 Se obtuvieron los valores de cambio de señal mediante la diferencia de los valores de señal en cada uno de los ciclos 6 a 45. Se obtuvieron los valores de cambio de señal para la detección de CT mediante la resta de los valores de señal a 66 °C respecto de los valores de señal a 63 °C, y se obtuvieron los valores de cambio de señal para la detección de TP mediante la resta de los valores de señal a 77,5 °C respecto de los valores de señal a 74,5 °C.

25 *Obtención de un conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal.*

30 Utilizando los valores de cambio de señal en los ciclos 6 a 45, se obtuvieron conjuntos de datos de ciclo/valor de cambio de señal y se representaron gráficamente como ciclos frente a valores de cambio de señal.

35 *Determinación de la presencia o la ausencia de secuencia diana de ácido nucleico.*

40 La presencia o la ausencia de la secuencia diana de ácido nucleico se determinó mediante el ajuste de los conjuntos de datos de ciclo/valor de cambio de señal con una función sigmoidal y aplicando un valor umbral (URF 110) al conjunto de datos ajustado.

45 Las figs. 8 a 12 representan curvas de amplificación obtenidas mediante la representación gráfica de conjuntos de datos de ciclo/valor de cambio de señal para las cinco muestras. Las líneas de puntos representan los valores de cambio de señal calculados en cada ciclo y las líneas continuas representan los valores ajustados sigmoidalmente utilizando una función sigmoidal de Fórmula matemática 1. En las figs. 8 a 12, la curva a la izquierda representa una curva de amplificación para CT y la curva a la derecha representa una curva de amplificación para TP.

50 Se analizaron las cinco muestras para que presentasen valores máximos de las curvas ajustadas sigmoidalmente que superasen el valor umbral, URF 110, y por lo tanto para que fuesen positivos para tanto CT como TP. Estos resultados se refiere a que en donde se encuentran presentes múltiples secuencias diana de ácido nucleico, la presente invención permite determinar la presencia o la ausencia de múltiples secuencias diana de ácido nucleico de una manera simultánea y exacta mediante un conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal obtenido a partir de un valor de cambio de señal en cada ciclo de amplificación.

55 Además, a medida que se reducían las cantidades de las secuencias diana de ácido nucleico en las cinco muestras, se midió un aumento de los valores de Ct. En las figs. 8 a 10, a medida que se reducían las cantidades de ADNp de TP (10^4 copias/reacción, 10^3 copias/reacción y 10^2 copias/reacción) en la presencia de CP 10^4 copias/reacción, se estimaron valores de Ct incrementados (26,1393, 29,4043 y 34,0292), y en las FIGS. 8, 11 y 12, a medida que se

reducen las cantidades de ADNp de CT (10^4 copias/reacción, 10^3 copias/reacción y 10^2 copias/reacción) en presencia de TP 10^4 copias/reacción, se estimaron valores de C_t incrementados (24,1816, 27,9323 y 32,2068).

5 En consecuencia, los presentes inventores encontraron que la presente invención permite determinar simultánea y fiablemente la presencia o ausencia de múltiples secuencias diana de ácido nucleico en un único recipiente de reacción mediante un conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal obtenido a partir de un valor de cambio de señal en cada ciclo de amplificación.

10 *Ejemplo 3: detección de secuencia diana de ácido nucleico utilizando temperaturas de referencia seleccionadas de más de tres temperaturas de detección.*

15 En los Ejemplos 1 a 2, se determinaron dos temperaturas de detección basándose en un valor esperado de T_f de una dupla para una secuencia diana de ácido nucleico y se utilizaron como temperaturas de referencia. El Ejemplo 3 exemplifica una realización de la presente invención en la que se determinaron por lo menos tres temperaturas de detección para cada secuencia diana de ácido nucleico a fin de obtener valores de señal y después se seleccionaron dos temperaturas de referencia entre las tres o más temperaturas de detección mediante consideración de los valores de señal.

20 *Preparación de composición generadora de señal.*

25 Se mezclaron diecisésis muestras por separado con composiciones generadoras de señal contenidas en el kit AnyplexII™ VPH HR (Seegene Inc., n.º de cat. HP7E00X) para detectar el gen de HBB (hemoglobina beta), VPH (papilomavirus humano) tipo 35 y VPH tipo 18.

30 35 La composición generadora de señal contiene una composición para formar una dupla que proporciona una señal detectable para una secuencia diana de ácido nucleico mediante el método PTOCE. En el caso de que esté presente la secuencia diana de ácido nucleico en una muestra, un oligonucleótido de mediación (es decir, PTO) hibridado específicamente con la secuencia diana de ácido nucleico es escindida por una polimerasa que presenta actividad de nucleasa 5' y un fragmento de escisión se hibrida con un oligonucleótido de captura (es decir, CTO) para la extensión, formando de esta manera una dupla extendida que proporciona una señal detectable.

40 45 La T_f esperada de la dupla extendida en la presencia del gen de HBB es 63 °C. La parte de molde del CTO para el gen HBB presenta una etiqueta dual de Q670 y BHQ2. La T_f esperada de la dupla extendida en la presencia de VPH tipo 35 es 70,5 °C. La parte de molde del CTO para VPH tipo 35 presenta una etiqueta dual de Q670 y BHQ2. La T_f esperada de la dupla extendida en la presencia de VPH tipo 18 es 76,5 °C. La parte de molde de CTO para VPH tipo 18 presenta una etiqueta dual de Q670 y BHQ2.

Se prepararon las diecisésis muestras tal como en la Tabla 4, utilizando ADNp clonado con el gen HBB, la secuencia de VPH tipo 35 o la secuencia de VPH tipo 18 en una cantidad de 50 copias/reacción.

TABLA 4

Muestras	1	2	3	4
A	-	-	HBB	HBB
	-	VPH tipo 35	-	VPH tipo 35
	-	-	-	-
B	-	-	HBB	HBB
	-	VPH tipo 35	-	VPH tipo 35
	-	-	-	-
C	-	-	HBB	HBB
	-	VPH tipo 35	-	VPH tipo 35
	VPH tipo 18	VPH tipo 18	VPH tipo 18	VPH tipo 18
D	-	-	HBB	HBB
	-	VPH tipo 35	-	VPH tipo 35
	VPH tipo 18	VPH tipo 18	VPH tipo 18	VPH tipo 18

45 La mezcla de reacción para una amplificación mediante PCR en tiempo real se preparó con el kit AnyplexII™ VPH HR: mezcla de reacción en el volumen final de 20 μ l que contenía 5 μ l de 4X VPH HR TOM, 5 μ l de EM1, 5 μ l de agua libre de ARNasa y 5 μ l de muestra de ADNp. "TOM" es una mezcla de oligonucleótidos y EM1 es la polimerasa *Taq*.

Reacción

50 55 Se llevaron a cabo reacciones de amplificación mediante PCR en tiempo real utilizando las diecisésis mezclas de reacción en CFX96 (ver. 1.6, Bio-Rad, Inc.) y se detectaron las señales en un canal (canal Q670). Los perfiles de temperatura y tiempo de las reacciones de amplificación se resumen en la Tabla 5.

TABLA 5

Etapa	Temp.	Tiempo (min:s)	Ciclo	Lectura de placa
1	95 °C	15:00	25	-
2	95 °C	00:03		-
3	60 °C	00:10		-
4	72 °C	00:10		-
5	95 °C	00:03		-
6	60 °C	00:10		-
7	60 °C	00:01		Lectura de placa
8	61,5 °C	00:01		Lectura de placa
9	63 °C	00:01		Lectura de placa
10	64,5 °C	00:01		Lectura de placa
11	66 °C	00:01		Lectura de placa
12	67,5 °C	00:01		Lectura de placa
13	69 °C	00:01		Lectura de placa
14	70,5 °C	00:01		Lectura de placa
15	72 °C	00:01		Lectura de placa
16	73,5 °C	00:01		Lectura de placa
17	75 °C	00:01		Lectura de placa
18	76,5 °C	00:01		Lectura de placa
19	78 °C	00:01		Lectura de placa
20	79,5 °C	00:01		Lectura de placa
21	81 °C	00:01		Lectura de placa
22	GOTO 2	24 veces más	-	-
23	55 °C	00:30	-	-

- 5 Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo durante 50 ciclos. Las etapas 2 a 4 corresponden a ciclos impares y las etapas 5 a 21 corresponden a ciclos pares. Los valores de señal se midieron solo en ciclos pares.

Obtención de valores de señal a temperaturas de detección.

- 10 Para cada secuencia diana de ácido nucleico, se fijaron seis temperaturas de detección en un intervalo de temperatura de detección que incluía un valor de T_f esperado de una dupla para una secuencia diana de ácido nucleico correspondiente. Para el gen de HBB, se fijaron las temperaturas de detección en 60 °C, 61,5 °C, 63 °C, 64,5 °C, 66 °C y 67,5 °C; para la secuencia de VPH tipo 35, las temperaturas de detección se fijaron en 66 °C, 67,5 °C, 69 °C, 70,5 °C, 72 °C y 73,5 °C, y para la secuencia de VPH tipo 18, las temperaturas de detección se fijaron en 73,5 °C, 75 °C, 76,5 °C, 78 °C, 79,5 °C y 81 °C. Las temperaturas de detección se fijaron en el intervalo de 1,5 °C.

15 Se aproximaron los valores de señal en ciclos impares mediante interpolación de los valores en ciclos impares. En el presente Ejemplo, se determinó un valor medio de los valores de señal en ciclos contiguos pares como los valores de señal en ciclos impares.

