

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 280 205**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2000 E 00917213 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **18.03.2015 EP 1171633**

54

Título: **Métodos de marcaje de materiales**

30

Prioridad:

**13.04.1999 GB 9908437**

45

Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente modificada:

**29.06.2015**

73

Titular/es:

**TRACETAG INTERNATIONAL LIMITED (100.0%)  
MERTON HOUSE CROESCADARN CLOSE  
CARDIFF CF2 7HE, GB**

72

Inventor/es:

**MINTON, JOHN EDWARD y  
SLEAT, ROBERT**

74

Agente/Representante:

**MORGADES MANONELLES, Juan Antonio**

## DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a métodos para marcar materiales y a la detección de dicho marcado.

5 Existe una necesidad generalizada de poder trazar el recorrido que ha realizado un material determinado a medida que se traslada de un lugar a otro. El movimiento puede ser de materiales naturales (por ejemplo, el flujo de agua en acuíferos subterráneos) o materiales que han sido procesados o fabricados por el hombre (por ejemplo, cualquier artículo construido por el hombre en un proceso de fabricación o recursos naturales tales como granos y minerales).  
 10 En tales situaciones existen motivos por los que es necesario desarrollar procedimientos específicos para trazar dichos movimientos. Puede suceder que la observación directa no sea posible, como al seguir el recorrido de un flujo subterráneo. Puede suceder que sea necesario supervisar el movimiento de artículos sin el conocimiento directo de los transportadores o, por motivos legales, para demostrar que el aspecto de un material en un punto determinado de la biosfera se debió al propio material originado en un punto de partida conocido.

15 Por ejemplo, puede ocurrir que artículos fabricados sean robados durante el tránsito o revendidos a un precio muy inferior al determinado por el proveedor por un distribuidor poco escrupuloso, por ejemplo en venta callejera. Un problema clave a la hora de condenar este hecho es la identificación de los artículos determinados vendidos, para establecer que dichos artículos han sido robados o revendidos por un distribuidor determinado. También se producen problemas con líquidos tales como el petróleo que los buques eliminan de forma rutinaria en el mar. Es  
 20 casi imposible identificar qué buque ha descargado el combustible y por ese motivo son infrecuentes los procesos judiciales y condenas por contaminar los océanos. Hay otros problemas asociados con el movimiento de materiales naturales, por ejemplo el movimiento de grano. Es especialmente difícil distinguir un lote de dichos materiales naturales de otros. En el caso del grano, en la Comunidad Europea se producen problemas con los granos que se transportan a través de diferentes fronteras para obtener una serie de subsidios de la UE por el mismo lote de grano.  
 25 Es necesario contar con un método para marcar el grano y que este resulte fácilmente detectable para evitar dicho fraude.

Se conocen diversos métodos en la técnica para marcar y detectar materiales, muchos de los cuales utilizan etiquetas de ácido nucleico de microtrazado, especialmente etiquetas fabricadas a partir de ADN. Los ácidos  
 30 nucleicos pueden proporcionar una cantidad ilimitada de información, debido a la secuencia variable de bases (adenina, citosina, guanina y timina [uracil en el caso de ARN que sustituye a la timina]) contenidas en la molécula. Pueden calcularse las condiciones de probabilidad de la frecuencia de una secuencia de bases determinada y, siempre que se utilicen bases suficientes, es decir, que se emplee como etiqueta una molécula de ADN lo suficientemente larga, puede definirse un microtrazado exclusivo con propósitos prácticos. Al usar combinaciones de  
 35 secuencias universales (aceptadas como estándares de la industria) y al variar los niveles de secuencias específicas, es posible identificar el tipo de producto genérico, el origen del producto (secuencias específicas de la empresa), el lote e incluso proporcionar un identificador para una unidad de comercio.

La solicitud de patente internacional anterior núm. PCT/GB91/00719 (publicada como WO91/17265) se describe un  
 40 método para supervisar el movimiento de un hidrocarburo mediante la adición de ADN compatible con hidrocarburo como un aditivo de microtrazado. La solicitud internacional núm. PCT/GB93/O1822 (publicada como WO94/04918) describe un método para marcar un líquido y posteriormente detectar que el líquido ha sido marcado que comprende añadir un aditivo al líquido. El aditivo comprende dos o más tipos de partículas no visibles a simple vista, cada una con diferentes medios de señalización o partículas con dos o más medios de señalización diferentes. Los medios de  
 45 señalización ayudan en la detección de las microperlas. Uno de los medios de señalización comprende ácido nucleico, mientras que el otro no es una etiqueta de ácido nucleico. En cada uno de los métodos citados, se añade el microtrazado exclusivo que comprende moléculas de ADN al material, se toman muestras del material resultante tras su movimiento, y se detecta, analiza y descodifica la presencia del aditivo de microtrazado en la muestra.

La solicitud internacional núm. PCT/GB94/01506 (publicada como WO95/02702) describe un método para marcar un artículo sólido o elemento añadiendo a un líquido un aditivo que comprende microperlas no visibles a simple vista que comprende dos o más medios de señalización para ayudar en su detección y medios de codificación para  
 50 ayudar en su identificación. El aditivo puede comprender dos o más microperlas cada una con diferentes medios de señalización, teniendo al menos una microesfera un medio de codificación, o bien puede comprender una microesfera con dos o más medios de señalización diferentes y al menos un medio de codificación. El medio de codificación y uno de los medios de señalización comprenden un ácido nucleico y otro de dichos medios de señalización comprende un medio de señalización de ácido no nucleico. El líquido que contiene el aditivo se añade al sólido y se deja secar para marcar el sólido. Posteriormente, se detectan microperlas con medios de señalización en el sólido, se toman muestras del sólido y se descodifica el medio de codificación. El método puede adaptarse  
 60 para su uso en la supervisión e interacción entre cualquier material, artículo, o elemento, y una persona o animal, utilizando un dispositivo adaptado para producir un aerosol que contiene un líquido que comprende un aditivo que contiene una pluralidad de microperlas.

La solicitud internacional núm. PCT/GB93/01822 (publicada como WO94/04918) describe un método para marcar un  
 65 líquido y posteriormente detectar que el líquido ha sido marcado. El método comprende: añadir al líquido un aditivo que comprende una pluralidad de partículas en una cantidad no superior a 1 parte en peso de partículas por  $10^6$

partes en peso de líquido, comprendiendo las partículas medios de señalización para ayudar en su detección y no siendo estos detectables a simple vista en el líquido; tomar una muestra de una posición del líquido que contiene el aditivo, y detectar la presencia de partículas en el líquido, con la condición de que los medios de señalización no estén formados únicamente por una etiqueta de ácido nucleico.

En cada uno de los métodos de la técnica anterior citados, el ácido nucleico o ADN de microtrazado descrito es un ácido nucleico o ADN sintético con una región variable flanqueada por regiones con secuencias predeterminadas. La secuencia de la región variable da a cada molécula de ácido nucleico o ADN de microtrazado una identidad característica única, mientras que las secuencias predeterminadas son comunes a todas las etiquetas. Las secuencias predeterminadas se reconocen mediante cebadores para su amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se usan para la posterior secuenciación. Así, para determinar la identidad de la región variable en el ácido nucleico o ADN de microtrazado, la región variable se amplifica usando cebadores complementarios a las regiones flanqueantes con secuencias predeterminadas. A continuación, se secuencia la región variable usando los mismos cebadores, para determinar la secuencia de la región variable y así la identidad de la etiqueta. Alternativamente, la secuenciación puede iniciarse a partir de una región de secuenciación del cebador incorporada a la etiqueta entre una región flanqueante y la región variable. Puesto que la región de secuenciación del cebador puede tener una secuencia exclusiva para una etiqueta determinada, esto permite la utilización de dos o más etiquetas diferentes de ácido nucleico o ADN para marcar el material.

A pesar de que los procedimientos descritos anteriormente son efectivos, los métodos de la técnica anterior proporcionan tan solo una respuesta de "SÍ/NO". Es decir, pueden determinar si una muestra determinada contiene una etiqueta de ácido nucleico, y cuál es la identidad de la etiqueta. Sin embargo, en la medida que sabemos, nadie ha considerado previamente que puede ser deseable determinar la cantidad de etiqueta presente en un material marcado. Los métodos descritos en la técnica anterior se preocupan únicamente del marcado, detección e identificación de etiquetas, sin proporcionar ninguna indicación de cuánta etiqueta de ácido nucleico está presente en la muestra.

Los autores han descubierto que puede resultar ventajoso determinar la cantidad de un marcador o etiqueta presente en un material marcado. Los autores han reconocido que la cantidad de una etiqueta presente en un material puede proporcionar pistas valiosas sobre la historia y movimientos del material.

Por ejemplo, al medir la cantidad real de etiqueta de un material y compararla con la cantidad usada inicialmente para marcar el material, es posible decir si un cliente (inadvertida o deliberadamente) ha diluido el material. La cantidad de etiqueta presente en el material también puede indicar si se ha producido contaminación, de modo que se pueden adoptar las medidas adecuadas. Determinar la cantidad de un marcador determinado también resulta útil cuando existen múltiples fuentes de contaminación ambiental. En tal caso, pueden marcarse con diferentes etiquetas diferentes fuentes de contaminación sospechosas de diferentes fábricas o plantas. Se toma una muestra de la corriente de efluente contaminado, y se detecta la presencia de cada una de las diferentes etiquetas para determinar si la contaminación está provocada por una fábrica determinada. Cabe destacar que al medir las concentraciones relativas de cada etiqueta en el flujo de efluente, se proporciona información sobre la contribución relativa de cada fuente a la contaminación ambiental. De ese modo, las autoridades pueden imponer las sanciones adecuadas a las fábricas o plantas contaminantes con conocimiento de la contribución de cada fábrica o planta a la contaminación.

Por lo tanto, es valioso contar con un método para marcar un material y para su posterior detección que proporcione una indicación de la cantidad de marcador presente en el material, hecho que aún no se ha tenido en cuenta en la técnica.

También podrá apreciarse que existen problemas inherentes en los métodos de la técnica anterior. Particularmente, son necesarios diversos pasos para detectar el marcador en la muestra. En primer lugar, deben realizarse reacciones PCR para amplificar la etiqueta de ADN de microtrazado. Para determinar si las reacciones tienen éxito, y para extraer los productos de reacción de dímeros de cebadores, cebadores no incorporados y nucleótidos, los productos de reacción pueden ser sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida, por ejemplo. A continuación, se extraen los productos de reacción del gel y el ADN amplificado purificado de los fragmentos de gel. A continuación se somete el ADN purificado a secuenciación de ciclos para determinar la secuencia de las regiones variables. Finalmente, la secuencia debe interpretarse y compararse con una base de datos conocida para determinar la identidad de la etiqueta usada. Los diversos pasos implicados en la fase de detección de los métodos de la técnica anterior hacen que el procedimiento sea largo, laborioso y que requiera tiempo, por lo que resulta costoso.

Además, para a separación adecuada de los productos de la reacción PCR de cebadores de dímeros, cebadores no incorporados y deoxinucleótidos, la longitud del ADN amplificado debe ser relativamente larga. Por lo general, la experiencia demuestra que el ADN amplificado debe tener una longitud superior a 200 pares de bases para conseguir una buena separación usando un gel de resolución normal. Debe ponderarse la necesidad de contar con un producto de amplificación relativamente largo para una buena separación según el coste y dificultad que implica el diseño y sintetización de oligonucleótidos largos (>100 nucleótidos de largo) para su uso como etiqueta. Por lo

tanto, a pesar de que resulta más eficiente y menos costoso sintetizar etiquetas más pequeñas, es más difícil distinguir esas etiquetas pequeñas de los artefactos de amplificación tras la PCR.

