

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO Radicación : 04003755 00000001 Folios: 204 ón Fecha (DD): 2004-03-18 17:05:00 Trámite : 011 PDI-PRIORI 379 FASE NÚCL 229 CUMPLEN Dependencia: 820 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES	
FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES 2000-10			
1 SOLICITUD DE: ☐ Corrección de Error Material ☒ Modificación a una solicitud			
2 SOLICITANTE		Nombre: INGENEUS, CORP. sociedad constituida y existente bajo las leyes de Barbados Dirección: Chancery House, High Street, Bridgetown, Barbados Teléfono: 347 36 11 E-mail: clientes@camyp.com Fax: 217 92 11 Domicilio: Bridgetown, Barbados	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: _____
3 REPRESENTANTE APODERADO		Nombre: Emilio FERRERO Dirección: Carrera 4ª No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 E-mail: caveller@cavelier.com Fax: 217 92 11 Domicilio: Bogotá, Colombia	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: <u>438.019 TP 31.929</u>
4 Número de expediente: <u>04.003.755</u> Clase: <u>C12Q 1/68</u> Título del Invento: <u>FORMACIÓN DE MULTIPLEX DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS</u>			
5 Descripción de la corrección o modificación solicitada: Se presenta una nueva descripción y un nuevo capítulo reivindicatorio que incluyen correcciones de edición y traducción únicamente.			
6 Comprobante de pago No. <u>04-16.256</u> Fecha: <u>1 de marzo de 2004</u>			
7 Anexos ☒ Comprobante de pago de la tasa por \$ 87.000.00 ☐ Poderes, si fuere el caso ☐ Certificado de existencia y representación legal, cuando el solicitante sea persona jurídica			
8 NOMBRE: EMILIO FERRERO FIRMA:  C.C. 438.019 de Usaquén T.P.A. 31.929			

FORMACION DE MULTIPLEX DE ACIDO NUCLEICO

1. CAMPO DE LA INVENCION

La invención se relaciona con multiplexes de ácido nucleico, y más particularmente a los métodos para crearlos como triplexes y cuádruplexes, y aún más para emplearlos en ensayos para detectar ácidos nucleicos específicos.

2. DESCRIPCION DEL ESTADO DEL ARTE

La habilidad de las moléculas del ácido nucleico de dos hebras simples de secuencias de bases complementarias para enlazar específicamente a cada una ha proporcionado las bases para herramientas poderosas de investigación y de diagnóstico. Aunque menos explorada que dicha "hibridación convencional" también la habilidad de las moléculas de una sola hebra para enlazarse con blancos de doble hebra y la habilidad de moléculas de doble hebra para enlazarse a blancos de doble hebra. La habilidad para enlazarse con blancos de doble hebra potencialmente tiene ventajas sobre otros tipos de hibridización.

Esto puede deberse en parte al hecho de que los blancos de doble hebra no estarían desnaturalizados, permitiendo condiciones de hibridización "moderado" y proporcionando un blanco menor dispuesto a convertirse en un espiral totalmente aleatorio. Esto puede deberse también en parte al hecho de que los mecanismos de apareamiento de bases pueden ser al menos parcialmente diferentes que en la hibridación convencional, permitiendo la posibilidad de cinéticas más favorables y una reducción en la cantidad de sonda necesaria en la mezcla de reacción de hibridización.

Trabajos anteriores en crear multiplexes han incluido:

- 1) La formación de triplexes como parte de un proceso de recombinación homóloga, el cual es un proceso mediado por la proteína bacteriana RecA y proteínas de función similar en otros organismos;
- 2) La creación de estructuras de tres hebras durante la hibridización *in situ* (por ejemplo en la Patente U.S. 5,707,801 de Bresser et al.); y
- 3) Complejos de tres hebras o de cuatro hebras que se basan en el enlace de tipo Hoogsteen.

En estos trabajos previos no se ha explotado completamente el potencial de la formación de multiplexes. Los procesos mediados por RecA requieren una proteína. Los procesos de hibridización *in situ* son basados en un principio del blanco intercelular de doble hebra que abre localmente su estructura de doble hebra, proporcionando un blanco de una sola hebra que se hibridiza de acuerdo a los principios de hibridización convencional. Los complejos reportados se basan en polímeros del tipo Hoogsteen y son limitadas a estructuras que no son verdaderos heteropolímeros. En su lugar que requieren que una hebra dada sea una polipurina o una polipirimidina o muy cercana a la misma. Ver por ejemplo Floris et al., "Efecto de los cationes en la formación una hélice triple de purina-purina-pirimidina en una solución de una mezcla de sales de diferente valencia", 260 Eur. J. Biochem. 801-809 (1999).

Como fue el caso de los ácidos nucleicos triplex, el conocimiento convencional relacionado con los ácidos nucleicos cuadruplex ha sido también debido a

183
2

estructuras peculiares que solo existen en condiciones relativamente extremas para una clase relativamente pequeña de ácidos nucleicos. En particular, Sen et al. (Nature 334: 364-366 (1988)) divulgaron que unos oligonucleótidos ricos en guanina pueden acoplarse a ellos mismos espontáneamente en hélices de cuatro hebras *in vitro*. Sen et al. (Biochemistry 31: 65-70 (1992)) divulga que estos complejos de cuatro hebras pueden ser asociados más adelante en superestructuras compuestas de 8, 12, o 16 oligómeros.

Marshet al. (Biochemistry 33: 10718-10724 (1994)), y Nucleic Acids Research 23: 696-700 (1995)) divulgaron que algunos oligonucleótidos ricos en guanina pueden acoplarse en alineaciones no paralelas formando "alambres-G". Estas estructuras super organizadas son estabilizadas por cuartetos-G y consisten en cuatro residuos de guanosina arreglados en un plano y mantenidos juntos a través de apareamiento de base de Hoogsteen. De acuerdo a Sen et al. (Biochemistry 31:65-70 (1992)), al menos tres guaninas continuas dentro de un oligómero son críticas para formación de estas estructuras super organizadas.

Se ha sugerido que los ADN's de cuatro hebras juegan un rol importante en una variedad de procesos biológicos, como la inhibición de la VIH-1 integrasa (Mazumder et al., Biochemistry 35: 13762-13771 (1996)), la formación de la sinapsis durante la meiosis (Sen et al., Nature 334: 364-366 (1988)), y el mantenimiento de telómeros (Williamson et al., Cell 59:871-880(1989)); Baran et al., Nucleic Acids Research 25: 297-303 (1997)).

Se ha sugerido más adelante que el controlar la producción de cuadruplexes ricos en guanina puede ser la clave para controlar ciertos procesos biológicos. Por ejemplo, la Patente U.S. No. 6,017,709 de Hardin et al. sugiere que la actividad de telomerasa

puede ser controlada a través de medicamentos que inhiben la formación de los cuartetos de guanina.

La patente U.S. No. 5,888,739 de Pinter et al. divulga que los cuatruplexes basados en cuartetos de G pueden ser utilizados en un ensayo para detectar ácido nucleicos. Luego de hibridización de un oligonucleótido complementario, la estructura cuartetos de G se desenrolla o se alinea, y de esta forma incrementando la distancia entre el donador y el aceptor de las diferentes partes de la estructura de cuartetos de G, resultando en una disminución de la interacción y del cambio detectable en la señal (por ejemplo, fluorescencia) emitida de la estructura.

La Patente U.S. No. 5,912,332 de Agrawal et al., divulga un método para la purificación de oligonucleótidos sintéticos, donde los oligonucleótidos sintéticos se hibridizan específicamente con un oligonucleótido deseado, de largo completo y concomitantemente forma un agregado de multímero, como un cuatruplex de ADN. El agrado de multímero que contiene los oligonucleótidos para ser purificados y luego aislados utilizando técnicas de exclusión por tamaño.

A pesar de los desarrollos precedentes, el potencial completo de los cuatruplex de ácido nucleico no ha sido completamente apreciado ni explotado.

Relacionado con el problema de desarrollar los experimentos del tipo de hibridización con blancos de doble hebra también se encuentra el problema de cómo detectarlo. Las tinturas fluorescentes han sido utilizadas para detectar y cuantificar ácidos nucleicos por décadas. En la forma más básica, los ensayos basados en la intensidad de la fluorescencia han comprendido típicamente el contacto del blanco con una sonda que contiene un fluoróforo, removiendo cualquier sonda no enlazada

de la sonda enlazada, y detectando la fluorescencia en la muestra lavada. Ensayos homogéneos han mejorado el error de estos ensayos básicos, ya que los anteriores no requerían el paso de lavado o la provisión de un soporte de fase no líquida.

Por ejemplo, las patentes U.S. Nos. 5,538,848 de Livak et al. y 4,220,450 de Maggio divulgan ensayos basados en fluorescencia homogénea de secuencias de nucleótidos utilizando sondas de oligonucleótidos en solución. Sin embargo, esas patentes requieren el uso de un agente de extinción en combinación con el agente de detección, de manera tal que puedan hacer una distinción entre las señales generadas por las sondas hibridizadas y las sondas no hibridizadas. Livak et al. también requiere el uso de enzimas en este método divulgado. Los agentes de extinción y las enzimas adicionan complejidad y hacen más caro estos métodos.

La patente U.S. 5,332,659 de Kidwell divulga un método para detectar secuencias de nucleótidos en soluciones utilizando sondas que comprenden al menos dos mitades de fluoróforo. Los fluoróforos deben ser seleccionados para que interaccionen electrónicamente entre sí cuando se encuentran lo suficientemente cerca para variar la dependencia de la longitud de onda de su espectro.

Las sondas no hibridizadas son más flexibles que las sondas hibridizadas a la secuencia blanco, y consecuentemente las dos mitades de fluoróforo en cada una de las sondas se encuentran más cerca a cada una cuando la sonda no está hibridizada que cuando la sonda se encuentra hibridizada. Así, un cambio en la emisión de la longitud de onda se correlaciona con las sondas libres y pueden ser monitoreadas como una indicación de la cantidad de sonda libres en la muestra.

La patente U.S. No. 5,846,729 de Wu et al. también divulga ensayos basados en fluorescencia homogénea para determinar ácidos nucleicos.

Adicionalmente a los desarrollos antes mencionados que detectan la intensidad de la fluorescencia, algunos han utilizado algunas de las ventajas de los ensayos de polarización fluorescente. Sin embargo existen inconvenientes significativos para los ensayos basados en polarización. El grado de cambio en la polarización es una función de enlazamiento que puede ser impredecible, y la interpretación de los datos conforme a la información inconsistente de las expectativas teóricas pueden requerir mayores esfuerzos de lo deseado en un método analítico, particularmente cuando el método es para automatizar. También existen otras limitaciones que aparecen debido al peso molecular de las moléculas que se encuentran en movimiento que están siendo evaluadas en un ensayo de polarización fluorescente.

Las presentes invenciones serán observadas, en varias incorporaciones importantes para tomar ventaja de las propiedades de las moléculas fluorescentes para los propósitos de detectar triplex y cuádruplex.

Todas las referencias citadas aquí se han incorporado por referencia en su totalidad.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

Métodos para crear multiplexes

En un aspecto general, la invención es un método para crear multiplexes de ácido nucleico, dicho método comprende los siguientes pasos:

1) Crear una mezcla que comprende agua, un duplex Watson-Crick, una cantidad suficiente de moléculas de una sola hebra de secuencias de bases mixtas para formar un multiplex que incluya el duplex Watson-Crick, y un agente acelerador que aumente la tasa o la cantidad de formación de multiplex, siendo dicho multiplex un triplex o un cuádruplex, donde dicha molécula de una sola hebra o moléculas son seleccionadas para que, si en un multiplex, cada una de ellas puede ser relacionada con todas las otras hebras del multiplex por adherencia a las reglas de apareamiento de base, dichas reglas son las de Watson-Crick o las reglas de apareamiento de bases homólogas; y

2) Incubar dicha mezcla para permitir la formación de multiplex, cada hebra de dicho multiplex relacionada con todas las otras hebras del multiplex por adherencia a las reglas de apareamiento de base; proporcionando que dentro del multiplex, el duplex Watson-Crick adicionado en el paso (1) es heteropolimérico con un contenido de G-C entre el 10% y el 90%.

En un aspecto particular del método, el multiplex es creado como un triplex, en el paso (1) el número suficiente de moléculas de una sola hebra es 1, y en el paso (2) el triplex es formado de -5 en una inclusión particular del método en el triplex, la molécula de una sola hebra es relacionada a una hebra del duplex por las reglas de apareamiento de bases de Watson-Crick y en la segunda hebra el duplex se aparea por las reglas de apareamiento de base homólogas. En otra inclusión particular, el duplex retiene sustancialmente su estructura de doble hélice y la molécula de una sola hebra reside en un surco de una estructura de doble hélice. Todos estos triplexes también son aspectos de la invención.

En otro aspecto particular del método, el multiplex creado es un cuádruplex, en el paso (1) del duplex Watson-Crick es primero un duplex Watson-Crick, en el paso (1) el número suficiente de moléculas de una sola hebra es 2, dichas moléculas de una sola hebra se encuentran en un segundo duplex Watson-Crick, y en el paso (2) el cuadro duplex es formado a partir de dicho primero y segundos duplexes.

Preferiblemente el paso (1) es llevado a cabo con dos de las moléculas de una sola hebra que se encuentran dentro del segundo duplex Watson-Crick.

Métodos para detectar el triplex

El método para crear el triplex puede ser adaptado para ser un método para detectar un triplex por adición de un paso adicional (3) en el cual el triplex es detectado.

Métodos para detectar el cuádruplex

El método para crear un cuádruplex puede ser adaptado para ser un método para detectar un cuádruplex por adición de un paso adicional (3) en el cual el cuádruplex es detectado.

Triplex

En otro aspecto general, la invención es un triplex (un complejo triplex) que comprende una sonda de una sola hebra unida a un blanco de ácido nucleico de doble hebra, donde dicha sonda comprende un ácido nucleico heteropolimérico o un análogo de ácido nucleico heteropolimérico, y todas las tripletas de bases de dicho triplex son miembros seleccionados a partir del grupo que consiste de A-T-A, T-A-T, U-A-T, T-A-U, A-U-A, U-A-U, G-C-G y C-G-C.

Cuadruplex

En otro aspecto, la invención es una estructura múltiplex que es un cuadruplex, el cuadruplex comprende: una primera hebra que contiene una secuencia primaria de nucleobases; una segunda hebra que contiene una segunda secuencia de nucleobases, donde la segunda hebra es asociada con dicha primera hebra por un enlace de Watson-Crick; una tercera hebra que contiene una tercera secuencia de nucleobases; y una cuarta hebra que contiene una cuarta secuencia de nucleobases, donde dicha hebra está asociada a la segunda hebra y a la tercera hebra por un enlace de Watson-Crick.

DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La invención será descrita en conjunto con los siguientes dibujos en los cuales se hace referencia a los numerales designados como también a los elementos, en donde:

Figuras 1, 2A y 2B muestran la intensidad de la fluorescencia en función de la temperatura, el contenido GC, y el grado de apareamiento de bases.

Figuras 3, 4, 5A, 5B, 5C y 5D muestran la intensidad de la fluorescencia en función de la longitud de onda, el grado de apareamiento de bases y los cationes.

Figuras 6A, 6B, y 6C muestran la intensidad de la fluorescencia en función del protocolo de laser, y el catión.

Figuras 7A, 7B, 7C, 8A, 8B, 9A, 9B, 9C, y 10 muestran, con respecto a los cuádruplexes, la intensidad de la fluorescencia en función del grado de apareamiento de bases y el catión.

Figura 11 muestra la intensidad de la fluorescencia en función del grado de apareamiento de bases en una solución que contiene etanol.

Figuras 12A, 12B, 12C y 12D muestra la intensidad de la fluorescencia en función de la longitud de onda para el apareamiento perfecto e imperfecto de bases en dsADN: ssADN complejos cuando el intercalador de ADN YOYO-1 está presente.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

GLOSARIO Y DEFINICION

Los códigos de una letra para las bases que forman parte de nucleótidos respectivos son: A: adenina; T: timina; G: guanina; C: citocina; U: uracilo. Estas letras pueden ser también usadas para representar los nucleótidos respectivos.

El contenido G-C del duplex es de 100 veces el número de pares de bases G-C dividido por la suma del número de pares de bases G-C más el número de A-T (o A-U) pares de bases y se expresa como un porcentaje (por ejemplo 20%).

Un agente acelerador se entiende aquí como el que "aumenta la razón o la cantidad de dicho triplex o la formación de dicho triplex o cuádruplex". La razón puede obtenerse con tan pocas medidas como dos, cada una en diferentes puntos en el tiempo. Las cantidades se refieren al número de triplexes o cuádruplexes, formados.

El término "agente acelerador" puede ser intercambiado por los términos "promotor" y "agente promotor" excepto cuando el promotor se refiere específicamente a un promotor del gen.

Los términos ácido nucleico, triplex, cuádruplex, y similares se refieren a moléculas que comprende ADN, ARN, y sus análogos que son capaces de formar estructuras similares como las de duplexes de Watson-Crick, y triplexes y cuádruplexes que se forman aquí.

El término "Nucleobases" se refiere a las bases A, U, G, C, T, y aquellos análogos que pueden conformar una par de bases de acuerdo a las reglas de Watson-Crick.

Los análogos de A, U, G, C, y T son aquellos análogos que pueden conformar un par de bases de acuerdo a las reglas de Watson-Crick.

Un duplex Watson-Crick es una molécula de 2 hebras o un segmento molecular en el cual las dos hebras son anti-paralelas, es decir que sus direcciones 5'—3' son opuestas. La estructura completa del duplex es aquella de una doble hélice. Las hebras se mantienen juntas por enlaces de hidrógeno y por interacciones hidrofóbicas. Una complementariedad entre pares de bases, A es pareja con T por dos enlaces de hidrógeno (o, en el caso de RNA, A está apareada con U) y G es apareada con C por tres enlaces de hidrógeno. Como resultado, la regla de apareamiento de bases es: A es pareja con T, A es pareja con U, y G es pareja con C.

Una molécula de ácido nucleico de tres hebras no necesariamente es un triplex y no necesariamente cualquier segmento de tres hebras de una molécula puede ser un triplex. Es posible que, en ninguna región dentro de una hebra, una hebra sea enlazada a más de una u otra hebra.

Un ejemplo simple sería una molécula en forma de Y donde las hebras 1 y 2 forman el tallo, las hebras 1 y 3 forman la parte superior izquierda, y la hebra 2 forma una única rama de una sola hebra en la parte superior derecha.

Un ejemplo de un triplex es una molécula de ácido nucleico con tres hebras o segmento molecular en el cual una de las hebras (arbitrariamente nombrada como hebra 1) sigue las reglas de apareamiento de bases de Watson-Crick (A-T, A-U, y G-C) con ambas hebras, la 2 y la 3. Las hebras 1 y 2 forman una estructura que es, o es muy cercana a, una estructura duplex de Watson-Crick. La hebra 3 reside en el surco mayor del duplex un ejemplo de dicho triplex es el que fue elaborado por V.B. Zhurkin et al., J. Mol. Biol., (1994) vol. 239, 181-200 (ver especialmente la Figura 2 de esta referencia), este artículo es incorporado aquí por referencia. Como parte de la estabilización de dicho triplex, la hebra 3 está enlazada a las otras dos hebras por las reglas de apareamiento como siguen: Una A en la hebra 3 está apareada con ambas una A de la hebra 1 y una T en la hebra 2; una G en la hebra 3 está apareada con ambas una G en la hebra 1 y una C en la hebra 2; una C en la hebra 3 está apareada con una C en la hebra 1 y una G en la hebra 2; y una T en la hebra 3 está apareada con una T en la hebra 1 y una A en la hebra 2. Estas reglas de apareamiento de base se satisfacen a pesar de las variables que el modo de Zhurkin considera (C o C⁺ O C', T o T').

El término "reglas de apareamiento de bases" se refiere a la especificidad entre una molécula de ácido nucleico y otra molécula de ácido nucleico cuando se enlazan mutuamente con especificidad.

Ejemplo de ello es el apareamiento de bases de Watson-Crick (G-C, y A-T o A-U) y las reglas de apareamiento de pares de bases homólogas (A-A, T-T, G-G, C-C, U-U).

"Decondensación" de un duplex es definido como el aumento en la longitud total de una repetición de la hélice de duplex. Por ejemplo la conformación B del duplex tiene una repetición de la longitud total de la hélice de 10 pares de bases; una decondensación de 106 resulta en la repetición de la longitud en 13 pares de bases.

ANP se refiere a los análogos de poliamida de ADN y ARN (ver por ejemplo patente U.S. No. 5,539,082 de Nielsen et al.)

Inclusiones específicas y formulaciones alternativas de las invenciones. Las invenciones como se describen en la sección de resumen de la invención tienen inclusiones específicas y prefieren las inclusiones de interés. Estas inclusiones se describen a través de esta solicitud. Sin embargo para conveniencia, muchas de ellas han sido resumidas en esta sección. De la misma forma las invenciones como son resumidas en la sección de resumen de la invención pueden redactarse de diferentes maneras expresando alguna variación de la invención pero manteniendo una super-posición sustancial de lo esencial de esta invención.

Dichas formulaciones alternativas de la invención también están incluidas en esta sección.

(A) Método para hacer multiplex

Los métodos para formar triplex o cuádruplex, descritos de manera general en la sección de resumen de la invención pueden realizarse opcionalmente por incorporación de uno o más de los siguientes dentro del método:

dentro del multiplex, el duplex de Watson-Crick adicionado en el paso (1) es heteropolimérico con un contenido G-C entre el 25% y el 75%, dentro de multiplex, el duplex adicionado de Watson-Crick en el paso (1) es heteropolimérico con un contenido de G-C entre el 10% y el 90%, y adicionalmente las frecuencias de combinación dentro del mismo de dímeros de purina-piridina y pirimidina-purina excede el 25% (los dímeros son identificados al comienzo del extremo 5' de la secuencia y progresan base por base hasta que se alcanza el extremo 3'; por ejemplo en la secuencia 5'-AAAGGGT tiene un solo dímero de purina-pirimidina (GT) y un dímero pirimidina purina sus frecuencias combinadas son iguales a 1/6); al ir realizando los pasos (1) y/o (2) con hebras de ácido nucleico y/o duplexes no en una célula (y no en un virus); realizando el paso (2) sin la ayuda de una proteína (como RecA o proteínas de función similar); en el paso (1) adicionando el agua de tal forma, que en una base de volumen, alcance al menos el 50% del volumen final de la mezcla (mas preferiblemente por al menos el 80% del volumen final, más preferiblemente el paso (1) el agua es el único líquido adicionado a la mezcla); en el paso (1) sin adicionar ninguna proteína; realizando el paso (2) a una temperatura o temperaturas arriba de la temperatura de congelación de la solución acuosa y no a más de 85°C (más preferiblemente entre 5°C y 30°C, más preferiblemente entre 15°C y 25°C) en el paso (1), adicionando un anión o, más preferiblemente un catión como agente acelerador (monovalente, divalente o multivalente; por ejemplo, un catión metálico o un péptido catiónico), donde dicho catión es por lo menos un miembro seleccionado del grupo que consiste de los cationes de alcali metálicos, de los cationes metálicos de tierras alcalinas, cationes metálicos de transición,

espermidina trivalente $\text{CO}(\text{NH}_3)$ y espermina tetravalente; donde dicho catión es Na^+ proporcionado a una concentración de 50mM a 125mM; donde dicho catión es seleccionado del grupo que consiste en Mn^{+2} proporcionado a una concentración de 10mM a 45mM, magnesio Mg^{+2} proporcionado a una concentración de 10mM a 45mM, y Ni^{+2} proporcionado a una concentración de 20mM; en el paso (1) adicionando un intercalador como un agente acelerador (especialmente un intercalador fluorescente; preferiblemente un bis intercalador); en el paso (1) dicho acelerador es un fluoróforo intercalante seleccionado del grupo consistente en YOYO-1, TOTO-1, YOYO-3, TOTO-3, POPO-1, BOBO-1, POPO-3, BOBO-3, LOLO-1, JOJO-1, dímeros de cianina, YO-PRO-1, TO-PRO-1, YO-PRO-3, TO-PRO-3, PO-PRO-5, PO-PRO-1, BO-PRO-1, PO-PRO-3, BO-PRO-3, LO-PRO-1, JO-PRO-1, monómeros de cianina, bromuro de etidio, homodímero de etidio-1, homodímero de etidio-2, derivados de etidio, acridina, acridina naranja, derivados de acridina, heterodímeros de acridina y etidio, monoazida de etidio, yoduro de propidio, tintes SYTO, verde 1 SYBR, tintes SYBR, verde pico, tintes SYTOX, y 7-aminoactinomicina D. En el paso (1) dicho agente acelerador es un cloróforo no intercalante (especialmente uno seleccionado del grupo que consiste de biotina, rodamina, tintes de Alexa, tintes de BODIPY, conjugados de biotina, sondas reactivos de tiol, fluoresceína y sus derivados (incluyendo sondas "encarceladas"), verde de oregón, verde de rodamina, tintes QSY)) y dicha intensidad es inversamente proporcional a la correlación de la formación de triplex y/o el cuádruplex; en el paso (1) dicho agente acelerador es enlazado a por lo menos una de dicha primera hebra, dicha segunda hebra, dicha tercera hebra y dicha cuarta hebra; en el paso (1) adicionando un agente acelerador que es un intercalador que se enlaza al surco menor del duplex de Watson-Crick en el paso (1) adicionando un agente acelerador (especialmente un líquido orgánico soluble en agua, como es la dimetil formamida, etanol, y glicerol) que a 25°C es líquido; en el paso (1) adicionando más de un agente acelerador; en

el paso (1) adicionando un agente acelerador que es un agente de condensación o de condensación en relación al duplex de Watson-Crick; en el paso (1) adicionando un agente acelerador que es un análogo de A, T, U, C, o G; en el paso (1) adicionando un agente acelerador seleccionado del grupo que consiste en lectina y polisacáridos; en los pasos (1) y (2), amortiguar la mezcla con un pH de alrededor de 5 hasta aproximadamente 9; una citocina en al menos una de las siguientes tripletas de base C-G-C o G-C-G que tiene carga positiva; una citosina en cada tripleta de base C-G-C y G-C-G que tiene carga positiva; en el paso (2) el tiempo de incubación es no mayor de aproximadamente dos horas (más preferiblemente no mayor de una hora; y dentro de un marco de tiempo, preferiblemente de al menos 25%, más preferiblemente de por lo menos 50%, de los posibles multiplexes que se han formado); por lo menos dicho único agente acelerador es una molécula enlazante al surco menor de los ácidos nucleicos, que se enlaza de manera no intercalante y que se enlaza con una constante de solución de por lo menos 10^3 M^{-1} ; donde el multiplex es parte de un circuito eléctrico.

(Alternativamente, la invención es un circuito eléctrico que comprende una estructura de multiplex). Será aparente para alguien versado en el arte que las condiciones específicas precedentes también pueden ser aplicadas para el siguiente método para hacer un cuádruplex.

En una versión alternativa, el método para formar cuádruplex comprende:

(1) proporcionar un medio de hibridización que comprende una primera hebra, una segunda hebra, una tercera hebra, una cuarta hebra, agua, un buffer y al menos un agente acelerador; y

(2) incubar dicho medio de hibridización por un tiempo efectivo de incubación para hibridizar dicha segunda hebra a dicha cuarta hebra para proporcionar la mencionada estructura multiplex en la cual dicha estructura multiplex comprende: una primera hebra que contiene una primera secuencia de nucleobases; una segunda hebra que contiene una segunda secuencia de nucleobases, donde dicha segunda hebra está asociada con la primera hebra por enlaces de Watson-Crick; una tercera hebra que contiene una tercera secuencia de nucleobases; y una cuarta hebra que contiene una cuarta secuencia de nucleobases, donde dicha cuarta hebra está asociada a dicha segunda hebra y dicha tercera hebra por enlaces de Watson-Crick.