20 20 Las temperaturas entre las temperaturas de detección y los valores de señal en las temperaturas entre temperaturas de detección se aproximaron mediante interpolación de temperaturas de detección y valores de señal a temperaturas de detección. En el presente Ejemplo, se determinó un valor medio de los valores de señal en temperaturas de detección contiguas, como valores de señal a una temperatura media de temperaturas de detección contiguas.

25 25 *Selección de temperaturas de referencia.*

Se seleccionaron las temperaturas de referencia para las secuencias diana de ácido nucleico del modo siguiente:

- 30 30 Para la selección de las temperaturas de referencia, se utilizaron valores de señal en los ciclos 46 a 50. Se calcularon cinco valores de cambio de señal utilizando los valores de señal medidos a seis temperaturas de detección en cada ciclo para el gen de HBB. Se calcularon los valores de cambio de señal mediante la resta de los valores de señal en temperaturas de detección contiguas y se asignaron a temperaturas interpoladas de las temperaturas de detección contiguas (es decir, una temperatura media de las dos temperaturas de detección contiguas). Los valores medios de los valores de cambio de señal a la misma temperatura de detección en los ciclos 46 a 50 se calcularon para proporcionar valores medios de cambio de señal a temperaturas de detección correspondientes. Se asignó el valor de cambio de señal medio más alto como un primer valor de cambio de señal medio, un valor de cambio de señal medio más alto entre valores de cambio de señal medios contiguos al valor de cambio de señal medio más alto se asignó como segundo valor de cambio de señal medio y los demás valores de cambio de señal medios, como tercer valor de cambio de señal medio. Se calculó la proporción de (diferencia entre el segundo valor de cambio de señal medio y el tercero valor de cambio de señal medio) y (diferencia entre el primer valor de cambio de señal medio y el

tercer valor de cambio de señal medio). En donde la proporción excedía un valor umbral (0,4), se asignó el valor de cambio de señal medio más alto a la mediana de temperatura entre la temperatura para el primer valor de cambio de señal medio y la temperatura para el segundo valor de cambio de señal medio, y se seleccionaron dos temperaturas separadas de la mediana de temperatura en el mismo intervalo (p. ej., 1,5 °C) en ambas direcciones como dos temperaturas de referencia. En donde la proporción es no superior al valor umbral (0,4), el primer valor de cambio de señal medio se determinó finalmente como el valor de cambio de señal medio más alto y dos temperaturas separadas de una temperatura interpolada correspondiente al primer valor de cambio de señal medio en el mismo intervalo (p. ej., 1,5 °C) se seleccionaron en ambas direcciones como dos temperaturas de referencia.

10 Se seleccionaron dos temperaturas de referencia para la detección de VPH tipo 35 y VPH tipo 18 utilizando valores de señal a seis temperaturas de detección en los ciclos 46 a 50 de la misma manera que aquellos para el gen de HBB.

La Tabla 6 muestra dos temperaturas de referencia para cada muestra, que se utilizaron para calcular los valores de cambio de señal para la detección del gen de HBB.

15

TABLA 6

Muestras	1	2	3	4
A	-	-	62,25 °C 65,25 °C	62,25 °C 65,25 °C
B	-	-	61,50 °C 64,50 °C	61,50 °C 64,50 °C
C	-	-	62,25 °C 65,25 °C	61,50 °C 64,50 °C
D	-	-	62,25 °C 65,25 °C	62,25 °C 65,25 °C

20 Los presentes inventores esperaban que las dos temperaturas de detección para el gen de HBB fueran 61,5 °C y 64,5 °C basándose en la T_f esperada (63 °C) de una dupla para el gen de HBB. En las muestras B3, B4 y C4, las temperaturas de detección eran iguales a las dos temperaturas de detección esperadas basándose en la T_f esperada. En las muestras A3, A4, C3, D3 y D4, las dos temperaturas de detección fueron 62,25 °C y 65,25 °C. Se obtuvieron los valores de señal en 62,25 °C y 65,25 °C mediante interpolación de valores de señal en temperaturas de detección contiguas.

25 La Tabla 7 muestra dos temperaturas de referencia para cada muestra, que se utilizaron para calcular los valores de cambio de señal para la detección de la secuencia de VPH tipo 35.

30

TABLA 7

Muestras	1	2	3	4
A	-	69,75 °C 72,75 °C	-	69,75 °C 72,75 °C
B	-	69,75 °C 72,75 °C	-	69,75 °C 72,75 °C
C	-	69,75 °C 72,75 °C	-	69,75 °C 72,75 °C
D	-	69,75 °C 72,75 °C	-	69,75 °C 72,75 °C

35 Los presentes inventores esperaban que las dos temperaturas de detección para la secuencia de VPH tipo 35 fueran 69 °C y 72 °C, basándose en una T_f esperada (70,5 °C) de una dupla para la secuencia de VPH tipo 35. En todas las muestras, se seleccionaron las dos temperaturas de detección como 69,75 °C y 72,75 °C. Se obtuvieron valores de señal a 69,75 °C y 72,75 °C mediante interpolación de los valores de señal en temperaturas de detección contiguas.

La Tabla 8 muestra dos temperaturas de referencia para cada muestra, que se utilizaron para calcular valores de cambio de señal para la detección de la secuencia de VPH tipo 18.

40

TABLA 8

Muestras	1	2	3	4
A	-	-	-	-
B	-	-	-	-
C	75,75 °C 78,75 °C	75,75 °C 78,75 °C	75,75 °C 78,75 °C	75,75 °C 78,75 °C

(continuación)

Muestras	1	2	3	4
D	75,75 °C 78,75 °C	75,75 °C 78,75 °C	75,75 °C 78,75 °C	75,75 °C 78,75 °C

5 Los presentes inventores esperaban que las dos temperaturas de detección para la secuencia de VPH tipo 18 fueran 75 °C y 78 °C, basándose en una T_f esperada (76,5 °C) de una dupla para la secuencia de VPH tipo 18. En todas las muestras, se seleccionaron las dos temperaturas de detección como 75,75 °C y 78,75 °C. Se obtuvieron valores de señal a 75,75 °C y 78,75 °C mediante interpolación de los valores de señal en temperaturas de detección contiguas.

10 *Obtención de un conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal.*

10 Se calcularon los valores de cambio de señal para cada muestra y secuencia diana de ácido nucleico mediante la resta de los valores de señal a las dos temperaturas de referencia seleccionadas.

15 *Determinación de la presencia o la ausencia de secuencia diana de ácido nucleico.*

15 La presencia o la ausencia de las secuencias diana de ácido nucleico en diecisésis muestras se determinó mediante ajuste de los conjuntos de datos de ciclo/valor de cambio de señal con una función sigmoidal y aplicando un valor umbral (URF 50) al conjunto de datos ajustado.

20 Las Tablas 9 a 11 representan los valores de C_t de las secuencias diana de ácido nucleico en las muestras.

TABLA 9. HBB

Muestras	1	2	3	4
A	-	-	35,70	37,86
B	-	-	35,67	39,79
C	-	-	36,76	39,21
D	-	-	37,16	39,98

25 TABLA 10. VPH tipo 35.

Muestras	1	2	3	4
A	-	35,84	-	35,77
B	-	36,24	-	35,45
C	-	35,26	-	36,22
D	-	35,60	-	34,91

TABLA 11. VPH tipo 18.

Muestras	1	2	3	4
A	-	-	-	-
B	-	-	-	-
C	34,40	34,10	34,15	34,71
D	33,43	35,00	34,20	34,61

30 Los resultados demuestran que las temperaturas de referencia pueden seleccionarse a partir de por lo menos tres temperaturas de detección al considerar valores de señal a por lo menos tres temperaturas de detección, y puede determinarse la presencia o la ausencia de secuencias diana de ácido nucleico mediante valores de cambio de señal entre las temperaturas de referencia seleccionadas en ciclos de amplificación.

35 Los valores T_f esperados o calculados de las duplas para las secuencias diana de ácido nucleico serían diferentes de los valores T_f de reacción reales bajo condiciones de reacción tales como tipos de muestras, temperaturas de reacción, concentraciones salinas, concentraciones de cationes divalentes, concentraciones de oligonucleótidos y pH. Por lo tanto, los valores T_f de reacción reales de las duplas para las secuencias diana de ácido nucleico presentarían 40 variación entre reacciones. La presente invención, utilizando temperaturas de referencia determinadas mediante la consideración de valores de señal de temperaturas de detección, resulta muy ventajosa para detectar secuencias diana de ácido nucleico con exactitud, en el sentido de que se seleccionan temperaturas de referencia adecuadas a los valores T_f de reacción reales.

45 *Ejemplo 4: detección de secuencia diana de ácido nucleico utilizando temperaturas de referencia seleccionadas de más de tres temperaturas de detección.*

Otra realización de la presente invención utilizando temperaturas de referencia seleccionadas de más de tres temperaturas de detección se exemplificó con diferentes secuencias diana de ácido nucleico y duplas que comprendían una etiqueta informadora diferente de los utilizados en el Ejemplo 3.

5 *Preparación de composición generadora de señal.*

Se mezclaron dieciséis muestras con composiciones generadoras de señal para detectar el VPH (virus humano del papiloma) tipo 33, VPH tipo 39 y VPH tipo 52. Las composiciones generadoras de señal contenían una composición para formar una dupla que proporcionaba una señal detectable para una secuencia diana de ácido nucleico mediante el método PTOCE.