Por lo tanto, existe una necesidad no satisfecha de contar con un método para marcar un material y para su posterior detección que implique menos pasos y que pueda utilizar oligonucleótidos relativamente cortos como etiquetas.

Se presenta un método para detectar si un material ha sido marcado con un marcador que comprende una etiqueta de ácido nucleico, comprendiendo este método los pasos de: (a) tomar una muestra de una porción del material; y (b) detectar la presencia de la etiqueta de ácido nucleico en la muestra, estando caracterizado dicho método en que la cantidad de etiqueta de ácido nucleico presente en la muestra se determina para proporcionar una indicación de la cantidad de marcador presente en el material.

El método puede también comprender el paso de la técnica anterior de: añadir o aplicar un marcador que comprende una etiqueta de ácido nucleico al material.

La etiqueta de ácido nucleico puede ser amplificada preferiblemente mediante una reacción de amplificación del ácido nucleico. La cantidad de etiqueta de ácido nucleico presente en una muestra puede ser determinada preferiblemente midiendo la cantidad de amplificación necesaria para que la cantidad de ácido nucleico amplificado alcance un nivel predeterminado. La cantidad de ácido nucleico amplificado de una reacción de amplificación de ácido nucleico puede determinarse de una serie de formas. Los medios actuales a través de los cuales se determina la cantidad de ácido nucleico amplificado no es importante, a pesar de que en esta memoria se describirán una serie de formas preferidas mediante las cuales se puede medir dicha cantidad: Podrá apreciarse que cuanto mayor sea la presencia inicial de la etiqueta de ácido nucleico en la muestra, menos amplificación será necesaria para alcanzar un nivel predeterminado particular de ácido nucleico amplificado. Por lo tanto, es posible calibrar el sistema de detección usando cantidades iniciales conocidas de etiquetas de ácido nucleico en una serie de reacciones de ensayo. Entonces, puede medirse la cinética de acumulación de ácido nucleico amplificado en una reacción, y compararse con la de las reacciones de prueba. De este modo se permite determinar qué cantidad de etiqueta de ácido nucleico está presente en una muestra de ensayo, y así qué cantidad de ácido nucleico está presente en el material marcado. Se conocen diversos métodos para la amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la ligasa, TMA y NASBA, etc. y pueden emplearse dichos métodos para la amplificación de etiquetas de ácido nucleico en los métodos aquí descritos. Sin embargo, la reacción de amplificación de ácido nucleico usada preferiblemente es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los autores han previsto que los métodos descritos en esta memoria se usan de forma adecuada con diferentes realizaciones de etiqueta de ácido nucleico, cada una de las cuales contiene al menos una secuencia de identificación para la etiqueta. Cuando los autores se refieren en esta solicitud a una "secuencia de identificación", se refieren a una disposición de nucleótidos con una secuencia determinada, la cual permite determinar la identidad de la etiqueta de ácido nucleico en la que está presente. Debe generarse un grupo de etiquetas de ácido nucleico, cada una de las cuales posee una o más secuencias de identificación diferentes. El resto de dicha etiqueta del grupo (es decir, regiones que no incluyen la secuencia o secuencias de identificación) pueden contener secuencias comunes a todas las etiquetas de ácido nucleico del grupo. Tras marcar un material con una etiqueta del grupo, se toma una muestra del material. Por lo tanto, detectar la presencia de una región de identificación determinada en la muestra proporciona una indicación directa de la identidad de la etiqueta de ácido nucleico usada para marcar el material.

En los métodos de detección, la etiqueta de ácido nucleico entra en contacto con dos oligonucleótidos cebadores en una reacción de amplificación de ácido nucleico. Una primera etiqueta de ácido nucleico (referida en esta memoria como etiqueta de Tipo I) contiene solo una secuencia de identificación y solo uno de los oligonucleótidos cebadores posee una secuencia que corresponde a dicha secuencia de identificación. En otra realización de la etiqueta de ácido nucleico (referida como etiqueta de Tipo II), están presentes dos secuencias de identificación, y ambos oligonucleótidos cebadores poseen secuencias que corresponden a sus secuencias de identificación respectivas. Es decir, puede decirse que una etiqueta de Tipo II se amplifica usando cebadores para sus secuencias de identificación. En otra realización alternativa de la etiqueta, a la que los autores se refieren como etiqueta de Tipo III, solo está presente una secuencia de identificación que está flanqueada por regiones cebadoras, y ninguno de los oligonucleótidos cebadores posee una secuencia que corresponde a la secuencia de identificación.

Por lo tanto, puede decirse que la etiqueta de ácido nucleico puede entrar en contacto con un primer oligonucleótido cebador capaz de cebar la amplificación de la etiqueta de ácido nucleico y que posee una secuencia que corresponde a una primera secuencia contenida en la etiqueta de ácido nucleico. En una primera etiqueta de ácido nucleico (Tipo I), la primera secuencia es la misma secuencia que la secuencia de identificación y, por lo tanto, el primer oligonucleótido cebador posee una secuencia que corresponde a la secuencia de identificación. El otro oligonucleótido cebador de la reacción de amplificación puede corresponder a cualquier otra secuencia de la etiqueta de ácido nucleico. Lo que resulta esencial es que uno de los oligonucleótidos cebadores pueda realizar el cebado desde la secuencia de identificación, de modo que la presencia de amplificación del ácido nucleico indique que la secuencia de identificación está presente y así proporcionar una indicación de la identidad de la etiqueta de ácido nucleico.

En una etiqueta de Tipo II, la etiqueta de ácido nucleico también comprende una segunda secuencia de identificación, en ese caso la etiqueta de ácido nucleico se pone en contacto en la reacción de amplificación con un segundo oligonucleótido cebador con una secuencia que corresponde a la segunda secuencia de identificación. El primer oligonucleótido puede tener una secuencia formada por la primera secuencia de identificación y el segundo oligonucleótido una secuencia que complementa a la segunda secuencia de identificación. Alternativamente, el primer oligonucleótido posee una secuencia que complementa a la primera secuencia de identificación y el segundo oligonucleótido una secuencia formada por la segunda secuencia de identificación. Las dos secuencias de identificación pueden estar la una junto a la otra, o bien pueden flanquear secuencias intermedias. Para una etiqueta tipo II, la amplificación tiene lugar en presencia de dos oligonucleótidos cebadores, y ambos cebadores deben poder unirse durante la reacción de amplificación para que se produzca una amplificación con éxito. Las dos secuencias de identificación de una etiqueta de Tipo II pueden tener secuencias idénticas, o bien secuencias diferentes. La última disposición permite la producción de un mayor número de permutaciones de etiquetas de ácidos nucleicos individualmente distintivas.

Resultará aparente que, cuando se configura una reacción de amplificación con al menos un oligonucleótido cebador que corresponde a una secuencia o secuencias de identificación de una etiqueta de ácido nucleico de Tipo I o de Tipo II, la especificidad de la reacción de amplificación reside básicamente en el oligonucleótido cebador determinado o de los cebadores usados. Si se produce la amplificación, significa que el cebador u oligonucleótidos cebadores han reconocido una secuencia de identificación complementaria en la etiqueta de ácido nucleico. Por el contrario, la ausencia de amplificación indica que la secuencia de identificación determinada no está presente en la etiqueta presente en la muestra. Esto permite determinar fácilmente la identidad de una etiqueta de ácido nucleico desconocida formando una serie de medios de amplificación de ácido nucleico con diferentes cebadores, y detectando cuál de los medios de amplificación tiene como resultado una amplificación correcta. Podrá apreciarse que los métodos usando las realizaciones mencionadas de etiquetas de ácido nucleico permiten realizar un procedimiento de "un paso", ya que la detección, identificación y cuantificación de las etiquetas de ácido nucleico se produce en una reacción. La presencia de amplificación indica que una etiqueta de ácido nucleico está presente en la muestra, y da una indicación de la identidad de la etiqueta de ácido nucleico usada para marcar el material. Al mismo tiempo, puede medirse la cantidad de ácido nucleico amplificado para dar una indicación de la cantidad de etiqueta de ácido nucleico de la muestra y así, del material. Por lo tanto no es necesaria la purificación de la etiqueta amplificada y la posterior secuenciación para determinar su identidad. Las etiquetas de ácido nucleico usadas en la invención pueden así ser más cortas que las usadas previamente.

También se describe en la presente memoria un método para marcar un material y para detectar posteriormente que ha sido marcado, comprendiendo el método los pasos de: (a) añadir o aplicar un marcador que comprende una etiqueta de ácido nucleico al material, comprendiendo la etiqueta de ácido nucleico al menos una secuencia de identificación para la etiqueta; (b) tomar una muestra de una porción del material que contiene dicho marcador y separar opcionalmente la etiqueta de ácido nucleico de la muestra; (c) amplificar al menos una porción de la etiqueta de ácido nucleico mediante una reacción de amplificación de ácido nucleico que incluye poner en contacto la etiqueta de ácido nucleico con un primer oligonucleótido con una secuencia que corresponde con la secuencia de identificación de la etiqueta de ácido nucleico; y (d) detectar la amplificación del ácido nucleico como una indicación de la presencia del marcador en la muestra, y así que el material ha sido marcado.

También se describe en la presente memoria un método para detectar si un material ha sido marcado con un marcador que comprende una etiqueta de ácido nucleico determinada, comprendiendo la etiqueta de ácido nucleico al menos una secuencia de identificación para la etiqueta, comprendiendo este método los pasos de: (a) tomar una muestra de una porción del material y separar opcionalmente cualquier etiqueta de ácido nucleico de la muestra; (b) amplificar cualquier etiqueta de ácido nucleico presente en la muestra mediante una reacción de amplificación de ácido nucleico que incluye poner en contacto la etiqueta de ácido nucleico con un primer oligonucleótido con una secuencia que corresponde con la secuencia de identificación de la etiqueta de ácido nucleico; y (c) detectar la amplificación del ácido nucleico como una indicación de la presencia del marcador particular en la muestra, y así que el material ha sido marcado con un marcador que comprende dicha etiqueta.

La etiqueta de ácido nucleico puede comprender al menos una secuencias de identificación para la etiqueta, y el método comprende adicionalmente los pasos de: (c) amplificar al menos una porción de la etiqueta de ácido nucleico mediante una reacción de amplificación de ácido nucleico que incluye poner en contacto la etiqueta de ácido nucleico con un primer oligonucleótido con una secuencia que corresponde con la secuencia de identificación de la etiqueta de ácido nucleico; y (d) determinar la cantidad de amplificación necesaria para que el ácido nucleico amplificado alcance un nivel predeterminado como indicación de la cantidad de marcador presente en la muestra.

Convenientemente, el método comprende además los pasos para: (c) amplificar al menos una porción de la etiqueta de ácido nucleico mediante una reacción de amplificación de ácido nucleico que incluye poner en contacto la etiqueta de ácido nucleico con un primer oligonucleótido con una secuencia que corresponde con la secuencia de identificación de la etiqueta de ácido nucleico; y (d) determinar la cantidad de amplificación necesaria para que el ácido nucleico amplificado alcance un nivel predeterminado como indicación de la cantidad de marcador presente en la muestra y así la cantidad de marcador en el material.