En particular las inclusiones de métodos de formación de cuádruplex que siguen aplican solos o en combinación (las descripciones que siguen utilizan la terminología del método para ser cuádruplex que especifica 4 hebras separadas pero que también es aplicable al método que especifica un duplex Watson-Crick como uno o dos de los materiales de partida): al menos uno de dicha primera hebra y dicha segunda hebra además comprende un agente farmacéutico, la hibridización de dicha segunda hebra a dicha cuarta hebra coloca a dicho agente farmacéutico a una distancia efectiva de un blanco en dicha tercera hebra, dicha cuarta hebra o en otra molécula asociada con al menos una de dicha tercera hebra y cuarta hebra; dicho agente farmacéutico un miembro seleccionado del grupo que consisten en ácidos nucleicos designados para unirse a secuencias como tales del gen de genes clínicamente relevantes, ácidos nucleicos designados para enlazarse con genes clínicamente relevantes, y ácidos nucleicos designados para enlazarse con sitios de origen de replicación de patógenos; dicha tercera hebra y cuarta hebra son proporcionadas en dicho medio de hibridización antes de que dicha primera hebra y dicha segunda hebra, y dicha primera hebra y dicha segunda hebra sean

proporcionadas en forma deshidratada anterior a la rehidratación por contacto de dicho medio de hibridización; al menos una de la primera hebra y la segunda hebra están marcadas covalentemente con un fluoróforo no intercalante y dicha intensidad es inversamente proporcional a dicha afinidad de enlace; al menos un agente acelerador es un fluoróforo intercalante, y la intensidad de la fluorescencia de un medio de prueba que contiene dicha estructura multiplex es directamente relacionada con la afinidad de enlace de dicha segunda hebra para dicha cuarta hebra; hibridización de la segunda hebra a dicha cuarta hebra se detecta como el cambio en la fluorescencia, quimiluminescencia, electroquimiluminescencia o señal eléctrica; una intensidad de dicha señal es correlacionada con la afinidad de enlace entre dicha segunda hebra y dicha cuarta hebra; hibridización de dicha segunda hebra a dicha cuarta hebra inactiva en actividad asociada con al menos uno de dicha tercera hebra y cuarta hebra.

(B) Métodos para detectar triplexes

Los métodos para detectar un triplex, descritos generalmente en la sección de resumen de la invención, pueden realizarse opcionalmente por incorporación de uno o más de los siguientes dentro del método: realizando el método como un ensayo homogéneo tal durante o anterior al paso (3), las moléculas de una sola hebra que no son partes del triplex no son colocadas dentro del contenedor separadas de aquellas que contienen el triplex; utilizando un método de detección para discriminar entre un apareamiento perfecto de acuerdo a la regla de apareamiento de bases, un mal apareamiento de una base (o eliminación), y un mal apareamiento de 2 bases (o eliminación), entre el duplex y la molécula de una sola hebra en el triplex (el método preferiblemente comprende la calibración del método con moléculas que comprenden malos apareamientos conocidos); utilizando la extensión del enlace del intercalador (por ejemplo, como se indica por el aumento de la fluorescencia) como

una indicación de la formación del triplex; tal que una longitud de onda en la cual dicho fluoróforo intercalante fluorescencias cambian a una segunda longitud de onda luego de la intercalación, una diferencia entre dicha longitud de onda y dicha segunda longitud de onda indica que un complejo entre dicha sonda y dicho blanco es un duplex o un triplex y si dicho blanco es ADN o ARN; la sonda es covalentemente marcada con un fluoróforo no intercalante y su intensidad es inversamente proporcional a la afinidad de enlace (especialmente donde dicho fluoróforo no intercalante es un miembro seleccionado del grupo que consiste de biotina, rodamina y fluoresceína); utilizando una molécula de una sola hebra marcada con un fluoróforo como molécula de una sola hebra; el método es un ensayo homogéneo conducido sin proporcionar una señal de un agente de extinción en dicha secuencia blanco (es decir, en el duplex) o en la sonda (es decir en la molécula de una sola hebra) y/o sin desnaturalización previa a dicha secuencia blanco y/o sin amplificación de PCR de dicha secuencia blanco; dicho método es un ensayo homogéneo conducido sin proporcionar una señal de un agente de extinción en dicha secuencia blanco o en dicha sonda; la sonda tiene una columna parcialmente cargada o descargada; la sonda comprende una secuencia de ANP y/o es ssANP preparada por síntesis paralela; la sonda y dicha secuencia blanco tiene la misma longitud; la sonda tiene una longitud de 5 a 30 nucleótidos; la radiación para excitar la fluorescencia es emitida a partir de un láser de iones de argón a una longitud de onda de al menos 200 nm hasta 1000 nm; la muestra de prueba tiene un volumen de por lo menos 20 microlitros que tienen por lo menos 10 femtomoles de una secuencia blanco y por lo menos 10 femtomoles de la sonda; la concentración de la secuencia blanco en dicha muestra no es mayor a 5×10^{-1} u M; la concentración de la sonda en la muestra no es mayor a 5×10^{-1} M; el método es llevado a cabo en un biochip; el fluoróforo intercalante es adicionado al medio en forma libre de dicha sonda y libre de dicha secuencia blanco; el fluoróforo intercalante es un miembro

seleccionado del grupo que consiste de YOYO-1, TOTO-1, bromuro de etidio, homodímero de etidio-1, homodímero de etidio-2 y acridina.

En un aspecto alternativo, la invención es un método de detección que comprende: proporcionar un blanco de ácido nucleico de doble hebra o un análogo de ácido nucleico que comprende una secuencia blanco, donde dicha secuencia blanco contiene al menos una base de purina y al menos una base de pirimidina; proporcionar una sonda que comprende una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de análogos de ácido nucleico; proporcionando un agente acelerador; adicionando dicha sonda, dicha secuencia blanco y dicho agente acelerador a medida para proveer una muestra de prueba que contiene un complejo triplex que comprende dicha sonda enlazada a dicha secuencia blanco, donde todas las tripletas de base de dicho complejo son miembros seleccionados del grupo que consiste de A-T-A, T-A-T, U-A-T, T-A-U, A-U-A, U-A-U, G-C-G y C-G-C; irradiando dicha muestra de prueba con una reacción que excita para causar que la muestra emita radiación fluorescente; detectando una intensidad de dicha radiación fluorescente, donde dicha intensidad se correlaciona con la afinidad de enlace entre dicha sonda y dicha secuencia de blanco, y determinando de dicha intensidad una extensión de la correlación entre dicha sonda y dicha secuencia blanco.

En otro aspecto alternativo, el método comprende: proporcionar un ácido nucleico blanco un análogo de ácido nucleico que tiene una secuencia blanco, donde dicha secuencia blanco contiene al menos una base purina y al menos una base pirimidina; proporcionando una sonda de doble hebra que comprende una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de análogos de ácido nucleico; proporcionando un agente acelerador de hibridización; adicionando dicha sonda, dicho blanco y dicho agente acelerador de hibridización a un medio que proporciona una muestra

de prueba que contiene un triplex de Watson-Crick que comprende dicha sonda enlazada a dicha secuencia blanco; irradiando dicha muestra de prueba con una reacción que excita para causar que la muestra emita radiación fluorescente; detectando una intensidad de dicha radiación fluorescente, en donde dicha intensidad está relacionada con la afinidad de enlace entre dicha sonda y dicha secuencia blanco; y determinando a partir de dicha intensidad un grado de apareamiento entre dicha sonda y dicha secuencia blanco donde dicho método es un ensayo homogéneo conducido sin proporcionar un agente de señal de extinción a dicha secuencia blanco o en dicha sonda;

(C) Métodos para detectar cuádruplex

Los métodos para detectar cuádruplexes, descritos en general en la sección de resumen de la invención, pueden realizarse opcionalmente incorporando uno o más de los siguientes dentro del método: realizando el método como un ensayo homogéneo, durante o antes del paso (3) de moléculas de ácido nucleico que no son partes del cuádruplex y no son colocadas dentro del contenedor separadas del que contiene el cuádruplex; el método es un ensayo homogéneo conocido sin proporcionar un agente de señal de extinción en dicha secuencia blanco o en dicha sonda (es decir, el segundo duplex de Watson-Crick) y/o sin desnaturalización previa de dicha secuencia blanco y/o sin amplificación por PCR de dicha secuencia blanco; utilizando el método de detección para discriminar entre un apareamiento perfecto de acuerdo a las reglas de apareamiento de base, un mal apareamiento de una base (o eliminación), y un mal apareamiento de 2 bases (de eliminación), entre el primero y segundo duplex de Watson-Crick (preferiblemente por calibración del método con moléculas que comprenden malos apareamientos conocidos); utilizando la extensión del enlace del intercalador como una indicación de la formación del cuádruplex (especialmente por utilización de un intercalador fluorescente utilizando fluorescencia

aumentada como un indicador); el fluoróforo intercalante es adicionado al medio en forma libre de dicha sonda y libre de dicha secuencia de blanco; el fluoróforo intercalante es un miembro seleccionado del grupo que consiste de YOYO-1, TOTO-1, bromuro de etidio, homodímero de etidio-1, homodímero de etidio-2 y acridina; una longitud de onda en la cual dicho fluoróforo intercalante dando fluorescencia a una segunda longitud de onda luego de la intercalación, una diferencia entre dicha longitud de onda y dicha segunda longitud de onda indica si el complejo entre dicha sonda y dicho blanco es un duplex o un triplex y si dicho blanco es ADN o ARN; la sonda está marcada covalentemente con un fluoróforo no intercalante y dicha intensidad es inversamente proporcional a dicha afinidad de enlace (especialmente donde dicho fluoróforo no intercalante es un miembro seleccionado del grupo que consiste de biotina, rodamina y fluoresceína) utilizando una molécula de una sola hebra marcada con fluoróforo como parte del segundo duplex Watson-Crick; el método más adelante comprende cuantificar la afinidad de enlace; la sonda tiene una columna parcialmente cargada o descargada; la sonda comprende una secuencia de ANP y/o ssANP preparada por paralela; la sonda y dicha secuencia blanco tienen la misma longitud; la sonda tiene una longitud de 5 a 30 nucleótidos (o pares de base); la radiación de excitación de la fluorescencia es emitida a partir de un láser de ion de argón a una longitud de onda de 200 nm hasta aproximadamente 1000 nm; la muestra de prueba tiene un volumen de por aproximadamente 20 microlitros conteniendo por lo menos 10 femtomoles de la secuencia blanco y por menos 10 femtomoles de la sonda; la concentración de la secuencia blanco en dicha muestra no es mayor que 5×10^{-1} M; la concentración de la sonda en la muestra no es mayor de 5×10^{-10} M; una radiación entre dichas primera y segunda hebra a dichas tercera y cuarta hebra que es de 10:1; las concentraciones de dichas primera, segunda, tercera y cuarta hebras no son mayores de 5×10^{-1} M; el método es realizado en un biochip.

En un aspecto alternativamente relacionado, el método comprende: proporcionar un ácido nucleico blanco o un análogo de ácido nucleico que tiene la secuencia blanco, donde dicha secuencia blanco contiene por lo menos una base purina y por lo menos una base pirimidina; proporcionando una sonda de doble hebra que comprende una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de análogo de ácido nucleico; proporcionando un agente acelerador de hibridización; adicionando dicha sonda, dicho blanco y dicho agente acelerador de hibridización a un medio para proporcionar una muestra de prueba que contiene el cuadruplex Watson-Crick que comprende dicha sonda unida a dicha secuencia de blanco; irradiando dicha muestra de prueba con una radiación que excita para ocasionar que la muestra emita radiación fluorescente; detectando una intensidad de dicha radiación fluorescente, donde dicha intensidad es correlacionada con la afinidad de blanco entre dicha sonda y dicha secuencia de blanco; y determinando de dicha intensidad el grado de apareamiento entre dicha sonda y dicha secuencia blanco en donde este método es un ensayo homogéneo conocido sin proporcionar un agente de señal de extinción en dicha secuencia blanco o en dicha sonda.

(D) Los triplexes

El triplex descrito de manera general en la sección de resumen de la invención, puede opcionalmente tener uno o más de las siguientes características: cada hebra es heteropolimérico con un contenido G-C entre 25% y 75%, cada hebra es heteropolimérica con un contenido G-C entre 10% y 90%, y adicionalmente las frecuencias combinadas en ella de dímeros de purina-pirimidina y dímeros de piridina-purina excede el 25%; no está en una célula (y no en un virus); es estable a pH mayor que 7.6 (pero menor que pH 9); está en un medio a un pH mayor que 7.6 (y preferiblemente menor que pH 9); el ácido nucleico de una sola hebra o el análogo

de ácido nucleico tiene una longitud de 5 a 30 bases y el blanco de ácido nucleico de doble hebra tiene una longitud de 8 a 3.3×10^9 pares de bases; la secuencia blanco es heteropolimérica y contiene de 25% a 75% bases de purina y de 75% a 25% de bases de pirimidina en cualquier orden (preferiblemente en donde la frecuencia de dímeros de purina-pirimidina más la frecuencia de dímeros de pirimidina-purina exceda el 25%); la sonda (es decir la molécula de una sola hebra) está unida covalentemente a un agente de segmentación de ácido nucleico de doble hebra; la sonda está unida covalentemente a un agente quimioterapéutico; la sonda está unida covalentemente a un marcador (por ejemplo, un complejo multi-molecular de señalización, un par redox, un agente quimioluminescente, un agente electroquimioluminiscente, en una incorporación preferida, un fluoróforo, especialmente de modo tal que la intensidad de fluorescencia del complejo es correlacionada con una afinidad del enlace entre la sonda y la secuencia blanco); las reglas de apareamiento de enlace para moléculas de ácido nucleico de una sola hebra son, con respecto al duplex de una hebra las reglas de apareamiento de base de Watson-Crick, G-C y uno de A-T o A-U, y, con respecto a otras hebras de duplex son: A-A y T-T o U-U; el duplex sustancialmente retiene o mantiene la estructura de doble hélice de Watson-Crick, y la molécula de una sola hebra reside en un surco de la doble hélice; el agente acelerador forma un enlace entre una parte del duplex y una parte de la molécula de ácido nucleico de una sola hebra; el agente acelerador está unido covalentemente a la molécula de ácido nucleico de una sola hebra; ambas hebras del duplex de Watson-Crick son ADN (especialmente cuando todas las hebras del triplex son de ADN); el agente acelerador se enlaza a una base en el duplex de Watson-Crick, siendo dicha base una a la cual la molécula de ácido nucleico de una sola hebra se une; el reactivo acelerador se enlaza a la base en el duplex de Watson-Crick, dicha base no siendo una en el triplex; el agente acelerador se enlaza a la columna de fosfato en duplex de Watson-Crick; el agente acelerador

se enlaza a más de un sitio en el duplex de Watson-Crick, cada sitio se encuentra o en una base o en la columna de fosfato de dicho duplex; el agente acelerador se enlaza en el sitio en el duplex de Watson-Crick, dicho sitio se encuentra o en una base o en una columna de fosfato de dicho duplex; el agente acelerador se enlaza a una base en el duplex de Watson-Crick y a una base en la molécula de ácido nucleico de una sola hebra; el agente acelerador se enlaza a una base en la molécula de ácido nucleico de una sola hebra.

(E) Los cuádruplex

Los cuádruplex descritos en general en la sección de resumen de la invención, pueden tener opcionalmente uno o más de las siguientes características: cada uno de dichas cuatro hebras es heteropolimérico con un contenido G-C entre 10% y 90%; la segunda y cuarta hebras están alineadas en dirección paralela de 3' a 5' y el enlace entre esas 2 hebras concuerdan con las reglas de apareamiento de pares de bases homólogos; las primera y tercera hebras están alineadas en una dirección paralela de 5' a 3' y el enlace entre esas 2 hebras concuerdan con las reglas de apareamiento de bases homólogos; la segunda y cuarta hebras están alineadas en una dirección paralela de 3' a 5' y el enlace entre dichas segunda y cuarta hebras concuerdan con las reglas de apareamiento de bases homólogos y adicionalmente la primera y tercera hebras están alineadas en una dirección paralela de 5' a 3' y el enlace entre dichas primera y tercera hebras concuerdan con las reglas de apareamiento de bases homólogos; la segunda y cuarta hebras están alineadas en una dirección paralela de 3' a 5' y el enlace entre esas dos hebras concuerda con las reglas de apareamiento de Watson-Crick; las primera y tercera hebras están alineadas en una dirección paralela de 5' a 3' y el enlace entre esas 2 hebras concuerda con las reglas de apareamiento de base de Watson-Crick; la segunda y cuarta hebras están alineadas en una dirección paralela de 3' a 5' y el enlace entre

dicha segunda y cuarta hebras concuerda con las reglas de apareamiento de base de Watson-Crick y adicionalmente las primera y tercera hebras están alineadas en una dirección paralela de 5' a 3' y el enlace entre dichas primera y tercera hebras concuerda con las reglas de apareamiento de base de Watson-Crick; las primera y cuarta hebras están alineadas en direcciones anti-paralelas de 5' a 3' y 3' a 5', respectivamente, y el enlace entre las 2 hebras concuerda con las reglas de apareamiento de base de Watson-Crick; las segunda y tercera hebras están alineadas en direcciones anti-paralelas 3' a 5' y 5' a 3', respectivamente, y el enlace entre esas 2 hebras concuerda con las reglas de apareamiento de base de Watson-Crick; la primera y cuarta hebras están alineadas en direcciones anti-paralelas de 5' a 3' y 3' a 5', respectivamente, y el enlace entre dicha primera y cuarta hebra concuerda con las reglas de apareamiento de base de Watson-Crick y adicionalmente la segunda y tercera hebras están alineadas en direcciones anti-paralela de 3' a 5' y 5' a 3', respectivamente, y el enlace entre dicha segunda y tercera hebra concuerda con las reglas de apareamiento de base de Watson-Crick; la primera y cuarta hebra están alineadas en direcciones anti-paralelas de 5' a 3' y 3' a 5', respectivamente, y el enlace entre esas dos hebras concuerda con las reglas de apareamiento de bases homólogas; la segunda y tercera hebras están alineadas en direcciones anti-paralelas de 3' a 5' y 5' a 3', respectivamente, y el enlace entre esas 2 hebras concuerda con las reglas de apareamiento de bases de Watson-Crick; la primera y cuarta hebra están alineadas en direcciones anti-paralelas de 5' a 3' y 3' a 5', respectivamente, y el enlace entre dichas primera y cuarta hebra concuerda con las reglas de apareamiento de bases homólogas y adicionalmente la segunda y tercera hebras se encuentran alineadas direcciones anti-paralelas de 3' a 5' y 5' a 3', respectivamente, y el enlace entre dicha segunda y tercera hebra concuerda con las reglas de apareamiento de bases homólogas; cada base que interactúa de dicha primera hebra interactúa específicamente con ambas bases adyacentes en dicha

tercera hebra y con la base en dicha cuarta hebra, la base a la cual dicha tercera hebra está enlazada; cada base que interactúa en dicha segunda hebra interactúa específicamente con ambas bases adyacentes en dicha cuarta hebra y la base en dicha tercera hebra, la base a la cual dicha base de la cuarta hebra está enlazada; es un cuadruplex aislado, purificado, artificial o sintético; cada hebra es heteropolimérico donde el contenido G-C se encuentra entre 25% y 75%; cada hebra es un heteropolímero con un contenido de G-C entre 10% y 90%, y adicionalmente las frecuencias combinadas entre la misma de dímeros de purina-pirimidina y dímeros de pirimidina-purina exceden del 25%; no está en una célula (y no en un virus); cada hebra independientemente comprende un ácido nucleico heteropolimérico o un análogo de ácido nucleico heteropolimérico; cada una de dichas hebras independientemente comprende ADN o ARN; cada una de dichas hebras independientemente comprende un análogo de ácido nucleico heteropolimérico que contiene una columna sin carga o parcialmente cargada; una de dichas segunda hebra o cuarta hebra comprende ADN y la otra de dicha segunda hebra o cuarta hebra comprende ARN, mARN, hnARN, rARN, tARN o cADN; la segunda hebra y dicha cuarta hebra son homológamente paralelas entre sí; un surco mayor de dicha primera hebra y dicha segunda hebra es colocado en el surco menor de dicha tercera hebra y dicha cuarta hebra; la segunda hebra y dicha cuarta hebra son paralelamente complementarias entre sí; un surco mayor de dicha primera hebra y dicha segunda hebra es colocado en un surco menor de dicha tercera hebra y dicha cuarta hebra; cada nucleobase se enlaza a no más de dos otras nucleobases; ninguna hebra es continua con otra hebra; la estructura multiplex está sustancialmente libre de enlaces Hoogsteen; la estructura multiplex está sustancialmente libre de cuartetos de G-G; la primera hebra y dicha segunda hebra tienen una longitud de 5 a 50 pares de bases; la tercera hebra y dicha cuarta hebra son ADN genómico; la tercera hebra y dicha cuarta hebra incluyen un haplotipo en el

ADN genómico; la tercera hebra y cuarta hebra son productos de amplificación por PCR; en donde dicha estructura multiplex es libre de soporte sólido; la estructura multiplex está unida a un soporte sólido (donde el soporte sólido puede ser eléctricamente conductivo o no eléctricamente conductivo); en donde la estructura multiplex además comprende un agente terapéutico, profiláctico o de diagnóstico enlazado al menos a una de dicha primera hebra, dicha segunda hebra, dicha tercera hebra y dicha cuarta hebra; en donde la primera hebra y dicha segunda hebra tienen una longitud de 5 a 30 pares de bases y dicha tercera hebra y dicha cuarta hebra tienen una longitud cada una de 8 a 3.3×10^9 pares de bases cada una; en donde la cuarta secuencia contiene un 25% a 75% de base purínicas y 75% a 25% de bases pirimidínicas en cualquier orden (preferiblemente en donde la frecuencia de dímeros de purina-pirimidina más la frecuencia de dímeros de pirimidina-purina exceden el 25%); los primero y segundo duplexes de Watson-Crick (ver el método de elaboración de un cuadruplex en la sección de resumen de la invención) tiene cada uno un contenido de G-C entre 30 y 70%; ambas hebras del primer duplex de Watson-Crick son ADN (especialmente cuando todas las hebras del cuadruplex son ADN); el reactivo acelerador se enlaza a una base en el primer duplex Watson-Crick, dicha base siendo una a la cual una base del segundo duplex se enlaza; el reactivo acelerador se enlaza a la base en el primero o segundo duplex de Watson-Crick, dicha base no siendo parte del cuadruplex; el agente acelerador se enlaza a la columna de fosfato del primero o segundo duplex de Watson-Crick; el reactivo acelerador se enlaza a más de un sitio en uno del primero o segundo duplex Watson-Crick, cada sitio en una base o en la columna de fosfato; el reactivo acelerador se enlaza en un sitio del duplex Watson-Crick, dicho sitio se encuentra o en una base o en una columna de fosfato; el agente acelerador se enlaza a una base en el primero duplex de Watson-Crick y a una base en el segundo duplex de Watson-Crick; el agente acelerador se enlaza al surco menor del primer y/o segundo

duplex de Watson-Crick; el agente acelerador forma un enlace entre una parte del primer duplex de Watson-Crick y parte del segundo duplex de Watson-Crick.

Aspectos adicionales de la invención.

La invención proporciona complejos triplex que comprenden una sonda de una sola hebra enlazada a un blanco de ácido nucleico de doble hebra, donde la sonda comprende un ácido nucleico heteropolimérico o un análogo de ácido nucleico heteropolimérico, y todas las tripletas de base del complejo son miembros seleccionados del grupo que consiste de A-T-A, T-A-T, U-A-T, T-A-U, A-U-A, U-A-U, G-C-G y C-G-C.

A diferencia de ciertas triplexes de Hoogsteen divulgados en el arte previo, las triplexes de la invención son estables a valores de pH mayores que 7.6. Más aún, los triplexes inventivos no requieren la presencia de secuencias de homopirimidina o secuencias de homopurina, como en ciertos triplexes del arte previo. Por ejemplo, la secuencia blanco puede contener del 25% a 75% de base purínicas y del 75% al 25% de bases pirimidínicas en cualquier orden.

Preferiblemente el ácido nucleico de una sola hebra o el análogo de ácido nucleico del triplex tiene una longitud de 5 a 30 bases y el blanco del ácido nucleico de doble hebra tiene una longitud de 8 a 3.3×10^9 pares de bases.

La formación de triplex de acuerdo con la invención es apropiada para una variedad de usos. Por ejemplo, sondas enlazadas covalentemente un agente de segmentación de ácido nucleico de doble hebra puede ser utilizado para específicamente segmentar secuencias blanco de ácidos nucleicos de doble hebra. Las sondas enlazadas covalentemente a un agente quimioterapéutico pueden ser

utilizados para específicamente tratar secuencias blanco de ácidos nucleicos de doble hebra.

En las incorporaciones preferidas, la invención proporciona un método rápido, sensible, amigable al medio ambiente, y seguro para ensayar enlazamientos entre un blanco de doble hebra y una sonda de una sola hebra, en donde el blanco comprende una secuencia de ácidos nucleicos o un análogo de secuencia de ácido nucleico y la sonda comprende una secuencia de ácido nucleico o una secuencia análoga de ácido nucleico.

A diferencia de ciertos ensayos del arte previo, la invención no solamente detecta la presencia de enlaces específicos de sonda-blanco, pero también proporciona una información cualitativa y cuantitativa con relación a la naturaleza de la interacción entre una sonda y un blanco. Por ende, la invención posibilita al practicante a distinguir entre un apareamiento perfecto, un mal-apareamiento de un par de bases, un mal-apareamiento de dos pares de bases, un mal-apareamiento de tres pares de bases, una eliminación de un par de bases, una eliminación de dos pares de bases y una eliminación de tres pares de bases que aparecen entre una secuencia de bases en las sondas y de una hebra del blanco de doble hebra.

Las incorporaciones de la invención comprenden la calibración de la señal medida (por ejemplo, intensidad de fluorescencia) para una primera mezcla de sonda blanco contra el mismo tipo de señal que se exhibe por otras sondas combinadas con el mismo blanco, en donde cada una de las otras sondas difieren de la primera sonda por lo menos en una base.

Se puede generar una curva de calibración, en donde la magnitud de la señal medida (por ejemplo, intensidad de fluorescencia) es una función de la afinidad de enlace entre el blanco y la sonda.

Como la afinidad de enlace entre el blanco y una pluralidad de diferentes sondas varía con el número de bases mal apareadas, la naturaleza del (los) mal-apareamiento (s) (A-G vs. A-C vs. T-G vs. T-C, etc.), la localización de la(s) falla(s) de apareamiento dentro del triplex, etc. el ensayo de la invención puede ser utilizado para secuenciar el blanco.

En las incorporaciones, la señal medida puede ser la intensidad de fluorescencia de un fluoróforo incluido en la muestra de prueba. En dichas incorporaciones, la afinidad de enlace entre la sonda y el blanco puede ser directamente o inversamente correlacionado a la intensidad, dependiendo si el fluoróforo señala la hibridización por medio de señales de extinción o señales de amplificación. Bajo condiciones seleccionadas, la intensidad de fluorescencia generada por agentes intercalantes puede ser directamente correlacionado con la afinidad del enlace de sonda-blanco, considerando que la intensidad de incorporaciones preferidas que emplean un fluoróforo no-intercalante enlazado covalentemente a la sonda pueden ser inversamente correlacionados con la afinidad de enlace de sonda-blanco. La intensidad de la fluorescencia disminuye para los fluoróforos no intercalantes a medida que la extensión del apareamiento entre la sonda y el blanco aumenta, preferiblemente sobre un rango de inclusive 0-2 mal-apareamientos y/o eliminaciones, más preferiblemente sobre un rango de inclusive 0-3 mal-apareamiento y/o eliminaciones.

La invención permite cuantificar la afinidad de enlace entre la sonda y el blanco. Dicha información puede ser valiosa para una variedad de usos, incluyendo el diseño de drogas anti-sentido con características optimizadas de enlace.

A diferencia de métodos del arte previo, el ensayo de la invención es preferiblemente homogéneo. El ensayo puede ser conducido sin separar el complejo de sonda-blanco de la sonda libre y el blanco antes de detectar la magnitud de la señal medida.

El ensayo no requiere un paso de separación en gel, de este modo permitiendo un gran aumento en el caudal de ensayo. Análisis cuantitativo son simples y precisos. Consecuentemente el ensayo de enlace ahorra mucho tiempo y costos, y puede ser fácilmente automatizado.

Adicionalmente, hace posible que variables de enlace tales como el buffer, pH, concentración iónica, temperatura, tiempo de incubación, concentraciones relativas de secuencias de sonda y de blanco, concentraciones de intercalador, extensión de secuencias de blanco, extensión de secuencia de la sonda, y requerimientos de posibles cofactores para ser determinados rápidamente.