10 La T_f esperada de la dupla extendido en la presencia del VPH tipo 33 es 63 °C. La parte de molde del CTO para el VPH tipo 33 presenta una etiqueta dual de Cal red 610 y BHQ2. La T_f esperada de la dupla extendido en la presencia de VPH tipo 39 es 70 °C. La parte de molde del CTO para el VPH tipo 39 presenta una etiqueta dual de Cal red 610 y BHQ2. La T_f esperada de la dupla extendido en la presencia del VPH tipo 52 es 76 °C. La parte de molde del CTO para el VPH tipo 52 presenta una etiqueta dual de Cal red 610 y BHQ2.

15 Las dieciséis muestras se prepararon como Tabla 12 utilizando ADNp clonado con la secuencia del VPH tipo 33, la secuencia del VPH tipo 39 o la secuencia del VPH tipo 52 en la cantidad de 50 copias/reacción.

20

TABLA 12

Muestras	1	2	3	4
A	-	-	VPH tipo 33	VPH tipo 33
	-	VPH tipo 39	-	VPH tipo 39
	-	-	-	-
B	-	-	VPH tipo 33	VPH tipo 33
	-	VPH tipo 39	-	VPH tipo 39
	-	-	-	-
C	-	-	VPH tipo 33	VPH tipo 33
	-	VPH tipo 39	-	VPH tipo 39
	VPH tipo 52	VPH tipo 52	VPH tipo 52	VPH tipo 52
D	-	-	VPH tipo 33	VPH tipo 33
	-	VPH tipo 39	-	VPH tipo 39
	VPH tipo 52	VPH tipo 52	VPH tipo 52	VPH tipo 52

25 Las secuencias del cebador cadena arriba, cebador cadena abajo, PTO y CTO utilizados en el presente Ejemplo son:

33-F 5'-AATGGTATTGTTGGGGCAAT|||||ATTGTTAC-3' (SEQ ID NO: 1)

33-R 5'-TCCTGIAACTASCAGATGGAGG|||||TTAACCAA-3' (SEQ ID NO: 2)

33-PTO 5'-AACGGTACGACGGCACACARGTAACTAGTGACAGTACATATAAAAATGA[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 3)

33-CTO 5'-[BHQ2]TTATATTTATTTATTATA[T(CAL Red 610)]ACTGCCGTGTAACCGTT-3' (SEQ ID NO: 4)

39-F 5'-GAYACTACCCGTAGTACCAACTTAC|||||TACCTCTA-3' (SEQ ID NO: 5)

39-R 5'-CTGGCAGATGGTGGAGGAG|||||GCRAAATTC-3' (SEQ ID NO: 6)

39-PTO 5'-ACGGCGCAATACCTCCACGTGCCTKRTATATTCCCTAAA[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 7)

39-CTO 5'-[BHQ2]TATTATTATTAAGAGCTGCT[T(CAL Red 610)]CCGAGGTATTGCCCGT-3' (SEQ ID NO: 8)

52-F 5'-CAGGGCCACAATAATGGCA|||||TGGGGCAAT-3' (SEQ ID NO: 9)

52-R 5'-CCTTCCTTAGGTGGTGTGT|||||TGACAWGT-3' (SEQ ID NO: 10)

52-PTO 5'-TGTCGATCGCGTCCAGTCCTCTAAATAGTGGCATCCATYTAT[espaciador C3]-3' (SEQ ID NO: 1)

52-CTO 5'-[BHQ2]TGCATATGTCGGGTACGAC[T(CAL Red 610)]GGTGGACGCGATCGACA-3' (SEQ ID NO: 12)

(I: desoxiinosina)

5

(Las letras subrayadas indican la parte de etiquetado 5' del PTO)

La mezcla de reacción para una amplificación mediante PCR en tiempo real se preparó para contener, en el volumen final de 20 μ l, una muestra, oligonucleótidos para la detección de la diana VPH tipo 33 [6 pmoles de cebador directo (SEQ ID NO: 1), 6 pmoles de cebador inverso (SEQ ID NO: 2), 3 pmoles de PTO (SEQ ID NO: 3), 1 pmol de CTO (SEQ ID NO: 4)], oligonucleótidos para la detección de la diana de VPH tipo 39 [4 pmoles de cebador directo (SEQ ID NO: 5) y 4 pmoles de cebador inverso (SEQ ID NO: 6), 3 pmoles de PTO (SEQ ID NO: 7), 1 pmol de CTO (SEQ ID NO: 8)], oligonucleótidos para la detección de la diana de VPH tipo 52 [3 pmoles de cebador directo (SEQ ID NO: 9) y 3 pmoles de cebador inverso (SEQ ID NO: 10), 2 pmoles de PTO (SEQ ID NO: 11), 1 pmol de TO (SEQ ID NO: 12)] y 10 μ l de EM4 (polimerasa Taq).

Reacción

20 Las reacciones de amplificación mediante PCR en tiempo real se llevaron a cabo utilizando las diecisésis mezclas de reacción en CFX96 (ver. 1.6, Bio-Rad, Inc.) y se detectaron las señales en un canal (canal Cal red 610). Los perfiles de temperatura y tiempo de las reacciones de amplificación son los mismos que los perfiles en el Ejemplo 3.

Obtención de valores de señal a temperaturas de detección.

25 Para cada secuencia diana de ácido nucleico, se fijaron seis temperaturas de detección en un intervalo de temperatura de detección que incluía un valor esperado de Tf de una dupla para una secuencia diana de ácido nucleico correspondiente. Para el gen del VPH tipo 33, las temperaturas de detección se fijaron en 60 °C, 61,5 °C, 63 °C, 64,5 °C, 66 °C y 67,5 °C; para la secuencia del VPH tipo 39, las temperaturas de detección se fijaron en 66 °C, 67,5 °C, 69 °C, 70,5 °C, 72 °C y 73,5 °C, y para la secuencia del VPH tipo 52, las temperaturas de detección se fijaron en 73,5 °C, 75 °C, 76,5 °C, 78 °C, 79,5 °C y 81 °C. Las temperaturas de detección se fijaron en el intervalo de 1,5 °C.

30 Los valores de señal en ciclos impares se aproximaron mediante interpolación de los de ciclos pares. En el presente Ejemplo, se determinó un valor medio e valores de señal en ciclos contiguos pares como valores de señal en ciclos impares.

35

Las temperaturas entre temperaturas de detección y valores de señal en las temperaturas entre las temperaturas de detección se aproximan mediante interpolación de temperaturas de detección y valores de señal a temperaturas de detección. En el presente Ejemplo, se determinó un valor medio de valores de señal en temperaturas de detección contiguas como valores de señal a una temperatura media de temperaturas de detección contiguas.

5

Selección de temperaturas de referencia.

Las temperaturas de referencia para las secuencias diana de ácido nucleico se seleccionaron tal como se describe en el Ejemplo 3.

10

La Tabla 13 muestra dos temperaturas de referencia para cada muestra, que se utilizaron para calcular los valores de cambio de señal para la detección del VPH tipo 33.

15

TABLA 13

Muestras	1	2	3	4
A	-	-	62,25 °C 65,25 °C	62,25 °C 65,25 °C
B	-	-	62,25 °C 65,25 °C	62,25 °C 65,25 °C
C	-	-	62,25 °C 65,25 °C	63,00 °C 66,00 °C
D	-	-	62,25 °C 65,25 °C	63,00 °C 66,00 °C

Los presentes inventores esperaban que las dos temperaturas de detección para la secuencia de VPH tipo 39 fueran 69 °C y 72 °C, basándose en una T_f esperada (70 °C) de una dupla para la secuencia de VPH tipo 39. En todas las muestras, se seleccionaron las dos temperaturas de detección como 69 °C y 72 °C. La Tabla 15 muestra dos temperaturas de referencia para cada muestra, que se utilizaron para calcular los valores de cambio de señal para la detección de la secuencia del VPH tipo 52.

20

TABLA 15

Muestras	1	2	3	4
A	-	-	-	-
B	-	-	-	-
C	75,75 °C 78,75 °C	75,75 °C 78,75 °C	75,75 °C 78,75 °C	75,75 °C 78,75 °C
D	75,75 °C 78,75 °C	75,75 °C 78,75 °C	75,75 °C 78,75 °C	75,75 °C 78,75 °C

25

Los presentes inventores esperaban que las dos temperaturas de detección para la secuencia de VPH tipo 52 fueran 75 °C y 78 °C, basándose en una T_f esperada (76 °C) de una dupla para la secuencia de VPH tipo 52. En todas las muestras, se seleccionaron las dos temperaturas de detección como 75,75 °C y 78,75 °C. Se obtuvieron los valores de señal en 75,75 °C y 78,75 °C mediante interpolación de los valores de señal en temperaturas de detección contiguas.

30

Obtención de un conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal.

Los valores de cambio de señal para cada muestra y secuencia diana de ácido nucleico se calcularon mediante resta de los valores de señal a las dos temperaturas de referencia seleccionadas.

35

Determinación de la presencia o la ausencia de una secuencia diana de ácido nucleico.

La presencia o la ausencia de las secuencias diana de ácido nucleico en diecisésis muestras se determinó mediante ajuste de los conjuntos de datos de ciclo/valor de cambio de señal con una función sigmoidal y aplicando un valor umbral (URF 50) al conjunto de datos ajustado.

40

Las Tablas 16 a 18 representan los valores de C_t de las secuencias diana de ácido nucleico en las muestras.

45

TABLA 16. VPH tipo 33.

Muestras	1	2	3	4
A	-	-	37,51	39,12
B	-	-	36,70	39,90
C	-	-	40,17	40,49
D	-	-	38,84	41,47

TABLA 17. VPH tipo 39.

5

Muestras	1	2	3	4
A	-	34,15	-	34,59
B	-	34,96	-	35,01
C	-	34,48	-	34,63
D	-	34,80	-	34,86

TABLA 18. VPH tipo 52.