Una tercera etiqueta de ácido nucleico (Tipo III) posee una secuencia de identificación que está flanqueada por una primera y una segunda región de la etiqueta de ácido nucleico que contienen sitios de cebado para la amplificación del ácido nucleico. Por lo tanto, la etiqueta de Tipo III se amplifica en una reacción de amplificación de ácido nucleico poniéndola en contacto con un primer oligonucleótido cebador con una secuencia que no corresponde a la secuencia de identificación de la etiqueta. El otro oligonucleótido cebador de la reacción de amplificación posee una secuencia que tampoco se corresponde a la secuencia de identificación. Así, el primer oligonucleótido posee una secuencia que corresponde a una secuencia contenida en la primera o en la segunda región y el segundo oligonucleótido contiene una secuencia que corresponde a una secuencia de la primera o de la segunda región de la etiqueta.

Para esta etiqueta, puede generarse un grupo de ácidos nucleicos siendo la primera y la segunda región comunes a todas las etiquetas del grupo, aunque siendo la secuencia de identificación diferente para cada miembro del grupo. La amplificación de ácido nucleico puede realizarse usando oligonucleótidos cebadores con "secuencias genéricas", que se unen a secuencias de la primera y segunda región de la etiqueta. La detección de la secuencia de identificación y la cuantificación del ácido nucleico amplificado pueden tener lugar al mismo tiempo que la amplificación, o con posterioridad.

Aquí se describe un método para marcar un material y detectar posteriormente que ha sido marcado, estando caracterizado dicho método en que proporciona una indicación de la cantidad de marcador presente en el material, comprendiendo el método los pasos de: (a) añadir o aplicar un marcador que comprende una etiqueta de ácido nucleico al material, comprendiendo la etiqueta de ácido nucleico una primera y una segunda región que flanquean una secuencia de identificación de la etiqueta; (b) tomar una muestra de una porción del material que contiene dicho marcador y separar opcionalmente la etiqueta de ácido nucleico de la muestra; (c) amplificar al menos una porción de la etiqueta de ácido nucleico mediante una reacción de amplificación de ácido nucleico que incluye poner en contacto la etiqueta de ácido nucleico con un primer oligonucleótido con una secuencia que corresponde con dicha primera región de la etiqueta de ácido nucleico; y (d) determinar la cantidad de amplificación necesaria para que el ácido nucleico amplificado alcance un nivel predeterminado como indicación de la cantidad de marcador presente en la muestra. La reacción de amplificación del ácido nucleico puede ser una reacción en cadena de la polimerasa.

Aquí se describe un método para marcar un material y detectar posteriormente que ha sido marcado, comprendiendo el método los pasos de: (a) añadir o aplicar un marcador que comprende una etiqueta de ácido nucleico al material, comprendiendo la etiqueta de ácido nucleico una primera y una segunda región que flanquean una secuencia de identificación de la etiqueta; (b) tomar una muestra de una porción del material que contiene dicho marcador y separar opcionalmente la etiqueta de ácido nucleico de la muestra; (c) poner en contacto la etiqueta de ácido nucleico con un primer oligonucleótido cebador cuya secuencia corresponde a una secuencia contenida en dicha primera región de la etiqueta de ácido nucleico y una sonda oligonucleótida que lleva un medio de señalización y cuya secuencia corresponde a dicha secuencia de identificación; (d) amplificar al menos una porción de la etiqueta de ácido nucleico mediante una reacción en cadena de la polimerasa que incluye una polimerasa de ácido nucleico con una actividad exonucleasa de 5' a 3' en donde se liberan fragmentos que incluyen medios de señalización de la sonda oligonucleótida durante la amplificación del ácido nucleico; y (e) detectar fragmentos liberados como indicación de que se ha producido la amplificación y por lo tanto que el material ha sido marcado, en donde la cantidad de etiqueta de ácido nucleico presente en la muestra se determina para proporcionar una indicación de la cantidad de marcador presente en la muestra. La etiqueta de ácido nucleico puede ponerse en contacto con un segundo oligonucleótido cebador capaz de cebar la amplificación de la etiqueta y con una secuencia que corresponde a una secuencia contenida en la segunda región. Además de tener medios de señalización, que puede ser una etiqueta fluorescente, la sonda oligonucleótida también puede llevar medios de atenuación para atenuar una señal de los medios de señalización. Dicha atenuación tendrá como resultado puede ser la transferencia de energía de resonancia de Förster a través del espacio. Una señal detectable de un fragmento liberado tendrá preferiblemente un nivel más elevado que una señal detectable por la sonda oligonucleótida.

De acuerdo con la invención, proporcionamos un método para detectar si un material ha sido marcado con una etiqueta de ácido nucleico, el método comprende los métodos siguientes:

(a) proporcionar un grupo de etiquetas de ácido nucleico, cada una de las cuales comprende una región genérica con una secuencia presente en todas las etiquetas de ácido nucleico dentro del grupo, estando la región genérica flanqueada por regiones codificadas con secuencias de identificación para la etiqueta;

(b) seleccionar una etiqueta de ácido nucleico determinada dentro del grupo;

(c) añadir o aplicar un marcador que comprende la etiqueta seleccionada de ácido nucleico al material; y

(d) poner en contacto la etiqueta de ácido nucleico con una sonda oligonucleótida marcada, apta para unirse a la región genérica de la etiqueta de ácido nucleico; y

(e) detectar la hibridación de la sonda oligonucleótida a la región genérica de la etiqueta de ácido nucleico, indicando así que el material estaba marcado con la etiqueta de ácido nucleico.

También se describe en la presente memoria un kit para determinar qué etiqueta de ácido nucleico en particular de un grupo conocido de diferentes etiquetas de ácido nucleico se ha usado para marcar un material, comprendiendo cada etiqueta de ácido nucleico del grupo al menos una secuencia de identificación para la etiqueta, comprendiendo el kit medios para formar una pluralidad de medios de reacción de amplificación de ácido nucleico, conteniendo cada medio un oligonucleótido con una secuencia que corresponde a la secuencia de identificación de una etiqueta de ácido nucleico conocida del grupo, y que puede amplificar una etiqueta de ácido nucleico diferente del grupo. La etiqueta de ácido nucleico comprende una región genérica con una secuencia presente en todas las etiquetas de ácido nucleico del grupo, y cada medio de amplificación de ácido nucleico comprende también preferiblemente un oligonucleótido con una secuencia que corresponde a una secuencia contenida en la región genérica.

En realizaciones preferidas de la invención, el marcador comprende además un medio indicador además de la etiqueta de ácido nucleico, la presencia de los cuales es fácilmente detectable en cualquier porción de muestra del material. La presencia del medio indicador en la muestra indica que también está presente en la muestra una etiqueta de ácido nucleico. Así, puede realizarse una sencilla prueba para detectar la presencia de medios indicadores y por lo tanto ácido nucleico en una muestra, antes de proceder con el análisis detallado de la identidad o cantidad de la etiqueta. El medio indicador puede comprender una pluralidad de partículas. Las partículas pueden estar formadas por cualquier tipo de material adecuado de materia anteriormente viva, muerta o no viable, y las partículas pueden tener cualquier tamaño o forma adecuados para el objeto previsto. Por lo general, partículas con un tamaño medio no superior a 5 micras son adecuadas en la mayoría de las ocasiones. Las partículas tienen preferiblemente un tamaño medio de 0,01 a 5 micras, más preferiblemente de 0,05 a 1 micra, con un tamaño típico de alrededor de 0,25 o 0,5 micras. Lo importante es que no sean visibles a simple vista, pero que puedan detectarse fácilmente. Con este objeto, las partículas pueden marcarse, por ejemplo, con tinte fluorescente.

Preferiblemente, el medio indicador comprende microperlas o microesferas, opcionalmente con una etiqueta fácilmente detectable. Las microperlas/esferas de ejemplo están comercializadas por Dynal (RU) de Wirral, Merseyside, RU, con la denominación comercial genérica de DYNABEADS y DYNASHPERES. La preparación de estas perlas se describe, en, por ejemplo, la publicación de las patentes europeas núms. 91953, 10986 y 106873 y las patentes estadounidenses núms. 4186120, 4563510 y 4654267.

El método según la invención en su aspecto descrito en esta memoria puede utilizarse para una determinación cuantitativa de la cantidad de etiqueta de ácido nucleico en un material marcado. Los autores describen tres métodos preferidos para cuantificar la cantidad de ácido nucleico amplificado en una reacción. Como se ha indicado anteriormente, el método de detección no es relevante, aunque los métodos descritos en esta memoria presentan diversas ventajas.

En una realización preferida de la invención se utiliza un ensayo nucleasa 5' para la detección y la cuantificación, que es una modificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ensayo nucleasa 5' se describió inicialmente en Holland et al.; 1991 (Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. y Gelfand, D. H, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7276-7280) y Holland et al., 1992 (Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., Will, S., Saiki, R. K. and Gelfand, D. H, *Clinical Chemistry*, 38, 462-463). Este ensayo también es el sujeto de la patente estadounidense núm. 5.210.015 y 5.487.972, y de las modificaciones posteriores. Un kit comercial para realizar el ensayo nucleasa 5', conocido como TAQMAN, está disponible de PC Biosystems.

En un ensayo nucleasa 5' tal y como el aplicado aquí, la etiqueta de ácido nucleico se pone en contacto con una sonda oligonucleótida marcada, además de con un primer oligonucleótido cebador con una secuencia que corresponde a la primera secuencia de la etiqueta, en presencia de una polimerasa de ADN con una actividad exonucleasa de 5' a 3'. La sonda oligonucleótida marcada puede unirse a una secuencia de la etiqueta de ácido nucleico durante la amplificación. Para la primera etiqueta de ácido nucleico con una secuencia de identificación (etiqueta de Tipo I), la sonda etiquetada se une a una secuencia de 5' a 3' aguas abajo del primer oligonucleótido cebador. Para la segunda etiqueta de ácido nucleico (etiqueta de Tipo II), es decir, donde la etiqueta de ácido nucleico posee dos secuencias de identificación y que se pone en contacto con un segundo oligonucleótido cebador que corresponde a la segunda región de identificación, la secuencia a la que se une la sonda está flanqueada por la primera y la segunda secuencia de identificación. Así, la sonda marcada al unirse a la etiqueta de ácido nucleico durante la amplificación se encuentra de 5' a 3' aguas abajo de uno de los oligonucleótidos cebadores.

Para la tercera realización de la etiqueta (etiqueta de Tipo III), la secuencia a la que está unida la sonda está formada por la secuencia de identificación de la etiqueta de ácido nucleico. De este modo, para la etiqueta, las ubicaciones de la primera y segunda región (que contienen los sitios de cebado) son tales que el primer oligonucleótido cebador unido a la etiqueta de ácido nucleico se encuentra 5' a 3' aguas arriba de la sonda marcada unida a su secuencia de identificación correspondiente. Para todas las etiquetas, el oligonucleótido cebador y la sonda pueden estar el uno junto al otro. Alternativamente, pueden estar separados por la presencia de una secuencia intermedia en la etiqueta de ácido nucleico. La sonda está etiquetada con un medio de señalización, preferiblemente una etiqueta fluorescente.