El ensayo puede ser conducido en, por ejemplo, una solución dentro de un pozo, en una superficie impermeable o en un biochip.

Más aún, el ensayo inventivo es conducido preferiblemente sin proporcionar un agente de señal de extinción en la sonda o en el blanco.

A pesar de que los inventores han divulgado previamente las ventajas de los ensayos de intensidad de fluorescencia para hibridización (ver por ejemplo, la solicitud de patente U.S. No. 09/224,505, presentada en diciembre 31 de 1998), ensayos de acuerdo con la presente invención específicamente detectan triplexes de la sonda y el blanco de doble hebra, de modo que se obvia la necesidad de desnaturalizar el blanco.

Mientras que sondas de ácido nucleico (y análogos de ácido nucleico) han sido conocidas como que forman triplexes con ciertas clases limitadas de blancos (ver por ejemplo, Floris et al., supra, Dervan et al., supra, Eghom et al., 365 Nature 566(1993), y Tomac et al., 118 J. Am. chem. Soc. 5544 (1996)), es sorprendente que los inventores hayan sido capaces de ensayar específicamente con triplexes formados entre sondas de ácido nucleico de una sola hebra (por ejemplo, ssADN y ARN) y blancos de ácido nucleico de doble hebra (por ejemplo, dsADN), en donde la interacción entre las sondas y los blancos está basada en el apareamiento de bases de Watson-Crick (al menos en el sentido que A enlaza con T (o U, en el caso de ARN) y G se enlaza con C), en lugar del modelo muy limitado de Hoogsteen de hibridización de triplex de, por ejemplo, Dervan et al. El término "triplex Watson-Crick," el cual es empleado aquí, está destinado a cristalizar esas diferencias mediante la limitación de la naturaleza del apareamiento de base entre la sonda de una sola hebra y el blanco de doble hebra a A-T-A-, T-A-T, U-A-T, T-A-U, A-U-A, U-A-U, G-C-G y/o C-G-C (incluyendo C⁺-G-C, y/o cualquier otra especie de base ionizada). Estos grupos de tres miembros son denominados de aquí en adelante como tripletas de base Watson-Crick y las estructuras resultantes son denominadas como triplexes Watson-Crick.

Las sondas adecuadas para utilizar en el ensayo inventivo incluyen, por ejemplo, ssADN, ARN, APN y otros análogos de ácidos nucleico que tienen columnas sin carga o parcialmente cargadas. La secuencia de las sondas que tienen cualquier longitud de 8 a 20 bases son preferidas dado que este es el rango dentro del cual se encuentran las secuencias únicas de ADN más pequeñas de procariotas y eucariotas. Las sondas de 12 a 18 bases son particularmente preferidas dado que esta es la longitud de las secuencias únicas más pequeñas en el genoma humano. En las incorporaciones, las sondas de 5 a 30 bases son las más preferidas. Sin embargo, una pluralidad de sondas más cortas pueden ser utilizadas para detectar una secuencia de nucleótidos que tienen una pluralidad de secuencias blanco no-único dentro de ellas, las cuales combinan para identificar únicamente la secuencia de nucleótidos. La longitud de la sonda puede ser seleccionada para casar con la longitud del blanco.

Los inventores han descubierto el desarrollo sorprendente que ellos fueron capaces de ensayar específicamente una gran variedad de triplexes formados de una manera dependiente al apareamiento de bases de Watson-Crick entre sondas de ácido nucleico de una sola hebra (por ejemplo ssADN, ARN, ssAPN y otros análogos de ADN o ARN) y blancos de ácido nucleico de doble hebra (por ejemplo dsADN). Los inventores han descubierto que la formación de triplex y/o la estabilización es mejorada por la presencia de un agente intercalante en la muestra que está siendo probada.

Los inventores han descubierto que la formación y/o la estabilización de triplex Watson-Crick es mejorada por la presencia de cationes en la muestra probada. Los cationes adecuados incluyen, por ejemplo, cationes monovalentes, tal como Na^+ (preferiblemente a una concentración de 50 mM a 125 mM), K^+ , y otros iones de

metales alcalinos; cationes divalentes, como iones de metales de tierras alcalinas (por ejemplo, Mg^{+2} y Ca) y iones de metales de transición divalente (por ejemplo, Mn , Ni , Cd^{+2} , Co^{+2} y Zn^{+2}); y cationes que tienen una carga positiva de al menos tres, tal como la espermidina trivalente de $Co(NH_3)_6^{+3}$, y la espermina tetravalente. El Mn^{+2} es preferiblemente proporcionado a una concentración de 10mM a 30mM. Mg^{+2} es preferiblemente proporcionada a una concentración de 15mM a 20mM. Ni^{+2} es preferiblemente proporcionada a una concentración de aproximadamente 20mM. En incorporaciones, Mg^{+2} y Mn^{+2} son proporcionadas en combinación a una concentración de 10mM cada una, 15mM cada una o 20mM cada una (por ejemplo, 10-20mM cada una).

La cantidad del catión adicionado al medio en el cual el triplex se forma depende de un número de factores, incluyendo la naturaleza del catión, la concentración de sonda, la concentración del blanco, la presencia de cationes adicionales y el contenido de base de la sonda y el blanco. Las concentraciones preferidas de catión y de mezclas pueden ser rutinariamente descubiertas por experimentación.

La presente invención no requiere el uso de sondas radiactivas, las cuales son peligrosas, tediosas y consumen tiempo para usarlas, y necesitan ser regeneradas constantemente.

Las sondas de la invención son preferiblemente seguras para su uso y estables por años. De acuerdo con esto, las sondas pueden ser manufacturadas u ordenarse en grandes cantidades y ser almacenadas.

En incorporaciones, la sonda está marcada con un complejo de señalización de multimoléculas o un par redox, o con una marca que produce quemiluminiscencia o tiene propiedades de electroquimiluminiscencia.

Se prefiere que la sonda o el blanco (preferiblemente la sonda) tenga una marca fluorescente enlazada covalentemente a esto. La marca es preferiblemente un fluoróforo no intercalante. En dichas incorporaciones, el fluoróforo es preferiblemente enlazado a la sonda a cualquiera de los dos extremos. Los marcadores de fluorescencia preferidos incluyen biotina, rodamina y fluoresceína, y otros marcadores que fluorescen cuando son irradiados con energía excitante.

Las longitudes de onda de excitación son seleccionadas (por experimentación de rutina y/o conocimientos convencionales) para que correspondan a este máximo de excitación para el fluoróforo que se está utilizando, y es preferiblemente de 200 a 1000 nm. Los fluoróforos son preferiblemente seleccionados para tener una longitud de onda de emisión de 200 a 1000 nm. En las incorporaciones preferidas, un láser de iones de argón es utilizado para irradiar el fluoróforo con una luz que tiene una longitud de onda en un rango de 400 a 540 nm, y una emisión de fluorescencia es detectada en un rango de 500 a 750 nm.

El ensayo de la invención puede ser realizado sobre una gran variedad de temperaturas, tal como, por ejemplo de 5°C a 85°C. Ciertos ensayos del estado del arte requieren temperaturas elevadas, adicionando costos y demoras al ensayo. Por otro lado, la invención puede ser conducida a temperatura ambiente o menores (por ejemplo, a temperaturas menores de 25°C).

La confiabilidad de la invención es independiente del contenido de guanina y citocina en dicho blanco. Dado que los pares de bases G-C forman tres enlaces de hidrógeno, mientras que los pares de base A-T forman solo dos enlaces de hidrógeno, las secuencias de la sonda y del blanco con mayor contenido de G o C son más estables, poseyendo una temperaturas de fusión mayor.

Consecuentemente, las pares de bases mal apareadas que aumentan el contenido de G-C de la sonda hibridizada y de la región del blanco por encima de eso presentes en híbridos perfectamente apareados pueden equiparar la debilidad del enlace asociada con una sonda mal apareada. Los triplexes que contienen cada una de los posibles mal-apareamientos de bases entre la sonda y el blanco probaron ser más inestables que los triplexes que están perfectamente apareados, resultando siempre en intensidades de fluorescencia menores que en los híbridos que son perfectamente complementarios, cuando un fluoróforo intercalante fue utilizado.

El ensayo de la invención es extremadamente sensible, de este modo obviando la necesidad de conducir una amplificación por PCR del blanco.

Por ejemplo, es posible ensayar una muestra de ensayo que tiene un volumen más o menos 20 microlitros, el cual contiene más o menos 10 femtomoles de blanco y más o menos 10 femtomoles de sonda.

Las incorporaciones de la invención son lo suficientemente sensibles para ensayar los blancos a una concentración de 5×10^{-9} M, preferiblemente a una concentración de no más de 5×10^{-1} M. Las incorporaciones de la invención son lo suficientemente sensibles para emplear sondas a una concentración de 5×10^{-9} M, preferiblemente a una concentración de no más de 5×10^{-1} M. Esto sin decir que los valores

mencionados no buscan sugerir que el método no puede detectar concentraciones más altas.

El medio en el cual se forman triplexes puede ser cualquier medio convencional conocido por ser apropiado para preservar nucleótidos. Ver, por ejemplo, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Lab Manual, "Vol.2 (1989). Por ejemplo, el medio líquido puede comprender nucleótidos, agua, amortiguadores y concentraciones estándar de sales. Cuando cationes divalentes son usados exclusivamente para promover la formación de triplex, agentes quelantes como EDTA o EGTA no deben ser incluidos en las mezclas de reacción.

El enlace específico entre bases complementarias ocurre bajo una gran variedad de condiciones que tienen variaciones en temperatura, concentraciones de sal, fuerza electrostática, y composición de los amortiguadores.

Ejemplos de estas condiciones y métodos para aplicarlos son conocidos en el estado del arte.

A diferencia de muchos triplexes del tipo Hoogsteen, los cuales son inestables o inexistentes a niveles de pH por encima de 7.6, los triplexes de Watson-Crick de la invención son estables en una gran variedad de niveles de pH, preferiblemente de pH 5 hasta aproximadamente pH9.

Se prefiere que los triplexes sean formados a una temperatura de más o menos 5°C a más o menos 25°C por más o menos una hora o menos. Tiempos de reacción más largos no son requeridos, pero una incubación hasta por 24 horas en la mayoría de los casos no afectó adversamente los triplexes. Los tiempos rápidos de enlace

de triplexes de Watson-Crick de la invención contrastan con los tiempos de enlace mucho más largos para los ensayos basados en triplexes de Hoogsteen.

A pesar de que no es requerido, es posible facilitar la formación de triplexes en solución al utilizar ciertos reactivos en adición a los cationes. Los ejemplos preferidos de estos reactivos incluyen proteínas enlazantes de una sola hebra como la proteína RecA, la proteína T4 del gen 32, y la proteína de enlace de una sola hebra de *E. coli*, proteínas de enlace de surcos mayor o menor de ácido nucleico, viologen y sustancias intercalantes como bromuro de etidio, actinomicina D, psoralen, andangelicin. Dichos reactivos facilitadores pueden ser útiles en condiciones de operación extremas, por ejemplo, a niveles de pH anormales o temperaturas extremadamente altas.

El ensayo inventivo puede ser usado para por ejemplo identificar regiones asequibles en secuencias de nucleótidos doblados para determinar el número de pares de bases mal complementadas en un complejo de hibridización y para el mapeo de genomas.

En este contexto los inventores pueden hay veces sugerir que los triplexes Watson-Crick resultan de la hibridización de las sondas al blanco duplex. Mientras que los fluoróforos que están atados a las sondas producen emisiones fluorescentes extintas luego de haber sido expuestas a los blancos duplex que contienen una hebra de bases complementarias de Watson-Crick lo cual indica la ocurrencia de cierto tipo de evento de enlace los inventores no están seguros que lo que ocurre en el triplex Watson-Crick sea mejor descrito como hibridización en el sentido tradicional asociado con la formación de duplex Watson-Crick.

Mientras que la formación de un triplex Watson-Crick puede ser hay veces referido como un evento de hibridación en este sentido esto es por pura conveniencia y no está intentando limitar el alcance de la invención con respecto a cómo la formación de un triplex Watson-Crick puede ser mejor caracterizado.

Diferente a los cuádruplexes discutidos en la Sección de Antecedentes arriba, la estructura multiplex preferida de la invención contiene por lo menos cuatro hebras de ácidos nucleicos enlazados entre si, de acuerdo a las reglas de enlace tradicionales de Watson-Crick.

Como se usa en este contexto, el término *"enlace de Watson-Crick"* busca definir la asociación específica entre pares opuestos de hebras de ácidos nucleicos (y/o ácidos nucleicos análogos) via apareadas bases opuestas. Mientras que la formación de un cuádruplex de Watson-Crick puede hay veces en este contexto ser referido como un evento de hibridización, esto es por pura conveniencia y no busca limitar el alcance de la invención con respecto a cómo la formación de un cuádruplex Watson-Crick puede ser caracterizado.

Las estructuras multiplex de la invención son preferiblemente cuádruplex. Cada hebra del multiplex independientemente comprende un ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico. Ácidos nucleicos apropiados comprenden, por ejemplo, ADN o ARN. Los análogos de ácido nucleicos preferidos contienen una columna sin carga o parcialmente cargada (es decir, una columna que tiene una carga que no es tan negativa como la columna de ADN nativa).

En ciertas incorporaciones, uno de la segunda o cuarta hebra de los cuádruplexes de cuatro hebras comprende ADN y la otra de la segunda o cuarta hebra comprende ARN, mARN, hnARN, rARN, tARN o cADN.

En ciertas incorporaciones, la segunda hebra y la cuarta hebra son homólogos paralelos entre sí. En esas incorporaciones un surco mayor de la primera y segunda hebra es puesto en un surco menor de la tercera y cuarta hebra.

En otras incorporaciones, la segunda y la cuarta hebra son paralelos complementarios entre sí. En dichas incorporaciones las cuales poseen "complementariedad de nido", un surco mayor de la primera y segunda hebra es puesto en un surco menor de la tercera y cuarta hebra.

En ciertas incorporaciones, cada nucleobase se enlaza a no más de dos otras nucleobases. En algunas de estas incorporaciones, las bases de la segunda hebra enlazan específicamente (por medio de las reglas Watson-Crick) a las bases complementarias de la primera hebra y a las bases complementarias de la cuarta hebra, y las bases de la cuarta hebra enlazan específicamente (por medio de las reglas Watson-Crick) a las bases complementarias de la tercera hebra y a las bases complementarias de la segunda hebra, en donde las bases de la primera y tercera hebra enlazan a no más de una otra base cada una. Por lo tanto en adición a los pares de bases tradicionales de Watson-Crick, dichas incorporaciones incluyen las siguientes tripletas de bases Watson-Crick: A-T-A, T-A-T, U-A-T, T-A-U, A-U-A, U-A-U, G-C-G y/o C-G-C (incluyendo C⁺-G-C, y/o cualquier otra especie de base ionizada).

En ciertas incorporaciones como se cree que bases opuestas de la primera y la tercera hebra también enlazan entre sí, en adición a: (a) el enlace entre bases opuestas de la primera y segunda hebra; (b) en enlace entre bases opuestas de la tercera y cuarta hebra; y (c) el enlace entre bases opuestas de la segunda y cuarta hebra.

En ciertas incorporaciones de la estructura múltiplex de la invención, ninguna hebra es contigua con otra hebra. Esto es, hay por lo menos cuatro hebras separadas. A pesar de que conformaciones dobladas y de las mismas (por ejemplo, torques de pelo, etc.) se encuentran dentro del alcance de la invención, porciones dobladas de una sola hebra no hacen que la hebra cuente más de una vez frente al mínimo de cuatro hebras separadas.

Las estructuras múltiplex de la invención preferiblemente no se basan en enlaces Hoogsteen o cuartetos G-G para el mantenimiento de las estructuras múltiplex, a pesar de que cantidades insignificantes de enlaces Hoogsteen y/o cuartetos G-G puedan estar presentes. Esto es, estructuras múltiplex de la invención son preferiblemente libres sustancialmente de enlaces Hoogsteen, y sustancialmente libres de cuartetos G-G.

En ciertas incorporaciones, la primera y la segunda hebra de múltiplex son 5 a 50 bases de largas (más preferiblemente de 5 a 30 bases de largas) y la tercera y la cuarta hebras son de 8 a 3.3×10^9 pares de bases de largas. Por ejemplo la primera y la segunda hebra pueden constituir una sonda de doble hebra y la tercera y la cuarta hebra pueden constituir un blanco de doble hebra, tal como ADN genómico, el cual puede contener un haplotipo.

En ciertas incorporaciones la tercera y la cuarta hebra son productos amplificados de PCR.

Los multiplexes de la invención pueden estar presentes en solución, en un soporte sólido, *in vitro* o *in vivo*. El soporte sólido puede ser eléctricamente conductivo (por ejemplo, un electrodo) o no conductivo.

La formación de cuádruplex de acuerdo a la invención es apropiado para una variedad de usos. Por ejemplo sondas de doble hebra enlazadas covalentemente a un agente de segmentación de ácidos nucleicos de doble hebra pueden ser utilizados para segmentar específicamente secuencias blanco de ácidos nucleicos de doble hebra. Sondas de doble hebra que están enlazadas covalentemente a un agente quimioterapéutico pueden ser utilizados para específicamente tratar secuencias blanco de ácidos nucleicos de doble hebra. Por lo tanto, la invención comprende estructuras múltiplex que además comprenden un agente terapéutico, profiláctico o diagnóstico enlazado a por lo menos una de las primeras, segunda, tercera y cuarta hebra.

Adicionalmente multiplexes de la invención son apropiados para el uso en la nanoingeniería, tal como para proveer un circuito eléctrico a nivel molecular (es decir, nanoescala). Más detalles relacionados con nanoingeniería con ácidos nucleicos pueden ser encontrados en la solicitud de patente U.S. No. 5,948,897 de Sen et al. y por referencias citadas en la misma.

Las estructuras múltiplex de la invención pueden ser proporcionadas por un método que comprende: proveer un medio de hibridización que comprende la primera hebra, la segunda hebra, la tercera hebra, la cuarta hebra, agua, un amortiguador y un

promotor; y la incubación del medio de hibridización por un tiempo de incubación efectivo para hibridizar la segunda hebra a la cuarta hebra.

El medio de hibridización puede incluir cualquier medio convencional conocido que sea apropiado para preservar nucleótidos. Ver, por ejemplo, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Lab. Manual," Vol. 2 (1989). Por ejemplo, el medio puede comprender nucleótidos, agua, amortiguadores y concentraciones de sal standard. Cuando cationes divalentes son usados exclusivamente para promover la formación de cuádruplex, queladores tal como EDTA o EGTA no deben ser incluidas en las mezclas de reacción.

Enlaces específicos entre bases complementarias ocurren bajo una gran variedad de condiciones que tienen variaciones en temperaturas, concentraciones de sal, fuerza electrostática, y composición del amortiguador.

Ejemplos de estas condiciones y métodos para su aplicación son conocidas en el estado del arte.

Diferente a muchos multiplexes de tipo Hoogsteen, los cuales son inestables o inexistentes a niveles de pH por encima de aproximadamente 7.6, los multiplexes de Watson-Crick de la presente invención son estables sobre un amplio rango de niveles de pH, preferiblemente entre pH5 y pH9.

Además, los multiplexes inventivos no requieren la presencia de secuencias de homopirimidina o secuencias de homopurinas, como si en ciertas anterioridades de cuádruplexes. Por ejemplo, la secuencia del blanco puede contener de 25% a 75% de bases de purina y de 75% a 25% de bases de pirimidina en cualquier orden.

Se prefiere que los multiplexes sean formados a unas temperaturas entre 5°C y 25°C por aproximadamente 2 horas o menos. El tiempo de incubación es preferiblemente menor que 5 minutos, incluso a temperatura ambiente. Reacciones de tiempo superiores no son requeridas, pero la incubación por más de 24 horas en la mayoría de casos no afectó adversamente los cuatruplexes. Los tiempos rápidos de enlace de cuatruplexes de Watson-Crick de la invención contrastan con los tiempos mucho más largos de enlace para cuatruplexes de Hoogsteen.

El promotor en el medio de hibridización es preferiblemente un agente intercalador o un catión. El agente intercalador puede ser, por ejemplo, un fluoróforo, tal como un miembro seleccionado del grupo que consiste de YOYO-1, TOTO-1, bromuro de etidio, homodímero-1 de etidio, homodímero-2 de etidio, y acridina.

Cationes apropiados incluyen, por ejemplo, cationes monovalentes, tal como Na^+ (preferiblemente a una concentración de 50 mM a 125 mM), K^+ , y otros iones de metal alcali; cationes divalentes tal como iones de metal de tierra alcalina (por ejemplo, Mg^{+2} y Ca^{+2}) y iones de metal de transición divalentes (por ejemplo, Mn^{+2} , Ni^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} y Zn ; y cationes que tienen una carga positiva de por lo menos 3 tal como $\text{Co} < \text{RTI} (\text{NH}_3) 6^{+3}$, esperimidina trivalente y espermina tetravalente. Mn^{+2} es preferiblemente proporcionado a una concentración de 10 mM a 45 mM. Mg^{+2} es preferiblemente proporcionado a una concentración de 10 mM a 45 mM. Ni^{+2} es preferiblemente proporcionado a una concentración de aproximadamente 20 mM. En incorporaciones, Mg^{+2} y Mn^{+2} son proporcionados en combinación a una concentración de 10 mM cada uno, 15 mM cada uno, 20 mM cada uno, 25 mM cada uno, 30 mM cada uno, 35 mM cada uno, o 40 mM cada uno (es decir, 10-40 mM cada uno).

La cantidad de catión adicionado al medio en el cual se forma el múltiplex depende de un número de factores, incluyendo la naturaleza del catión, la concentración de sonda, la concentración de blanco, la presencia de cationes adicionales y el contenido de base de la sonda y el blanco. Las concentraciones y mezclas de catión preferidas pueden ser descubiertos experimentalmente mediante rutina.

A pesar de no ser requerido, otros promotores incluyen, por ejemplo, proteínas de ligación de hebra simple tal como proteína RecA, proteína 32 del gen T4, proteína de ligación de hebra simple de *E. coli*, proteína de ligación de surco mayor o menor de ácidos nucleicos, viologen y sustancias intercalantes adicionales tal como actinomicina D, psoralen, y angelicina. Dichos reactivos facilitadores pueden probarse útiles en condiciones de operación extremas, por ejemplo bajo niveles de pH anormales o temperaturas extremadamente altas.

La invención también habilita un método en el cual hibridización de una segunda hebra a una cuarta hebra inactiva una actividad asociada con por lo menos una de las terceras hebras y de la cuarta hebra. Por lo tanto, por lo menos una de las primeras hebras y la segunda hebra además comprende un agente farmacéutico, en donde hibridización de la segunda hebra a la cuarta hebra pone al agente farmacéutico en una distancia efectiva de un blanco sobre la tercera hebra, la cuarta hebra o sobre cualquier molécula asociada con por lo menos una de la tercera hebra y de la cuarta hebra. El agente farmacéutico es preferiblemente un miembro seleccionado del grupo que consiste de ácidos nucleicos diseñados para ligar secuencias de promotores de genes de relevancia clínica, ácidos nucleicos diseñados para ligar genes de relevancia clínica, o ácidos nucleicos diseñados para ligar sitios de origen de replicación de patógenos.

En incorporaciones preferidas, la invención proporciona un método rápido, sensible, amigable al medio ambiente, y seguro para experimentar la ligación entre un blanco de hebra simple o hebra doble y una sonda de hebra doble, en donde el blanco comprende una secuencia de ácido nucleicos o una secuencia análoga de ácidos nucleico y la sonda comprende una secuencia de ácido nucleico o una secuencia análoga de ácido nucleico.

El ensayo inventivo puede ser utilizado para, por ejemplo, identificar regiones asequibles en secuencias de nucleótidos dobladas, para determinar el número de pares de bases mal-complementadas en un complejo de hibridización, y para mapear genomas.

La invención no solamente detecta la presencia de ligación de sonda-blanco específico, pero también provee información cualitativa y cuantitativa con relación a la naturaleza de la interacción entre la sonda y el blanco. Por lo tanto, la invención posibilita al practicante distinguir entre una complementación perfecta, una mala complementación de un par de base, una mala complementación de dos pares de bases, una mala complementación de tres pares de bases, una eliminación de un par de bases, una eliminación de dos pares de bases y una eliminación de tres pares de bases que surgen entre una secuencia en la sonda de doble hebra y una secuencia en el objetivo de doble hebra.

Incorporaciones de la invención comprende calibrar la señal medidas (por ejemplo, fluorescencias, quimioluminiscencias, electroquimioluminiscencia o propiedades eléctricas) para una primera mezcla sonda-blanco contra el mismo tipo de señal

exhibido por otras sondas combinadas con el mismo blanco, en donde cada una de las sondas difiere de la primera sonda en por lo menos una base.

Una curva de calibración puede ser generada, en donde la magnitud de la señal medida (por ejemplo, intensidad fluorescente) es una función de la afinidad de ligación entre el blanco y la sonda.

Como la afinidad de ligación entre el blanco y una pluralidad de diferentes sondas varía con el número de bases mal complementadas, la naturaleza de la mala complementación (es) (A-G vs. A-C vs. T-G vs. T-C, etc.), la localización de la mala complementación (es) dentro del cuádruplex, etc., el experimento de la invención puede ser utilizado para secuenciar el blanco.

En incorporaciones, la señal medida puede ser la intensidad de emisión fluorescente de un fluoróforo incluido en la muestra en prueba.

En dichas incorporaciones, la afinidad de ligación entre la sonda y el blanco puede ser directa o inversamente correlacionada con la intensidad de emisión, dependiendo si el fluoróforo señala la hibridización mediante la señal de extinción o señal de amplificación.

Bajo condiciones seleccionadas, la intensidad de emisión fluorescente generada por agentes intercalantes puede ser directamente correlacionada con la afinidad de ligación sonda-blanco, mientras que la intensidad de emisión de incorporaciones preferidas que emplean un fluoróforo no intercalado que está covalentemente enlazado a la sonda puede ser inversamente correlacionados con la afinidad de ligación sonda-blanco. La intensidad de emisión fluorescente decrece para

fluoróforos no intercalados en la medida que la complementación entre la sonda y el blanco incrementa, preferiblemente sobre un rango inclusive de 0 a 2 mal complementaciones y/o eliminaciones, más preferentemente sobre un rango inclusive de 0 a 3 mal-complementaciones y/o eliminaciones.

La invención posibilita la cuantificación de afinidad de ligación entre sonda y blanco. Este tipo de información puede ser valiosa para una variedad de usos, incluidos el diseño de drogas anti-sentido con características de ligación optimizadas.

El experimento de la invención es preferentemente homogéneo. El experimento puede ser conducido sin separar el complejo sonda-blanco de la sonda libre y el objetivo libre antes de detectar la magnitud de la señal medida. El experimento no requiere un paso de separación por gel, de este modo permitiendo un gran incremento en el material de prueba procesado. Los análisis cuantitativos son simples y precisos. En consecuencia el experimento de ligación ahorra mucho tiempo y gastos, y pueden ser fácilmente automatizados. Además, permite que variables de ligación tales como amortiguador, pH, concentración iónica, temperatura, tiempo de incubación, concentraciones relativas de secuencias de sonda y blanco, concentración de intercalante, longitud de secuencia de blanco, longitud de secuencia de sonda, y requerimientos de posibles co-factores (es decir, promotor) sean rápidamente determinados.

El experimento puede ser conducido en por ejemplo una solución dentro de un pozo o micro canal, o una superficie impermeable o en un blochip.

En ciertas incorporaciones la tercera y cuarta hebras son provistas en el medio de hibridación antes de la primera y segunda hebra, y la primera y segunda hebras son

provistas en forma deshidratada antes de rehidratación por contacto con el medio de hibridización.

Adicionalmente, el experimento inventivo es preferiblemente conducido sin proveer un agente de extinción de señal sobre el blanco o sobre la sonda.