Muestras	1	2	3	4
A	-	-	-	-
B	-	-	-	-
C	35,07	33,88	34,53	35,81
D	32,74	35,58	34,75	34,72

- 10 Los resultados demuestran que las temperaturas de referencia pueden seleccionarse a partir de por lo menos tres temperaturas de detección en consideración de los valores de señal a por lo menos tres temperaturas de detección y la presencia o la ausencia de secuencias diana de ácido nucleico pueden determinarse a partir de valores de cambio de señal entre las temperaturas de referencia seleccionadas en ciclos de amplificación.

15

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico en una muestra, que comprende:
 5 poner en contacto en un único recipiente de reacción la muestra con composiciones generadoras de señal para detectar la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico, en donde las composiciones generadoras de señal forman una pluralidad de duplas para la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico, en donde cada dupla de la pluralidad de duplas proporciona una señal indicativa de la presencia o la ausencia de cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente y la pluralidad de duplas presentan valores T_f diferentes entre sí,
 10 llevar a cabo una reacción durante por lo menos dos ciclos para (i) la formación de la pluralidad de duplas y (ii) la disociación de las duplas,
 15 obtener en todos o algunos ciclos de la reacción, valores de señal a por lo menos dos temperaturas de detección en cada uno de una pluralidad de intervalos de temperatura de detección asignados a la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico, en donde cada uno de la pluralidad de intervalos de temperatura de detección comprende un intervalo de temperatura en el que cambia la cantidad de una dupla para cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente, pero en donde la cantidad de duplas para las demás secuencias diana de ácido nucleico se mantiene sin cambios,
 20 obtener un valor de cambio de señal de valores de señal entre dos temperaturas de referencia seleccionadas de entre por lo menos dos temperaturas de detección en cada uno de la pluralidad de intervalos de temperatura de detección, de manera que se obtiene un conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal para cada una de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico, y
 25 determinar la presencia o la ausencia de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico en la muestra mediante el conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal para cada una de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico.
2. Método según la reivindicación 1, en el que las composiciones generadoras de señal comprenden oligonucleótidos etiquetados para la formación de la pluralidad de duplas, cada uno de los cuales proporciona la señal indicativa de la presencia de cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente, en donde las duplas formadas comprenden los oligonucleótidos etiquetados y la hibridación y/o disociación de las duplas proporciona una señal detectable.
 30
3. Método según la reivindicación 1, en el que las duplas comprenden oligonucleótidos etiquetados que comprenden una etiqueta que presenta la misma propiedad de señal.
 35
4. Método según la reivindicación 1, en el que la pluralidad de duplas son (i) una dupla formada mediante hibridación entre la secuencia diana de ácido nucleico y un oligonucleótido etiquetado, (ii) una dupla formada mediante hibridación entre un oligonucleótido que comprende una secuencia hibridante complementaria a la secuencia diana de ácido nucleico y un oligonucleótido etiquetado complementario a por lo menos una parte de la secuencia hibridante, o (iii) una dupla formada de una manera dependiente de la escisión que implica un oligonucleótido de mediación, en el que el oligonucleótido de mediación está hibridado con la secuencia diana de ácido nucleico, en donde preferentemente (a) la dupla formada de una manera dependiente de la escisión que implica el oligonucleótido de mediación es una dupla formada de una manera dependiente de la formación de una cadena extendida que se forma mediante extensión de un fragmento liberado por la escisión que implica el oligonucleótido de mediación, (b) la dupla formada de una manera dependiente de la escisión que implica un oligonucleótido de mediación es una dupla formada mediante hibridación de un fragmento liberado mediante la escisión que implica el oligonucleótido de mediación con un oligonucleótido correspondiente, (c) la dupla formada de una manera dependiente de la escisión que implica el oligonucleótido de mediación es una dupla formada de una manera dependiente de la formación de una cadena extendida mediante (i) hibridación del oligonucleótido de mediación con la secuencia diana de ácido nucleico, (ii) la escisión del oligonucleótido de mediación o un amplicón que contiene un oligonucleótido de mediación, por una nucleasa, generando un fragmento, (iii) la hibridación del fragmento con un oligonucleótido de captura que comprende una parte de captura 5' que se hibridará con el fragmento y una parte de molde 3', y (iv) la realización de una reacción de extensión del fragmento hibridado con la parte de captura en la parte de molde 3' para formar la cadena extendida, o (d) la dupla formada de una manera dependiente de la escisión que implica un oligonucleótido de mediación es una dupla formada mediante (i) hibridación del oligonucleótido de mediación con la secuencia diana de ácido nucleico, (ii) la escisión del oligonucleótido de mediación por una nucleasa, generando un fragmento, y (iii) la hibridación del fragmento con un oligonucleótido correspondiente.
 40
5. Método según la reivindicación 4, en el que el amplicón que contiene el oligonucleótido de mediación se produce mediante amplificación de la secuencia diana de ácido nucleico utilizando el oligonucleótido de mediación como un cebador y escindiendo una parte de una secuencia complementaria al oligonucleótido de mediación en el amplicón para liberar un fragmento.
 45
- 60
- 65

6. Método según la reivindicación 4, en el que la dupla formada de una manera dependiente de la formación de la cadena extendida es (i) una dupla entre la cadena extendida y el oligonucleótido de captura, (ii) una dupla entre el oligonucleótido de captura y un oligonucleótido hibridante del oligonucleótido de captura, (iii) una dupla entre un oligonucleótido de captura y una cadena dualmente extendida entre la cadena extendida capturada y el oligonucleótido de captura de cadena extendida, (iv) una dupla entre la cadena dualmente extendida y un oligonucleótido hibridante de la cadena dualmente extendida, o (v) una dupla entre el oligonucleótido de captura de cadena extendida y un oligonucleótido que va a hibridarse con el oligonucleótido de captura de la cadena extendida.
- 10 7. Método según la reivindicación 1, en el que, cuando las temperaturas y valores de señal de las mismas se interpolan a partir de por lo menos dos temperaturas de detección, las dos o más temperaturas de detección comprenden las temperaturas de detección interpoladas.
- 15 8. Método según la reivindicación 1, en el que las dos o más temperaturas de detección son de 2 a 10 en número.
- 20 9. Método según la reivindicación 1, en el que las dos o más temperaturas de detección están seleccionadas de manera que un valor esperado de T_f de la dupla para cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente está comprendido entre una temperatura de detección más alta y una temperatura de detección más baja de las dos o más temperaturas de detección.
- 25 10. Método según la reivindicación 1, en el que las dos temperaturas de referencia se seleccionan con una temperatura de detección más alta y una temperatura de detección más baja de las dos o más temperaturas de detección.
- 30 11. Método según la reivindicación 1, en el que las dos temperaturas de referencia difieren entre sí en no más de 6 °C.
- 35 12. Método según la reivindicación 1, en el que el valor de cambio de señal se calcula mediante la utilización de todos o algunos valores de señal entre las dos temperaturas de referencia o el valor de cambio de señal se calcula mediante la utilización de dos valores de señal a las dos temperaturas de referencia.
- 40 13. Método según la reivindicación 1, en el que (i) las dos o más temperaturas de detección son no menos de 3 en número; el método comprende, además, analizar los valores de señal a las tres o más temperaturas de detección para seleccionar las dos temperaturas de referencia, (ii) las dos o más temperaturas de detección son no menos de 3 en número; los valores de cambio de señal se calculan mediante la utilización de valores de señal a las tres o más temperaturas de detección para seleccionar las dos temperaturas de referencia, o (iii) las dos o más temperaturas de detección son no menos de 3 en número; los valores de cambio de señal se calculan mediante la utilización de valores de señal a las tres o más temperaturas de detección y las dos temperaturas de referencia se seleccionan de manera que un valor de cambio de señal más alto entre los valores de cambio de señal calculados está incluido entre las dos temperaturas de referencia.
- 45 14. Método según la reivindicación 13, en el que el valor de cambio de señal más alto se asigna a una temperatura entre las temperaturas de detección utilizadas para calcular el valor de cambio de señal más alto.
- 50 15. Método según la reivindicación 1, en el que las dos o más temperaturas de detección son no menos de 3 en número; los valores de cambio de señal se calculan mediante la utilización de valores de señal entre temperaturas de detección inmediatamente contiguas y las dos temperaturas de referencia se seleccionan de manera que un valor de cambio de señal más alto entre los valores de cambio de señal calculados está incluido entre las dos temperaturas de referencia; en donde los valores de cambio de señal se asignan a temperaturas entre las temperaturas de detección utilizadas para calcular los valores de cambio de señal correspondientes; el valor de cambio de señal más alto entre los valores de cambio de señal se asigna como un primer valor de cambio, un valor de cambio de señal más alto y un valor de cambio de señal más bajo entre dos valores de cambio de señal contiguos al valor de cambio de señal más alto se asigna a un segundo valor de cambio de señal y un tercer valor de cambio de señal, respectivamente; en el caso de que la proporción entre (i) la diferencia entre el segundo valor de cambio de señal y el tercer valor de cambio de señal, y (ii) la diferencia entre el primer valor de cambio de señal y el tercer valor de cambio de señal supere un valor umbral, el valor de cambio de señal más alto se asigna a una mediana de temperatura entre la temperatura para el primer valor de cambio de señal y la temperatura para el segundo valor de cambio de señal, y se seleccionan dos temperaturas separadas de la mediana de temperatura en el mismo intervalo, en ambas direcciones, como las dos temperaturas de referencia, o en donde los valores de cambio de señal se asignan a temperaturas entre las temperaturas de detección utilizadas para calcular los valores de cambio de señal correspondientes; el valor de cambio de señal más alto entre los valores de cambio de señal se asigna como un valor de primer cambio, un valor de cambio de señal más alto y un valor de cambio de señal más bajo entre los dos valores de cambio de señal contiguos al valor de cambio de señal más alto se asignan como un segundo valor de cambio de señal y un tercer valor de cambio de señal, respectivamente; en el caso