Durante la fase de síntesis de la PCR, el primer oligonucleótido cebador se extiende por la actividad polimerasa de la polimerasa de ADN. La sonda oligonucleótida marcada que se encuentra aguas abajo se degradará por la

actividad exonucleasa de 5' a 3' de la polimerasa, y se liberarán fragmentos con el medio de señalización. El medio de señalización de los fragmentos liberados puede ser detectado como una indicación del progreso de la reacción de amplificación. Particularmente, la presencia de dicha señal, indica que está presente el ácido nucleico amplificado. Por lo tanto, si se detecta una señal, esto indica que el ácido nucleico está presente en la muestra y, por lo tanto, que el material ha sido marcado. Además, la cantidad de señal será proporcional a la cantidad de ácido nucleico amplificado producido durante el transcurso de la reacción, de modo que la medición del nivel de señal dará una indicación de la cantidad de ácido nucleico amplificado.

Cualquier polimerasa con una actividad nucleasa 5' a 3' puede usarse en el ensayo nucleasa 5'. Polimerasas de ADN de mamíferos o bacteriano, por ejemplo, polimerasa I de ADN de *E. coli*, son adecuadas para su uso en el método. En el caso de la reacción en cadena de la polimerasa, la polimerasa debe ser estable al calor. Polimerasas termoestables son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, polimerasas de ADN de *Thermus aquaticus*, *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermus flavus*, *Thermus thermophilus*, etc.

Además de estar etiquetada con un medio de señalización, la sonda oligonucleótida también puede marcarse opcionalmente con un medio de atenuación, que atenúa la señal detectable de la etiqueta fluorescente en una sonda intacta. Se ha descubierto que se produce una atenuación adecuada cuando el medio de señalización se encuentra en el extremo 5' del oligonucleótido y el medio de atenuación se encuentra en el extremo 3'. Se cree que la atenuación se produce mediante la transferencia de energía de resonancia de Förster a través del espacio (FRET, descrita por Förster, V. Th., (1948), *Annals Physics* (Leipzig), 255-75). Por lo tanto, la proximidad del medio de atenuación al medio de señalización de la sonda oligonucleótida provoca la atenuación de una señal detectable por el medio de señalización, cuando el segundo oligonucleótido está intacto. Dicha atenuación no se produce cuando los fragmentos marcados se liberan por la actividad exonucleasa de la polimerasa, cuando el medio de atenuación se separa del medio de señalización. En este caso, la señal detectable de la sonda oligonucleótida intacta es sustancialmente inferior a la señal detectable de los fragmentos liberados, y la señal de los fragmentos liberados puede detectarse más fácilmente.

Un método alternativo para medir la presencia o cantidad de ácido nucleico es medir la incorporación de oligonucleótidos cebadores en amplicones. Para ello, el primer oligonucleótido cebador, y/o el segundo oligonucleótido cebador (de estar presente), se marcan convenientemente con un medio de señalización. A medida que progresa la amplificación, se incorporan los cebadores en amplicones de ácido nucleico amplificado. Se detecta una señal de un cebador así incorporado como medida de la presencia de ácido nucleico amplificado en la reacción. Además, dicha señal puede medirse para proporcionar una indicación de la cantidad de ácido nucleico amplificado en la reacción. El(los) cebador(es) pueden marcarse opcionalmente también con un medio de atenuación que, en caso de estar presente, atenúa una señal detectable del medio de señalización en un oligonucleótido cebador libre. Sin embargo, cuando se incorpora el oligonucleótido en un amplicon, el medio de atenuación no puede atenuar la señal del medio de señalización. Así, la señal detectable del oligonucleótido libre (en solución) se encuentra en un nivel sustancialmente inferior al de la señal detectable del cebador incorporado. El medio de señalización puede ser una etiqueta fluorescente y la atenuación puede tener lugar mediante la transferencia de energía de resonancia de Förster a través del espacio.

También son posibles otras formas de detectar y determinar la cantidad de ácido nucleico amplificado. Así, por ejemplo, puede cuantificarse la cantidad de ácido nucleico amplificado durante la reacción PCR tomando muestras periódicamente de la reacción. Entonces puede medirse la cantidad de material de ácido nucleico en las muestras que pueden hibridarse en una sonda de ácido nucleico. La sonda es un oligonucleótido con una secuencia que complementa una secuencia contenida en la etiqueta de ácido nucleico, estando flanqueada dicha secuencia por las secuencias unidas a los cebadores usados en la amplificación. Puede apreciarse que este método funciona porque solo el ácido nucleico amplificado puede hibridarse en dicha sonda. La sonda estará etiquetada preferiblemente para permitir su detección más fácilmente. Dicho principio de detección se usa en el sistema PCR cuantitativo PCR-LIGHT fabricado por Tropix/PE Applied Biosystems. En dicho sistema, un oligonucleótido cebador se marca con biotina, y la reacción PCR se interrumpe durante la fase exponencial de amplificación. Se toma una muestra del tubo de reacción y se une a una superficie recubierta de estreptavidina. A continuación se desnaturaliza el producto unido, y se elimina la cadena sin unir. A continuación se pone en contacto una sonda "interna" marcada con fluoresceína con el producto desnaturalizado de la PCR, y un anticuerpo antifluoresceína conjugado con fosfatasa alcalina se añade junto con un sustrato quimioluminescente. La emisión de luz medida en un luminómetro indica la presencia y cantidad de producto de amplificación.

El ácido nucleico que forma la etiqueta puede ser ácido deoxiribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). La etiqueta puede ser de proteína conjugada en ácido nucleico (proteína-ácido nucleico, PNA). Se prefiere el ADN debido a su mayor estabilidad y resistencia a las nucleasas. A pesar de que la etiqueta de ácido nucleico puede ser de doble cadena, preferiblemente estará formada por una molécula de ADN de una cadena, más preferiblemente un oligonucleótido. Ácidos nucleicos producidos naturalmente y sintéticos son adecuados para su uso como etiqueta. La expresión "producido naturalmente" hace referencia a moléculas de ADN o ARN que se producen en la naturaleza. El término "sintético" hace referencia a ADN o ARN sintetizado en laboratorio usando procedimientos rutinarios de síntesis bien conocidos en la técnica pertinente.



Preferiblemente, la etiqueta es un oligonucleótido de ADN sintético. El ADN sintético puede formarse a partir de cinco bases naturales: adenina, timina, guanina, citosina y uracil, y bases no naturales, por ejemplo, bases de inosina, y nucleótidos derivados, tales como 7-deazo-2'-deoxiguanosina, alquilfosfonato oligodeoxinucleótidos, oligodeoxinucleótidos de fosforotioato y oligodeoxinucleótidos  $\alpha$ -anoméricos. En determinadas circunstancias, etiquetas que incorporan bases que no se producen naturalmente pueden poseer ventajas respecto a las que contienen solo bases que se producen naturalmente, por ejemplo, en cuanto a la estabilidad, porque es menos probable que se degraden por la actividad nucleasa, o por sustancias químicamente activas o condiciones ambientales, tales como el calor o las radiaciones ultravioleta. La utilización de etiquetas que incorporan bases que no se producen naturalmente está limitada solo por su capacidad de ser efectivamente detectadas por los medios de detección. En los métodos de etiquetado usando la tecnología PCR preferida, la etiqueta debe ser capaz de formar duplicidades con cebadores PCR y de funcionar como una plantilla para las polimerasas usadas en el procedimiento PCR.

Preferiblemente, el ácido nucleico se detecta y se cuantifica al mismo tiempo que se amplifica. Pueden usarse diversas tecnologías de amplificación de ácido nucleico en el método descrito en esta memoria, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR), NASBA y TMA. En una realización preferida, el método utiliza el PCR, descrito en las patentes estadounidenses núms. 4683202 y 4683195 y las publicaciones de patentes europeas núms. 258017 y 237362.

Normalmente, la secuencia de identificación comprende al menos 20 bases nucleótidas para garantizar la especificidad adecuada de cualquier etiqueta de modo que la contaminación accidental no conduzca a resultados falsos. Cuanto mayor sea la secuencia, mayor será el contenido potencial de información de la etiqueta, aunque también será mayor la probabilidad de que la degradación se convierta en un problema. Además, la síntesis de etiquetas más largas también es más cara y menos eficiente, tal y como se ha descrito anteriormente. Preferiblemente, la etiqueta de ácido nucleico posee una longitud de entre 60 a 125 pares de bases o nucleótidos. Más preferiblemente, la etiqueta de ácido nucleico tendrá una longitud inferior a 90 nucleótidos o pares de base, y más preferiblemente la etiqueta de ácido nucleico tendrá una longitud de alrededor de 63 nucleótidos o pares de base. Esto permite la hibridación de dos cebadores que normalmente tienen una longitud de alrededor de 20 bases o nucleótidos, y que cuando se hibridan en la etiqueta, se separan por una región de la etiqueta que tiene una longitud de alrededor de 20 hasta 85 bases/nucleótidos. Esta región puede contener una región de unión para una sonda de nucleasa 5', tal y como se describe a continuación con más detalle. El tamaño real de la etiqueta no es importante, siempre que la etiqueta tenga el tamaño adecuado para cebadores del tamaño adecuado para reconocer secuencias correspondientes dentro de la etiqueta. Por motivos económicos, las etiquetas pueden escogerse para que sean tan cortas como sea posible.

La marca o medio de señalización puede ser una sustancia fluorescente, especialmente una tinción fluorescente. Tinciones fluorescentes adecuadas incluyen (aunque sin por ello limitarse): Alococianina, ficocianina, ficoeritrina, rodamina, oxacina, coumarina, derivados de fluoresceína, por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína y diacetato de carboxifluoresceína, así como rojo Texas, amarillo/naranja acridina, bromuro de etidio, yoduro de propidio, bisbenzamida (disponible comercialmente de Hoeschst con el nombre comercial H33258), etc. Preferiblemente, la etiqueta fluorescente es FAM (6-carboxi-fluoresceína) o TET (6-carboxi-4,7,2'-tetraclorofluoresceína).

Se usa una etiqueta de ácido nucleico escogida de un grupo de etiquetas para marcar un material aplicando un marcador que comprende la etiqueta escogida al material. Si el material a marcar es un líquido, basta con añadir la etiqueta de oligonucleótido directamente en el líquido. Si el material a marcar es un líquido con base agua, entonces la etiqueta puede añadirse directamente al líquido. Si el material es de base hidrocarburo o aceite, la etiqueta puede modificarse convenientemente (por ej., mediante metilación) antes de añadirla al material. En el caso de marcado de material sólido, la etiqueta de oligonucleótido puede disolverse primero en un líquido adecuado, que a continuación se aplica al sólido y se deja secar. La etiqueta de oligonucleótido también puede aplicarse en forma de aerosol, que se pulveriza sobre el sólido. Además de la etiqueta de oligonucleótido, el marcador también puede comprender adicionalmente un aglutinante o medio de detección, tal y como se ha descrito anteriormente.

Posteriormente, puede tomarse una muestra del material marcado y someterse directamente a análisis con procesamiento previo opcional de ser necesario. Por ejemplo, si el material es un líquido, puede tomarse un pequeño volumen del líquido y añadirse directamente a las reacciones de amplificación. De forma similar, también pueden añadirse partículas sólidas pequeñas directamente a las reacciones de amplificación. Sin embargo, normalmente se prefiere, en el caso de un material sólido, extraer una etiqueta de ácido nucleico del sólido con anterioridad. Esto puede realizarse convenientemente lavando el material sólido en el que se ha aplicado el marcador con un tampón de base agua adecuado.