A pesar de que los inventores han revelado anteriormente las ventajas de ensayos de intensidad fluorescente para hibridización (ver, por ejemplo solicitud de patente U.S. No. 09/224,505, presentada en diciembre 31 de 1998), ciertas incorporaciones del experimento inventivo específicamente detectan cuádruplexes de las sondas y el blanco de doble hebra, por lo tanto obviando la necesidad de denaturar el blanco. Es sorprendente que los inventores hayan sido capaces de específicamente ensayar cuádruplexes formados entre sondas de doble hebra y blancos de doble hebra, en donde la interacción entre sondas y blancos está basada en apareamiento de bases de Watson-Crick (por lo menos en el sentido de A ligando a T (o U en el caso de ARN y G ligando a C), en vez del muy limitado modelo de Hoogsteen de hibridización de cuádruplex de, por ejemplo, Pitner et al., supra.

Sondas apropiadas para utilizar en el experimento inventivo incluyen, por ejemplo, ADNds, ARNds, híbridos de ADN: híbridos de ARN, APNds, híbridos de ADN: APN y otros ácidos nucleicos análogos de doble hebra que tienen columnas sin carga o parcialmente cargadas. Secuencias de sondas que tienen una longitud de 8 a 20 bases son preferidas dado que este es el rango dentro del cual se encuentran las secuencias de ADN únicas más pequeñas de procariotes y eucariotes. Sondas de 12 a 18 bases son particularmente preferidas dado que esta es la longitud de las secuencias únicas más pequeñas en el genoma humano. En incorporaciones, sondas de 5 a 30 bases son más preferidas. Sin embargo, una pluralidad de sondas

más cortas pueden ser utilizadas para detectar secuencias de nucleótidos que tienen una pluralidad de secuencias de blancos no únicas dentro de esto, las cuales combinan para identificar únicamente las secuencias de nucleótidos. La longitud de la sonda puede ser solucionada para complementar la longitud del blanco.

La presente invención no requiere el uso de sondas radioactivas, las cuales son peligrosas, tediosas, y consumidoras de tiempo para ser usadas, y que requieren de ser constantemente regeneradas.

Las sondas de la invención son preferiblemente seguras de usar y estables por años. De acuerdo con esto, las sondas pueden ser elaboradas u ordenadas en grandes cantidades y almacenadas.

En incorporaciones la sonda es marcada con un complejo de señalización de multi molécula o un par redox, o con una marca que genera propiedades quemiluminiscentes o electroquemiluminiscentes.

Cuando un intercalador fluorescente no está presente en el medio de hibridización, es preferible que la sonda o el blanco (preferiblemente la sonda) tenga un marcaje fluorescente covalentemente enlazado a este mismo. La marca es preferentemente un fluoróforo no intercalado un fluoróforo intercalado. En dichas incorporaciones el fluoróforo es preferiblemente enlazado a una sonda en ambos extremos.

Los marcadores de fluorescencia preferidos incluyen biotina, rodamina, acridina y fluoresceína, y otros marcadores que fluorescen cuando son irradiados con energía excitadora.



La longitud de onda que excita es seleccionada (por experimentación de rutina y/o conocimiento convencional) para corresponder a este máximo de excitación por los fluoróforos que son utilizados, y es preferiblemente entre 200 y 1000 nm. Los fluoróforos son preferiblemente seleccionados para que tengan una longitud de onda de emisión de 200 a 1000 nm. En incorporaciones preferidas, un láser de ion argón es utilizado para irradiar el fluoróforo con luz que tiene una longitud de onda en un rango de 400 a 540 nm, y emisión de fluorescencia es detectada en un rango de 500 a 750 nm.

El ensayo de la invención puede ser llevado a cabo sobre una gran variedad de temperaturas, tales como, por ejemplo, de 5 a 85°C. Ciertos experimentos del estado del arte requieren temperaturas elevadas, adicionando costos y demoras al experimento. Por otra parte la invención puede ser conducida a temperatura ambiente o por debajo (por ejemplo, a una temperatura por debajo de 25°C).

La confiabilidad de la invención es independiente del contenido guanina y citocina en dicho blanco. Dado que pares de bases G-C forman tres enlaces de hidrógeno, mientras que pares de bases A-T forman solo dos enlaces de hidrógeno, las secuencias de blanco y sonda con un contenido más alto de G o C son más estables, teniendo temperaturas de fusión más altas.

En consecuencia, malas complementaciones de pares de bases que incrementan el contenido de GC de la sonda hibridizada y de la región de blanco por encima de éste presentes en híbridos perfectamente complementados pueden compensar la debilidad de ligación asociados con una sonda mal complementada.

El experimento inventivo es extremadamente sensible por lo tanto obviando la necesidad de conducir amplificaciones PCR del blanco.

Por ejemplo, es posible experimentar una muestra de prueba que tiene un volumen de aproximadamente 20 microlitros, la cual contiene aproximadamente 10 femtomoles de blanco y aproximadamente 10 femtomoles de sonda.

Las incorporaciones de la invención son suficientemente sensibles para ensayar blancos a una concentración de 5×10^{-9} M, preferiblemente a una concentración de no más de 5×10^{-1} M. Las incorporaciones de la invención son suficientemente sensibles para utilizar sondas a una concentración de 5×10^{-9} M, preferiblemente a una concentración de no más que 5×10^{-1} M. Esto sin decir que los valores dados no buscan sugerir que el método no puede detectar concentraciones mayores.

La relación de sonda (por ejemplo, primeras y segunda hebras) a blanco (por ejemplo tercera y cuarta hebra) es de 30: 1 a 1:1, preferiblemente aproximadamente 10:1.

Los ejemplos van a mostrar que YOYO-1, un conocido intercalador que habita el surco menor del dúplex ADN, puede facilitar y la asociación de señal de triplex o ligación de un oligo de ADN con un blanco dúplex, lo cual es indicativo de un grado de complementariedad, acertado con base en el reconocimiento de pares de base de Watson-Crick entre las bases en el oligo y las bases de la secuencia complementaria en el blanco dúplex.

La ligación de triplex observada no puede ser una versión del motivo de triplex de homopirimidina, bien caracterizado en la literatura, dado el requerimiento de

complejos por altas condiciones ácidas. Similarmente si nuestro típico tipo nativo de 33% de contenido de GC oligo-15 fue evaluado como un compañero de ligación a la "la hebra rica en purina" en el blanco dúplex como es el requerimiento del motivo de triplex de homopurina, nuestro oligo podría estar mal complementado por 9 bases ya sea en la secuencia de oligo o el sitio de ligación putativo en la hebra rica en purina del blanco dúplex.

El intercalador de YOYO-1 ha sido reportado por Johansen y Jacobsen (1998) como que habita el surco menor del dúplex de ADN basado en estudios de espectroscopía NMR. También se reporta que YOYO-1 actuó para decondensar localmente la conformación B del dúplex ADN por 106 resultando en una repetición helical general de 13 pares de bases en vez de 10 pares de bases usualmente encontrados en una conformación B de repetición helical.

Como un fluoróforo, la emisión de YOYO-1s fue muy mejorada por la adición de un oligo complementario al medio que tiene el blanco duplex. La emisión mejorada asociada con la interacción del oligo y el dúplex puede ser acreditado ya sea al YOYO-1 que está presente en el dúplex de surco menor y que emite luz más energéticamente luego del contacto del oligo con el dúplex o el YOYO-1 encontrando un segundo lugar hospitalario para localizarse en el surco creado por el oligo y la hebra complementaria en el dúplex cuando las respectivas bases del mismo contactan la una a la otra. También es posible que ambos eventos estén ocurriendo. Estudios adicionales, tal como cristalografía de rayos-X y espectroscopía NMR van a establecer las posibles localizaciones e interacciones de YOYO-1 con el Triplex Natural.

Johansen y Jacobsen (1998) concluyeron que la decondensación del dúplex ADN por 106 es causada por la bi-intercalación del cromóforo de YOYO-1 mientras que la cadena de unión de amina de polipropileno permanece en el surco menor del dúplex.

Este puede ser parte del mecanismo mediante el cual el blanco es decondensado 106, una relajación la cual va a ser expresada fuera del sitio de la interacción de YOYO-1 en ambas direcciones. También puede ser posible que la naturaleza catiónica +4 de YOYO-1 localizada en el surco menor entre la columna del dúplex resulta en la relajación de la repulsión entre las cargas aniónicas del fosfato en la inmediata vecindad del sitio de ligación de YOYO-1, causando que las hebras de la columna se mueven más cerca una de la otra en la vecindad del YOYO-1. Si un segundo YOYO-1 se localiza así mismo cerca de un YOYO-1 presente en el dúplex de surco menor, por medio de habitar el surco creado por el oligo y la hebra complementaria cuando se contactan una a otra en el surco menor, que YOYO-1 también podría actuar reduciendo la repulsión aniónica entre la columna oligo y la región de secuencia complementaria de la columna.

También observamos que reactivos que condensan el ADN dúplex tienen la habilidad de facilitar la formación de triplex. Adicionalmente a la bien conocida habilidad de cationes monovalentes, divalentes, y multivalentes para condensar ADN dúplex, nuestros resultados sugieren que los cationes forman puentes los cuales hacen posible el enlace entre bases en el oligo y bases en la hebra complementaria de dúplex. Nosotros mostramos esto en primeramente formando triplexes facilitados por cationes y luego destruyendo las estructuras de puente. El resultado de continuo laseamiento del medio en el cual los cationes y los triplex estaban presentes fue la rápida desaparición de todas las estructuras triplex.

Nuestra experiencia con triplexes facilitados por YOYO-1 es que estos son de una vez formados a temperatura ambiente y persisten por muchas horas cuando son formados. Con el tiempo, los oligos mal complementados continúan el mismo nivel bajo de emisiones de fluoróforo lo cual indica el mismo nivel de formación de triplex. Por otro lado los cationes aparecen resultar en condiciones transitorias las cuales son conductivos a formaciones de triplex o cuádruplex. Los cationes incluyeron intercaladores tales como YOYO-1, cationes de centro de metal tal como MgC121 o péptidos catiónicos tales como espermidina, de los cuales todos actúan sobre la conformación por la interacción con cargas aniónicas para resultar en la modificación de la conformación del blanco de ADN dúplex. Los resultados variaron con especies de cationes, y su concentración, o la presencia de varias especies a varias concentraciones.

Nosotros hemos mostrado que concentraciones apropiadas de solventes orgánicos permiten la modificación del blanco de ADN dúplex, lo cual permite que los triplexes ocurran.

La naturaleza transitoria de mucho de las formaciones de triplex y cuádruplex es congruente con el requerimiento del organismo que muchos procesos que envuelven el acceso a información de secuencias desde el ADN dúplex pueda ser fácilmente reversible, esto es, activado y terminado. Sin embargo, dichas formaciones son suficientemente estables de tal manera que diagnostico y otros ensayos pueden basarse en ellos.

Por lo tanto, hemos descubierto que es la condensación o decondensación del dúplex de ADN, por cualquier medio, lo que hace posible el reconocimiento entre el oligo y la secuencia complementaria suficiente para alcanzar un contacto de por lo

menos una base en el oligo con una base de la hebra complementaria del blanco dúplex. Hay probablemente un número de puntos de partida desde la posición usualmente encontradas por pares de bases adyacentes en una secuencia cuando el tamaño de la repetición helical es modificado por condensación o decondensación. Este realineamiento de pares de bases apiladas en la hélice modificada muy probablemente permita un cambio suficiente en órbitas de electrones de ese presente dentro del apilamiento de base de una doble hélice inmodificada, para permitir el enlace de la tercera hebra a la hebra complementaria para comenzar.

Modificación de dúplex ya sea por condensación o decondensación puede ocurrir más bien de manera homogénea con todas las cargas aniónicas en el ADNds y la vecindad afectada generalmente al mismo tiempo o la modificación puede ser localizada. En el último caso una serie de modificaciones grandemente variables va a ocurrir en los pares de bases de ADN y columnas progresivamente distantes del locus de modificación. En ambos casos las condiciones pueden ser creadas para permitir un evento de enlace entre una base sobre el oligo y una base en la hebra complementaria del dúplex para generar apareamiento de triplex.

Una vez dicho enlace ha sido iniciado se puede entender como las dos secuencias flanqueantes (extremas) de bases sobre el oligo pueden ser lanzadas en posición para enlazar las bases de las secuencias flanqueantes de la hebra complementaria del dúplex.

Mientras que nuestros experimentos muestran gran estabilidad en los triplexes facilitados por YOYO-1, muchos otros reactivos tienen efectos sobre la conformación del dúplex de ADN lo cual resulta en Triplexes Naturales siendo formados

transitoriamente. Estas estructuras de triple hélice continúan su proceso en conformaciones las cuales son menos favorables para mantenimiento de triplex, resultando en la pérdida de estructura de triplex.

Cualquier agente capaz de actuar para modificar la conformación de blanco ADNds tiene que ser monitoreado por sus efectos con el tiempo para establecer concentraciones y tiempos de incubación apropiados en las condiciones de temperatura, pH, etc., seleccionados. Esta aplicación enseña muchos métodos de evaluación para dichos reactivos los cuales pueden ser utilizados o modificados por las personas versadas en la materia para practicar lo que se enseña aquí.

La invención va a ser ilustrada con más detalle con referencia a los ejemplos que siguen, pero se debe entender que la presente invención no está determinada a ser limitada de esta manera.

EJEMPLOS

La invención va a ser ilustrada en más detalle con referencia a los siguientes ejemplos, pero no se debe entender que la presente invención está determinada a ser limitada de esta manera.

Ejemplo 1

El ejemplo 1 demuestra que el experimento de la invención puede discriminar entre complementariedad perfecta de complejos de ADNds: ADNss y complejos de ADNds: ADNss que contienen 1bp, 2 bp y 3 bp malas complementaciones o eliminaciones cuando un intercalador catiónico de ADN, YOYO-1 (Sondas Moleculares, Eugene, OR, USA), está presente. Análisis espectroscópicos de NMR

del mecanismo de interacción entre YOYO-1 y ADNds han mostrado que la intercalación YOYO-1 resulta en la decondensación localizada de hélices de ADNds por 106 generando una repetición helical general de 13 pares de bases, opuesto a lo normal de 10 pares de bases de repetición helical en conformaciones B de ADNds no condensadas [J. Biomolec. Struct. and Dynamics 16, 205-222 (1998)].

Las secuencias de blanco de ADNss de 50-mero sentido y anti-sentido complementario, derivadas del exon 10 del gen fibrosis cística humana [Nature 380, 207 (1996)] fueron sintetizadas en un sintetizador de ADN (Expedite 8909, PerSeptiveBiosystems) y purificado por HPLC.

Cantidades equimolares de los oligonucleótidos complementarios fueron calentados a 95°C por 10 minutos y permitidos anillar gradualmente a medida que la temperatura se enfriaba a 21°C por 1.5 horas. Los oligonucleótidos de ADNds fueron disueltos en H₂Odd a una concentración de 1 pmole/l.

La secuencia para la hebra sentido del blanco de ADN del tipo nativo (SEQ ID NO:1) fue: 5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT CAT CTT TGG TGT TTC CTA TGA TGA ATATA-3'.

La secuencia para la hebra anti-sentido para el blanco de ADN de tipo nativo (SEQ ID NO: 1) fue: 5'- TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC CAA AGA TGA TAT TTT CTT TAA TGG TGCCA-3'.

SEQ ID NO: 2 fue una secuencia de blanco de ADNds mutante de 50-mero idéntico al blanco de ADN tipo nativo (SEQ ID NO: 1) excepto por una mutación de un par de base (subrayado) en la posición de aminoácidos 507 en la cual la secuencia de la hebra sentido de tipo nativo CAT fue cambiada por CGT.

La secuencia para la hebra sentido de SEQ ID NO:2 fue: 5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT CGT CTT TGG TGT TTC CTA TGA TGA ATATA-3'

La secuencia para la hebra anti-sentido de SEQ ID NO: 2 fue: 5'-TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC CAA AGA CGA TAT TTT CTT TAA TGG TGCCA-3'

SEQ ID NO: 3 fue una secuencia de blanco de ADNds mutante de 50-mero idéntica al blanco de ADN de tipo nativo (SEQ ID NO: 1) excepto por una mutación de dos pares de bases consecutivas (subrayado) en la posición de aminoácidos 506 y 507 en la cual la secuencia de hebra sentido de tipo nativo CAT fue cambiada por ACT.

La secuencia para la hebra sentido de SEQ ID NO: 3 fue: 5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT ACT CTT TGG TGT TTC CTA TGA TGA ATA TA-3'. La secuencia para la hebra anti-sentido de SEQ ID NO:3 fue: 5'-TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC CAA AGA GTA TAT TTT CTT TAA TGG TGCCA-3'. SEQ ID NO:4 fue una secuencia de blanco de ADNds mutante de 50-mero idéntica al blanco de ADN de tipo nativo (SEQ ID NO: 1) excepto por una mutación de tres pares de bases consecutivas (subrayada) en las posiciones de aminoácidos 506 y 507 en las cuales la secuencia de hebra de sentido de tipo nativo CAT fue cambiada ACG.

La secuencia para la hebra sentido de SEQ ID NO: 4 fue: 5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT ACG CTT TGG TGT TTC CTA TGA ATATA-3'

La secuencia para la hebra anti-sentido de SEQ ID NO: 4 fue: 5'-TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC CAA AGC GTA TAT TTT CTT TAA TGG TGCCA-3'. SEQ ID NO: 5 fue una secuencia de blanco de ADNds mutante de 47-mero idéntica al objetivo de ADN de tipo nativo (SEQ ID NO: 1) excepto por una eliminación consecutiva de tres

pares de bases (indicado por tres puntos) en las posiciones de amino ácidos 507 y 508 en la cual la secuencia de hebra de sentido de tipo nativo CTT es eliminada.

La secuencia para la hebra sentido de SEQ ID NO:5 fue: 5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT CAT... TGG TGT TTC CTA TGA TGA ATA TA-3'

La secuencia para la hebra anti-sentido de SEQ ID NO:5 fue: 5'-TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC CA ... A TGA TAT TTT CTT TAA TGG TGCCA-3'

La sonda No. 1 fue una sonda de ADNss de 15-mero diseñada para ser completamente complementaria a un segmento de 15 nucleótidos de una hebra de sentido de el blanco de ADN de tipo nativo de 50-mero (SEQ ID NO: 1), que superpone las posiciones de amino ácidos 505 a 510 [Nature 380, 207(1996)]. La quiralidad de la sonda fue opuesta o antiparalela a la de la hebra de sentido en el blanco. La sonda No. 1 fue sintetizada en un sintetizador de ADN, purificada por HPLC, y disuelta en H₂Odd a una concentración de 1 pmole/1.

La secuencia para la sonda No. 1 fue: 5'-CAC CAA AGA TGATAT-3'. La mezcla de reacción de hibridización (120 μ l) contenía lo siguiente: 6 pmoles blanco de ADNds, 6 pmoles de sonda de ADNss, 0.5 X TBE y 500 nM de intercalador de ADN YOYO-1 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Las mezclas de reacción fueron incubadas a temperatura ambiente (21°C) por 5 minutos, puestos en una cubeta de cuarzo, irradiados con un rayo de láser de ión argón que tiene una longitud de onda de 488 nm y monitoreados repetidamente por emisiones de fluorescencia a medida que la temperatura incrementa con el tiempo, en una cámara calentada. Medidas de temperatura concurrentes de las muestras fueron alcanzadas por una sonda de temperaturas controlada por un software colocada directamente en cada muestra.

Las intensidades de fluorescencia máximas fueron graficadas como una función de temperatura para cada muestra analizada.

La Figura 1 ilustra que las intensidades fluorescentes mayores fue alcanzadas cuando la secuencia blanco de ADNds no-denaturada de 50-mero de tipo nativo (SEQ ID NO:1) fue reaccionada con la sonda de ADNss de 15-mero No. 1 de 30°C a 85°C. A temperaturas por debajo de 65°C, la T_m de ADNds de tipo nativo de 50-mero, fueron formados complejos de ADNds : ADNss, mejorados por intercalador YOYO-1 de ADN. A medida que la temperatura incrementa sobre 65°C, los complejos de ADNds : ADNss se convirtieron en complejos de ADNss: ADNss. Claramente el YOYO-1 fue capaz de intercalar y eficientemente fluorecer en ambos tipos de complejos.

En contraste, sondas complementarias incompletas de combinaciones de blanco que generan una mala complementación de un par de base (1 bp) (SEQ ID NO: 2 + Sonda No. 1), una mala complementación de 2 bp consecutivas (SEQ ID NO: 3+ Sonda No. 1), una mala complementación de 3 bp consecutivas (SEQ ID NO: 4 + Sonda No. 1) y una eliminación de 3 bp (SEQ ID NO: 5 + Sonda No. 1) resulta en intensidades de fluorescencias que fueron 57%, 94%, 97% y 98% por debajo de 30°C, y 47%, 79%, 92%, y 91% por debajo de 65°C respectivamente, que lo observado con las secuencias de complementación perfecta (Figura 1). Muestras del control que comprenden blancos de ADNds de 50-meros plus 500 nM YOYO-1 exhibieron niveles de fluorescencia los cuales fueron a o por debajo del nivel de fluorescencia observado con complejos de mala complementación de 3 bp a 30°C (datos no mostrados). El nivel de fluorescencia emitido por la sonda de ADNss No. 1 plus 500 nM de muestra de YOYO-1 fue idéntico a lo emitido por YOYO-1 solo (datos no mostrados). A medida que la temperatura incrementa sobre 65°C el grado

de discriminación entre complementación perfecta y la mala complementación de pares de base decreció, lo cual es indicativo de un rompimiento gradual de la estructura de ADNds: ADNss. Por los 85°C, las intensidades fluorescentes alcanzadas por una mala complementación de 1 bp, una mala complementación de 2 bp, una mala complementación de 3 bp y una eliminación de 3 bp fue 40%, 63%, 92% y 83% por debajo de lo obtenido por la complementación perfecta (Figura 1).

A cualquier temperatura dada, el nivel característico de fluorescencia emitida por cada complejo fue monitoreada sobre el tiempo entre 5 minutos y 24 horas.

La presencia del agente de condensador de ADN, YOYO-1, permitió una sonda de ADNss ser utilizada para diferenciar entre complementariedad perfecta de complejos de ADNds: ADNss y aquellas que contienen malas complementaciones o eliminaciones de 1 bp, 2 bp o 3 bp, sin el requerimiento de previamente denaturar los blancos de ADNds.

Ejemplo 2

Para asegurar que el ensayo de intensidad fluorescente utilizando un agente decondensador de ADN, sondas de ADNss y blancos de ADNds no-denaturadas, pudieran aplicar para sondas y blancos de ADN que poseen dramáticamente diferentes contenidos de porcentaje de GC (y potencialmente diferentes temperaturas de anillaje), nuevas sondas de ADNss de 15-mero y secuencias de blanco de ADNds de 50-mero fueron sintetizadas, purificadas y anilladas como anteriormente descrito. Ambas sondas de ADNss y blancos de ADNds fueron disueltos en agua (H₂Odd) a una concentración de 1 pmole/l.

SEQ ID NO: 6 fue una secuencia de blanco de ADNds de 50-mero modificada de

SEQ ID NO: 1, en donde el contenido de porcentaje de GC fue cambiado de 30% a 52%.

Las secuencias para hebra sentido del blanco de ADN de tipo nativo (SEQ ID NO: 6) fue: 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CAT CTC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTCTG-3'. La secuencia para la hebra anti-sentido del blanco de ADN de tipo nativo (SEQ ID NO: 6) fue: 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGCTC-3'. SEQ ID NO: 7 fue una secuencia de blanco de ADNds mutante de 50-mero idéntica a la SEQ ID NO: 6, excepto por una mutación de un par de base (subrayado) en la cual la secuencia de hebra sentido CTC fue cambiada por CTT.

La secuencia para la hebra sentido del mutante SEQ ID NO: 7 fue: 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CAT CTT TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTCTG-3'. La secuencia para la hebra anti-sentido de mutante SEQ ID NO: 7 fue: 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAA AGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGCTC-3'.

SEQ ID NO: 8 fue una secuencia de blanco de ADNds mutante de 50-mero idéntica a la SEQ ID NO: 6, excepto por una mutación de un par de base (subrayado) en la cual la secuencia de la hebra sentido CAT fue cambiada por CGT.

La secuencia para la hebra sentido del mutante SEQ ID NO: 8 fue: 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CGT CTC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTCTG-3'. La secuencia para la hebra anti-sentido de mutante (SEQ ID NO: 8) fue: 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA CGA CAG TGT CTG TCA TGG TGCTC-3'. La SEQ ID NO: 9 fue una secuencia de blanco de ADNds mutante de 50-mero idéntica a la SEQ ID NO: 6, excepto por una mutación de un par de base (subrayado) en el cual la secuencia de la hebra sentido CAT fue cambiada por CTT.

La secuencia para hebra sentido del mutante SEQ ID NO: 9 fue: 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CTT CTC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTCTG-3'. La secuencia para la hebra anti-sentido de mutante SEQ ID NO: 9 fue: 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA AGA CAG TGT CTG TCA TGG TGCTC-3'. La SEQ ID NO: 10 fue una secuencia de blanco de ADNds mutante de 50-mero idéntica a la SEQ ID NO: 6, excepto por una mutación de un par de base (subrayado) en la cual la secuencia de la hebra sentido CTC fue cambiada por CCC.

La secuencia para hebra sentido del mutante SEQ ID NO: 10 fue: -53-5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CAT CCC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTCTG-3'. La secuencia para la hebra-anti sentido de mutante SEQ ID NO: 10 fue: 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG GGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGCTC-3'. La SEQ ID NO: 11 fue una secuencia de blanco de ADNds mutante de 50-mero idéntica a la SEQ ID NO: 6, excepto por una mutación de un par de base (subrayado) en la cual la secuencia de la hebra sentido CTC fue cambiada por CGC.

La secuencia para la hebra sentido del mutante SEQ ID NO: 11 fue: 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CAT CGC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTCTG-3'. La secuencia para la hebra anti-sentido de mutante SEQ ID NO: 11 fue: 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG CGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGCTC-3'. La SEQ ID NO: 12 fue una secuencia blanco de ADNds mutante de 50-mero idéntica a SEQ ID NO: 6, excepto por una mutación consecutiva de dos pares de base (subrayada), en la cual la secuencia de la hebra sentido CAT fue cambiada por ACT.

La secuencia para la hebra sentido de mutante SEQ ID NO:12 fue: 5'- GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT ACT CTC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTCTG-3'.

La secuencia para la hebra anti-sentido del mutante SEQ ID NO:12 fue: 5'- CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA GTA CAG TGT CTG TCA TGG TGCTC-3'.

La SEQ ID NO:13 fue una secuencia de blanco de ADNds de 50-mero modificada de SEQ ID NO:1, en donde el porcentaje de contenido de GC fue cambiado de 30% a 72%.

La secuencia para hebras sentido de blanco de ADN de tipo nativo (SEQ ID NO:13) fue: 5'- GAG CAC CCT CCC AGG CAC GGT CGT CCC TGG TGC GAC CTC CGA CGA GCGTG-3'.

La secuencia para las hebras anti-sentido del blanco de ADN de tipo nativo (SEQ ID NO: 13) fue :5'- CAC GCT CGT CGG AGG TCG CAC CAG GGA CGA CCG TGC CTG GGA GGG TGCTC-3'.

La SEQ ID NO:14 fue una secuencia de blanco de ADNds mutante de 50-mero idéntica a SEQ ID NO:13, excepto por una mutación de una par de base (subrayada), en la cual la secuencia de la hebra sentido de CGT fue cambiada por CAT.

La secuencia para la hebra sentido del mutante SEQ ID NO: 14 fue:5'-GAG CAC CCT CCC AGG CAC GGT CAT CCC TGG TGC GAC CTC CGA CGA GCGTG-3'. La secuencia para la hebra anti-sentido del mutante SEQ ID NO. 14 fue: 5'- CAC GCT CGT CGG AGG TCG CAC CAG GGA TGA CCG TGC CTG GGA GGG TGCTG-3'.

La SEQ ID NO:15 fue una secuencia de blanco de ADNds mutante de 50- mero idéntica a SEQ ID NO: 13, excepto por una mutación consecutiva de dos pares de bases (subrayada), en la cual la secuencia de la hebra sentido de CGT fue cambiada por ATT.

* La secuencia para la hebra sentido del mutante SEQ ID NO:15 fue: 5'- GAG CAC CCT CCC AGG CAC GGT ATT CCC TGG TGC GAC CTC CGA CGA GCGTG-3'.