- de que la proporción entre (i) la diferencia entre el segundo valor de cambio de señal y el tercer valor de cambio de señal, y (ii) la diferencia entre el primer valor de cambio de señal y el tercer valor de cambio de señal es no superior a un valor umbral, se asigna el valor de cambio de señal más alto a la temperatura para el primer valor de cambio de señal y las dos temperaturas que están separadas de la temperatura para el primer valor de cambio de señal en el mismo intervalo se seleccionan en ambas direcciones como las dos temperaturas de referencia.
16. Método según la reivindicación 1, en el que el método comprende, además, el cálculo de un valor T_f de reacción real de la dupla para cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente mediante la utilización de los valores de señal a tres temperaturas de detección.
17. Método según la reivindicación 1, en el que las dos temperaturas de referencia se seleccionan de manera que un valor T_f de reacción real de la dupla para cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente está incluido entre las dos temperaturas de referencia.
18. Método según la reivindicación 1, en el que el valor de cambio de señal se obtiene mediante una resta, una proporción o una frecuencia de cambio de los valores de señal.
19. Método según la reivindicación 1, en el que las dos temperaturas de detección de referencia para la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico no están solapadas entre sí.
20. Método según la reivindicación 1, en el que las dos temperaturas de referencia se seleccionan mediante el análisis de los valores de cambio de señal para una secuencia diana idéntica de ácido nucleico en el recipiente de reacción único y en recipientes de reacción diferentes.
21. Método según la reivindicación 1, en el que las composiciones generadoras de señal comprenden una composición que comprende un oligonucleótido etiquetado para generar una señal detectable mediante una reacción de escisión dependiente de la presencia de una de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico, el oligonucleótido etiquetado se escinde mediante una nucleasa en la reacción de duplas, y se lleva a cabo la obtención de los valores de señal a una temperatura a la que todos las duplas para las demás secuencias diana de ácido nucleico de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico están hibridadas o disociadas para no generar ninguna señal; en donde la etiqueta en el oligonucleótido etiquetado para generar una señal detectable mediante una reacción de escisión presenta la misma propiedad de señal que los marcas en las duplas.
22. Método según la reivindicación 1, en el que el método comprende, además, restaurar los valores de señal a partir del conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal para cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente a fin de obtener un conjunto de datos restaurado de ciclo/valor de señal, y la determinación de la presencia o la ausencia de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico en la muestra se lleva a cabo mediante la utilización del conjunto de datos restaurado de ciclo/valor de señal; en donde preferentemente los valores de señal restaurados son valores de señal a temperaturas a las que una dupla para cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente genera un valor de señal más alto.
23. Medio de almacenamiento legible por ordenador que contiene instrucciones para configurar un procesador para llevar a cabo un método que comprende:
recibir valores de señal; en donde los valores de señal se obtienen mediante (i) la puesta en contacto en un único recipiente de reacción de una muestra con composiciones generadoras de señal para detectar una pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico, en donde las composiciones generadoras de señal forman una pluralidad de duplas para la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico, cada uno de la pluralidad de duplas proporciona una señal indicativa de la presencia o la ausencia de cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente y la pluralidad de duplas presenta valores T_f diferentes entre sí, (ii) llevar a cabo una reacción durante por lo menos dos ciclos para la formación de la pluralidad de duplas y la disociación de las duplas, y (iii) obtener en todos o algunos ciclos de la reacción, valores de señal a por lo menos dos temperaturas de detección en cada uno de la pluralidad de intervalos de temperatura de detección asignados a la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico, en donde cada uno de la pluralidad de intervalos de temperatura de detección comprende un intervalo de temperatura en el que la cantidad de una dupla para cada secuencia diana de ácido nucleico correspondiente cambia, pero en que la cantidad de duplas para las demás secuencias diana de ácido nucleico se mantiene sin cambios,
generar un conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal para cada una de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico mediante la obtención de un valor de cambio de señal de valores de señal entre dos temperaturas de referencia seleccionadas de las dos o más temperaturas de detección en cada uno de la pluralidad de intervalos de temperatura de detección, y
determinar la presencia o la ausencia de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico en la muestra mediante el conjunto de datos de ciclo/valor de cambio de señal para cada una de la pluralidad de secuencias diana de ácido nucleico.