Más detalles de estos métodos se describirán con referencia a los dibujos que la acompañan, en donde:

La FIGURA 1 es un esquema de señal fluorescente detectada respecto a una referencia en cada ciclo PCR en una serie de concentraciones de partida (por ml) de etiqueta de ácido nucleico; y

La FIGURA 2 es un diagrama logarítmico derivado de los datos de la Figura 1, mostrando el ciclo umbral (es decir el ciclo en el que la señal detectada está por encima del nivel de referencia) en una serie de concentraciones de partida de etiqueta de ácido nucleico.

## 5 **Experimento I: La estructura de Tipo I detectada y cuantificada con ensayo nucleasa 5'**

Puede usarse una etiqueta de Tipo I para marcar un material, e identificarse y cuantificarse mediante el ensayo nucleasa 5'.

- 10 Un grupo de etiquetas oligonucleótidas de ADN monocatenario se sintetiza según métodos de síntesis oligonucleótida convencionales conocidos en la técnica. Las etiquetas tienen preferiblemente una longitud de alrededor de 70 nucleótidos (nt), y contienen solo una secuencia de identificación en cada etiqueta. Por ejemplo, el grupo puede contener las siguientes etiquetas:

ID. de SEC: nº 1

Región A

Región B

Región C

**ACGTAGTAAAGAGGTGCCCGCCCCCGCTTTTCGCAGAACACCGAAGGAAGACCACACGTGAGCCCAGAAC**

15

ID. de SEC: nº 2

Región A

Región B

Región C

**ACGTAGTAAAGAGGTGCCCGCCCCCGCTTTTCGCAGAACACCGAAGGAAGAACTGATCGGGCTCAACTGGA**

- 20 Como puede observarse, la secuencia de identificación (Región C) es una región variable con una secuencia particular que varía según la etiqueta. Por lo tanto, la secuencia de esta región es única para la etiqueta determinada en la que se dispone la secuencia particular. Por otro lado, las regiones A y B poseen las mismas secuencias en todas las etiquetas del grupo y pueden denominarse secuencias "genéricas". En este caso, si la secuencia de identificación es una etiqueta de 20 nucleótidos de largo, entonces con 4 bases disponibles, pueden sintetizarse aproximadamente  $1,1 \times 10^{12}$  etiquetas únicas.

- 25 A continuación se escoge una sola etiqueta oligonucleótida del grupo y se usa para marcar un material aplicando un marcador que comprende la etiqueta escogida, tal y como se ha descrito anteriormente. Posteriormente, se toman muestras de una porción del material marcado, y la muestra se somete a análisis para determinar la identidad y/o cantidad de etiqueta en la muestra. De ser necesario, la etiqueta oligonucleótida puede extraerse opcionalmente de la muestra y someterse a análisis.

- 30 A los efectos de detección y cuantificación, se sintetiza un conjunto de pares de oligonucleótidos cebadores correspondientes para su uso en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando métodos convencionales de sintetización de ADN bien conocidos en la técnica. Un oligonucleótido cebador de cada par del conjunto posee una secuencia formada por una secuencia en la Región A del grupo de etiquetas. El otro oligonucleótido cebador del par posee una secuencia que complementa a una secuencia de la región de identificación variable (Región C) de una etiqueta oligonucleótida diferente del grupo. Así, el número de pares de cebadores corresponde al número de etiquetas oligonucleótidas del grupo, y cada par de cebadores del conjunto puede amplificar una (y solo una) de las etiquetas oligonucleótidas del grupo. Podrá apreciarse que el diseño de los pares de cebadores y la sonda oligonucleótida pueden variarse. Así, el oligonucleótido cebador de un par puede tener una secuencia complementaria a una secuencia de la Región A, en cual caso el otro cebador tendrá una secuencia formada por una secuencia de la Región C.

- 45 Además de los pares de cebadores, un tercer oligonucleótido se construye para su uso como una sonda en el ensayo nucleasa 5', una vez más usando métodos de síntesis de ADN convencionales. La sonda oligonucleótida posee una secuencia formada por o que complementa a una secuencia de la Región B de las etiquetas del grupo. Al igual que con la elección de cebadores PCR debe tenerse debidamente en cuenta la secuencia de la sonda marcada. Particularmente, la secuencia de la sonda se escoge de modo que su punto de fusión esté preferiblemente por encima del de ambos cebadores PCR, de modo que durante la reacción de amplificación, la sonda se una a su objetivo antes de que se produzca una extensión de cebador significativa.

- 50 La sonda oligonucleótida está marcada con una etiqueta fluorescente tal como FAM (6-carboxi-fluoresceína) o TET (6-carboxi-4,7,2'-tetracloro-fluoresceína). La marca fluorescente se incorpora a la sonda por medios convencionales conocidos en la técnica. Además, actualmente es posible solicitar a fuentes comerciales sondas personalizadas con fluorescente u otro de tipo de etiquetas ya incorporadas. Al igual que la etiqueta fluorescente,

también se incorporan a la sonda medios de atenuación, por ejemplo, mediante un proceso de acoplamiento convencional conocido en la técnica. El medio de atenuación es preferiblemente un colorante inhibidor de la coloración, cuando está presente en la misma sonda oligonucleótida que la etiqueta fluorescente, atenúa o reduce la señal de fluorescencia observada en la etiqueta fluorescente preferiblemente mediante la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). Así, en una sonda oligonucleótida intacta, se reduce la señal de la etiqueta fluorescente.

A continuación se prepara una serie de reacciones de ensayo nucleasa 5'. Cada tubo de reacción contiene una porción alícuota de la muestra que contiene la etiqueta oligonucleótida desconocida, *Taq* ADN polimerasa, dNTP, cloruro de magnesio, y tampón. Además, como cebadores PCR, cada tubo de reacción contiene un par de cebadores diferentes escogidos del conjunto de oligonucleótidos cebadores descritos anteriormente, así como una cantidad de la sonda oligonucleótida marcada. El número de tubos de reacción corresponde al número de etiquetas oligonucleótidas diferentes del grupo. Puesto que cada par de cebadores del conjunto tan solo puede amplificar una y solo una de las etiquetas oligonucleótidas del grupo de etiquetas, el hecho de que una reacción PCR con éxito se haya producido en un tubo de reacción particular indica que el par de cebadores de dicho tubo ha reconocido las secuencias correspondientes en la etiqueta oligonucleótida y ha permitido la amplificación de dicha etiqueta. Así, puede determinarse fácilmente la identidad de la etiqueta oligonucleótida usada para marcar el material realizando las reacciones PCR y determinando cuáles de las reacciones tienen éxito. Por supuesto, si se sospecha que una muestra contiene una etiqueta determinada, es necesario realizar solo una reacción PCR con el par de cebadores adecuados para comprobar si se produce amplificación. De forma similar, si se cree que la etiqueta pertenece a un pequeño número de etiquetas candidatas, un número reducido de reacciones pueden realizarse con los pares de cebadores adecuados.

La ventaja del ensayo nucleasa 5' es que la cuantificación de la etiqueta puede producirse al mismo tiempo que la detección de la amplificación. Se produce una sola señal de fluorescencia, la presencia de la cual indica que se ha producido amplificación (y por lo tanto, proporciona la identidad de la etiqueta), mientras que la fuerza de la señal se determina para proporcionar una indicación de la cantidad de etiqueta en la muestra (tal y como se describe a continuación con más detalle).

Cuando la sonda marcada y los cebadores se hibridan en sus respectivas secuencias complementarias, la estructura de la etiqueta es tal que la sonda marcada se encuentra 5' a 3' aguas abajo de uno de los cebadores. A medida que el ADN polimerasa amplía el cebador unido a la etiqueta, encuentra la sonda marcada unida a la etiqueta. La actividad nucleasa 5' a 3' de la polimerasa degrada la sonda marcada, y libera fragmentos marcados en el medio de reacción. Sin embargo, en función de la estructura de la etiqueta, los cebadores y la sonda, la sonda marcada cuando se hibrida en la etiqueta puede encontrarse incluso inmediatamente aguas abajo (es decir, adyacente) del cebador. En tal caso, la actividad exonucleasa procede a degradar la sonda marcada sin que se produzca ninguna extensión del cebador. Tal y como se ha mencionado anteriormente, en una sonda oligonucleótida intacta, la señal de la etiqueta fluorescente se reduce, aunque cuando se liberan fragmentos marcados, la señal deja de atenuarse y puede ser detectada con los medios adecuados, por ejemplo, un detector de fluorescencia. A medida que progresa la amplificación, la fuerza de la señal debe aumentar exponencialmente, a medida que se libera en el medio un mayor número de fragmentos marcados. La fuerza de la señal puede determinarse y usarse para determinar la concentración inicial de la etiqueta en la muestra como se describe a continuación. Los recipientes de reacción usados en el ensayo tienen paredes transparentes a la señal fluorescente, por lo cual la señal puede detectarse durante el transcurso de la reacción PCR sin necesidad de interrumpir la reacción.

Antes de ejecutar las reacciones de amplificación, se calibra el sistema de detección usando cantidades iniciales conocidas de etiquetas oligonucleótidas en una serie de reacciones de ensayo. La FIGURA 1 es un gráfico en el que se muestra el nivel de señal fluorescente detectado en el nivel de base (eje Y) en cada ciclo de la reacción PCR (eje X), en una serie de concentraciones iniciales ( $10^4$ ,  $10^6$ ,  $10^8$ ,  $10^{10}$  por ml) de etiqueta de ácido nucleico. Los oligonucleótidos A2, B2 y C2 tienen concentraciones de  $10^4$ /ml, A3, B3 y C3 tienen concentraciones de  $10^6$ /ml, A4, B4 y C4 tienen concentraciones de  $10^8$ /ml mientras que A5, B5 y C5 tienen concentraciones de  $10^{10}$ /ml. La barra horizontal, muestra el nivel de referencia de la señal fluorescente, que se determina igual a cero. Como puede observarse, el ciclo umbral, es decir el ciclo en el que la señal se vuelve detectable respecto al nivel de referencia (es decir, El punto en el cual la curva empieza a aumentar), es diferente para concentraciones iniciales diferentes de la etiqueta. Cuanta más etiqueta esté presente inicialmente en la muestra, antes será significativa la señal en la reacción. Los datos usados para la Figura 1 se incluyen a continuación en la Tabla 1.

Concentración inicial  $10^4$ /ml

|                 |      |      |      |
|-----------------|------|------|------|
| Oligonucleótido | A2   | B2   | C2   |
| Ciclo umbral    | 32.3 | 32.4 | 33.4 |

Concentración inicial  $10^6$ /ml

|                 |      |      |      |
|-----------------|------|------|------|
| Oligonucleótido | A3   | B3   | C3   |
| Ciclo umbral    | 25.3 | 26.3 | 26.2 |

Concentración inicial  $10^8$ /ml

|                 |      |      |      |
|-----------------|------|------|------|
| Oligonucleótido | A4   | B4   | C4   |
| Ciclo umbral    | 18.1 | 18.9 | 18.1 |

Concentración inicial  $10^{10}$ /ml

|                 |      |      |      |
|-----------------|------|------|------|
| Oligonucleótido | A5   | B5   | C5   |
| Ciclo umbral    | 12.0 | 12.0 | 12.2 |

TABLA 1: Los ciclos umbrales para diferentes concentraciones iniciales de oligonucleótidos. Se usaron tres oligonucleótidos para cada concentración y se muestran como ejemplos, A2, B2 y C2.