La secuencia para la hebra anti-sentido del mutante SEQ ID NO:15 fue: 5'- CAC GCT CGT CGG AGG TCG CAC CAG GGA ATA CCG TGC CTG GGA GGG TGCTC-3'.

La sonda No. 2 fue una sonda de ADNss de 15-meros diseñada para complementar completamente a un segmento de 15 nucleótidos de hebra sentido del blanco de ADN de tipo nativo de 50-meros (SEQ ID NO:6). La quiralidad de la sonda fue opuesta o anti-paralela al de la hebra sentido en el blanco. La secuencia para la sonda No.2 fue: 5'-CAC CAG AGA TGA CAG-3'.

La sonda No. 3 fue una sonda de ADNss de 15-meros diseñadas para completamente complementar a un segmento de 15 nucleótidos de la hebra de sentido del blanco de ADN de tipo nativo de 50-meros (SEQ ID NO:13). La quiralidad de la sonda fue opuesta o anti-paralela a la de la hebra sentido en el blanco.

La secuencia de la Sonda No. 3 fue: 5'- CAC CAG GGA CGA CCG-3'. Las condiciones del ensayo de hibridización fueron idénticas a las descritas en el ejemplo 1.

Cuando la Sonda de ADNss No. 2 (con un contenido de GC de 53%) fue reaccionado con un blanco de ADNds de tipo nativo de 50-meros (SEQ ID NO:6) y blancos de ADNds mutantes (SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO:12), complejos de ADNds:ADNss fueron formados a bajas temperaturas bajo condiciones no denaturantes (Figura 2A). Mientras que complejos de ADN perfectamente complementados alcanzaron las mayores intensidades fluorescentes, los complejos incompletamente complementados con una mala complementación de un par de base (1 bp) (SEQ ID NO:8 + Sonda No. 2) y una mala complementación consecutiva de 2 bp (SEQ ID NO:12 + Sonda No. 2) produjeron intensidades de fluorescencia que fueron 63% y 95% más bajas, respectivamente, que las observadas con las secuencias perfectamente complementadas a 30°C (Figura 2A). A medida que la temperatura incrementaba, el rompimiento gradual de complejos de ADNds:ADNss ocurrió, resultando en una disminución de intensidades fluorescentes y menor discriminación entre complementación perfecta y la mala complementación de pares de bases. Por los 85°C, muy poca diferencia en fluorescencia fue observada entre secuencias perfectamente complementadas y aquellas que contienen malas complementaciones de pares de bases (figura 2A). Similarmente en presencia de YOYO-1, los complejos de ADNds:ADNss fueron formados cuando la sonda de ADNss No. 3 (que posee un porcentaje de GC de 73%) fue reaccionado con el correspondiente blanco de ADNds de tipo nativo de 50-meros (SEQ ID NO:13) y los blancos de ADNds mutantes (SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:15). Las intensidades de fluorescencia para un complejo de ADN mal complementado en un par de base (1 bp) (SEQ ID NO:14 + Sonda No. 3) y un complejo de ADN mal complementados en 2 bp consecutivas (SEQ ID NO:15 + Sonda No.3) fue 48%y 64% más bajo, respectivamente, que el obtenido por la secuencia perfectamente complementada a 30°C (Figura 2B). La fluorescencia de todas las muestras decreció a medida que la

temperatura incrementó de 30°C a 85°C, indicativo de la disminución de ligación de YOYO-1 y el rompimiento del complejo de ADNds:ADNss.

Sin tener en cuenta el porcentaje de contenido de GC de las sondas de ADNss y los objetivos de ADNds, el YOYO-1 fue capaz de facilitar la formación de complejo de ADNds:ADNss bajo condiciones no-denaturantes, para permitir una discriminación certera entre secuencias perfectamente complementarias y aquellas que contienen mutaciones de 1 o 2 pares de bases.

Ejemplo 3

Los siguientes ejemplos van a demostrar la especificidad del ensayo utilizando diferentes agentes condensadores de ADN para promover y estabilizar la formación de complejo con bancos de ADNds no-denaturados y sondas de ADN-Fss.

La sonda No.4 fue una sonda de ADNss antiparalela de 15-meros idéntica a la sonda No. 1 excepto por tener una porción de fluorescina adherida a la 5' posición. La sonda No. 4 fue sintetizada en un sintetizador de ADN, purificada por HPLC, y disuelta en agua (H₂O dd) a una concentración de 1 pmole/pl.

La secuencia de la Sonda No. 4 fue: 5'- Flu-CAC CAA AGA TGA TAT-3'. La mezcla de reacción de hibridización (401) contenía lo siguiente: 0.4 pmoles de blanco de ADNds, 4 pmoles de la Sonda No. 4 de ADNss marcada con fluorescina en la posición 5', 10mM Tris-HCl, pH 7.5, y 10mM a 125 mM NaCl. Las mezclas de reacción fueron incubadas a temperatura ambiente (21°C) por una hora, sin previa denaturación de los blancos de ADNds. Las muestras fueron colocadas en una cubeta de cuarzo, irradiadas con un rayo de láser de ión argón que tiene una longitud de onda de 488 nm y monitoreada por emisiones de fluorescencia. Las

intensidades de fluorescencia máximas ocurrieron a una longitud de onda de 525nm, la longitud de onda de emisión para fluoresceína. La intensidad de emisión de fluorescencia fue graficada como una función de la longitud de onda para cada muestra analizada.

En ausencia de NaCl o presencia de 10 mM o 25mM NaCl, no se detectó enlace entre los blancos de ADNds y la sonda de ssADN-F anti-paralela (datos no mostrados). Después de una hora de incubación en presencia de 50 mM NaCl complejos de ADNds:ADN-Fss que consisten de secuencias perfectamente complementadas (SEQ ID NO: 1 + Sonda No. 4) ya formadas, resultaron en un decrecimiento del 49% en intensidad de emisión fluorescente comparada con la emitida por la sonda de control No. 4 (marcada con ADN-Fss) (Figura 3). En contraste, complejos de ADNds:ADN-Fss incompletamente complementados que contienen una mala complementación de 1 par de base G-T (SEQ ID NO:2 + Sonda No. 4) produjeron un decrecimiento del 11% en intensidad de emisión fluorescente comparado con la exhibida por la muestra de control de sonda No. 4.

La presencia de 75 mM, 100mM y 125 mM NaCl en la mezcla de reacción también resultó en la extinción de emisión de fluorescencia consistente con cantidades significativas de formación de complejos entre el blanco de SEQ ID NO:1 perfectamente complementado y la sonda No. 4 anti-paralela, y significativamente menor extinción cuando el blanco SEQ ID NO:2 mal complementado en una bp G-T y la sonda No. 4 estaban presentes, produciendo intensidades de fluorescencia similares a las observadas en la presencia de 50mM de NaCl (datos no mostrados).

El uso de cationes monovalentes, los cuales son agentes condensadores de ADN conocidos, facilitaron la formación de complejos de ADN entre blancos de ADNss no-

denaturados y sondas de ADNss antiparalelas marcadas fluorescentemente, para permitir una diferenciación confiable entre secuencias de ADN perfectamente complementadas y aquellas que contienen una única mala complementación de 1 bp. La reacción ocurrió a temperatura ambiente dentro de una hora de incubación a una relación de sonda : objetivo de 10 a 1. Los blancos de ADNds y las sondas ADNss utilizados en este ejemplo contenían un contenido de GC de 33%, y no contenían extensiones de ADN de homopurina o homopirimidina. A pesar de la presencia de 6 bases de pirimidina inter-espaciadas entre la sonda de ADNss de 15 nucleótidos, los complejos de ADNds: ADNss se formaron bien en una manera de secuencia específica.

Ejemplo 4

Para asegurar que el experimento de intensidad fluorescente, el cual utilizó sondas de ADNss marcadas con 5' fluorecina y blancos de ADNds no-denaturados en presencia de agentes condensadores de ADN tal como cationes podrían aplicar a sondas y blancos de ADN que poseen dramáticamente diferentes porcentajes de contenidos de GC (y potencialmente diferentes preferencias de anillaje), secuencias de sondas de ADN-Fss de 15-meros y secuencias de blancos de ADNds de 50-meros (con un porcentaje de contenido de GC variable) fueron sintetizados, purificados y anillados como anteriormente. Ambos, las sondas de ADN-Fss y los blancos de ADNds fueron disueltos en agua (H_2O) a una concentración de 1 pmol/gl.

La sonda No. 5 fue una sonda de ADNss anti-paralela de 15-meros idéntica a la sonda No. 2 excepto por que tenía una porción de fluorecina adherida a la posición 5'.

La secuencia de la Sonda No. 5 fue: 5'-Flu-CAC CAG AGA TGA CAG-3'

La sonda No. 6 era una sonda de ADNss anti-paralela de 15- meros idéntica a la sonda No. 3 excepto en que tenía una porción de fluorescina adherida a la posición 5'.

La secuencia de la sonda No. 6 fue: 5'-Flu-CAC CAG GGA CGA CCG-3'

Los ensayos llevados a cabo en el ejemplo 3 fueron facilitados por la adición de cationes monovalentes en las mezclas de reacción. La especificidad del experimento fue adicionalmente examinada utilizando cationes divalentes (en vez de cationes monovalentes) para promover la formación de complejos con blancos de ADNds y sondas de ADN-Fss que poseen varios porcentajes de contenido GC.

La mezcla de reacción de hibridización (40 μ l) contenía lo siguiente: 0.4 pmoles de blanco de ADNds, 4 pmoles de sonda de ADNss marcada con fluorescina en la posición 5', 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 y 5 mM a 30 mM de $MnCl_2$ o 5 mM a 30 mM de $MgCl_2$ o 5 mM a 30 mM de $NiCl_2$. Las mezclas de reacción fueron incubadas a temperatura ambiente (21°C) por una hora, sin previa denaturación de los blancos de ADNds. Las muestras fueron colocadas en una cubeta de cuarzo, irradiadas con un rayo de láser de ión argón que tiene una longitud de onda de 488 nm y monitoreadas por emisión de fluorescencia. Las intensidades de fluorescencia máximas ocurrieron a una longitud de onda de 525 nm, la longitud de onda de emisión para fluorescina. La intensidad para emisión de fluorescencia fue graficada como una función de longitud de onda para cada muestra analizada.

Cuando la sonda de ADN-Fss No. 5 (con un contenido de GC de 53%) fue incubada con el blanco de ADNds de tipo nativo de 50-meros (SEQ ID NO: 6) y blancos de ADNds mutantes (SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 12) en presencia de 10 mM de

MnCl₂ complejos de ADNds: ADN-Fss fueron formados a temperatura ambiente bajo condiciones no denatürantes. Mientras que complejos de ADN perfectamente complementados produjeron un decrecimiento máximo de intensidad fluorescente (un decrecimiento de 43% después de una 1 de incubación), el complejo menos estable de ADNds: ADN-Fss que contiene una mala complementación de T-G de 1 bp (SEQ ID NO: 7 + Sonda No. 5) produjo una intensidad fluorescente que fue 20% más baja que la observada con la sonda No. 5 solamente después de una 1 hora de incubación (Figura 4). Los complejos de ADNds: ADN-Fss que resultaron en una mala complementación de G-T de 1 bp (SEQ ID NO: 8 + Sonda No. 5), una mala complementación T-T de 1 bp (SEQ ID NO: 9 + Sonda No. 5), una mala complementación de C-A de 1 bp (SEQ ID NO: 10 + Sonda No. 5) y una mala complementación de C-T y A-G de 2 bp consecutivos (SEQ ID NO: 12 + Sonda No. 5) fueron todas menos estables que el complejo de ADNds: ADN-Fss perfectamente complementado (SEQ ID NO: 6 + Sonda No. 5) produciendo intensidades fluorescentes dentro de lo observado para la Sonda No. 5 solamente y lo observado para el complejo de ADN perfectamente complementado (datos no mostrados). Excepto por el complejo de ADNds: ADN-Fss mal complementado en un par de base (1bp) de T-T, el cual era el menos estable (resultando en solo un 5% de decrecimiento en intensidad fluorescente después de 1 hora), todos los demás complejos de ADN mal complementados generaron una intensidad de fluorescencia muy similar. Solo el complejo de ADNds:ADN-Fss que contenían una mala complementación de 1 bp de G-A (SEQ ID NO: 11 + Sonda No. 5) produjeron una intensidad fluorescente más baja que la producida por el complejo de ADNds:ADN-Fss perfectamente complementado (datos no mostrados).

Las inclusiones de 20 mM de MgCl₂ o 20 mM de MnCl₂ o 20 mM de NiCl₂ también facilitaron la formación de complejos de ADNds:ADN-Fss cuando la sonda No. 6 de

ADN-Fss (que posee un 73% de contenido de G-C) fue reaccionado con el correspondiente blanco de ADNds tipo nativo de 50-meros (SEQ ID NO: 13) y el blanco de ADNds mutante (SEQ ID NO: 14) por 1 hora (datos no mostrados).

Como esperado los complejos de ADNds:ADN-Fss perfectamente complementados generaron los máximos decrecimientos en intensidad fluorescente, mientras que los complejos de ADNds:AND-Fss mal complementados en un par de base A-C menos estables (SEQ ID NO: 14 + Sonda No. 6) produjeron niveles intermedios de fluorescencia (datos no mostrados).

Complejos de ADNds:ADN-Fss perfectamente complementados (que poseen un contenido de G-C de 33%) (SEQ ID NO: 1 + Sonda No. 4) se formaron bien en 1 hora en presencia de 10 mM de MnCl_2 , resultando en un decrecimiento de 57% en intensidad fluorescente comparado con la emitida por la sonda No. 4 solamente (datos no mostrados). Estas condiciones de reacción son altamente infavorables para los complejos ADNds:ADN-Fss que contienen una mala complementación de G-T de 1 bp (SEQ ID NO: 2 + Sonda No. 4), resultando en una fluorescencia incrementada comparada con la observada por la sonda No. 4 solamente (datos no mostrados).

Sin tener en cuenta el porcentaje de contenido de GC en los blancos de ADNds y sondas de ADNss, la adición de cationes divalentes tal como Mn, Mg^{+2} o Ni^{+2} promovió la formación de complejo de ADNds:ADN-Fss bajo condiciones no denaturantes, para permitir discriminación acertada entre secuencias perfectamente complementarias y aquellas que contienen mutaciones de una par de base (1bp).

Ejemplo 5

Los experimentos de formación de complejo de ADNds:ADN-Fss en los ejemplos 3 y 4 fueron llevados a cabo en presencia de un tipo de catión monovalente o divalente. Los siguientes ejemplos van a demostrar la confiabilidad del experimento de la invención para diferenciar entre complementaciones perfectas complejos de ADNds:ADN-Fss mal complementados en 1 bp cuando combinaciones de cationes divalentes fueron utilizados como agentes promotores para la formación de complejos.

La mezcla de reacción de hibridización (40 μ l) contenía lo siguiente: 0.4 pmoles de blanco de ADNds, 4 pmoles de sonda de ADNss marcada con fluorescina en la posición 5', 10 mM de Tris-HCL, pH 7.5, y 5 mM a 20 mM de cada uno de $MgCl_2$ y $MnCl_2$. Las mezclas de reacción fueron incubadas a temperatura ambiente (21°C) por 1 hora, sin previa denaturación de los blancos de ADNds. Las muestras fueron colocadas en una cubeta de cuarzo, irradiadas con un rayo de láser de ión argón que tiene una longitud de onda de 488 nm y monitoreada para emisiones fluorescentes. La intensidad de fluorescencia fue graficada como una función de la longitud de onda de cada muestra analizada.

Cuando la sonda No. 6 de ADN-Fss anti-paralela (con un contenido de GC de 73%) fue incubada por 1 hora con el blanco de ADNds de tipo nativo de 50-meros (SEQ ID NO: 13) en presencia de 20 mM de $MgCl_2$ y 20 mM de $MnCl_2$, complejos de ADNds:ADN-Fss perfectamente complementados fueron formados eficazmente, generado un decrecimiento de 46% en la fluorescencia comparado con lo emitido por la Sonda No. 6 solamente (Figura 5A). Estas condiciones de reacción fueron altamente desfavorables para los complejos de ADNds:ADN-Fss que contenían una mala complementación de A-C de un par de base (SEQ ID NO: 14 + Sonda No. 6),

resultando en una reducción del 3% en fluorescencia comparada con lo observado con la Sonda No. 6 solamente (Figura 5A). Resultados muy similares fueron obtenidos cuando las mismas muestras fueron incubadas por 1 hora en presencia 10 mM de $MgCl_2$ y 10 mM de $MnCl_2$, o 15 mM de $MgCl_2$ y 15 mM de $MnCl_2$ (datos no mostrados). La adición de 5 mM de $MgCl_2$ y 5 mM de $MnCl_2$ fue insuficiente para permitir la formación de complejos entre la Sonda No. 6 de ADN-Fss anti-paralela y todos los blancos de ADNds probados siguiendo una incubación de 1 hora (datos no mostrados).

Cuando la Sonda No. 4 de ADN-Fss anti-paralela (con un contenido de GC de 33%) fue incubada con el blanco de ADNds de tipo nativo (SEQ ID NO: 1) o blancos de ADNds mutantes (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3), en presencia de 10 mM de $MgCl_2$ y 10 mM de $MnCl_2$, fue observada una formación de complejo de ADN mínima (datos no mostrados). Sin embargo, la incubación en presencia de 15 mM de $MgCl_2$ y 15 mM de $MnCl_2$ por 1 hora facilitaron la formación de complejos de ADNds:ADN-Fss perfectamente complementados (SEQ ID NO: 1 + Sonda No. 4), como se evidencia por el decrecimiento del 49% en la intensidad fluorescente observada, comparada con la obtenida por la Sonda No. 4 (Figura 5B). Los complejos de ADNds:ADN-Fss que resultaron en una mala complementación de G-T de 1 bp (SEQ ID NO: 2 + Sonda No. 4) o una eliminación de 3 bp (SEQ ID NO: 3 + Sonda No. 4) fueron muy inestables en la presencia de 15 mM de $MgCl_2$ y 15 mM de $MnCl_2$, produciendo un decrecimiento del 2% en fluorescencia y un incremento del 5% en fluorescencia, respectivamente, comparado con la emitida por la Sonda No. 4 solamente (Figura 5B).

El tratamiento con 20 mM de $MgCl_2$ y 20 mM de $MnCl_2$ por 2 hora, resultó en una reducción de un 68%, un 48% y un 6% en fluorescencia para complejos de

ADNds:ADN-Fss perfectamente complementados y para complejos de ADNds; ADN-Fss que contienen una mala complementación de G-T de 1 bp o una eliminación de 3 bp respectivamente, comparado con lo observado con la Sonda No. 4 solamente (datos no mostrados).

Como se ilustra en la Figura 5C, en presencia de 10 mM de $MgCl_2$ y 10 mM de $MnCl_2$, los complejos de ADNds:ADN-Fss que poseen un contenido de GC de 53% y que contienen secuencias perfectamente complementarias (SEQ ID NO: 6 + Sonda No. 5) o una mala complementación T-G de 1 bp (SEQ ID NO: 7 + Sonda No. 5) generaron intensidades de fluorescencia después de 1 hora de incubación que fueron 68% y 20% más bajas, respectivamente, que las emitidas por la Sonda No. 5 anti-paralela solamente.

Cuando la Sonda No. 5 anti-paralela (con un contenido GC de 53%) fue incubada por 1 hora con el objetivo de ADNds de tipo nativo de 50-meros (SEQ ID NO: 6) en presencia de 15 mM de $MgCl_2$ y 15 mM de $MnCl_2$, complejos de ADNds:ADN-Fss perfectamente complementados fueron formados muy eficientemente, generando un decrecimiento de 74% en fluorescencia comparado con lo alcanzado por la Sonda No. 5 solamente (Figura 5D). En contraste, complejos de ADNds:ADN-Fss que contienen una mala complementación T-G de 1 bp (SEQ ID NO: 7 + Sonda No. 5) fueron mucho menos estables en presencia de 15 mM de $MgCl_2$ y 15 mM de $MnCl_2$, alcanzando un decrecimiento de 15% en fluorescencia comparado a la emitida por la Sonda No. 5 solamente después de 1 hora de incubación (Figura 5D). Similarmente los complejos ADNds:ADN-Fss que resultaron en una mala complementación G-T 1 bp (SEQ ID NO: 8 + Sonda No. 5), una mala complementación de C-A de 1 bp (SEQ ID NO: 10 + Sonda No. 5), una mala complementación de G-A 1 bp (SEQ ID NO: 11 + Sonda No. 5) y una mala complementación de A-G y C-T de 2 bp

consecutivas (SEQ ID NO: 12 + Sonda No. 5) fueron todas mucho menos estables que complejo de ADN perfectamente complementado (datos no mostrados). Cuando la Sonda No. 5 (que tiene un contenido de GC de 53%) fue reaccionado con el blanco de ADNds SEQ ID NO: 3 (que contiene un contenido de GC de 33%) se observó un incremento de 3% en fluorescencia comparado con lo obtenido por la Sonda No. 5 solamente (Figura 5D), lo cual indica la no-formación de complejos de ADN. Este resultado era esperado, considerando que resultaría en la combinación de esta sonda y blanco en una mala complementación de 5 bp.

Colectivamente, los ejemplos 3,4 y 5 demostraron que la adición de agentes condensadores tales como cationes monovalentes o cationes divalentes (por sí mismos o en combinación), promovieron la formación de complejos de ADN entre blancos de ADNds y sondas de ADNss marcadas fluorescentemente, que poseen dramáticamente diferentes porcentajes de contenido de GC, para permitir acertadas y confiables discriminaciones entre secuencias perfectamente complementarias y aquellas que contienen varias mutaciones de 1 bp.

Ejemplo 6

Los complejos de ADNds:ADN-Fss facilitados por YOYO-1 se forman bien a temperatura ambiente dentro de 5 minutos de incubación y generan emisiones fluorescentes al mismo nivel de intensidad por horas.

Los complejos que contienen malas complementaciones de pares de bases similarmente emiten señales fluorescentes que persisten, indicando el mismo nivel de formación de complejo con el tiempo. Para examinar la tasa de formación, estabilidad y tasa de disociación de complejos de ADNds:ADN-Fss formadas en

presencia de agentes condensadores tales como cationes, se llevaron a cabo experimentos de paso del tiempo.

La mezcla de reacción de hibridación (40/ μ l) contenían lo siguiente: 0.4 pmoles de blanco no-denaturado de ADNds, 4 pmoles de sonda de ADNss marcada con fluorescina en la posición 5', 10 mM de Tris-HCl, pH 7.5, y 10 mM de $MgCl_2$ y 10 mM de $MnCl_2$. Las mezclas de reacción fueron incubadas a temperatura ambiente (21°C) por varios periodos que varían de 1 minuto a 2 horas. Posterior a la incubación, las muestras fueron colocadas entre cubetas de cuarzo, irradiadas una vez con un rayo de láser de ión argón que tiene una longitud de onda de 488 nm y monitoreadas por emisiones fluorescentes. Otras mediciones fluorescentes fueron tomadas de las mismas muestras luego de subsecuentes y múltiples irradiaciones de láser, en los tiempos indicados (Figura 6). La intensidad de fluorescencia fue graficada en función del tiempo por cada muestra analizada.

La fluorescencia emitida por muestras control que comprenden 4 pmoles de Sonda No. 5 más 10 mM de $MgCl_2$ y 10 mM de $MnCl_2$, en ausencia del blanco de ADNds, dramáticamente decrecieron en una tercera parte dentro de solo 5 minutos de incubación (datos no mostrados), y luego declinaron constantemente a una tasa mucho más lenta dentro de las siguientes horas (Figura 6A). Nosotros nos referimos a este efecto como "Extinción Catiónica". Esta inhibición de fluorescencia, asociada con periodos de incubación incrementados de sondas de ADN-Fss con cationes específicos, ocurrieron rutinariamente en presencia de cationes divalentes, pero no en presencia de cationes monovalentes (datos no mostrados). Esta observación hace evidente la importancia de incubar la muestra control en un experimento bajo exactamente las mismas condiciones que reaccionan las muestras prueba de un experimento. Múltiple laseamiento de cada muestra control de ADN-Fss luego de

períodos variables de incubación inhibieron extinción adicional del fluoróforo, resultando en un nivel estable de fluorescencia posteriormente (Figura 6A).

Este resultado fue completamente inesperado. Cuando la Sonda No. 5 de ADN-Fss anti-paralela fue incubado con el blanco de ADNds de tipo nativo de 50-meros (SEQ ID NO: 6) en presencia de 10 mM de $MgCl_2$ y 10 mM de $MnCl_2$, la formación de complejos de ADNds:ADN-Fss fue evidente después de 15 minutos de incubación resultando en un decrecimiento en fluorescencia, el cual fue 6% mayor que la extinción catiónica progresiva de la sonda control No. 5 (Figura 6B).

La formación de complejos fue indicada grandemente después de 30 y 60 minutos de incubación de SEQ ID NO: 6 con la Sonda No. 5 en presencia de 10 mM de $MgCl_2$ y 10 mM de $MnCl_2$, generando un decrecimiento de 76% y 61% en fluorescencia, respectivamente, comparado por lo alcanzado por la Sonda No. 5 extinta catiónicamente solamente (Figura 6B). Luego de 90 a 120 minutos de incubación en presencia de 10 mM de $MgCl_2$ y 10 mM de $MnCl_2$, no estaba señalando la formación de complejos (Figura 6B). El nivel de emisión fluorescente observada a los 90 y 120 minutos fue completamente atribuida al efecto de extinción catiónica (comparar Figuras 6A y 6B).

En contraste, los complejos de ADNds:ADN-Fss que contenían una mala complementación de T-G de 1 bp (SEQ ID NO: 7 + Sonda No. 5), se formaron a una tasa más lenta y fueron mucho menos estables una vez formados en presencia de 10 mM de $MgCl_2$ y 10 mM de $MnCl_2$. El complejo con una mala complementación de T-G de 1 bp fue primeramente observado luego de 30 minutos de incubación, y apareció haber sido eliminado luego de 60 minutos de incubación (Figura 6C). Una

vez más la sonda era anti-paralela a la hebra complementaria en el dúplex (Figura 6C).

Irradiación de láser múltiple de complejos de ADNds:ADN-Fss de complementación perfecta (SEQ ID NO: 6 + Sonda No. 5) formados luego de 30 minutos o 60 minutos de incubación en presencia de 10 mM de $MgCl_2$ y 10 mM de $MnCl_2$, resultaron en emisiones fluorescentes consistentes con la destrucción de esos complejos a una tasa característica para complejos de ADN que contienen una sonda de ADNss anti-paralela (Figura 6B). Cuando una medición subsecuente fue realizada a los 45 minutos luego de lasear el complejo de complementación perfecta a los 30 minutos, el nivel de intensidad de emisión fue 1869, lo cual es testimonio de lo rápido que el complejo fue destruido (datos no mostrados). El nivel de emisión fluorescente, luego del laseamiento múltiple, retornó a los valores de extinción catiónica observados por el control solo de Sonda No. 5 incompleja (comparar Figuras 6A y 6B). La única excepción fue los complejos perfectamente complementados formados luego de 15 minutos de incubación e irradiados repetidamente luego de eso (Figura 6B). En este caso que la emisión fluorescente no fue consistente con la destrucción de los complejos (Figura 6B), a pesar de que la extinción catiónica adicional de la Sonda No. 5, fue totalmente inhibida cuando fue irradiada múltiplemente luego de una incubación de 15 minutos (Figura 6A).

Los complejos de ADNds:ADN-Fss que contienen una mala complementación T-G de 1 bp (SEQ ID NO: 7 + Sonda No. 5) fueron de manera similar aparentemente destruidos por laseamiento múltiple (Figura 6C).

Se llevó a cabo un experimento para determinar la base del efecto de laseamiento múltiple sobre los complejos. Se encontró que cuando cationes frescos fueron

adicionados a la mezcla de reacción la cual había sido laseada dos veces la inhibición de extinción catiónica en fluorescencia emitida por las sondas de ADN-Fss no pudo ser reversada y extinción catiónica adicional no ocurrió luego de incubación adicional, lo cual fuertemente sugiere que las sondas de ADN-Fss fue inactivada por irradiación múltiple, por un mecanismo aún desconocido (datos no mostrados). Similarmente, cuando sondas de ADN-Fss frescas fueron adicionadas a la mezcla de reacción, la cual había sido laseada dos veces, luego de normalizar para la emisión de fluorescencia incrementada de la sonda fresca, no se observó ninguna extinción catiónica progresiva subsecuente luego de incubación adicional de la mezcla de reacción, lo cual fuertemente sugiere que los cationes laseados fueron inhabilitados de alguna manera (datos no mostrados).