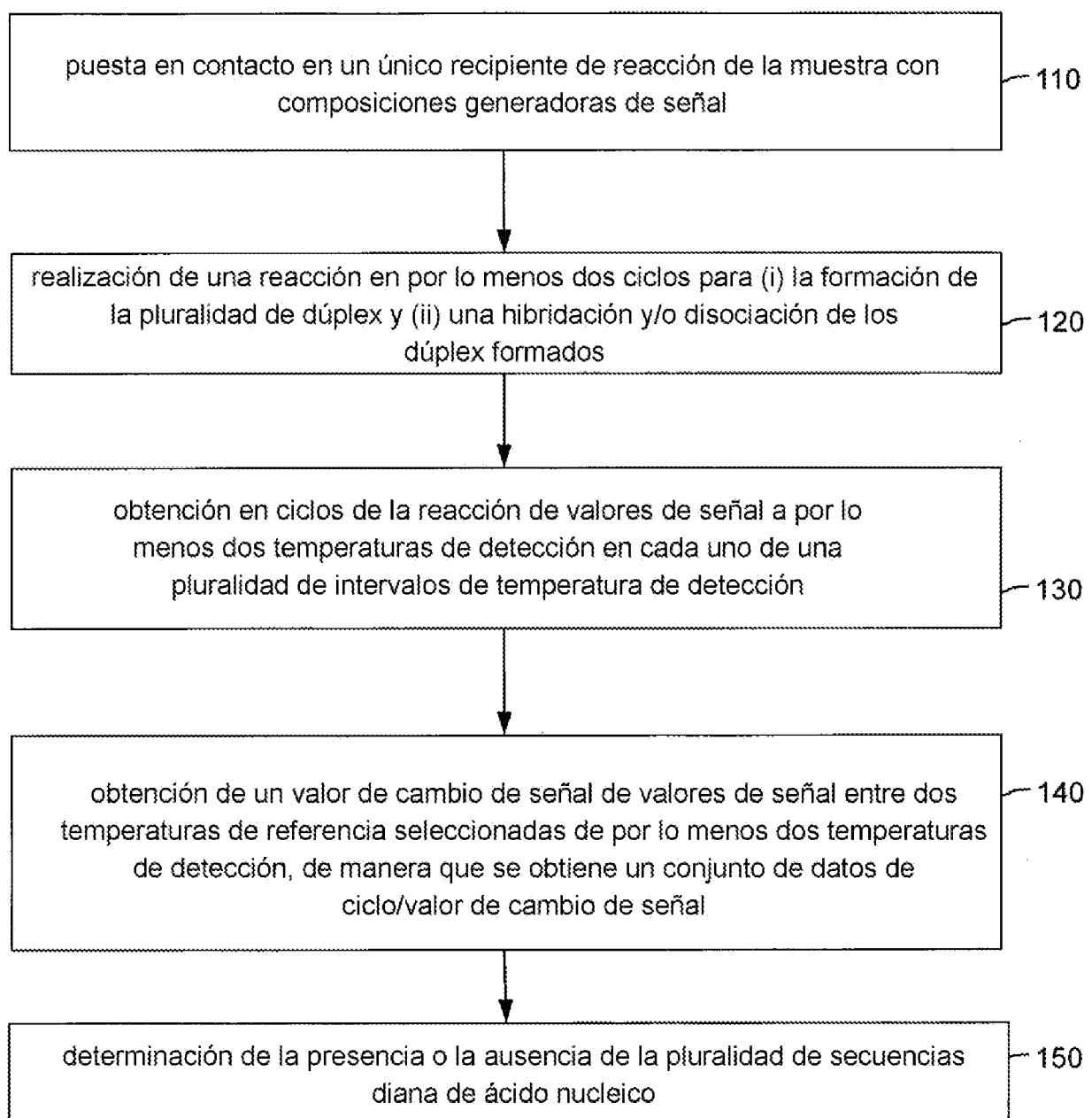
Fig. 1

Fig. 2

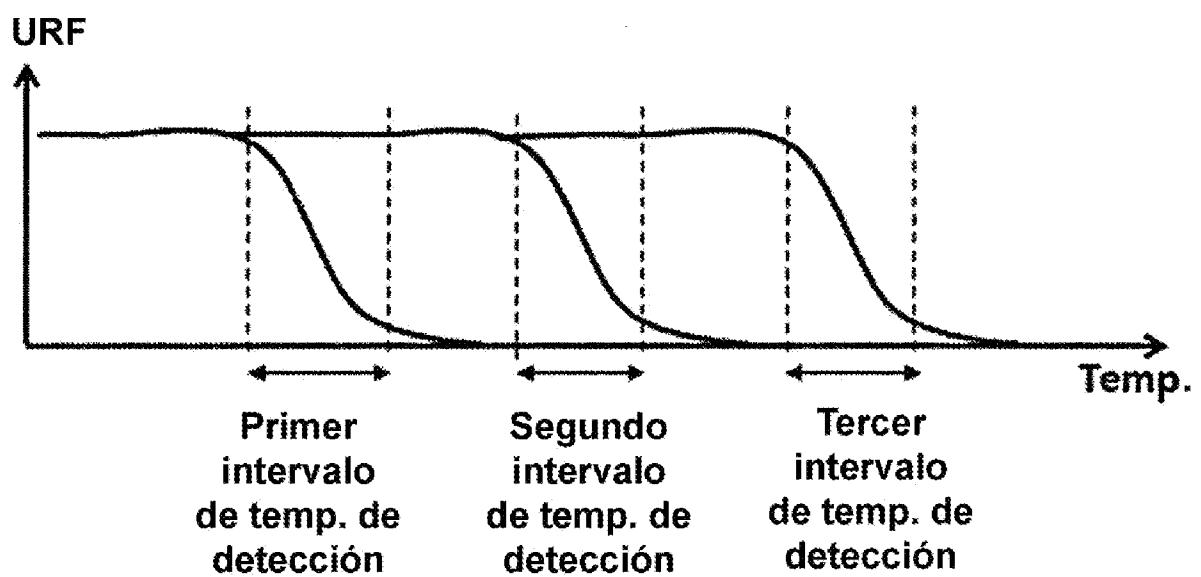


Fig. 3

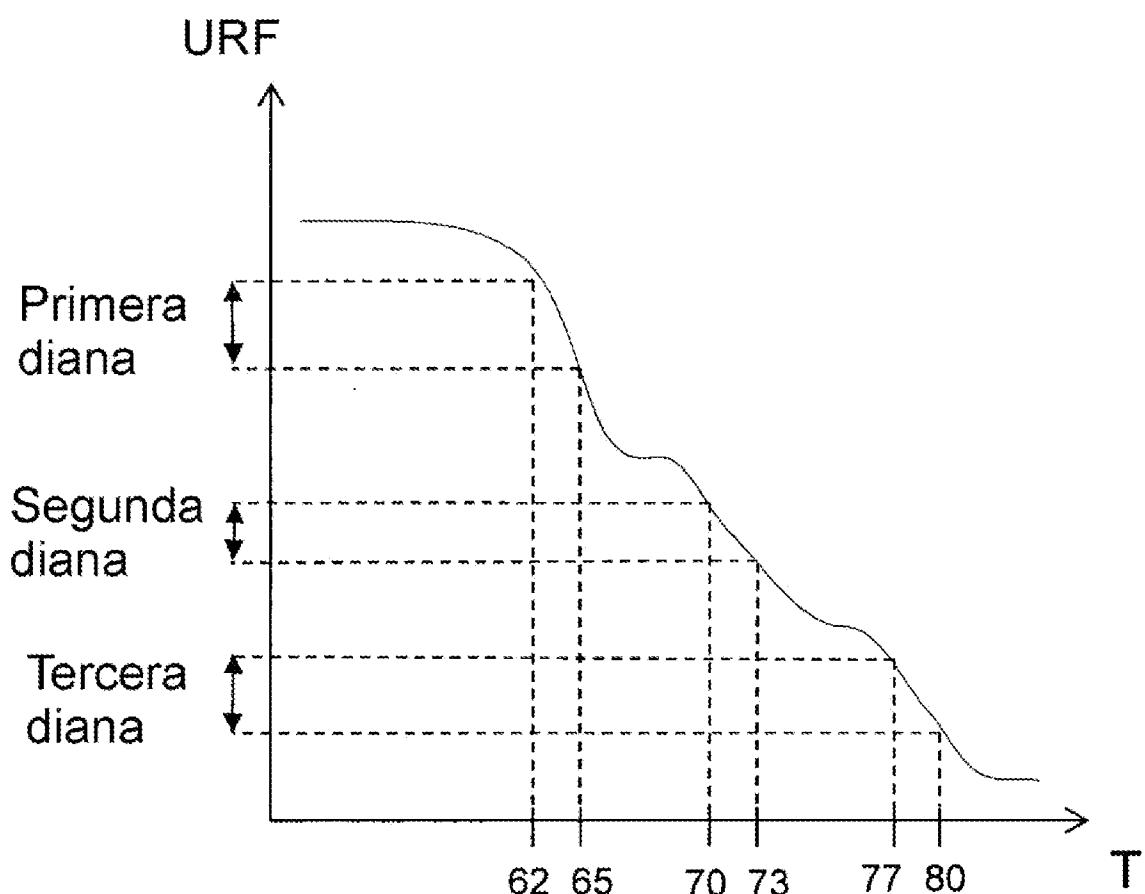


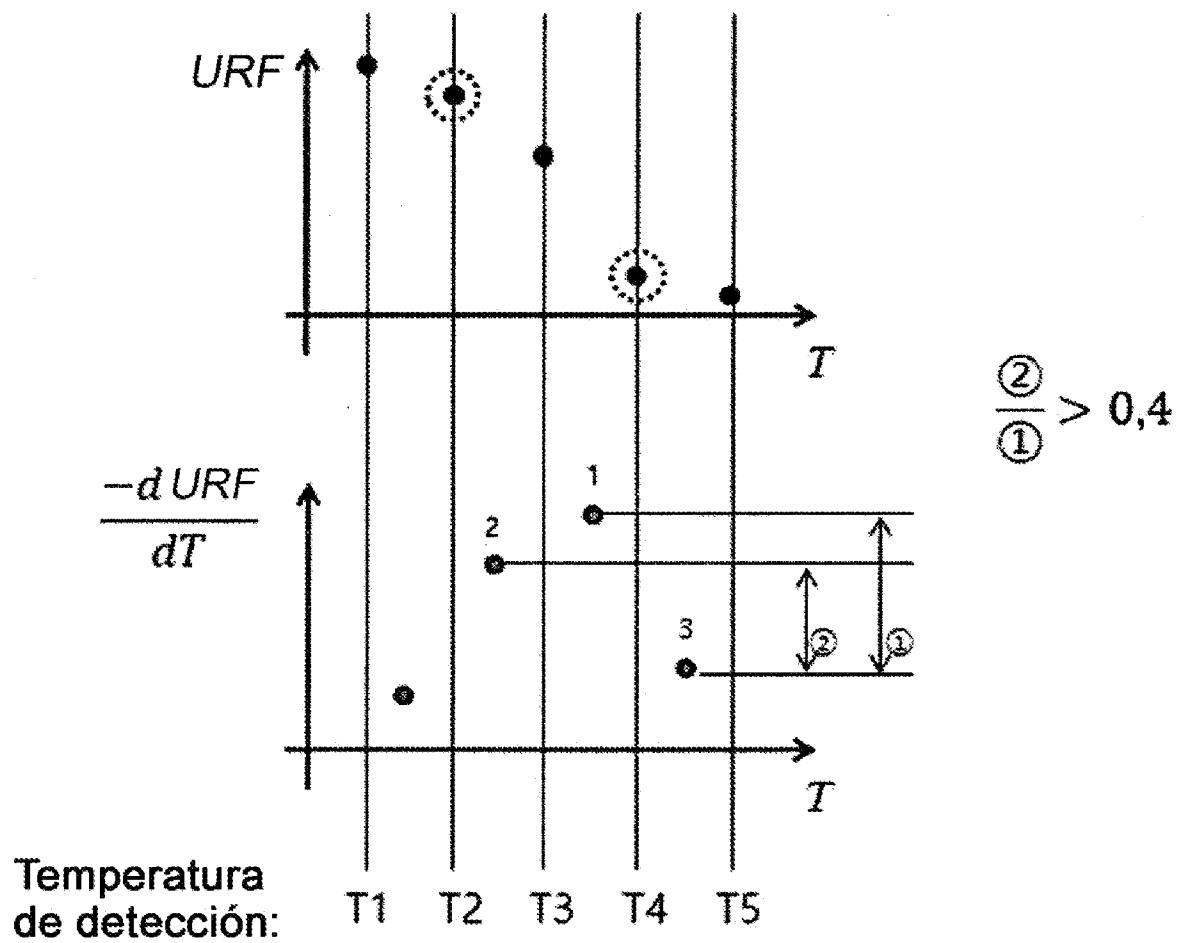
Fig. 4

Fig. 5

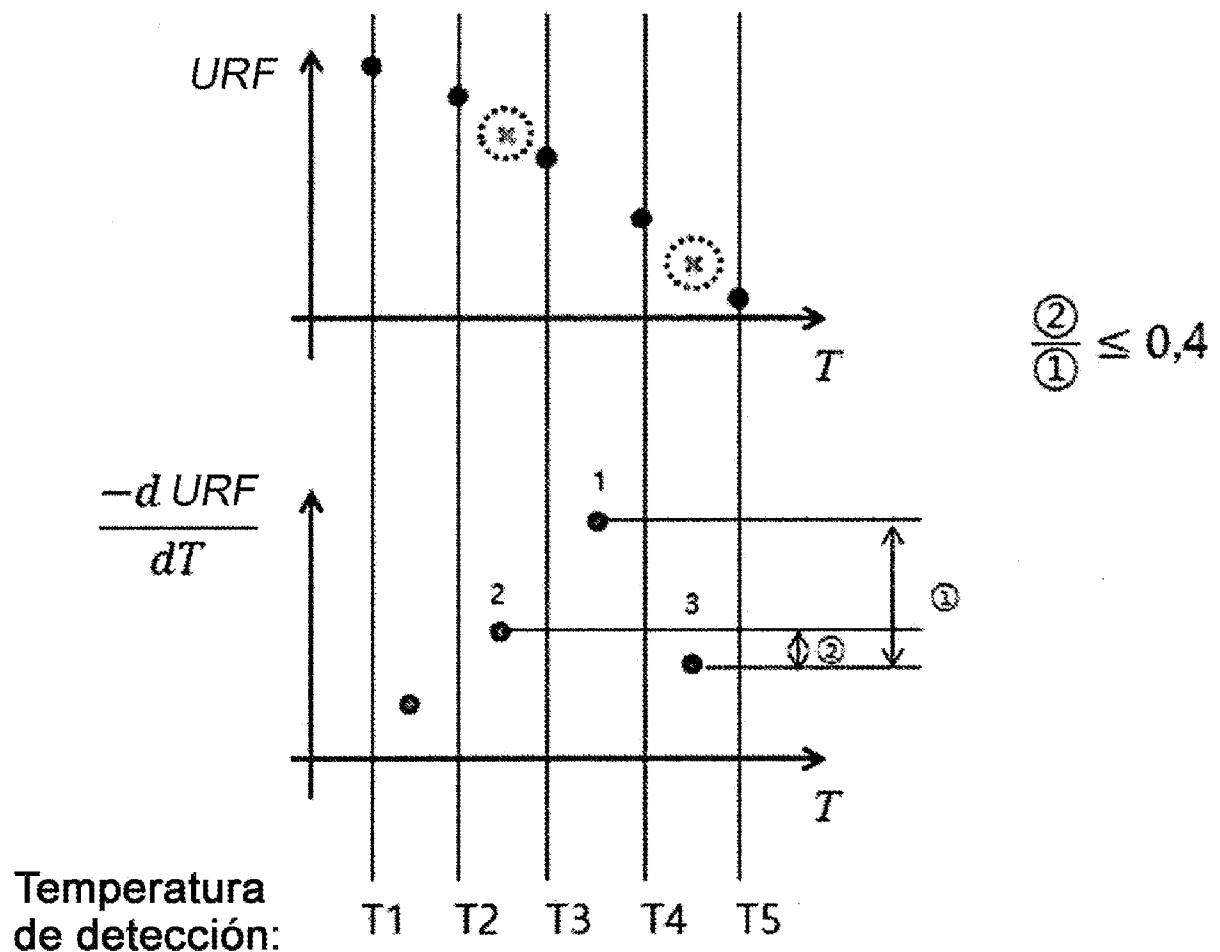
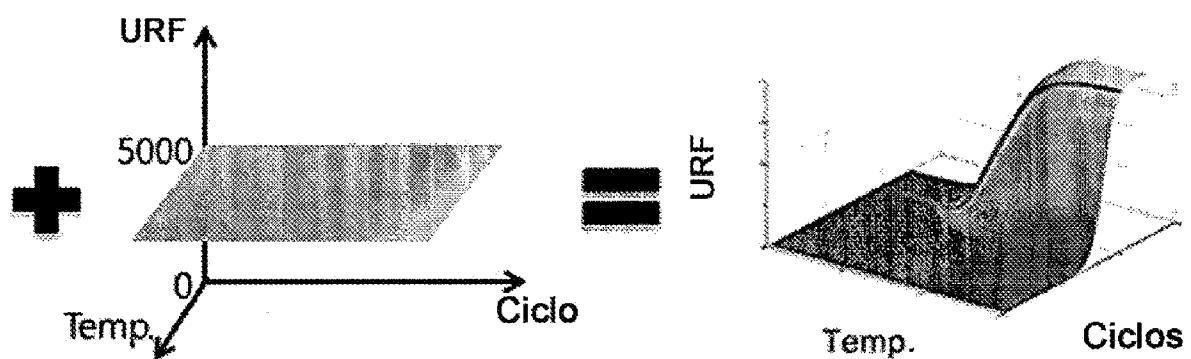
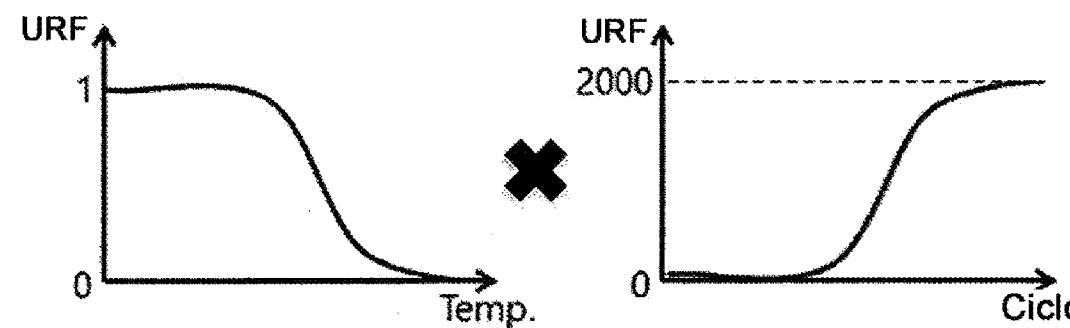


Fig. 6

$$URF(T, C) = f(T) g(C) + \alpha$$