Los datos recogidos durante la calibración pueden usarse para generar una curva estándar. La FIGURA 2 es un gráfico en el que se muestra el ciclo umbral (es decir, el ciclo en el que la señal es detectable respecto a la referencia) como el eje Y, se esquematiza con el logaritmo de la concentración inicial de partida. Podrá observarse que el ciclo umbral es directamente proporcional al logaritmo de la concentración inicial de partida. Idealmente, la pendiente de la línea debería ser -3,3.

A fin de determinar la concentración inicial de la etiqueta en la reacción de ensayo, se determina el nivel en el que la señal es detectable respecto a la referencia. A continuación se compara este ciclo umbral con la curva estándar para proporcionar la concentración inicial de la etiqueta en la muestra. La concentración de la etiqueta en la muestra puede obviamente ser usada para determinar la concentración de etiqueta en el material marcado.

**Experimento II: La estructura de Tipo II detectada y cuantificada con ensayo nucleasa 5'**

Puede usarse una etiqueta de Tipo II para marcar un material, y puede identificarse y cuantificarse mediante el ensayo nucleasa 5'.

Un grupo de etiquetas oligonucleótidas de ADN monocatenario se sintetiza según métodos de síntesis oligonucleótida convencionales conocidos en la técnica. Las etiquetas tienen preferiblemente una longitud de alrededor de 70 nucleótidos (nt), y contienen dos secuencias de identificación en cada etiqueta. Por ejemplo, el grupo puede contener las siguientes etiquetas:

ID. de SEC: nº 3

Región A

Región B

Región C

**ATGACGATGTCGGAATGATCCGACCCGCTTTCGCAGAACACCGAATACCAACTGCGACCAAGGCGT**

ID. de SEC: nº 4

Región A

Región B

Región C

**ATTGGAGACAGACCCGAAGCGACCCGCTTTCGCAGAACACCGAAGGTGGGAAATACCAACTGCGA**

Como se ha mostrado anteriormente, en una etiqueta de Tipo II las Regiones A y C son regiones variables con secuencias de identificación que varían según la etiqueta. Por otro lado, la región B es una secuencia "genérica" con la misma secuencia que todas las etiquetas del grupo. En el grupo descrito, puesto que las secuencias de

identificación tienen ahora una longitud de 40 (2 x 20) nucleótidos, están disponibles aproximadamente  $2,2 \times 10^{12}$  etiquetas diferentes. Así, al usar una etiqueta de Tipo II en lugar de una etiqueta de Tipo I aumenta el número de etiquetas disponibles para el marcado.

El material se marca y se toman muestras del modo descrito en el Ejemplo I. La posterior identificación y cuantificación de la etiqueta es también la descrita anteriormente en el Ejemplo I, salvo que puesto que ahora hay dos secuencias de identificación, los dos pares de cebadores del conjunto cebador están diseñados para cebear la amplificación de una sola etiqueta del grupo. Es decir, un oligonucleótido cebador de un par del conjunto posee una secuencia formada por una secuencia en Región A de una etiqueta oligonucleótida del grupo, mientras que el otro cebador del par posee una secuencia que es complementaria a una secuencia en la Región C de la misma etiqueta oligonucleótida. Alternativamente, un cebador posee una secuencia complementaria a una secuencia de la Región A y el otro una secuencia formada por una secuencia de la Región C. Así, cada par de cebadores puede amplificar una y solo una de las etiquetas del grupo. Además del par de cebadores, se sintetiza una tercera sonda oligonucleótida marcada tal y como se describe en el Experimento I.

El ensayo nucleasa 5' se realiza del mismo modo que el descrito en el Experimento I.

Al igual que con una etiqueta de Tipo 1, la presencia de una amplificación con éxito, proporciona la identidad de la etiqueta, y el nivel en el que la señal es detectable respecto a la referencia se determina y compara con una curva estándar para proporcionar la concentración inicial de la etiqueta en la muestra. Huelga decir que la concentración de etiqueta en el material marcado puede calcularse fácilmente a partir de la concentración de la etiqueta en la muestra.

### **Experimento III: La etiqueta de Tipo I o de Tipo II detectada y cuantificada midiendo la incorporación de cebadores marcados en amplicones**

Una etiqueta de Tipo I o de Tipo II puede usarse para marcar un material, y puede identificarse y cuantificarse detectando y determinando la cantidad de incorporación del oligonucleótido cebador marcado en amplicones (productos de amplificación).

Un grupo de etiquetas oligonucleótidas de ADN monocatenario se sintetiza según métodos de síntesis oligonucleótida convencionales conocidos en la técnica. Las etiquetas tienen preferiblemente una longitud de alrededor de 70 nucleótidos (nt), y contienen una (Tipo I) o dos (Tipo II) secuencia de identificación en cada etiqueta. Por ejemplo, el grupo puede contener las siguientes etiquetas de Tipo I:

#### **ID. de SEC: nº 5**

Región A

Región B

**ACGTAGTAAAGAGGTGCCCGCCACCCGCTTTCGCAGAACACCGAAGGAAGACCACACGTGAGCCCAGAAC**

#### **ID. de SEC: nº 6**

Región A

Región B

**ACGTAGTAAAGAGGTGCCCGCCCCGCTTTCGCAGAACACCGAAGGAAGAACTGATCGGGCTCAACTGGA**

Alternativamente, el grupo puede contener las siguientes etiquetas de Tipo II:

#### **ID. de SEC: nº 7**

Región A

Región B

**ATGACGATGTCGGAATGATCCGACCCGCTTTCGCAGAACACCGAATACCAACTGCGACCAAGGCGT**

#### **ID. de SEC: nº 8**

Región A

Región B

**ATTGGAGACAGACCCGAAGCGACCCGCTTTCGCAGAACACCGAAACGGTGGGAAATACCAACTGCGA**

El diseño y síntesis de las etiquetas y el marcado y toma de muestras del material, es el descrito anteriormente en el Experimento I. En una etiqueta de Tipo I (ID de SEC 5 y 6), la Región A es la misma para todas las etiquetas del grupo, mientras que la Región B es la secuencia de identificación que es diferente en cada etiqueta del grupo. En la etiqueta de Tipo II, ambas Regiones A y B (ID de SEC 7 y 8) son secuencias de identificación. Se sintetiza un conjunto de pares de cebadores tal y como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo I (en el caso de una etiqueta de Tipo I) y el Ejemplo II (en el caso de una etiqueta de Tipo II). Igual que antes, cada par de cebadores puede amplificar una y solo una de las etiquetas dentro del grupo. A menos uno de los cebadores de cada par debe marcarse con un medio de señalización (por ejemplo, etiqueta fluorescente) y un medio de atenuación, tal y como se ha descrito anteriormente en relación con la sonda oligonucleótida marcada del Experimento I.

Se prepara una serie de reacciones de amplificación PCR tal y como se ha descrito anteriormente en el Experimento I, salvo en que la sonda oligonucleótida marcada para el ensayo nucleasa 5' no está presente en la mezcla de reacción.

La etiqueta fluorescente y el medio de atenuación se escoge de modo que en un cebador libre en solución, el medio de atenuación la señal de la etiqueta fluorescente. Esta atenuación tiene lugar mediante la transferencia de energía de resonancia a través del espacio de Förster. Sin embargo, cuando se extiende el oligonucleótido cebador marcado mediante la polimerasa de ADN y se incorpora en un producto de amplificación (amplicon), el medio de atenuación no atenúa la señal de la etiqueta fluorescente y puede detectarse una señal de la etiqueta fluorescente. A medida que se produce la amplificación, el nivel de señal detectable debe aumentar exponencialmente. Cuanto más elevada sea la concentración de etiquetas presente inicialmente en la muestra, menor será el número de ciclo en el que la señal es detectable respecto a la referencia. Al calibrar el aparato de detección del mismo modo que el descrito en el Experimento I, puede producirse una curva estándar, que permitirá determinar la cantidad de etiqueta. Una vez más, la presencia de la señal puede determinarse al mismo tiempo que el nivel de la señal, para proporcionar la identidad de la etiqueta así como su cantidad en la muestra.

#### **Experimento IV: La etiqueta de Tipo I o de Tipo II detectada y cuantificada midiendo directamente el producto de amplificación**

Una etiqueta de Tipo I o de Tipo II puede usarse para marcar un material, y puede identificarse y cuantificarse detectando y determinando directamente la cantidad de productos de amplificación durante la reacción PCR. Los productos de amplificación se detectan y cuantifican usando el sistema de PCR cuantitativo PCR-LIGHT fabricado por Tropic/PE Applied Biosystems.

Un grupo de etiquetas oligonucleótidas de ADN monocatenario se sintetiza según métodos de síntesis oligonucleótida convencionales conocidos en la técnica. Las etiquetas tienen preferiblemente una longitud de alrededor de 70 nucleótidos (nt), y contienen una (Tipo I) o dos (Tipo II) secuencia de identificación en cada etiqueta. Por ejemplo, el grupo puede contener las siguientes etiquetas de Tipo I:

##### ID. de SEC: nº 9

Región A

Región B

Región C

ACGTAGTAAAGAGGTGCCCGCCACCCGCTTTCGCAGAACACCGAAGGAAGACCACACGTGAGCCCAGAAC

##### ID. de SEC: nº 10

Región A

Región B

Región C

ACGTAGTAAAGAGGTGCCCGCCCCCGCTTTCGCAGAACACCGAAGGAAGAAGTATCGGGCTCAACTGGA

Alternativamente, el grupo puede contener las siguientes etiquetas de Tipo II:

##### ID. de SEC: nº 11

Región A

Región B

Región C

ATGACGATGTCGGAATGATCCGACCCGCTTTCGCAGAACACCGAATACCAACTGCGACCAAGGCGT

ID. de SEC: nº 12

Región A

Región B

Región C

**ATTGGAGACAGACCCGAAGCGACCCGCTTTCGCAGAACACCGAAGCGTGGGAAATACCAACTGCGA**

El diseño y síntesis de las etiquetas es el descrito anteriormente en el Experimento I. En una etiqueta de Tipo I (ID de SEC 9 y 10), las Regiones A y B "genéricas" son las mismas para todas las etiquetas del grupo, mientras que la Región C es la secuencia de identificación que es diferente en cada etiqueta del grupo. En la etiqueta de Tipo II, las Regiones A y C (ID de SEC 7 y 8) son secuencias de identificación, mientras que la Región B es común a todas las etiquetas del grupo. Para la amplificación PCR, se sintetiza un conjunto de pares de cebadores del modo descrito anteriormente en el Experimento I (en el caso de una etiqueta del Tipo I) y en el Experimento II (en el caso de una etiqueta de Tipo II). Igual que antes, cada par de cebadores puede amplificar una y solo una de las etiquetas dentro del grupo.

Para permitir la captura de los productos de amplificación, uno de los cebadores de cada par se marca con biotina.