Ejemplo 7

Los ejemplos 1 a 6 demostraron que la formación de complejos de ADNds:ADN-Fss en una manera de secuencia específica entre blancos de ADNds y sondas de ADNss facilitadas por ya sea agentes de condensadores de ADN tal como YOYO-1 o por agentes condensadores de ADN tal como cationes monovalentes o divalentes.

Los siguientes ejemplos van a examinar la tasa de formación, estabilidad y tasa de disociación de complejos de ADNds:ADN-Fss formados en presencia de varios cationes. Estos ejemplos van a mostrar como las especies de catión, la concentración de cada catión, y la combinación de diferentes cationes a diferentes concentraciones influyen la tasa de formación, estabilidad y tasa de disociación de complejos de ADNds:ADNds formados.

Secuencias de sondas de ADNss de 15-meros de sentido y anti-sentido complementarias fueron sintetizados en un sintetizador de ADN y purificados por

HPCL. Cantidades equimolares de los oligonucleótidos complementarios fueron calentados a 95°C por 10 minutos y permitidos anillar gradualmente al tiempo que la temperatura bajó a 21°C sobre 1.5 horas. Oligonucleótidos de ADNds fueron disueltos en H₂O a una concentración de 1 pmole/μl.

La Sonda No. 7 fue una sonda de ADNds de 15 bp con una porción de fluorescina adherida a cada posición 5', diseñada para ser completamente homóloga a un segmento de 15 bp del blanco de ADN de tipo nativo de 50-meros (SEQ ID NO: 6). La hebra anti sentido de la Sonda No. 7 fue idéntica a la Sonda No. 5.

La secuencia para la hebra sentido de la Sonda No. 7 fue: 5S, -Flu- CTG TCA TCT CTGGTG-3'. La secuencia para la hebra anti sentido de la Sonda No. 7 fue: 5'-Flu, CAC CAG AGA TGA CAG-3'. La mezcla de reacción de hibridización (40μl) contenía lo siguiente: 0.4 pmoles de blanco no-denaturado de ADNds, 4 pmoles de Sonda de ADNds marcadas con fluorescina en la posición 5', 10 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 70 mM a 90 mM de KCl y 0 mM a 20 mM de NaCl. Las mezclas de reacción fueron incubadas a temperatura ambiente (21°C) por varios periodos que varían de 1 minuto a 2 horas. Luego de incubación las muestras fueron colocadas en cubetas de cuarzo, irradiadas una vez con rayo de láser de ión argón que tiene longitud de onda de 488 nm y monitoreadas por emisiones fluorescentes. La intensidad de fluorescencia fue graficada como una función del tiempo para cada muestra analizada.

La fluorescencia emitida por muestras control, que comprenden 4 pmoles de Sonda No. 7 más 90 mM de KCl en la ausencia de blancos de ADNds, permanecieron relativamente constantes a lo largo de los 120 minutos de incubación, indicando que no estaba ocurriendo extinción catiónica de la sonda de ADN-Fds en presencia de

KCl monovalente (Figura 7A). Cuando la Sonda No. 7 de ADN-Fds fue incubada con el blanco de ADN de tipo nativo de 50-meros (SEQ ID NO:6) y el blanco de ADNds mutante (SEQ ID NO: 7) en presencia de 90 mM de KCl, fueron formados complejos de ADNds:ADN-Fds a temperatura ambiente bajo condiciones no-denaturantes dentro de solo 15 minutos de incubación y persistieron por lo menos por 120 minutos (Figura 7A). Máxima discriminación entre complejos de complementación perfecta y complejos de ADNds:ADN-Fds con una mala complementación en 1 bp fue observada luego de 30 y 45 minutos de incubación en presencia de 90 mM de KCl, generando intensidades de fluorescencia que fueron 27% y 3% más bajas, respectivamente, luego de 30 minutos, y 34% y 15% más bajas, respectivamente, luego de 45 minutos, que lo emitido por la Sonda No. 7 solamente (Figura 7A).

En presencia de 70 mM de KCl y 20 mM de NaCl, los complejos de ADNds:ADN-Fds que contienen secuencias perfectamente complementadas (SEQ ID NO: 6 + Sonda No. 7) o una mala complementación de 1 bp (SEQ ID NO: 7 + Sonda No.7) produjeron intensidades fluorescentes que fueron 47% y 19% más bajas, respectivamente luego de 30 minutos, y 35% y 14% más bajas, respectivamente, luego de 45 minutos, que lo alcanzado por la Sonda No. 7 solamente (Figura 7B). Una pequeña cantidad de extinción catiónica de la Sonda No. 7 de ADN-Fds de muestra de control fue observada sobre los 120 minutos de incubación en presencia de 70 mM de KCl y 20 mM de NaCl (Figura 7B).

La mínima extinción catiónica mínima fue causada por la inclusión de NaCl, el cual cuando está presente solo causa una extinción de fluorescencia progresiva similar a la de la Sonda No. 7 (datos no mostrados).

La presencia de 80 mM de KCl y 10 mM de NaCl, preferentemente promovieron la formación de complejos de ADNds:ADN-Fds perfectamente complementadas entre el blanco de ADNds de tipo nativo (SEQ ID NO: 6) y la Sonda No. 7 de ADN-Fds, resultando en un decrecimiento en la emisión fluorescente del 18% al 48% y 34% luego de 30 minutos, 45 minutos y 60 minutos de incubación, respectivamente, comparado con la fluorescencia emitida por la muestra control de la Sonda No. 7 en estos tiempos (Figura 7C). En contraste, la formación de complejos de ADNds:ADN-Fds mal complementadas en 1 bp (SEQ ID NO: 7 + Sonda No. 7) fue muy ineficientes a lo largo de todos los 120 minutos de incubación en presencia de 80 mM de KCl y 10 mM de NaCl, como se evidencia por la baja reducción en la fluorescencia de 1% a 5% observada con estos complejos mal complementados comparado con la exhibida por la Sonda No. 7 (Figura 7C).

Por lo tanto, la inclusión de cationes monovalentes tales como KCl y NaCl a concentraciones cercanas a las fisiológicas promovieron la formación de complejos de ADN entre blancos de ADNds no denaturadas y sondas de ADNds marcadas fluorescentemente. La formación de complejos ocurrió con base en reconocimiento de pares de bases homólogos, con una cantidad medible y significativamente mayor de formación de complejos entre hebras de dúplex homólogas completamente complementarias. La reacción ocurrió a temperatura ambiente dentro de periodos de incubación relativamente cortos de 15 minutos a 60 minutos a una relación de sonda a blanco de 10 : 1. Los blancos de ADNds y las sondas ADNds utilizadas en este ejemplo fueron homólogos, con un contenido de GC de 53%, y no contenían elongaciones de homopurina o homopirimidina o cualquier hebra de ADN.

El ensayo de la invención fue capaz de identificar las secuencias de dsADN perfectamente complementadas y aquellas que contenían un par de bases mal-complementadas, utilizando sondas de dsADN.

Ejemplo 8

Los ensayos llevados a cabo en el ejemplo 7 fueron facilitados por la adición de cationes monovalentes en las mezclas de reacción. Este ejemplo demostrará la velocidad de formación, estabilidad y velocidad de disociación de complejos de dsADN : dsADN formados en presencia de cationes divalentes. Las condiciones de reacción fueron idénticas a las descritas en el ejemplo 7, excepto que KCl y NaCl fueron reemplazados con 30mM a 40mM cada uno de $MgCl_2$ y $MnCl_2$.

La muestra de la sonda No. 7 de dsDNA-F de control exhibió una reducción progresiva en fluorescencia con un tiempo aumentado de incubación en presencia de 30mM $MgCl_2$ y 30 mM $MnCl_2$ (Figura 8A) o 40 mM $MgCl_2$ y 40mM $MnCl_2$ (Fig. 8B). Esta extinción cationica fue similar a la observada con la sonda No. 5 de ssDNA-F en presencia de 10mM $MgCl_2$ y 10 mM $MnCl_2$ (Figura 6A).

Cuando la sonda No. 7 de dsDNA fue incubada con el blanco dsADN tipo nativo de 50-meros (SEQ ID No.6) en presencia de 30 mM $MgCl_2$ y 30 mM $MnCl_2$, la formación de complejos dsADN:dsADN-F fue evidente después de 60 minutos de incubación dando como resultado una disminución en fluorescencia, la cual fue 13% mayor que la extinción cationica progresiva de la sonda de control No. 7 (Figura 8A). La formación de complejo se indicó de manera apreciable después de 75 minutos de incubación de SEQ ID No. 6 con la sonda No. 7 en presencia de 30mM $MgCl_2$ y 30 mM $MnCl_2$, generando una disminución del 81% en fluorescencia, comparado con aquella alcanzada por la prueba No, 7 sola extinguida catiónicamente (Figura 8A).

Los complejos dsDNA:dsDNA-F que contenían un par base mal-complementados (SEQ ID No.7 + la sonda No. 7) también se formaron después de 60 minutos y 75 minutos de incubación en presencia de 30 mM $MgCl_2$ y 30mM $MnCl_2$, generando un 16 % y 30% de disminución en fluorescencia, respectivamente, comparada con la alcanzada por la sonda No. 7 sola extinguida catiónicamente (Figura 8A). Después de 90 y 120 minutos de incubación en presencia de 30mM $MgCl_2$ y 30 mM $MnCl_2$, no se señaló formación alguna de complejo (Figura 8A) . Después de 90 minutos, el nivel de fluorescencia observado se atribuyó en su totalidad al efecto de extinción catiónica (Figura 8A).

En presencia de 40 mM $MgCl_2$ y 40 mM $MnCl_2$, los complejos dsDNA:dsDNA-F que contienen secuencia perfectamente complementados (SEQ ID No. 6 + la sonda No. 7) o un par de base mal-complementada (SEQ ID No. 7 + la sonda No. 7) produjeron intensidades fluorescentes que fueron 17% menores y 4% más altas, respectivamente, después de 60 minutos, 36% y 22 % menores, respectivamente, después de 75 minutos, y 57% menores y 0.2% mayor, respectivamente, después de 90 minutos, que la emitida por la sonda No. 7 sola extinguida cationicamente (Figura 8B). Después de 120 minutos de incubación en presencia de 40 mM $MgCl_2$ y 40 mM $MnCl_2$, no se señaló formación alguna de complejo (Figura 8B).

La adición de cationes divalentes, tales como $MgCl_2$ y $MnCl_2$, facilitó la formación de complejo entre blancos de dsADN no-denaturados y sondas de dsADN marcas fluorescentemente, para permitir una discriminación certera entre secuencias homologas perfectamente complementarias y aquellas que contenían mutaciones en un par base (1bp). Aproximadamente el doble de la concentración de ambos $MgCl_2$ y $MnCl_2$ se requirió para la formación de complejos dsDNA:dsDNA comparados con la requerida para la formación de complejo dsDNA:ssDNA. La velocidad de formación

de los complejos dsDNA:dsDNA fue menor en presencia de cationes divalentes que en la presencia de cationes monovalentes. Una vez formados los complejos de dsDNA:dsDNA inducidos con cationes divalentes éstos parecieron ser estables durante un período de tiempo más corto.

Ejemplo 9

La velocidad de formación, estabilidad y velocidad de disociación de complejos dsDNA:dsDNA formados en presencia de cationes monovalentes y divalentes fue examinada a continuación. La mezcla de reacción de hibridación (40/.il) contenía lo siguiente: 0.4 pmoles de blanco dsDNA no-denaturado, 4pmoles de sonda de dsDNA marcada con fluoresceína en posición 5', 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 60 mM a 80mM KCl, 10mM a 20mM NaCl, 30mM $MgCl_2$ y 30mM $MnCl_2$. Las mezclas de reacción fueron incubadas a temperatura ambiente (21°C) por varios periodos que variaban entre 1 minuto y 150 minutos. Después de la incubación, se colocaron las muestras en una cubeta de cuarzo, se irradiaron una vez con un rayo láser de ión argón que tiene una longitud de onda de 488nm y se monitoriaron en búsqueda de emisión fluorescente. La intensidad de la fluorescencia fue graficada como una fusión del tiempo para cada muestra analizada.

La presencia de diferentes concentraciones de KCl y NaCl junto con 30 mM $MgCl_2$ y 30mM $MnCl_2$ dieron como resultado la extinción catiónica en la fluorescencia de la Sonda No. 7 de dsDNA-F control (Figura 9) que fue muy similar a aquella observada en presencia de únicamente cationes divalentes (Figura 8). Parece que la inclusión de los cationes monovalentes no afectó la extinción catiónica de la sonda dsDNA-F por los cationes divalentes.

Cuando la sonda de dsDNA-F No. 7 fue incubada con el blanco de dsDNA de tipo nativo de 50-meros (SEQ ID No. 6) y el blanco de dsDNA mutante (SEQ ID No. 7) en presencia de 60mM KCl, 20mM NaCl, 30 mM MgCl₂ y 30 mM MnCl₂, se formaron complejos dsDNA:dsDNA-F a temperatura ambiente bajo condiciones no-denaturantes dentro de solo 15 minutos de incubación y persistieron durante al menos 150 minutos (Figura 9A). Se observó la máxima discriminación entre complejos dsDNA:dsDNA-F perfectamente complementados y dichos complejos con un par base mal-coplimentados después de 30, 45 y 150 minutos de incubación, generando intensidades fluorescentes que fueron 43% y 16% más bajas, respectivamente después de 30 minutos, 38% y 16% más bajas, respectivamente, después de 45 minutos, y 65% y 1% más bajas, respectivamente después de 150 minutos, que los emitidos por la sonda No. 7 sola extinguida catiónicamente (Figura 9A).

En presencia de 70 mM KCl, 20mM NaCl, 30mM MgCl₂ y 30 mM MnCl₂, los complejos dsDNA:dsDNA-F que contenían secuencias perfectamente complementarias (SEQ ID No. 6 + sonda No. 7) o una mala-complementaciones de un par de base (SEQ ID No. 7 + sonda No. 7) produjeron intensidades fluorescentes que fueron 17% y 1% menores, respectivamente, después de 60 minutos, 48% y 11% menores, respectivamente, después de 75 minutos, 22% y 3% menores, respectivamente después de 90 minutos, y 34% y 2% menores, respectivamente, después de 120 minutos, que las alcanzadas por la sonda No. 7 sola extinguida catiónicamente (Figura 9B).

La presencia de 80mM KCl, 10mM NaCl, 30 mM MgCl₂ y 30 mM MnCl₂, preferiblemente promovió la formación de complejos de dsDNA:dsDNA-F perfectamente complementados entre el blanco de dsDNA de tipo nativo (SEQ ID

No. 6) y la sonda No. 7 de dsDNA-F, después de 30 minutos a 120 minutos de incubación. Los complejos perfectamente complementados de dsDNA:dsDNA-F generaron una disminución en la emisión fluorescente de 27%, 43%, 29% y 52% después del 60 minutos, 75 minutos, 90 minutos y 120 minutos de incubación, respectivamente, comparado con la fluorescencia emitida por la muestra de sonda No. 7 extinguida catiónicamente en dichos tiempos (Figura 9C). En contraste, la formación de los complejos dsDNA: dsDNA-F con un par base mal-complementado (SEQ ID No. 7 + la sonda No. 7) fue muy ineficiente después de una incubación de 45 a 90 minutos en presencia de 80mM KCl, 10 mM NaCl, 30mM MgCl₂ y 30 mM MnCl₂, como fue evidenciado por la baja reducción de 2% a 3% en la fluorescencia observada con estos complejos mal-complementados comparada a aquella exhibida por las sonda No. 7 extinguida catiónicamente (Figura 9C). Ocurrió formación mínima de complejo dsDNA:dsDNA-F de un par de base mal-complementado después de 120 minutos de incubación, dando como resultado una disminución de 14% en fluorescencia comparada con la emitida por la sonda No. 7 extinguida catiónicamente.

La presencia de ambos cationes monovalente y divalente promovió la formación de complejo dsDNA:dsDNA a una velocidad mayor que aquella de los cationes divalentes solos. Una vez formados los complejos facilitados por ambos tipos de cationes éstos persistieron por un mayor tiempo que los complejos promovidos por ya sea cationes monovalentes o cationes divalentes separadamente. Se observó una máxima discriminación entre complejos de dsDNA:dsDNA-F perfectamente complementados y los de un par de base mal-complemnetdaos por un intervalo de tiempo mayor en presencia de ambos cationes monovalentes y divalentes. Por lo tanto, las concentraciones fisiológicas de KCl, NaCl y MgCl₂ preferiblemente

facilitaron la formación de complejo entre hebras duplex homólogas totalmente complementarias, con base en el reconocimiento de par de base homólogo.

Ejemplo 10

Los ejemplos 3 a 6 demostraron la formación de complejos dsDNA:ssDNA en una manera específica de secuencia entre blancos de dsDNA y sondas de ssDNA facilitadas por agentes condensadores de ADN tales como cationes monovalentes o divalentes. El siguiente ejemplo examinará la velocidad de formación, estabilidad y velocidad de disociación de complejos de dsDNA:ssDNA formados en presencia de un catión multivalente, espermidina (que tiene una carga de +3), el cual es también capaz de condensar ADN.

La mezcla de reacción de hibridación (40Al) contenía lo siguiente: 0,2 pmoles de blanco de dsDNA no-denaturado, 2 pmoles de sonda de ssDNA marcada con fluoresceína en la posición 5', 10 mM Tris-HCl, pH7.5, y 1mM de espermidina. Las mezclas de reacción fueron incubadas a temperatura ambiente (21°C) durante diferentes periodos que varían de 1 minuto a 2 hora. Después de la incubación las muestras fueron colocadas en una cubeta de cuarzo, irradiadas una vez con un rayo láser de ión argón que tiene una longitud de onda de 488 nm y fueron monitoreadas en busca de emisión fluorescente. La intensidad de fluorescencia fue graficada como una función del tiempo para cada muestra analizada.

La sonda No. 5 de ssDNA-F de control exhibió una reducción progresiva en fluorescencia con un tiempo de incubación aumentada en presencia de 1mM de espermidina (Figura 10). Esta extinción catiónica no fue tan pronunciada como aquella observada cuando la misma sonda fue incubada en presencia de 10 mM

MgCl₂ y 10 mM MnCl₂, especialmente dentro de los primeros 5 minutos de incubación (Figura 6A).

Se indicó una formación de complejo perfectamente complementaria de dsDNA:ssDNA-F entre el blanco de dsDNA (SEQ ID No. 6) y la sonda No. 5 de ssDNA-F justo después de 15 y 30 minutos de incubación en presencia de 1 mM de espermidina, generando una disminución de 11% y 20% en fluorescencia, respectivamente, comparado con la alcanzada por la sonda No. 5 sola extinguida catiónicamente (Figura 10). Después de 45 minutos de incubación en presencia de 1 mM de espermidina, se señaló una formación de complejo mínima (Figura 10).

La inclusión de 1mM de espermidina fue altamente desfavorable para la formación de complejo de dsDNA:ssDNA-F que contenía una mala-complementación de un par de base T-G (SEQ ID No. 7 + la sonda No. 5), como fue evidenciado por una fluorescencia incrementada de 11% y 7% comparada a la observada por la sonda No. 5 extinguida catiónicamente después de 15 y 30 minutos de incubación, respectivamente (Figura 10). Apareció una mínima formación de complejo que involucraba secuencias incompletamente complementarias únicamente después de 75 minutos de incubación en presencia de 1 mM de espermidina y desapareció por 120 minutos.

La adición del agente de condensación de ADN, espermidina, facilitó una rápida formación de complejo de dsDNA:ssDNA entre secuencias perfectamente complementarias bajo condiciones no-denaturantes, para permitir diferenciación entre secuencias perfectamente complementarias y aquellas que contenían una mutación de un par de base.

Ejemplo 11

Muchos agentes diferentes, además de los cationes, son capaces de condensar dsDNA. El ejemplo 11 demuestra la velocidad de formación, estabilidad y velocidad de disociación de complejos de dsDNA:ssDNA formados en presencia de etanol, otro tipo de agente condensante de ADN.

La mezcla de reacción de hibridación (40Al) contenía lo siguiente: 0,2 pmoles de blanco dsDNA no-denaturado, 2 pmoles de sonda de ssDNA marcada con fluoresceína en la posición 5', 10 mM Tris-HCl, pH7.5, y 10% de etanol. Las mezclas de reacción fueron incubadas a temperatura ambiente (21°C) para diferentes periodos que varían de 1 minuto a 90 minutos. Después de la incubación, las muestras fueron colocadas en una cubeta de cuarzo, irradiadas una vez con un rayo láser de ión argón que tiene una longitud de onda de 488 nm y monitoreadas en busca de emisión fluorescente. La intensidad de fluorescencia fue graficada como una función del tiempo para cada muestra analizada.

Contrario a los cationes divalentes o multivalentes, la adición de 10% de etanol no dio como resultado una extinción en la fluorescencia emitida por la sonda No. 5 de ssDNA-F de control, sino que de hecho causó un ligero incremento en la fluorescencia de la sonda durante el tiempo (Figura 11).

La presencia de 10% de etanol preferiblemente promovió la formación de complejo de dsDNA:ssDNA-F perfectamente complementarios entre el blanco de dsDNA de tipo nativo (SEQ ID No. 6) y la sonda No. 5 de ssDNA-F después de una incubación de 15 minutos a 60 minutos (Figura 11). En contraste, la formación del complejo de dsDNA:ssDNA-F con un par de base mal-complementado de T-G (SEQ ID No. 7 + la sonda No. 5) fue muy ineficiente durante este tiempo de incubación en presencia de

10 % de etanol. Las intensidades fluorescentes producidas por los complejos perfectamente complementarios y los complejos con un par de base mal-complementado fueron 11% y 2% más bajos, respectivamente, después de 15 minutos, 12% y 1% menores, respectivamente, después de 30 minutos, 25% y 2% menores, respectivamente, después de 45 minutos, y 13% y 7% menores, respectivamente después de 60 minutos, que la emitida por la sonda No. 5 control (Figura 11). No se observó una formación significativa de complejo de dsDNA:ssDNA-F después de una incubación de 75 en presencia de 10 % de etanol.

La adición de bajas concentraciones de etanol, facilitó la formación de complejos de ADN entre blancos dsDNA no-denaturados y sondas de ssDNA marcados fluorescentemente, para permitir la discriminación entre secuencias perfectamente complementarias de aquellas que contenían una mutación de un par de base (1bp).

Ejemplo 12

El ejemplo 12 demuestra que el ensayo de la invención fue discriminar entre complejos de dsDNA:ssDNA perfectamente complementarios y complejos de dsDNA:ssDNA que contienen cada tipo de mala-complementación de un par de base posible, cuando el intercalador catiónico de ADN, YOYO-1, está presente.

Se sintetizaron sondas de ssDNA de 15-meros sentido y anti-sentido complementarias en un sintetizador de DNA, se purificaron por cromatografía HPLC, y se disolvieron en agua (H₂O) a una concentración de 1pmole/yl. La sonda No. 1 fue una sonda de ssDNA de 15-meros diseñada para ser completamente complementarias a un segmento de 15 nucleótidos de la hebra sentido de ADN blanco de tipo nativo de 50-meros (SEQ ID No.1), que se traslapa o sobrepone con las posiciones de aminoácidos 505 a 510 [Nature 380, 207 (1996)]. La quiralidad de

la sonda era opuesta o antiparalela a aquella de la hebra sentido en el blanco. Las sondas mutantes (sonda No. 8 sonda No. 16) eran idénticas en su secuencia a la sonda No. 1 excepto por una mutación de una base (subrayado).

Secuencia para Sonda No. 1 era : 5'-CAC CAA AGA TGA TAT-3'

Secuencia para Sonda No. 8 era : 5'-CAC CAA AGA AGA TAT-3'

Secuencia para Sonda No. 9 era : 5'-CAC GAA AGA TGA TAT-3'

Secuencia para Sonda No. 10 era : 5'-CAC CAA ACA TGA TAT-3'

Secuencia para Sonda No. 11 era : 5'-CAC CAT AGA TGA TAT-3'

Secuencia para Sonda No. 12 era : 5'-CAC CAG AGA TGA TAT-3'

Secuencia para Sonda No. 13 era : 5'-CAC CAC AGA TGA TAT-3'

Secuencia para Sonda No. 14 era : 5'-CAC CAA AGA CGA TAT-3'

Secuencia para Sonda No. 15 era : 5'-CAC CAA AAA TGA TAT-3'

Secuencia para Sonda No. 16 era : 5'-CAC AAA AGA TGA TAT-3'

La Sonda No. 17 fue una sonda de ssDNA de 15-meros diseñada para ser completamente complementaria a un segmento de 15 nucleótidos de la hebra antisentido del blanco de ADN de tipo nativo de 50-meros (SEQ No.1) que se traslapa o sobrepone a las posiciones aminoácidos 505 a 510 [Natura 380, 207 (1996)]. La quiralidad de la sonda era opuesta o antiparalela a la de la hebra antisentido en el blanco.

Las sondas mutantes (Sonda No. 18 a Sonda No. 26) eran idénticas en secuencia a la Sonda No. 17 excepto por una mutación de una base (subrayada).

Secuencia para Sonda No. 17 era : 5'-ATA TCA TCT TTG GTG-3'

Secuencia para Sonda No. 18 era : 5'-ATA TCT TCT TTG GTG-3'

Secuencia para Sonda No. 19 era : 5'-ATA TCA TCT TTG GTG-3'

Secuencia para Sonda No. 20 era : 5'-ATA TCA TGT TTG GTG-3'

Secuencia para Sonda No. 21 era : 5'-ATA TCA TCT ATG GTG-3'

Secuencia para Sonda No. 22 era : 5'-ATA TCA TCT CTG GTG-3'

Secuencia para Sonda No. 23 era : 5'-ATA TCA TCT GTG GTG-3'

Secuencia para Sonda No. 24 era : 5'-ATA TCG TCT TTG GTG-3'

Secuencia para Sonda No. 25 era : 5'-ATA TCA TTT TTG GTG-3'

Secuencia para Sonda No. 26 era : 5'-ATA TCA TCT TTT GTG-3'

La mezcla de reacción de hibridación (40y1) contenía lo siguiente: 2 pmoles de blanco de dsDNA, 2 pmoles de sonda de ssDNA, 0.5 x TBE y 500nM del intercalador de ADN YOYO-1. Las mezclas de reacción fueron incubadas a temperatura ambiente (21°C) por 5 minutos, sin denaturar previamente los blancos de dsDNA. Las muestras fueron colocadas en una cubeta de cuarzo, irradiadas con un rayo láser de ión argón que tiene una longitud de onda de 488 nm y monitoreadas en busca de emisión fluorescente. La intensidad de la emisión fluorescente fue graficada como una fusión de la longitud de onda para cada muestra analizada.

El blanco de dsDNA no-denaturado de tipo nativo de 50-meros (SEQ ID No. 1) se hizo reaccionar con la Sonda No. 1 de ssDNA antisentido de tipo nativo de 15-meros y diferentes sondas de ssDNA antisentido con una base mutante de 15-mer (Sonda No. 8 a Sonda No. 16), que generarían cada tipo de mala-complementación de un par de base posible. Como se esperaba, las mayores intensidades de emisión fluorescente fueron generadas por los complejos de dsDNA:ssDNA que consisten de secuencias perfectamente complementarias (SEQ ID No. 1 + Sonda No.1) (Figuras 12A y 12B). Los complejos de dsDNA:ssDNA que dieron como resultado una mala-complementación de un par de base A-A (SEQ ID No. 1 + Sonda No. 8), una mala-

complementación de un par de base G-G (SEQ ID No.1 + Sonda No. 9), una mala-complementación de un par de base C-C (SEQ ID No. 1 + Sonda No. 10), una mala-complementación de un par de base T-T (SEQ ID NO. 1 + Sonda No. 11), una mala-complementación de un par de base T-G (SEQ ID NO. 1 + Sonda No. 12), una mala-complementación de un par de base T-C (SEQ ID NO. 1 + Sonda No. 13), una mala-complementación de un par de base A-C (SEQ ID NO. 1 + Sonda No. 14), una mala-complementación de un par de base C-A (SEQ ID NO. 1 + Sonda No. 15), y una mala-complementación de un par de base G-A (SEQ ID NO. 1 + Sonda No. 16) produjeron intensidades de emisión fluorescente que fueron 63%, 66%, 50% 47%, 49%, 79%, 57%, 51% y 71% menores, respectivamente, que la emitida por los complejos de dsDNA:ssDNA perfectamente complementarios (Figuras 12A y 12B).