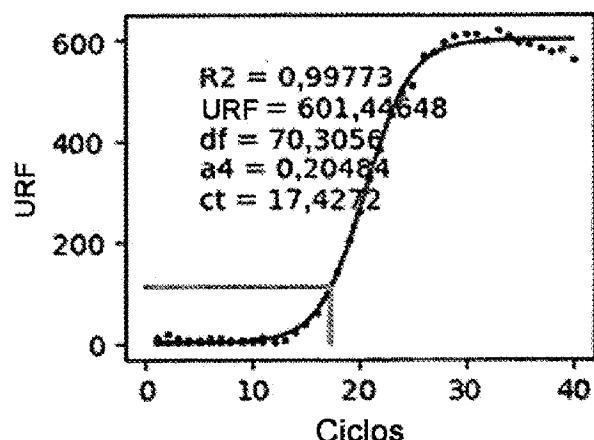
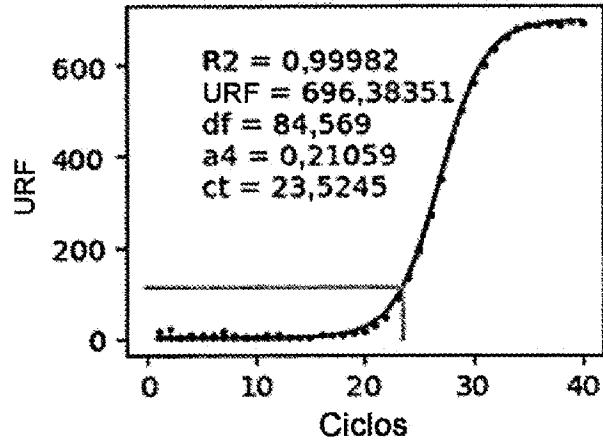
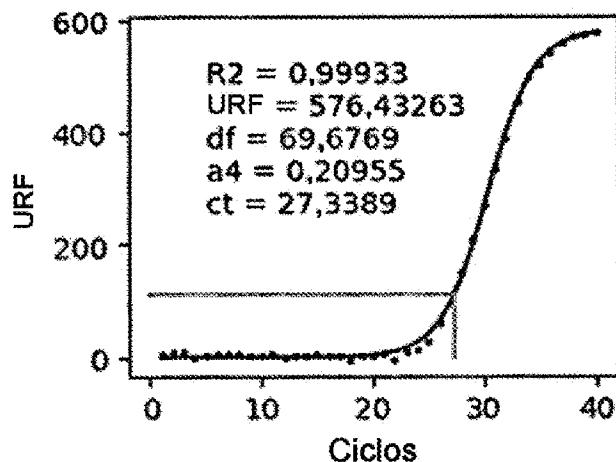
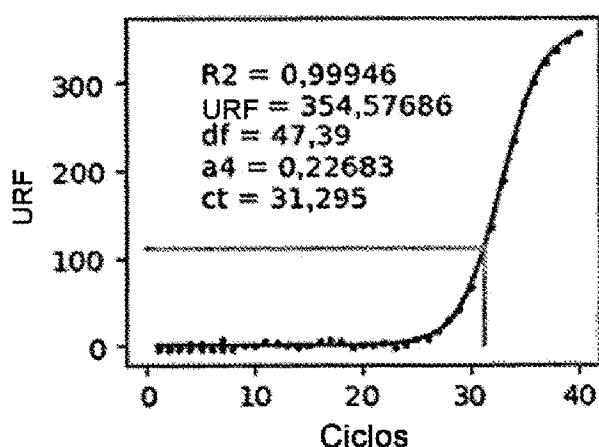
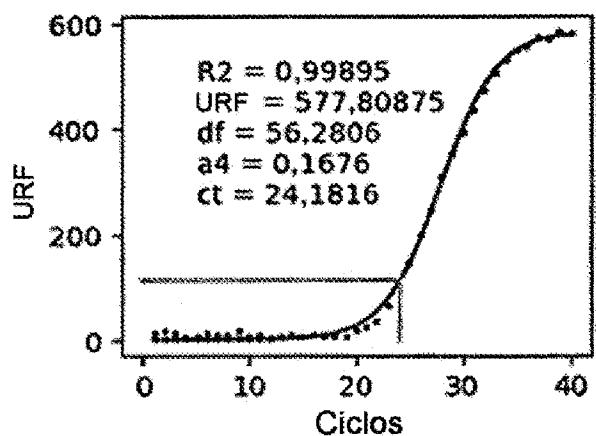
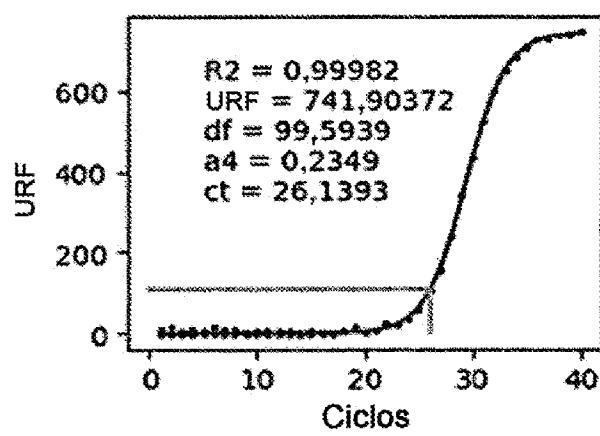
Fig. 7 $\langle CT \cdot 10^6 \rangle$  $\langle CT \cdot 10^4 \rangle$  $\langle CT \cdot 10^3 \rangle$  $\langle CT \cdot 10^2 \rangle$