El marcado y la toma de muestras del material es igual que el descrito anteriormente en el Experimento I. Se prepara una serie de reacciones PCR, conteniendo cada tubo de reacción un par de cebadores diferentes, escogidos del conjunto de cebadores oligonucleótidos, tal y como se describe en el Experimento I. La detección y cuantificación del producto de amplificación se efectúa tomando periódicamente muestras de cada tubo de reacción durante la fase exponencial de la amplificación. La muestra se aplica a una microplaca cuyos pocillos están recubiertos de estreptavidina. En el pocillo se captura cebador marcado con biotina no incorporada así como cualquier producto de amplificación. A continuación se lavan varias veces los pocillos con tampón. A continuación se desnaturalizan los productos de amplificación para exponer un ADN monocatenario unido a la microplaca, y se eliminan las cadenas complementarias. Una sonda marcada con fluoresceína con una secuencia complementaria de la secuencia genérica de la Región B se añade a la microplaca y se deja que se hibride con el ADN monocatenario unido. El anticuerpo anti fluoresceína conjugado con fosfatasa alcalina se añade junto con un sustrato quimioluminescente y se detecta la emisión de luz y se mide en un luminómetro. La presencia de emisión de luz indica una amplificación exitosa y así la identidad de la etiqueta de ácido nucleico, mientras que la cantidad de luz emitida indica la cantidad de producto de amplificación. Tal y como se ha descrito anteriormente en relación con el Experimento I, esto puede compararse respecto a una curva estándar para obtener la concentración inicial de la etiqueta en la muestra y así en el material marcado.

**Experimento V: Etiqueta de Tipo III detectada y cuantificada mediante ensayo nucleasa 5'**

Puede usarse un Tipo III para marcar un material, e identificarse y cuantificarse mediante el ensayo nucleasa 5'.

Un grupo de etiquetas oligonucleótidas de ADN monocatenario se sintetiza según métodos de síntesis oligonucleótida convencionales conocidos en la técnica. Las etiquetas tienen preferiblemente una longitud de alrededor de 70 nucleótidos (nt), y contienen una secuencia de identificación. Por ejemplo, el grupo puede contener las siguientes etiquetas:

ID. de SEC: nº 13

Región A

Región B

Región C

**ACGTAGTAAAGAGGTGCCCGCCACCCGCTTTCGCAGAACACCGAAGGAAGACCACACGTGAGCCCAGAAC**

ID. de SEC: nº 14

Región A

Región B

Región C

**ACGTAGTAAAGAGGTGCCCGCCATGGCATCGTCGGAGTTGGAGCTGGAAGACCACACGTGAGCCCAGAAC**

En una etiqueta de Tipo III, tan solo está presente una secuencia de identificación que es diferente según la etiqueta (Región B). Las Regiones A y C poseen secuencias comunes a todas las etiquetas del grupo. Se escoge una sola etiqueta oligonucleótida del grupo y se usa para marcar un material tal y como se ha descrito anteriormente en el Experimento I. Posteriormente, se toman muestras de una porción del material marcado y se someten a análisis para determinar su identidad y/o la cantidad de etiqueta en la muestra. Para ello, se sintetizan un par de oligonucleótidos cebadores uno de los cuales posee una secuencia formada por una secuencia en la Región A y el

otro una secuencia complementaria a una secuencia de la Región C. Alternativamente, un cebador puede tener una secuencia complementaria a una secuencia en la Región A y el otro una secuencia formada por una secuencia en la Región C. Además, también se sintetiza un conjunto de sondas oligonucleótidas marcadas, cada sonda del conjunto teniendo una secuencia complementaria o correspondiente a una secuencia de la Región B de una sola etiqueta del grupo. Las sondas están marcadas usando diferentes etiquetas fluorescentes con diferentes máximas de emisión. Así, por ejemplo, una sonda del conjunto puede estar etiquetada con rodamina, y otra con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Cada sonda también está unida a un medio de atenuación, que atenúa la señal de la etiqueta fluorescente de una sonda oligonucleótida intacta.

Para identificar y cuantificar la etiqueta usada para marcar el material se prepara una reacción de nucleasa 5' que contiene el par de oligonucleótidos cebadores además de un número de sondas marcadas de forma diferente del conjunto. Puesto que par de cebadores es complementario a las secuencias de las regiones "genéricas" del grupo, cualquier etiqueta presente en la muestra se amplificará sea cual sea su identidad. Sin embargo, solo una de las sondas marcadas se unirá a la etiqueta oligonucleótida durante la reacción. Tal y como se ha descrito anteriormente en el Experimento I, una sonda marcada hibridada en su secuencia complementaria de la etiqueta se encontrará 5' a 3' aguas abajo de un cebador de amplificación hibridado en la etiqueta, y la actividad exonucleasa 5' a 3' de la *Taq* ADN polimerasa degradará la sonda marcada durante la síntesis de ADN para liberar fragmentos marcados. Como se ha indicado anteriormente, el medio de atenuación no puede atenuar la señal de una etiqueta fluorescente en un fragmento liberado. Puesto que varias etiquetas fluorescentes se usan para etiquetar las diferentes sondas presentes en la reacción nucleasa 5', la señal fluorescente emitida por la reacción nucleasa 5' tendrá una de diversas longitudes de onda en función de las cuales se degrada una sonda determinada. Por lo tanto, para detectar la señal emitida se usa un detector multicanal capaz de detectar la radiación emitida en un número de diferentes longitudes de onda. Puesto que se conoce qué fluoróforo se usó para marcar cada sonda, la detección de la longitud de onda (o color) de la luz emitida indicará que sonda marcada se unió a la etiqueta y se degradó durante la reacción, y así proporcionar la identidad de la etiqueta oligonucleótida dentro del grupo que se usó para marcar el material. La fuerza de la señal aumenta exponencialmente durante una reacción con éxito y la calibración adecuada del sistema de detección permitirá determinar la concentración inicial de la etiqueta oligonucleótida, tal y como se ha explicado anteriormente en el Experimento I.

Podrá apreciarse que la ventaja de usar un ensayo nucleasa 5' con etiquetas de Tipo III es que es posible teóricamente identificar y cuantificar la etiqueta usando una única reacción de amplificación. Esta técnica se limita exclusivamente por el número de etiquetas fluorescentes distintivas para marcar las diferentes sondas oligonucleótidas, y por la capacidad de los detectores multicanal de discriminar entre las longitudes de onda de la señal emitida. Los detectores multicanal actuales pueden detectar hasta 8 longitudes de onda diferentes, lo cual significa que actualmente es posible contar con ocho sondas oligonucleótidas marcadas de forma diferente en la reacción de nucleasa 5'. Por lo tanto muchas de dichas reacciones deben llevarse a cabo en función del tamaño del grupo de etiquetas. Sin embargo, a medida que la tecnología progresa, esperamos que en el futuro sea posible tener un proceso de detección y cuantificación de "un tubo".

#### **Experimento VI: Ejemplo detallado ilustrando la etiqueta de Tipo II en el ensayo nucleasa 5'**

En el diseño de etiquetas oligonucleótidas están implicadas dos etapas, generación de secuencia aleatoria y diseño de cebador/sonda. En la primera etapa, se genera en primer lugar un gran número de secuencias de ADN aleatorias de 100 bases de longitud usando software PC/Gene adquirido a Oxford Molecular Limited, Reino Unido. Puede usarse cualquier software capaz de generar secuencias aleatorias de ADN. Se escogen las secuencias que tengan una composición nominal igual de las cuatro bases, y las secuencias generadas se exportan al software de diseño de cebador/sonda adecuado para la segunda etapa de diseño del cebador/sonda.

El software usado para diseñar los cebadores y la sonda es "Primer Express" de PE Applied Biosystems. "Primer Express" está disponible como parte del software para operar el hardware analítico PE-ABI 7700 usado para realizar ensayos de nucleasa 5', hardware también producido y vendido por PE Applied Biosystems. El funcionamiento detallado del software se describe en los manuales que lo acompañan. El software "Primer Express" aplica las normas habituales para el diseño de cebadores PCR (por ej., la necesidad de evitar horquillas, la necesidad de que los cebadores cuenten con  $T_m$  coincidentes, etc.) para el diseño de los cebadores. Además, el software evita la complementariedad significativa entre la sonda y cualquiera de los cebadores PCR y garantiza que la sonda es complementaria a la secuencia de interés y que se une a una región entre los dos cebadores. El software también garantiza que la sonda posee una  $T_m$  de al menos 10 grados centígrados superior que cualquiera de los cebadores de amplificación, y no posee una G en el extremo 5' de la sonda.

Una vez importada la secuencia oligonucleótida aleatoria al software "Primer Express", se indica al software que cree un nuevo diseño de sonda y cebador. A continuación se indica al software usando la función "Find Primers/Probe Now" que determine las primeras 200 combinaciones de cebador y sonda adecuadas para el conjunto por defecto de parámetros suministrados con el software. Los parámetros por defecto son los siguientes:  $T_m$  mínima para ambos cebadores fijada en 50 grados C,  $T_m$  máxima fijada a 60 grados C, y  $T_m$  óptima fijada a 58 grados C. La diferencia máxima  $T_m$  entre los cebadores es 2 grados. El contenido de GC de los cebadores se fija para que tenga



un mínimo de 20%, un máximo de 80%, sin cepo de CG 3' en ninguno de los cebadores. La longitud mínima del cebador se fija en 9, la máxima en 40 y la longitud óptima es 20. La  $T_m$  mínima del amplicon se fija en 0 grados, la  $T_m$  es 85 grados, mientras que las longitudes mínima y máxima del amplicon son 50 y 150, respectivamente. La  $T_m$  de la sonda se fija al menos 10 grados por encima de la  $T_m$  de los cebadores, y la secuencia de la sonda se fija para que no comience con una G, la repetición máxima de bases de los cebadores se fija en 3 residuos, mientras que los requisitos secundarios de la estructura del cebador se determinan como: pares de bases consecutivas máximas 3, pares de bases totales máximas 8. La combinación de cebadores y sonda con la puntuación de penalización más baja en relación con el oligonucleótido se identifican y la secuencia de la sonda se usa como base para diseñar cebadores para otras secuencias oligonucleótidas aleatorias tal y como se describe a continuación.

Se introduce la "secuencia de sonda común" identificada anteriormente en el siguiente oligonucleótido aleatorio importado al software "Primer Express". Para ello, se utilizan las funciones de edición del software "Primer Express", tal y como se describe con mayor detalle en el manual de funcionamiento del software. La experiencia demuestra que el mejor lugar para introducir la secuencia de la sonda es alrededor de la posición 35 de la base. La secuencia de sonda introducida puede fijarse usando el software, y puede volver a utilizarse la rutina "Find Primers/Probe Now" una vez más para localizar los pares de cebadores óptimos en la secuencia resultante (es decir, la secuencia aleatoria con la sonda insertada). Podrá apreciarse que puesto que se indica al software que fije la secuencia de la sonda, esta secuencia será la misma en todos los casos. Sin embargo, los pares de cebadores determinados para diferentes oligonucleótidos aleatorios variarán debido a que las regiones que flanquean la región de la sonda común son diferentes, al ser creados de forma aleatoria. El mejor par de cebadores óptimos se escoge para su uso, incluso aunque dicho par posee una puntuación de penalización superior a la del mejor par no óptimo.

Podrá apreciarse que la introducción de la secuencia de la sonda en un oligonucleótido aleatorio crea una secuencia mayor a 100 bases. Esto puede solucionarse de dos modos. En primer lugar, los oligonucleótidos aleatorios generados en la primera etapa pueden escogerse para que tengan 70 bases de longitud, en lugar de 100 bases. Así, la introducción de la secuencia de la sonda permitirá que la longitud completa de la secuencia tenga menos de 100 bases de longitud, y podrá aplicarse la rutina "Find Primers/Probe Now" a dicha secuencia. Sin embargo, esto no siempre proporciona resultados satisfactorios ya que la posición en la que se introduce la sonda afectará a los resultados de la rutina de localización de cebadores. En algunos casos, no se generarán pares de cebadores satisfactorios, y el oligonucleótido aleatorio en particular tendrá que descartarse e intentarse el procedimiento sobre el siguiente oligonucleótido aleatorio.