El ensayo de triple hebra también fue evaluado al hacer reaccionar el blanco de dsDNA no-denaturado de tipo nativo de 50-meros (SEQ ID No.1) con la Sonda No. 17 de ssDNA sentido de tipo nativo de 15-mer y diferentes sondas de ssDNA sentido mutadas en una base de 15-meros (Sonda No. 18 a Sonda No. 26), que generarían cada tipo de mala-complementación posible de un par de base. Los complejos de triple hebra de dsDNA:ssDNA perfectamente complementarios (SEQ IDNo. 1 + Sonda No. 17) que contienen una sonda de hebra sentido (Figuras 12C y 12D) se formaron con similar eficacia como los complejos de triple hebra perfectamente complementarios (SEQ ID No.1 + Sonda No. 1) que contienen una sonda de hebra antisentido (Figuras 12A y 12B).

Los complejos de dsDNA:ssDNA que resultaron en una mala-complementación de un par de base T-T (SEQ ID No. 1 + Sonda No. 18), una mala-complementación de un par de base C-C (SEQ ID No. 1 + Sonda No. 19), una mala-complementación de un par de base G-G (SEQ ID No. 1 + Sonda No. 20), una mala-complementación de

un par de base A-A (SEQ ID No. 1 + Sonda No. 21), una mala-complementación de un par de base C-A (SEQ ID No. 1 + Sonda No. 22), una mala-complementación de un par de base G-A (SEQ ID No. 1 + Sonda No. 23), una mala-complementación de un par de base G-T (SEQ ID No. 1 + Sonda No. 24), una mala-complementación de un par de base T-G (SEQ ID No. 1 + Sonda No. 25), y una mala-complementación de un par de base T-C (SEQ ID No. 1 + Sonda No. 26), produjeron intensidades de emisión fluorescentes que fueron 63%, 67%, 76%, 59%, 54%, 57%, 59%, 56% y 82% menores, respectivamente, que la emitida por los complejos de dsDNA:ssDNA perfectamente complementarios (Figuras 12C y 12D).

La variabilidad en las intensidades de emisión fluorescente observadas entre las diferentes mala-complementaciones de un par de base dependió más de la particular mala-complementación de par base que del cambio en el porcentaje de contenido GC de las secuencias de triple hebra mutante (Figura 12). Los resultados de la Figura 12 confirmaron la confiabilidad del ensayo de triple hebra para identificar todas las posibles mala-complementaciones de un par de base con gran certeza cuando las sondas de ssDNA sentido o antisentido se hicieron reaccionar con blancos dsDNA no-denaturaron en presencia del agente descondensador de ADN, YOYO-1.

Mientras que la invención ha sido descrita en detalle y con referencia a ejemplos específicos de la misma, será aparente para una persona versada en la materia que se pueden llevar a cabo diferentes cambios o modificaciones a la misma sin apartarse del espíritu y alcance de la misma.

REIVINDICACIONES

1. Un método para crear un múltiplex de ácido nucleico, donde dicho método comprende las etapas de:
 - 1) Crear una mezcla que comprende agua, un dúplex Watson-Crick, un número suficiente de moléculas de bases mixtas de secuencia de única hebra para formar un múltiplex que incluye el dúplex Watson-Crick, y un agente acelerador que aumenta una velocidad o cantidad de formación de múltiplex, dicho múltiplex es un triplex o cuádruplex, en donde dicha molécula o moléculas de única hebra se seleccionan de manera tal, que si es en un múltiplex, van a estar cada una relacionadas a todas las demás hebras del múltiplex por adherencia a las reglas de par base, donde dichas reglas son ya sean reglas de apareamiento de base de Watson-Crick o las reglas de apareamiento de base de unión homóloga; y
 - 2) Incubar dicha mezcla para permitir que se forme el múltiplex, cada hebra de dicho múltiplex está relacionada a todas las demás hebras del múltiplex por adherencia a las reglas de apareamiento de base; con la salvedad que, dentro del múltiplex, el dúplex Watson-Crick adicionado en el paso 1 es heteropolimérico con un contenido G-C entre 10% y 90%.
2. Un método de la Reivindicación 1 en donde el múltiplex creado es un triplex, en el paso (1) el número suficiente de moléculas de única hebra es 1, en el paso 2) el triplex es formado.

3. Un método de la Reivindicación 1 en donde el dúplex retiene sustancialmente su estructura de doble hélice y la molécula de única hebra reside en un surco de dicha estructura de doble hélice.
4. Un método de la Reivindicación 3 en donde la molécula de única hebra se relaciona con una hebra del dúplex por reglas de apareamiento de base de Watson-Crick y a la segunda hebra del dúplex por reglas de apareamiento de base de unión homóloga.
5. Un método de la Reivindicación 4 en donde el dúplex retiene sustancialmente su estructura de doble hélice y la molécula de única hebra reside en un surco de dicha estructura de doble hélice.
6. Un método de la Reivindicación 1 en donde, dentro del múltiplex, el dúplex Watson-Crick adicionado en el paso (1) es heteropolimérico con un contenido G-C entre 10% y 90%, y además las frecuencias combinadas dentro del mismo de dímeros, purinas-pirimidina y dímeros pirimidinpurina exceden el 25%.
7. Un método de la Reivindicación 1 en donde los pasos (1) y (2) se llevan a cabo con las hebras y/o dúplexes de ácido nucleico que no están en una célula.
8. Un método de la Reivindicación 1 en donde el paso (2) se lleva a cabo sin la ayuda de una proteína.

9. Un método de la Reivindicación 1, en donde en el paso (1), el agua se agrega de manera que acumule, con base en el volumen, al menos el 50% del volumen final de la mezcla.
10. Un método de la Reivindicación 1, en donde en el paso (1), el agua se adiciona de manera que acumule, con base en el volumen, al menos el 80% del volumen final de la mezcla.
11. Un método de la Reivindicación 1, en donde en el paso (1) el agua se adiciona de manera que se acumule, con base en el volumen, para todo el líquido adicionado a la mezcla.
12. Un método de la Reivindicación 1, en donde el paso (2) se lleva a cabo a una temperatura o a temperaturas por encima de la temperatura de congelamiento de la solución acuosa y a no más de 85°C.
13. Un método de la Reivindicación 12, en donde el paso (2) se lleva a cabo a una temperatura o temperaturas entre 5°C y 30°C.
14. Un método de la Reivindicación 13, en donde el Paso (2) se lleva a cabo o temperaturas entre 15°C y 25°C.
15. Un método de la Reivindicación 1, en donde en el paso (1), se agrega un catión como agente acelerador.
16. Un método de la Reivindicación 15, en donde dicho catión es Na⁺ suministrado a una concentración de 50mM a 125mM.

17. Un método de la Reivindicación 15, donde dicho catión se selecciona del grupo que consiste de Mn^{+2} suministrado a una concentración de 10mM a 45mM, Mg^{+2} suministrado a una concentración de 10 mM a 45mM, y Ni^{+2} suministrado a una concentración de 20mM.
18. Un método de la Reivindicación 1, en donde en el paso (1) se agrega un intercalador como agente acelerador.
19. Un método de la Reivindicación 18, en donde el intercalador es un intercalador fluorescente.
20. Un método de la Reivindicación 19, en donde el intercalador fluorescente se selecciona del grupo que consiste de YOYO-1, TOTO-1 YOYO-3, TOTO-3, POPO-1, BOBO-1, POPO-3, BOBO-3, LOLO-1, JOJO-1, dimeros de cianina, YO-PRO-1, TO-PRO-1, YO-PRO-3, TO-PRO-3, TO-PRO-5, PO-PRO-1, BO-PRO-1, PO-PRO-3, BO-PRO-3, LO-PRO-1, JO-PRO-1, monómeros de cianina, bromuro de etidio, etidihomodimero-1, etidihomodimero-2, derivados de etidio, acridina, acridina naranja, derivados de acridina, eterodimero etidio-acridina, monoacida de etidio, yoduro de propidio, colorantes SYTO, verde1 SYBR, colorantes SYBR, Verde Pico, colorantes SYTOX, y 7-aminoactinomicina D.
21. El método de la Reivindicación 1, en donde el agente acelerador es un fluoróforo no-intercalante .

22. Un método de la Reivindicación 21, en donde el fluoróforo no-intercalante se selecciona del grupo que consiste de biotina, rodamina, colorantes Alexa, colorantes BODIPY, conjugados de biotina, sondas tiolreactivas, floreceína y derivados que incluyen pero no se limitan a las sondas en jaulas, Verde Oregon, Verde Rodamina, colorantes QSY.
23. Un método de la Reivindicación 1, en donde en el paso (1) el agente acelerador es un intercalador que se liga al surco menor y/o mayor del dúplex de Watson-Crick.
24. El método de la Reivindicación 1, en donde en el paso (1) el agente acelerador a 25°C es un líquido.
25. El método de la Reivindicación 24, en donde en el paso (1) el agente acelerador es un líquido orgánico soluble en agua.
26. El método de la Reivindicación 1, en donde en el paso (1) se adiciona un agente acelerador que es un agente de condensación con relación al dúplex Watson-Crick.
27. El método de la Reivindicación 1, en donde en el paso (1) se agrega un agente acelerador que es un agente de descondensación con relación al dúplex Watson-Crick.
28. Un método para detectar un triplex, donde dicho método comprende el método de la Reivindicación (2) y además comprende un paso adicional (3) en el cual el triplex es detectado.

29. Un método de la Reivindicación 1, en donde el múltiplex creado es un cuádruplex, en el paso (1) el duplex Watson-Crick es un primer dúplex Watson Crick, y en el paso (1) el número suficiente de moléculas de única hebra es 2, aquellas moléculas de única hebra están en un segundo duplex Watson-Crick, y en el paso (2) el cuádruplex se forma de dichos primer y segundo duplexes. Preferiblemente el paso 1) se lleva a cabo con las dos moléculas de única hebra que ya se encuentran en el segundo duplex Watson-Crick.
30. Un método para detectar un cuádruplex, donde dicho método comprende el metodo de la Reivindicación 29 y además comprende un paso adicional (3) en el cual el cuádruplex es detectado.
31. Un triplex que comprende una sonda de única hebra unida a un blanco de ácido nucleico de doble hebra, en donde dicha sonda comprende un ácido nucleico heteropolimérico o un análogo de ácido nucleico heteropolimérico, y todas las tripletas de base de dicho triples son miembros seleccionados del grupo que consiste de A-T-A, T-A-T, U-A-T, T-A-U, A-U-A, U-A-U, G-C-G y C-G-C.
32. Un triplex de la Reivindicación 31, en donde el blanco de ácido nucleico de doble hebra retiene sustancialmente su estructura de doble hélice y el ácido nucleico o análogo heteropolimérico se encuentra en un surco de dicha estructura de doble hélice.

33. Un triplex de la Reivindicación 31, en donde el ácido nucleico y análogo heteropolimérico cada uno tiene un contenido G-C entre 10 y 90%.
34. Un triplex de la Reivindicación 33, en donde el blanco de ácido nucleico de doble hebra retiene sustancialmente su estructura de doble hélice y el ácido nucleico o análogo heteropolimérico se encuentra en un surco de dicha estructura de doble hélice.
35. Un cuádruplex que comprende: una primera hebra que contiene una primera secuencia de nucleobases; una segunda hebra que contiene una segunda secuencia de nucleobases, en donde dicha segunda hebra esta asociada con dicha primera hebra por enlace Watson-Crick; una tercera hebra que contiene una tercera secuencia de nucleobases; y una cuarta hebra que contiene una cuarta secuencia de nucleobases, en donde dicha cuarta hebra esta asociada con dicha tercera hebra por enlace Watson-Crick.
36. Un cuádruplex de la Reivindicación 35, en donde cada una de dichas cuatro hebras es heteropolimérica con un contenido G-C entre el 10% y el 90%.
37. Un cuádruplex de la Reivindicación 35, en donde ya sea (1) la segunda y cuarta hebras están alineadas en una dirección paralela 3' a 5' y el ligamiento entre dichas dos hebras se hace de acuerdo a reglas de apareamiento de base homólogas o (2) la primera y tercera hebras están alineadas en una dirección paralela de 5' a 3' y el ligamiento entre dichas dos hebras se hace de acuerdo a las reglas de apareamiento de bases homólogas o (3) la segunda y cuarta hebra estan alineadas en una dirección paralela de 3' a 5' y el ligamiento entre dichas segunda y cuarta hebras se hace de

acuerdo a reglas de apareamiento de bases homólogas y además la primera y tercera hebras están alineadas en una dirección paralela de 5' a 3' y el ligamiento entre dichas primera y tercera hebras se hace de acuerdo a reglas de apareamiento de bases homólogas.

38. Un cuádruplex de la Reivindicación 37 en donde cada una de dichas cuatro hebras es heteropolimérica con un contenido G-C entre 10% y 90%.
39. Un cuádruplex de la Reivindicación 35, en donde ya sea (1) la segunda y cuarta hebras están alineadas en una dirección paralela 3' a 5' y el ligamiento entre dichas dos hebras se hace de acuerdo a reglas de apareamiento de base Watson-Crick o (2) la primera y tercera hebras están alineadas en una dirección paralela de 5' a 3' y el ligamiento entre dichas dos hebras se hace de acuerdo con reglas de apareamiento de base Watson-Crick o (3) la segunda y cuarta hebras están alineadas en una dirección paralela 3' a 5' y el ligamiento entre dichas segunda y cuarta hebras se hace de acuerdo con reglas de apareamiento de base Watson-Crick y además la primera y tercera hebras están alineadas en una dirección paralela de 5' a 3' y el ligamiento entre dichas primera y tercera hebras se hace de acuerdo a reglas de apareamiento de base Watson-Crick.
40. Un cuádruplex de la Reivindicación 39, en donde cada una de dichas cuatro hebras es heteropolimérica con un contenido G-C entre 10% y 90%.
41. Un cuádruplex de la Reivindicación 35 en donde ya sea (1) la primera y cuarta hebras están alineadas en direcciones anti-paralelas 5' a 3' y 3' a 5', respectivamente, y el ligamiento entre las dos hebras se hace de acuerdo a

reglas de apareamiento de base Watson-Crick o (2) la segunda y tercera hebras están alineadas en una direcciones anti-paralelas 3' a 5' y 5' a 3', respectivamente, y el ligamiento entre dichas dos hebras se hace de acuerdo a las reglas de apareamiento de base Watson-Crick o (3) la primera y cuarta hebras están alineadas en direcciones anti-paralelas 5' a 3' y 3' a 5', respectivamente, y el ligamiento entre dichas primera y cuarta hebras se hace de acuerdo a reglas de apareamiento de base Watson-Crick y además la segunda y tercera hebra están alineadas en direcciones anti-paralelas de 3' a 5' y 5' a 3', respectivamente y el ligamiento entre dichas segunda y tercera hebras se hace de acuerdo a reglas de apareamiento de base Watson-Crick.

42. Un cuádruplex de la Reivindicación 41 en donde cada una de dichas cuatro hebras es heteropolimérica con un contenido G-C entre 10% y 90%.
43. Un cuádruplex de la Reivindicación 35 en donde ya sea (1) la primera y cuarta hebras están alineadas en direcciones anti-paralelas de 5' a 3' y 3' a 5', respectivamente, y el ligamiento entre las dos hebras se hace de acuerdo a reglas de apareamiento de bases homólogas o (2) la segunda y tercera hebras están alineadas en una dirección anti-paralela de 3' a 5' y 5' a 3', respectivamente, y el ligamiento entre dichas dos hebras se hace de acuerdo a las reglas de apareamiento de bases homólogas o (3) la primera y cuarta hebras están alineadas en direcciones anti-paralelas de 5' a 3' y 3' a 5', respectivamente, y el ligamiento entre dichas primera y cuarta hebras se hace de acuerdo a reglas de apareamiento de bases homólogas y además la segunda y tercera hebra están alineadas en direcciones anti-paralelas de 3' a 5' y 5' a 3', respectivamente y el ligamiento entre dichas segunda y tercera hebras se hace de acuerdo a reglas de apareamiento de bases homólogas.

44. Un cuádruplex de la Reivindicación 43, en donde cada una de dichas cuatro hebras es heteropolimérica con un contenido G-C entre 10% y 90%.
45. El cuádruplex de la Reivindicación 35, en donde cada base que interactúa de dicha primera hebra interactúa específicamente con ambas, la base adyacente en dicha tercera hebra y con la base en dicha cuarta hebra, la base a la cual la base de la dicha tercera hebra se liga.
46. Un cuádruplex de la Reivindicación 45, en donde cada una de dichas cuatro hebras es heteropolimérica con un contenido G-C entre 10% y 90%.
47. El cuádruplex de la Reivindicación 35, en donde cada base que interactúa de dicha segunda hebra interactúa específicamente con ambas, la base adyacente en dicha cuarta hebra y con la base en dicha tercera hebra, la base a la cual la base de dicha cuarta hebra esta ligada.
48. Un cuádruplex de la Reivindicación 47, en donde cada una de dichas cuatro hebras es heteropolimérica con un contenido G-C entre 10% y 90%.
49. El método de la Reivindicación 2, en donde dicho método comprende además un paso (3) en el cual el triplex es detectado.
50. El método de la Reivindicación 29, en donde dicho método comprende además un paso adicional (3) en el cual el cuádruplex es detectado.

51. El método de la Reivindicación 49, en donde dicho método discrimina entre una complementación perfecta por reglas de apareamiento de base, una mala-complementación o eliminación de una base, y una mala-complementación o eliminación de dos bases, entre el duplex y la molécula de única hebra en el triplex.
52. El método de la Reivindicación 50, en donde dicho método discrimina entre una complementación perfecta por reglas de apareamiento de base, una mala-complementación o eliminación de una base, y una mala-complementación o eliminación de dos bases, entre el primero y segundo duplex de Watson-Crick.
53. Un método para detectar un triplex, donde dicho método comprende: proporcionar un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico blanco de doble hebra que comprende una secuencia blanco, en donde dicha secuencia blanco contiene al menos una base purina y al menos una base pirimidina; suministrar una sonda que comprende una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de análogo de ácido nucleico; suministrar un agente acelerador; adicionar dicha sonda, dicha secuencia blanco y dicho agente acelerador a un medio para proporcionar una muestra de prueba que contiene un complejo triplex que comprende dicha sonda ligada a dicha secuencia blanco, en donde todas las tripletas de base de dicho complejo son miembros seleccionados del grupo que consiste de A-T-A, T-A-T, U-A-T, T-A-U, A-U-A, U-A-U, G-C-G y C-G-C; irradiar dicha muestra de prueba con radiación excitante para hacer que la muestra de prueba emita radiación fluorescente; detectar una intensidad de dicha radiación fluorescente, en donde dicha intensidad está correlacionada con una afinidad de ligamiento entre dicha

sonda y dicha secuencia blanco; y determinar de dicha intensidad una extensión de coincidencia entre dicha sonda y dicha secuencia blanco ; en donde dicho método es un ensayo homogéneo llevado a cabo sin proporcionar un agente de extinción de señal en dicha secuencia blanco o en dicha sonda.

54. Un método para detectar un triplex, dicho método comprende: suministrar un ácido nucleico blanco o un análogo de ácido nucleico que tiene una secuencia blanco, en donde dicha secuencia blanco contiene al menos una base purina y al menos una base piriminina; suministrar una sonda de doble hebra que comprende o una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de análogo de ácido nucleico; suministrar un agente acelerador de hibridación; adicionar dicha sonda, dicho blanco y dicho agente acelerador de hibridación a un medio para suministrar una muestra de prueba que contiene un triplex Watson-Crick que comprende dicha sonda ligada a dicha secuencia blanco; irradiar dicha muestra de prueba con radiación excitante para hacer que la muestra de prueba emita radiación fluorescente; detectar una intensidad de dicha radiación fluorescente, en donde dicha intensidad esta correlacionada con una afinidad de ligamiento entre dicha sonda y dicha secuencia blanco; y determinar de dicha intensidad una extensión de complementación entre dicha sonda y dicha secuencia blanco; en donde dicho metodo es un ensayo homogéneo que se lleva a cabo sin proporcionar un agente de extinción de señal en dicha secuencia blanco o en dicha sonda.

55. Un método para detectar un cuadruplex, donde dicho método comprende: suministrar un ácido nucleico blanco o un análogo de ácido nucleico que tiene una secuencia blanco, en donde dicha secuencia blanco contiene al menos

una base purina y al menos una base piriminina; suministrar una sonda de doble hebra que comprende una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de análogo de ácido nucleico; suministrar un agente acelerador de hibridación; adicionar dicha sonda, dicho blanco y dicho agente acelerador de hibridación a un medio para suministrar una muestra de prueba que contiene un cuádruplex Watson-Crick que comprende dicha sonda ligada a dicha secuencia blanco; irradiar dicha muestra de prueba con radiación excitante para hacer que la muestra de prueba emita radiación fluorescente; detectar una intensidad de dicha radiación fluorescente, en donde dicha intensidad esta correlacionada con una afinidad de ligamiento entre dicha sonda y dicha secuencia blanco; y determinar de dicha intensidad una extensión de complementación entre dicha sonda y dicha secuencia blanco; en donde dicho método es un ensayo homogéneo que se lleva a cabo sin proporcionar un agente de extinción de señal en dicha secuencia blanco o en dicha sonda.

Description of W002103051

NUCLEIC ACID MULTIPLEX FORMATION

SPECIFICATION

BACKGROUND OF THE INVENTION

1. FIELD OF INVENTION

The invention relates to nucleic acid multiplexes, and more particularly to methods of creating them as triplexes and quadruplexes, and furthermore employing them in assays to detect specific nucleic acids.

2. DESCRIPTION OF RELATED ART

The ability of two single-stranded nucleic acid molecules of complementary base sequence to bind specifically to each other has provided the basis for both powerful research and powerful diagnostic tools. Less fully explored than such "conventional hybridization" has been the ability of single stranded molecules to bind to double-stranded targets and the ability of double-stranded molecules to bind to double-stranded targets. The ability to bind to double-stranded targets potentially has advantages over conventional hybridization.

These could stem in part from the fact that the double-stranded target would not be denatured, allowing "milder" hybridization conditions and providing a target less prone to becoming a totally random coil. They could also stem in part from the fact that the base-pairing mechanisms would be at least partially different than in conventional hybridization, allowing the possibility for more favorable kinetics and a reduction in the

amount of probe needed in the hybridization reaction mixture.

Prior work on creating multiplexes have included:

- 1) The formation of triplexes as part of the homologous recombination process, a process mediated by the bacterial protein RecA and proteins of similar function in other organisms;
- 2) The creation of 3-stranded structures during *in situ* hybridization (e. g., U. S. patent 5,707,801 of Bresser et al.); and
- 3) 3-stranded or 4-stranded complexes that rely on Hoogsteen-type bonding.

This prior work does not fully exploit the potential for forming multiplexes. The RecA-mediated process requires a protein. The *in situ* hybridization processes are based on the principle that the double-stranded intracellular target will locally open its double-stranded structures, providing a single stranded target that will hybridize according to conventional hybridization principles. Complexes reported to rely on Hoogsteen-type polymers are limited to structures that are not true heteropolymers. Rather they require that a given strand be a polypurine or polypyrimidine or very close thereto. See, e.g., Floris et al., "Effect of cations on purine-purine-pyrimidine triple helix formation in mixed-valence salt solutions", 260 Eur. J. Biochem. 801-809 (1999).

As was the case with triplex nucleic acids, the conventional wisdom regarding quadruplex nucleic acids has been that such peculiar structures only exist under relatively extreme conditions for a relatively narrow class of nucleic acids. In particular, Sen et al. (Nature 334: 364-366 (1988)) disclosed that guanine-rich oligonucleotides can spontaneously self-assemble into four-stranded helices *in vitro*. Sen et al. (Biochemistry 31: 65-70 (1992)) disclosed that these four-

stranded complexes can further associate into superstructures composed of 8, 12, or 16 oligomers.

Marshet al. (Biochemistry 33: 10718-10724 (1994), and Nucleic Acids Research 23: 696-700 (1995)) disclosed that some guanine-rich oligonucleotides can also assemble in an offset, parallel alignment, forming long "G-wires". These higher-order structures are stabilized by G-quartets that consist of four guanosine residues arranged in a plane and held together through

Hoogsteen base pairing. According to Sen et al. (Biochemistry 31: 65-70 (1992)), at least three contiguous guanines within the oligomer are critical for the formation of these higher order structures.

It has been suggested that four-stranded DNAs play a role in a variety of biological processes, such as inhibition of HIV-1 integrase (Mazumder et al., Biochemistry 35: 13762-13771 (1996)), formation of synapsis during meiosis (Sen et al., Nature 334: 364-366 (1988)), and telomere maintenance (Williamson et al., Cell 59: 871-880 (1989)); Baran et al., Nucleic Acids Research 25: 297-303 (1997)).

It has been further suggested that controlling the production of guanine-rich quadruplexes might be the key to controlling such biological processes. For example, U. S. Patent No. 6,017,709 to Hardin et al. suggests that telomerase activity might be controlled through drugs that inhibit the formation of guanine quartets.

U. S. Patent No. 5,888,739 to Pitner et al. discloses that G-quartet based quadruplexes can be employed in an assay for detecting nucleic acids. Upon hybridization to a complementary oligonucleotide, the G-quartet structure unfolds or linearizes, thereby increasing the distance between a donor and an acceptor on different parts of the G-quartet structure, resulting in a

decrease in their interaction and a detectable change in a signal (e. g., fluorescence) emitted from the structure.

U. S Patent No. 5,912,332 to Agrawal et al. discloses a method for the purification of synthetic oligonucleotides, wherein the synthetic oligonucleotides hybridize specifically with a desired, full-length oligonucleotide and concomitantly form a multimer aggregate, such as quadruplex DNA. The multimer aggregate containing the oligonucleotide to be purified is then isolated using size-exclusion techniques.

Despite the foregoing developments, the full potential of quadruplex nucleic acid has neither been fully appreciated nor fully exploited.

Related to the problem of performing hybridization-type experiments with double-stranded targets is the means of detecting them. Fluorescent dyes have been used to detect and quantitate nucleic acids for decades. In their most basic form, fluorescent intensity-based assays have typically comprised contacting a target with a fluorophore-containing. Probe, removing any unbound probe from bound probe, and detecting fluorescence in the washed sample. Homogeneous assays improve upon such basic assays, in that the former do not require a washing step or the provision of a non-liquid phase support.

For example, U. S. Patents Nos. 5,538,848 to Livak et al. and 4,220,450 to Maggio disclose homogeneous fluorescence-based assays of nucleotide sequences using oligonucleotide probes in solution. However, these patents require the use of a quenching agent in combination with a reporting agent, so as to distinguish between the signals generated by hybridized probes and unhybridized probes. Livak et al. also requires the use of enzymes in its disclosed method. Quenching agents and enzymes add complexity and expense to the methods.

U. S. Patent No. 5,332,659 to Kidwell discloses a method for detecting nucleotide sequences in solution using probes

comprising at least two fluorophore moieties. The fluorophores must be selected to electronically interact with each other when close enough to vary the wavelength dependence of their spectra.

Unhybridized probes are much more flexible than probes hybridized to the target sequence, and consequently the two fluorophore moieties on each probe are more likely to be close to each other when the probe is unhybridized than when the probe is hybridized. Thus, a change in emission wavelength correlated with free probe can be monitored as an indication of the amount of free probe in the sample.

U. S. Patent No. 5,846,729 to Wu et al. also discloses homogeneous fluorescence-based assays for detecting nucleic acid.

In addition to the aforementioned developments, which detect fluorescent intensity, some have touted the advantages of fluorescent polarization assays. However, there are significant drawbacks to polarization-based assays. The degree of change in polarization as a function of binding can be unpredictable, and interpretation of data to conform inconsistent data to theoretical expectations can require more effort than is desirable in an analytical method, particularly when the method is to be automated. There are as well constraints arising from the molecular weight of the molecules whose motion is being evaluated in a fluorescent polarization assay.