Fig. 8



<CT 10⁴ >



<TP 10⁴ >

Fig. 9

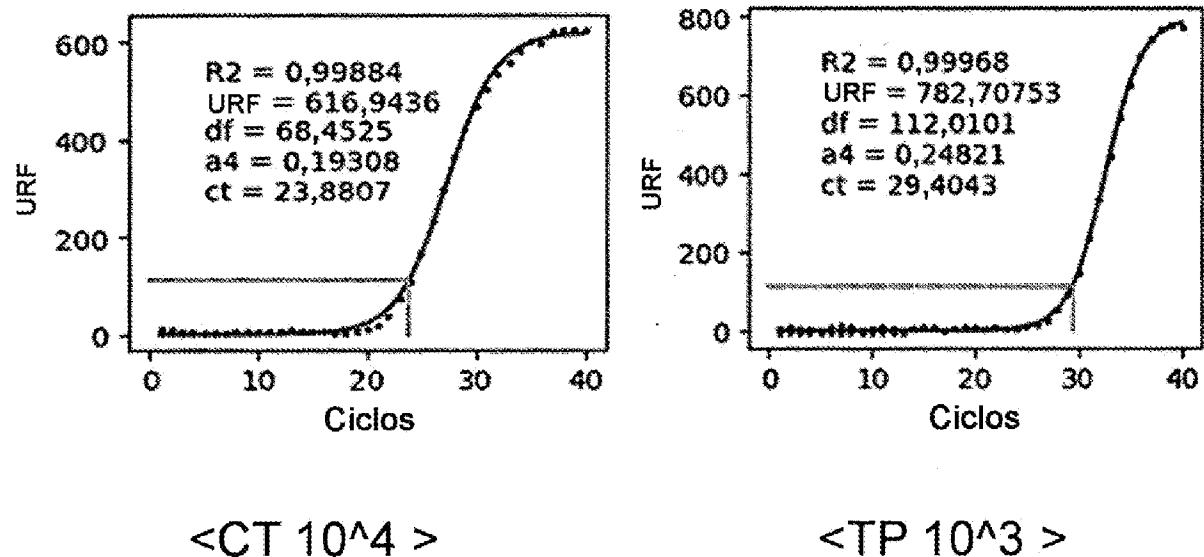


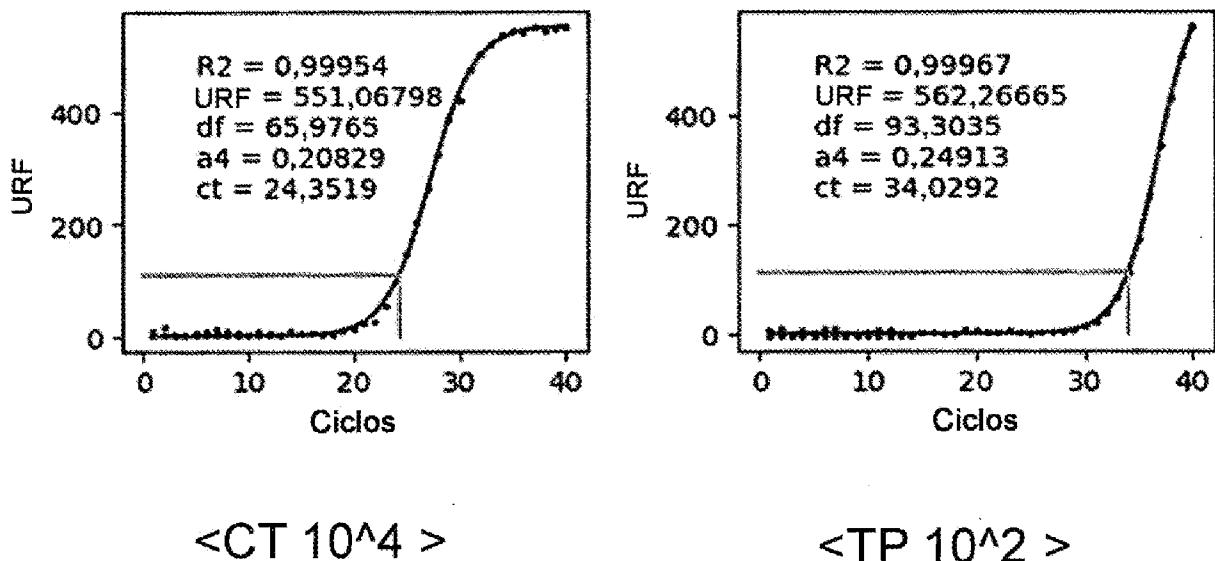
Fig. 10

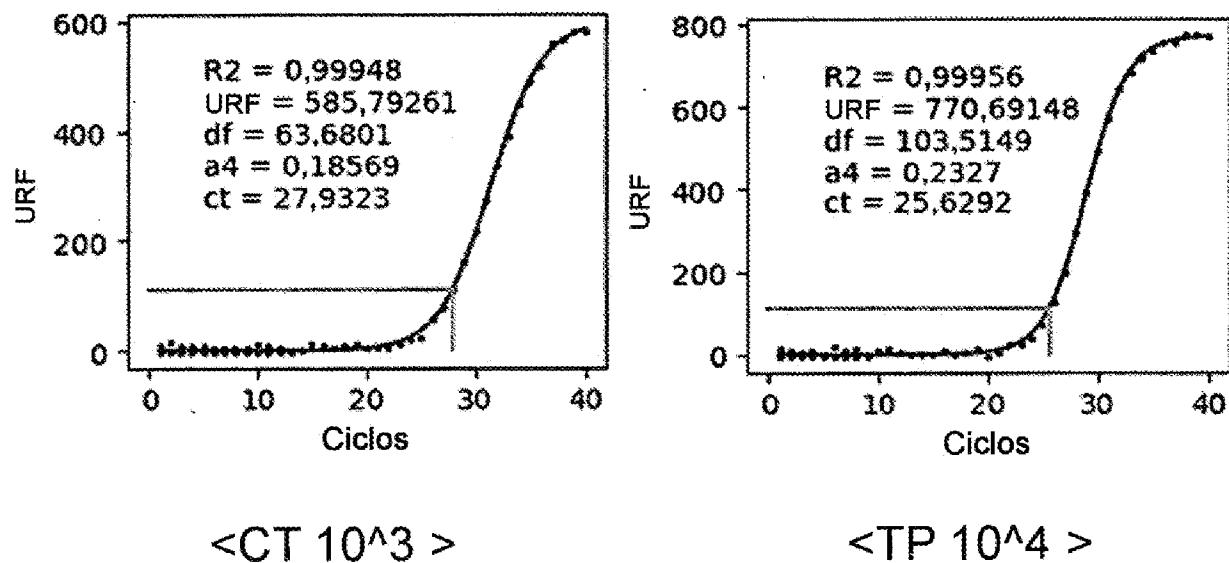
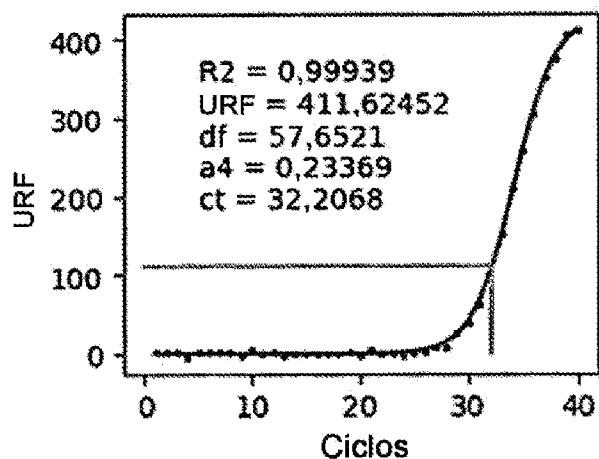
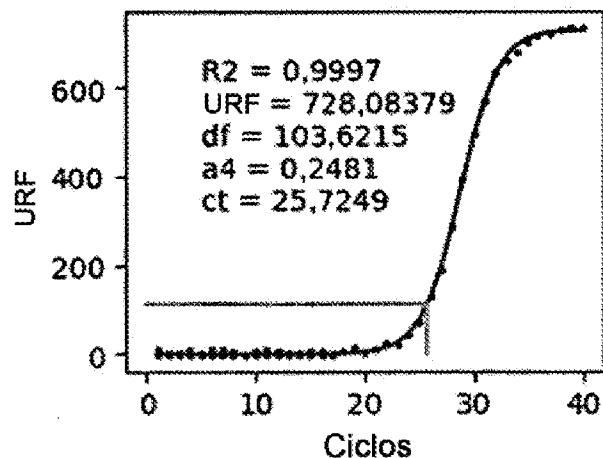
Fig. 11

Fig. 12<CT 10²><TP 10⁴>