Alternativamente, los oligonucleótidos generados en la primera etapa pueden mantenerse con 100 bases de longitud. La secuencia de la sonda se introduce en la secuencias de oligonucleótido aleatorio, y cuando se han establecido pares de cebadores satisfactorios, puede editarse el oligonucleótido resultante en el software "Primer Express" para eliminar las secuencias redundantes. Por ejemplo, puede determinarse que hay secuencias extrañas presentes en el oligonucleótido fuera de las secuencias de los cebadores. Es decir, las secuencias de los cebadores pueden no estar en los extremos distales de la secuencia oligonucleótida. En tal caso, el oligonucleótido puede editarse o eliminar dichas secuencias para reducir la longitud del oligonucleótido y puede volver a realizarse la rutina "Find Primers/Probe Now" sobre la secuencia editada.

Debe tenerse en cuenta que el uso del software "Primer Express" en el diseño de cebadores y sondas oligonucleótidos tan solo debe observarse como una ayuda para aumentar las posibilidades del pocillo de trabajo del ensayo nucleasa 5'. El único criterio absoluto que debe aplicarse es si el ensayo funciona en realidad. Así, solo una secuencia de sonda que haya tenido los resultados correctos en un ensayo debe seleccionarse como secuencia de sonda común, y una secuencia de sonda no ensayada nunca puede usarse como la base para el diseño de una etiqueta. Incluso aunque la sonda funcione correctamente con un conjunto determinado de cebadores contra un objetivo específico, puede no funcionar siempre bien. Deben comprobarse todos los diseños de ADN antes de liberar la etiqueta con propósito comercial.

Las etiquetas oligonucleótidas, secuencias de cebadores y sondas se solicitan comercialmente en instalaciones de síntesis personalizada. Para reducir el riesgo de contaminación, deben usarse diferentes recipientes de síntesis para la sintetización de las etiquetas y cebadores oligonucleótidos. De lo contrario, los cebadores pueden resultar contaminados con diferentes etiquetas, lo que conduciría a controles "negativos" que darían una señal positiva y a una consiguiente reducción de la sensibilidad de la detección. Idealmente, debe usarse un tercer recipiente de síntesis para la producción de la sonda. Las sondas marcadas deben proporcionarse en tampón y deben estar protegidas contra la luz.

Las condiciones de ensayo deben estandarizarse usando una sola mezcla de tampón, siendo la única variante los cebadores usados y la muestra del material a analizar. Puesto que el ensayo nucleasa 5' se basa en la reacción en cadena de la polimerasa, deben seguirse los requisitos para establecer un ensayo PCR con éxito. Dichos requisitos se han determinado en diversas publicaciones, y se considera que el experto en la técnica conozca dichos requisitos.

El ensayo nucleasa 5' se realiza usando los mismos componentes que la PCR normal para la adición de la sonda marcada. Los componentes PCR se adquieren de PE-Applied Biosystems como "Taqman PCR Core Reagent Kit",

con el número de parte N8080288. Los componentes del kit son los siguientes: Tampón A con concentración stock 10X para pH de tamponado y proporciona tinción fluorescente de referencia, cloruro de magnesio con una concentración stock de 25 mM para proporcionar los iones  $Mg^{2+}$  necesarios para la actividad de la ADN polimerasa, dATP con una concentración stock de 10 mM (adenina nucleótido necesario para la extensión del ADN), dUTP con una concentración stock de 10 mM (nucleótido de uracilo necesario para la extensión del ADN), dGTP con una concentración stock de 10 mM (nucleótido de guanina necesario para la extensión del ADN), dCTP con una concentración stock de 10 mM (nucleótido de citosina necesario para la extensión del ADN), y uracilo N glicosidasa (UNG) a 1 Unidad/microlitro para evitar la transferencia de ADN de un ensayo al siguiente. La enzima UNG se inactiva durante la reacción PCR aunque hidrolizará cualquier ADN que contenga uracilo al inicio del proceso PCR. Así, la enzima evita que el ADN se transfiera de una reacción PCR a la siguiente. Los viales PCR no deben abrirse para evitar la transferencia de ADN.

Los oligonucleótidos cebadores y sondas marcados deben formularse como soluciones stock de 5 micromoles en un tampón adecuado que tenga la siguiente composición. 1 mM Tris-HCl a pH 8,3, 5 mM KCl y 0,2 mM de cloruro de magnesio. Las soluciones de cebadores y sonda se alicuotan en una serie de viales y se almacenan congelados hasta que sean necesarios. No debe permitirse que un vial sea sometido a más de 5 ciclos de congelación/descongelación.

A continuación se mezcla el "Taqman PCR Core Reagent Kit" con las soluciones stock de sonda de 5 micromoles. 100 microlitros de tampón A, 220 microlitros de cloruro de magnesio, 20 microlitros de dATP, 20 microlitros de dUTP, 20 microlitros de dGTP, 20 microlitros de dCTP, 5 microlitros de AmpliTaq Gold (*Taq* polimerasa de ADN), 10 microlitros de UNG, 25 microlitros de la sonda marcada y 120 microlitros de agua. Los 560 microlitros resultantes son suficientes para 40 ensayos si se usan 14 microlitros por vial de ensayo. A continuación se añade en cada vial de ensayo 4,5 microlitros de cada uno de los cebadores directos e inversos, 5 microlitros de las soluciones stock de 5 micromoles descritas anteriormente y 2 microlitros de la muestra que contiene la etiqueta a analizar. La solución resultante posee las siguientes concentraciones finales de cada componente 1X tampón A, 5 mM de cloruro de magnesio, 0,2 mM de dATP, 0,2 mM de dUTP, 0,2 mM de dGTP, 0,2 mM de dCTP, 0,025 unidades/microlitro de AmpliTaq Gold, 0,05 unidades/microlitro de UNG, 0,125 micromoles de sonda marcada, 0,9 micromoles de cebador directo y 0,9 micromoles de cebador inverso. La concentración final de la tarjeta objetivo es desconocida.

Pueden usarse placas ópticas de 96 pocillos o tubos ópticos como recipientes de reacción. El primero tiene el número de catálogo N8010560 y el último el número de catálogo N8010933 disponible de PE-Applied Biosystems. Ambos requieren tapas ópticas (número de catálogo N8010935 de PE-Applied Biosystems). El detector de secuencias ABI Prism 7700, fabricado por E-Applied Biosystems, se usa para realizar la PCR y detectar la señal fluorescente y debe operarse según las instrucciones del fabricante.

**Reivindicaciones**

1. Un método para detectar si un material ha sido marcado con una etiqueta de ácido nucleico, cuyo método comprende los pasos de:
- 5 (a) proporcionar un grupo de etiquetas de ácido nucleico, cada una de las cuales comprende una región genérica con una secuencia presente en todas las etiquetas de ácido nucleico dentro del grupo, estando la región genérica flanqueada por regiones codificadas con secuencias de identificación para la etiqueta;
- (b) seleccionar una etiqueta de ácido nucleico determinada dentro del grupo;
- (c) añadir o aplicar un marcador que comprende la etiqueta seleccionada de ácido nucleico al material; y
- 10 (d) poner en contacto la etiqueta de ácido nucleico con una sonda oligonucleótida marcada, apta para unirse a la región genérica de la etiqueta de ácido nucleico; y
- (e) detectar la hibridación de la sonda oligonucleótida a la región genérica de la etiqueta de ácido nucleico, indicando así que el material estaba marcado con la etiqueta de ácido nucleico.
- 15 2. Un método según la primera reivindicación, en donde la etiqueta de ácido nucleico se compone de ADN.
3. Un método según la primera o segunda reivindicación, en donde la etiqueta de ácido nucleico es un oligonucleótido de ADN monocatenario.

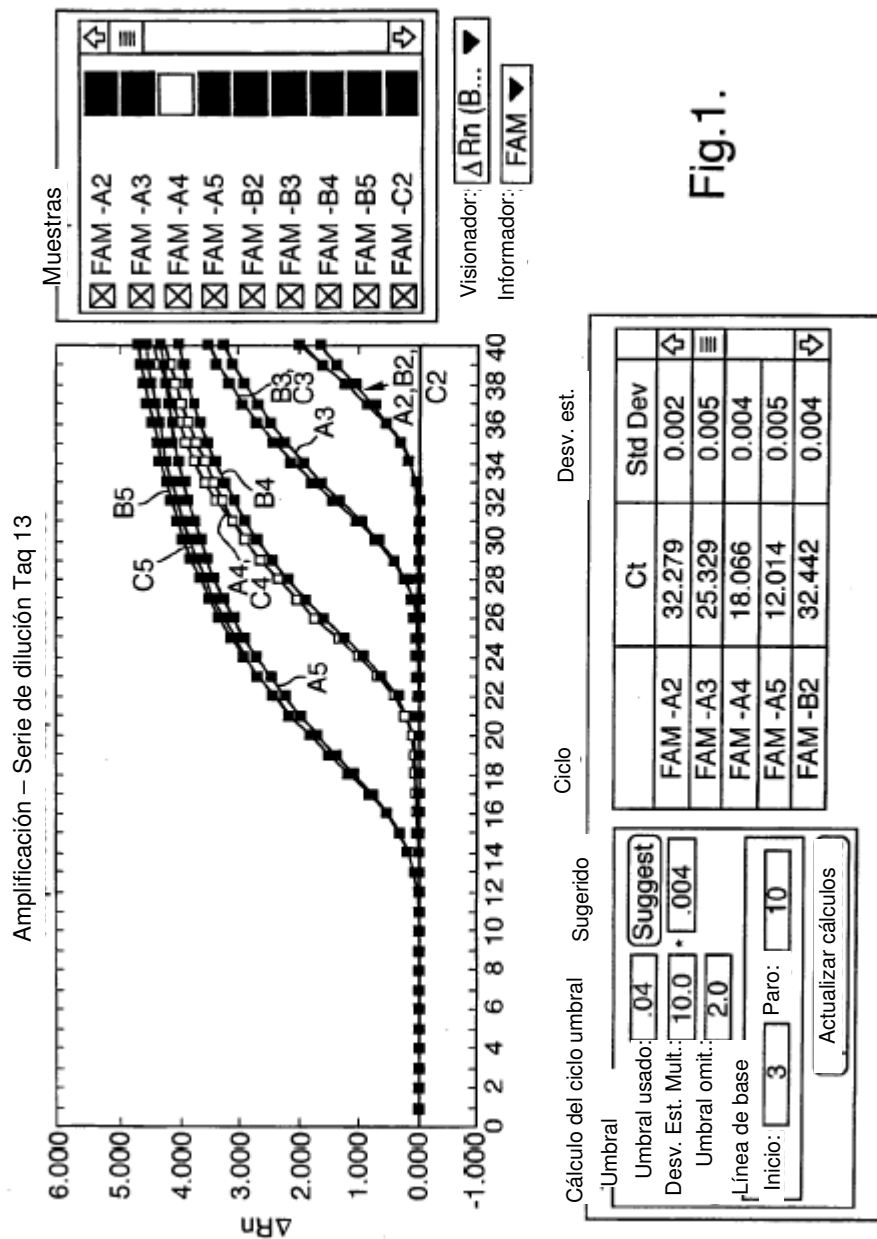


Fig.1.