The present inventions will be seen, in various important embodiments to take advantage of the properties of fluorescent molecules for purposes of detecting triplexes and quadruplexes.

All references cited herein are incorporated herein by reference in their entireties.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

Methods of creating multiplexes

In one general aspect, the invention is a method of creating a nucleic acid multiplex, said method comprising the steps of:

- 1) creating a mixture comprising water, a Watson-Crick duplex, a sufficient number of single-stranded mixed base sequence molecules to form a multiplex that includes the Watson Crick duplex, and an accelerator agent that increases a rate or amount of multiplex formation, said multiplex being a triplex or quadruplex, wherein said single-stranded molecule or molecules are selected so that, if in a multiplex, they would each be related to all other strands of the multiplex by adherence to base pairing rules, said rules being either Watson-Crick basepairing rules or homologous binding base-pairing rules; and
- 2) incubating said mixture to allow the multiplex to form, each strand of said multiplex related to all other strands of the multiplex by adherence to base-pairing rules; provided that, within the multiplex, the Watson-Crick duplex added in step (1) is heteropolymeric with a G-C content between 10% and 90%.

In one particular aspect of the method, the multiplex created is a triplex, in step (1) the sufficient number of single-stranded molecules is 1, and in step (2) the triplex is formed. In a particular embodiment of the method, in the triplex, the single-stranded molecule is related to one strand of the duplex by Watson-Crick base-pairing rules and to the second strand of the duplex by homologous binding base-pairing rules. In a further particular embodiment, the duplex substantially retains its double-helical structure and the single-stranded molecule resides in a groove of that double helical structure. All such triplexes are also aspects of the invention.

In another particular aspect of the method, the multiplex created is a quadruplex, in step (1) the Watson-Crick duplex is

a first Watson-Crick duplex, and in step (1) the sufficient number of single-stranded molecules is 2, those single-stranded molecules are in a second Watson-Crick duplex, and in step (2) the quadruplex is formed from said first and second duplexes.

Preferably step (1) is done with the two single-stranded molecules already in the second Watson-Crick duplex.

Methods of detecting a triplex

The method of creating a triplex can be adapted to be a method for detecting a triplex by adding an additional step (3) in which the triplex is detected.

Methods of detecting a quadruplex

The method of creating a quadruplex can be adapted to be a method for detecting a quadruplex by adding an additional step (3) in which the quadruplex is detected.

Triplex

In another general aspect, the invention is a triplex (a triplex complex) comprising a single-stranded probe bound to a double-stranded nucleic acid target, wherein said probe comprises a heteropolymeric nucleic acid or a heteropolymeric nucleic acid analog, and all base triplets of said triplex are members selected from the group consisting of A-T-A, T-A-T, U-A-T, T-A-U, A-U-A, U-A-U, G-C-G and C-G-C.

Quadruplex :

In another aspect, the invention is a multiplex structure that is a quadruplex, the quadruplex comprising: a first strand containing a first sequence of nucleobases; a second strand containing a second sequence of nucleobases, wherein said second strand is associated with said first strand by Watson-Crick bonding; a third strand containing a third sequence of

nucleobases; and a fourth strand containing a fourth sequence of nucleobases, wherein said fourth strand is associated with said second strand and said third strand by Watson-Crick bonding.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The invention will be described in conjunction with the following drawings in which like reference numerals designate like elements and wherein:

Figs. 1, 2A and 2B show the intensity of fluorescence as a function of temperature, GC content, and extent of base pair matching.

Figs. 3, 4, 5A, 5B, 5C and 5D show the intensity of fluorescence as a function of wavelength, extent of base pair matching and cation.

Figs. 6A, 6B, and 6C show intensity of fluorescence as a function of lasing protocol, and cation.

Figs. 7A, 7B, 7C, 8A, 8B, 9A, 9B, 9C, and 10 show, as regards quadruplexes, the intensity of fluorescence as a function of the extent of base pair matching and cation.

Fig. 11 shows the intensity of fluorescence as a function of the extent of base pair matching in a solution containing ethanol.

Figs. 12A, 12B, 12C and 12D show the intensity of fluorescence as a function of wavelength for perfect and imperfect base pair matches in dsDNA: ssDNA complexes when the cationic DNA intercalator YOYO-1 is present.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

GLOSSARY AND DEFINITIONS

The one-letter codes for the bases that form part of their respective nucleotides are: A: adenine; T: thymine; G: guanine; C: cytosine; U: uracil. These letters are also used to represent their respective nucleotides.

The G-C content of a duplex is the 100 times the number of G-C base pairs divided by the sum of the number of G-C base pairs plus the number of A-T (or A-U) base pairs and is expressed as a percentage (e. g., 20 %).

An accelerator agent is understood here as one that "increases a rate or amount of said triplex or quadruplex formation". A rate can be obtained with as few as two measurements, each at different time points. Amounts refer to the number of triplexes or quadruplexes formed.

The term "accelerator agent" is used interchangeably with the terms "promoter" and "promoter agent" except where the promoter specifically refers to a gene promoter.

The terms nucleic acid, triplex, quadruplex, and the like are intended to refer to molecules that comprise DNA, RNA, and analogues thereof capable of forming similar structures such as Watson-Crick duplexes, and the triplexes and quadruplexes formed herein.

"Nucleobase" refers to the bases A, U, G, C, T, and those analogs that can conform to Watson-Crick base-pairing rules.

Analogues of A, U, G, C, and T are those analogues that can conform to Watson-Crick base pairing rules.

A Watson-Crick duplex is a 2-stranded molecule or molecular segment in which the two strands are anti-parallel, their 5' - >

3' directions being opposite. The overall structure of the duplex is that of a double helix. The strands are held together by hydrogen bonds and hydrophobic interactions. There is base pair complementarity, A is paired with T by two hydrogen bonds (or, in the case of RNA, A is paired with U) and G is paired with C by three hydrogen bonds. As a result, the base-pairing rules are:

A is paired with T, A is paired with U, and G is paired with C.

A 3-stranded nucleic acid molecule is not necessarily a triplex and it is not necessary that any segment of a 3-stranded molecule be a triplex. It is possible that, at no region within any strand, is that strand bonded to more than one other strand.

A simple example would be a Y-shaped molecule where Strands 1 and 2 form the stem, Strands 1 and 3 form the left upper branch, and Strand 2 forms a single-stranded right upper branch.

An example of a triplex is a 3-stranded nucleic acid molecule or molecular segment in which one strand (arbitrarily named Strand 1) follows the Watson-Crick base-pairing rules (A-T, A-U, and G-C) with both Strand 2 and Strand 3. Strands 1 and 2 form a structure that is, or is close to, that of a Watson Crick duplex. Strand 3 resides in the major groove of that duplex. An example of such a triplex is the one elaborated by V.B. Zhurkin et al, J. Mol. Biol., (1994) vol. 239, 181-200 (See especially Figure 2 of that reference), which article is incorporated herein by reference. As part of the stabilization of such a triplex, Strand 3 is bonded to the other two strands by base pairing rules as follows:

An A on Strand 3 is paired with both an A on Strand 1 and a T on Strand 2; a G on Strand 3 is paired with both a G on Strand 1 and a C on Strand 2; a C on Strand 3 is paired with both a C on Strand 1 and a G on strand 2; and a T on strand 3 is paired with both a T on Strand 1 and an A on strand 2.

These base pairing rules are satisfied regardless of which variant (C or C+ or C', T or T') of the Zhurkin model is considered.

The term "base-pairing rules" are those that define the specificity between one nucleic acid molecule and another nucleic acid molecule when the two bind to each other with specificity.

Examples are Watson-Crick base pairing rules (G-C, and A-T or A U) and homologous binding base-pairing rules (A-A, T-T, G-G, C-C, U-U).

"Decondensation" of a duplex is defined as an increase in the overall helical repeat length of the duplex. For example, the B conformation of the duplex has an overall helical repeat length of 10 base pairs; a decondensation of 106 results in that repeat length being 13 base pairs.

PNA stands for polyamide analogs of DNA and RNA (see e. g., U. S. patent No. 5,539,082 to Nielsen et al.)

Specific embodiments and alternative formulations of the inventions

The inventions as described in the Summary of The Invention section have specific embodiments and preferred embodiments of interest. These embodiments are described throughout this application. However, for convenience, many of them are summarized in this section. Similarly, the inventions as summarized in the Summary of Invention section can be phrased in alternative fashions expressing some variation of the invention but retaining substantial overlap as to the essential invention.

Such alternative formulations of the invention are also included in this section.

(A) Methods of making the multiplexes

The methods of forming the triplex or quadruplex, described generally in the Summary of the Invention section, can optionally be performed by incorporating one or more of the following into the method: within the multiplex, the Watson-Crick duplex added in step (1) is heteropolymeric with a G-C content between 25% and 75%; within the multiplex, the Watson-Crick duplex added in step (1) is heteropolymeric with a G-C content between 10% and 90%, and furthermore the combined frequencies therein of purine-pyrimidine dimers and pyrimidine-purine dimers exceeds 25% (dimers are identified starting at the 5' end of the sequence and progressing one base at a time until the 3' end is reached; for example, the sequence 5'-AAAGGGT has one purine-pyrimidine dimer (GT) and no pyrimidine-purine dimers-their combined frequencies equal 1/6) ; performing steps (1) and/or (2) with the nucleic acid strands and/or duplexes not in a cell (and not in a virus); performing step (2) without the assistance of a protein (such as RecA or protein of similar function); in step (1), adding the water so that it accounts, on a volume basis, for at least 50 percent of the final volume of the mixture (more preferably for at least 80% of the final volume, most preferably in step (1) water is the only liquid added to the mixture); in step (1), not adding any protein; performing step (2) at a temperature or temperatures above the freezing temperature of the aqueous solution and at not more than 85°C (more preferably between 5°C and 30°C, most preferably between 15°C and 25°C) in step (1), adding an anion or, more preferably, a cation as the accelerator agent (monovalent, divalent or multivalent; for example, a metallic cation or a cationic peptide); wherein said cation is at least one member selected from the group consisting of alkali metal cations, alkaline earth metal cations, transition metal cations, $\text{Co}(\text{NH}_3)_3$ trivalent spermidine and tetravalent spermine; wherein said cation is Na^+ provided at a concentration of 50mM to 125mM ; wherein said cation is selected from the group consisting of Mn^{+2} provided at a

concentration of 10mM to 45mM, Mg²⁺ provided at a concentration of 10mM to 45mM, and Ni²⁺ provided at a concentration of 20mM ; in step (1) adding an intercalator as an accelerator agent (especially a fluorescent intercalator; preferably a bisintercalator); in step (1) said accelerator agent is an intercalating fluorophore selected from the group consisting of YOYO-1, TOTO-1, YOYO-3, TOTO-3, POPO-1, BOBO-1, POPO-3, BOBO-3, LOLO-1, JOJO-1, cyanine dimers, YO-PRO-1, TO-PRO-1, YO-PRO-3, TO-PRO-3, TO-PRO-5, PO-PRO-1, BO-PRO-1, PO-PRO-3, BO-PRO-3, LO-PRO-1, JO-PRO-1, cyanine monomers, ethidium bromide, ethidium homodimer-1, ethidium homodimer-2, ethidium derivatives, acridine, acridine orange, acridine derivatives, ethidium-acridine heterodimer, ethidium monoazide, propidium iodide, SYTO dyes, SYBR Green1, SYBR dyes, Pico Green, SYTOX dyes, and 7-aminoactinomycin D. in step (1) said accelerator agent is a non-intercalating fluorophore (especially one selected from the group consisting of biotin, rhodamine, Alexa dyes, BODIPY dyes, biotin conjugates, thiol-reactive probes, fluorescein and derivatives (including the "caged" probes), Oregon Green, Rhodamine Green, QSY dyes)) and said intensity is inversely correlated with formation of the triplex or quadruplex; in step (1) said accelerator agent is tethered to at least one of said first strand, said second strand, said third strand and said fourth strand; in step (1) adding an accelerator agent that is an intercalator that binds to the minor groove of the Watson-Crick duplex (or at least one of the two Watson-Crick duplexes); in step (1) adding an accelerator agent (especially an organic liquid soluble in water, such as dimethyl formamide, ethanol, and glycerol) that at 25 C is a liquid; in step (1) adding more than one accelerator agent; in step (1) adding an accelerator agent that is a condensation or decondensation agent as regards the Watson-Crick duplex; in step (1) adding an accelerator agent that is an analog of A, T, U, C, or G; in step (1) adding an accelerator agent selected from the group consisting of lectins and polysaccharides ; in steps (1) and (2), buffering the mixture with a pH of about 5 to about 9; one cytosine in at least one C-G-C or G-C-G base triplet is positively charged; one cytosine in each C-G-C and G-C-G base

triplet is positively charged; in step (2) the incubation time is not more than about two hours (more preferably not more than 1 hour; and within either time frame, preferably at least 25%, more preferably at least 50%, of the possible multiplexes have been formed); said at least one accelerator agent is a minor groove nucleic acid binding molecule, which binds in a nonintercalating manner and binds with an association constant of at least 10^3 M^{-1} ; wherein the multiplex is part of an electrical circuit.

(Alternatively, the invention is an electrical circuit comprising the multiplex structure.)

It will be apparent to someone of ordinary skill in the art that the foregoing specific conditions also apply to the following method for making a quadruplex.

In an alternatively phrased version, the method of forming the quadruplex comprises: (1) providing a hybridization medium comprising a first strand, a second strand, a third strand, a fourth strand, water, a buffer and at least one accelerator agent; and (2) incubating said hybridization medium for an incubation time effective to hybridize said second strand to said fourth strand to provide said multiplex structure wherein said multiplex structure comprises: a first strand containing a first sequence of nucleobases; a second strand containing a second sequence of nucleobases, wherein said second strand is associated with said first strand by Watson-Crick bonding; a third strand containing a third sequence of nucleobases; and a fourth strand containing a fourth sequence of nucleobases, wherein said fourth strand is associated with said second strand and said third strand by Watson-Crick bonding.

In particular embodiments of the methods of forming a quadruplex, the following apply alone or in combination (the descriptions that follow utilize the terminology of the method of making a quadruplex that specifies 4 separate strands but they are also applicable to the method that specifies a Watson-

Crick duplex as one or two of the starting materials): at least one of said first strand and said second strand further comprises a pharmaceutical agent, and hybridization of said second strand to said fourth strand places said pharmaceutical agent an effective distance from a target on said third strand, said fourth strand or on another molecule associated with at least one of said third strand and said fourth strand; said pharmaceutical agent is a member selected from the group consisting of nucleic acids designed to bind gene promoter sequences of clinically relevant genes, nucleic acids designed to bind clinically relevant genes, and nucleic acids designed to bind origin-of-replication sites of pathogens ; said third strand and said fourth strand are provided in said hybridization medium before said first strand and said second strand, and said first strand and said second strand are provided in dehydrated form prior to rehydration by contact with said hybridization medium; at least one of said first strand and said second strand is covalently labeled with a non-intercalating fluorophore and said intensity is inversely correlated with said binding affinity; at least one accelerator agent is an intercalating fluorophore, and a fluorescent intensity of a test medium containing said multiplex structure is directly correlated with a binding affinity of said second strand for said fourth strand ; hybridization of said second strand to said fourth strand is detected as a change in a fluorescent, chemiluminescent, electrochemiluminescent or electrical signal; an intensity of said signal is correlated with a binding affinity between said second strand and said fourth strand; hybridization of said second strand to said fourth strand inactivates an activity associated with at least one of said third strand and said fourth strand.

(B) Methods of detecting triplexes

The methods of detecting a triplex, described generally in the Summary of the Invention section, can optionally be performed by incorporating one or more of the following into the method:

carrying out the method as a homogenous-assay such that, during or prior to step (3), single-stranded molecules that are not part of the triplex are not placed in a vessel or container separate from that containing the triplex; using the detection method to discriminate between a perfect base-pairing-rules match, a one-base mismatch (or deletion), and a 2-base mismatch (or deletion), between the duplex and the single-stranded molecule in the triplex (the method preferably comprising calibrating the method with molecules comprising known mismatches) ; using the extent of binding of an intercalator (e. g., as indicated by increased fluorescence) as an indication of the formation of the triplex; such that a wavelength at which said intercalating fluorophore fluoresces shifts to a second wavelength upon intercalation, a difference between said wavelength and said second wavelength indicating whether a complex between said probe and said target is a duplex or a triplex and whether said target is DNA or RNA; the probe is covalently labeled with a non-intercalating fluorophore and said intensity is inversely correlated with said binding affinity (especially wherein said non-intercalating fluorophore is a member selected from the group consisting of biotin, rhodamine and fluorescein) ; using a fluorophore-labeled single stranded molecule as the single-stranded molecule; the method is a homogeneous assay conducted without providing a signal quenching agent on said target sequence (i. e., in the duplex) or on said probe (i. e., the single-stranded molecule) and/or without prior denaturation of said target sequence and/or without PCR amplification of said target sequence; said method is a homogeneous assay conducted without providing a signal quenching agent on said target sequence or on said probe; the probe has a partially charged or uncharged backbone; the probe comprises a PNA sequence and/or is ssPNA prepared by parallel synthesis; the probe and said target sequence are the same length; the probe is 5 to 30 nucleotides long ; the fluorescence-exciting radiation is emitted from an argon ion laser at a wavelength from about 200 nm to about 1000 nm; the test sample has a volume of about 20 microliters containing about 10 femtomoles of target sequence

and about 10 femtomoles of probe; the concentration of the target sequence in said sample is not more than 5×10^{-10} M; the concentration of the probe in the sample is not more than 5×10^{-10} M ; the method is conducted on a biochip; the intercalating fluorophore is added to the medium in a form free of said probe and free of said target sequence; the intercalating fluorophore is a member selected from the group consisting of YOYO-1, TOTO-1, ethidium bromide, ethidium homodimer-1, ethidium homodimer-2 and acridine.

In an alternatively phrased aspect, the invention is a detection method comprising: providing a target double-stranded nucleic acid or nucleic acid analogue comprising a target sequence, wherein said target sequence contains at least one purine base and at least one pyrimidine base; providing a probe comprising a nucleic acid sequence or a nucleic acid analog sequence; providing an accelerator agent; adding said probe, said target sequence and said accelerator agent to a medium to provide a test sample containing a triplex complex comprising said probe bound to said target sequence, wherein all base triplets of said complex are members selected from the group consisting of A-T-A, T-A-T, U-A-T, T-A-U, A-U-A, U-A-U, G-C-G and C-G-C ; irradiating said test sample with exciting radiation to cause the test sample to emit fluorescent radiation; detecting an intensity of said fluorescent radiation, wherein said intensity is correlated with a binding affinity between said probe and said target sequence; and determining from said intensity an extent of matching between said probe and said target sequence.

In another alternatively phrased related aspect, the method comprises: providing a target nucleic acid or nucleic acid analogue having a target sequence, wherein said target sequence contains at least one purine base and at least one pyrimidine base; providing a double-stranded probe comprising a nucleic acid sequence or a nucleic acid analog sequence; providing a hybridization accelerator agent; adding said probe, said target and said hybridization accelerator agent to a medium to provide

a test sample containing a Watson-Crick triplex comprising said probe bound to said target sequence; irradiating said test sample with exciting radiation to cause test sample to emit fluorescent radiation; detecting an intensity of said fluorescent radiation, wherein said intensity is correlated with a binding affinity between said probe and said target sequence; and determining from said intensity an extent of matching between said probe and said target sequence wherein said method is a homogeneous assay conducted without providing a signal quenching agent on said target sequence or on said probe;

(C) Methods of detecting quadruplexes

The methods of detecting a quadruplex, described generally in the Summary of the Invention section, can optionally be performed by incorporating one or more of the following into the method: carrying out the method as a homogenous assay, such that during or prior to step(3) nucleic acid molecules that are not part of the quadruplex are not placed in a vessel or container separate from that containing the quadruplex; the method is a homogeneous assay conducted without providing a signal quenching agent on said target sequence or on said probe (i. e., the second Watson-Crick duplex) and/or without prior denaturation of said target sequence and/or without PCR amplification of said target sequence; using the detection method to discriminate between a perfect base-pairing-rules match, a one-base mismatch (or deletion), and a 2-base mismatch (or deletion), between the first and second Watson-Crick duplexes (preferably by calibrating the method with molecules comprising known mismatches); using the extent of binding of an intercalator as an indication of the formation of the quadruplex (especially by using a fluorescent intercalator and using increased fluorescence as an indicator); the intercalating fluorophore is added to the medium in a form free of said probe and free of said target sequence; the intercalating fluorophore is a member selected from the group

consisting of YOYO-1, TOTO-1, ethidium bromide, ethidium homodimer-1, ethidium homodimer-2 and acridine; a wavelength at which said intercalating fluorophore fluoresces shifts to a second wavelength upon intercalation, a difference between said wavelength and said second wavelength indicating whether a complex between said probe and said target is a duplex or a triplex and whether said target is DNA or RNA; the probe is covalently labeled with a non-intercalating fluorophore and said intensity is inversely correlated with said binding affinity (especially wherein said non-intercalating fluorophore is a member selected from the group consisting of biotin, rhodamine and fluorescein); using a fluorophore-labeled single stranded molecule for part of the second Watson-Crick duplex; the method further comprises quantifying the binding affinity ; the probe has a partially charged or uncharged backbone; the probe comprises a PNA sequence and/or is ssPNA prepared by parallel synthesis; the probe and said target sequence are the same length; the probe is 5 to 30 nucleotides (or base pairs) long; the fluorescence-exciting radiation is emitted from an argon ion laser at a wavelength from about 200 nm to about 1000 nm; the test sample has a volume of about 20 microliters containing about 10 femtomoles of target sequence and about 10 femtomoles of probe; the concentration of the target sequence in said sample is not more than 5×10^{-1} M; the concentration of the probe in the sample is not more than 5×10^{-10} M; a ratio of said first strand and said second strand to said third strand and said fourth strand is about 10: 1; concentrations of each of said first strand, said second strand, said third strand and said fourth strand are not more than 5×10^{-1} M; the method is conducted on a biochip.

In an alternatively phrased related aspect, the method comprises: providing a target nucleic acid or nucleic acid analogue having a target sequence, wherein said target sequence contains at least one purine base and at least one pyrimidine base; providing a double-stranded probe comprising a nucleic acid sequence or a nucleic acid analog sequence; providing a

hybridization accelerator agent; adding said probe, said target and said hybridization accelerator agent to a medium to provide a test sample containing a Watson-Crick quadruplex comprising said probe bound to said target sequence; irradiating said test sample with exciting radiation to cause test sample to emit fluorescent radiation; detecting an intensity of said fluorescent radiation, wherein said intensity is correlated with a binding affinity between said probe and said target sequence; and determining from said intensity an extent of matching between said probe and said target sequence wherein said method is a homogeneous assay conducted without providing a signal quenching agent on said target sequence or on said probe.

(D) The triplexes

The triplex described generally in the Summary of the Invention section, can optionally have one or more of the following features: each strand is heteropolymeric with a G-C content between 25% and 75%; each strand is heteropolymeric with a G-C content between 10% and 90%, and furthermore the combined frequencies therein of purine-pyrimidine dimers and pyrimidine-purine dimers exceeds 25%; it is not in a cell (and not in a virus); it is stable at pH greater than 7.6 (but less than pH 9); it is in a medium at a pH greater than 7.6 (and preferably less than pH 9); the single-stranded nucleic acid or nucleic acid analog is 5 to 30 bases long and the double-stranded nucleic acid target is 8 to 3.3×10^9 base pairs long; the target sequence is heteropolymeric and contains 25% to 75% purine bases and 75% to 25% pyrimidine bases in any order (preferably wherein the frequency of purine-pyrimidine dimers plus the frequency of pyrimidine-purine dimers exceeds 25%); the probe (i. e., the single-stranded molecule) is covalently bound to a double-stranded nucleic acid cleaving agent; the probe is covalently bound to a chemotherapeutic agent; the probe is covalently bound to a label (for example, a multi-molecule signaling complex, a redox pair, a chemiluminescent agent, an electrochemiluminescent agent, or in a preferred

embodiment, a fluorophore, especially such that the fluorescent intensity of the complex is correlated with a binding affinity between the probe and the target sequence) ; the base pairing rules for the single-stranded nucleic acid molecule are, as regards one strand of the duplex, the Watson-Crick base-pairing rules, G-C and either A-T or A-U, and, as regards the other strand of the duplex are A-A and either T-T or U-U; the duplex substantially retains its Watson-Crick double helical structure, and the single-stranded molecule resides in a groove of the double helix; the accelerator agent forms a bond between part of the duplex and part of the single-stranded nucleic acid molecule; the accelerator agent is covalently linked to the single stranded nucleic acid molecule; both strands of the Watson-Crick duplex are DNA (especially where all strands of the triplex are DNA); the accelerator reagent binds to a base in the Watson-Crick duplex, said base being one to which a base in the single stranded nucleic acid molecule binds ; the accelerator reagent binds to a base in the Watson-Crick duplex, said base not being one in the triplex; the accelerator agent binds to the phosphate backbone of the Watson-Crick duplex; the accelerator agent binds to more than one site on the Watson-Crick duplex, each site either on a base or a place on a phosphate backbone of said duplex; the accelerator agent binds to one site on the Watson-Crick duplex, said site either on a base or on a phosphate backbone of said duplex; the accelerator agent binds to a base in the Watson-Crick duplex and to a base in the single-stranded nucleic acid molecule; the accelerator agent binds to a base in the single-stranded nucleic acid molecule.

(E) The Quadruplexes

The quadruplex described generally in the Summary of the Invention section, can optionally have one or more of the following features: each of said four strands is heteropolymeric with a G-C content between 10% and 90%; the second and fourth strands are aligned in a parallel 3' to 5' direction and binding between those 2 strands is according to

homologous base-pairing rules; the first and third strands are aligned in a parallel 5' to 3' direction and binding between those 2 strands is according to homologous base-pairing rules; the second and fourth strands are aligned in a parallel 3' to 5' direction and binding between said second and fourth strands is according to homologous base-pairing rules and furthermore the first and third strands are aligned in a parallel 5' to 3' direction and binding between said first and third strands is according to homologous base-pairing rules; the second and fourth strands are aligned in a parallel 3' to 5' direction and binding between those 2 strands is according to Watson-Crick base-pairing rules; the first and third strands are aligned in a parallel 5' to 3' direction and binding between those 2 strands is according to Watson-Crick base-pairing rules; the second and fourth strands are aligned in a parallel 3' to 5' direction and binding between said second and fourth strands is according to Watson-Crick base-pairing rules and furthermore the first and third strands are aligned in a parallel 5' to 3' direction and binding between said first and third strands is according to Watson-Crick base-pairing rules; the first and fourth strands are aligned in anti-parallel 5' to 3' and 3' to 5' directions, respectively, and binding between the 2 strands is according to Watson-Crick base-pairing rules; the second and third strands are aligned in anti-parallel 3' to 5' and 5' to 3' directions, respectively, and binding between those 2 strands is according to Watson-Crick base-pairing rules; the first and fourth strands are aligned in anti-parallel 5' to 3' and 3' to 5' directions, respectively, and binding between said first and fourth strands is according to Watson-Crick base pairing rules and furthermore the second and third strands are aligned in anti-parallel 3' to 5' and 5' to 3' directions, respectively, and binding between said second and third strands is according to Watson-Crick base-pairing rules; the first and fourth strands are aligned in anti-parallel 5' to 3' and 3' to 5' directions, respectively, and binding between those 2 strands is according to homologous base-pairing rules; the second and third strands are aligned in anti-parallel 3' to 5' and 5' to 3' directions, respectively, and binding between those

2 strands is according to homologous base-pairing rules; the first and fourth strands are aligned in anti-parallel 5' to 3' and 3' to 5' directions, respectively, and binding between said first and fourth strands is according to homologous base pairing rules and furthermore the second and third strands are aligned in anti-parallel 3' to 5' and 5' to 3' directions, respectively, and binding between said second and third strands is according to homologous base-pairing rules; each interacting base of the said first strand interacts specifically with both the adjacent base on the said third strand and with the base on the said fourth strand, the base to which the said third strand base is bound; each interacting base of the said second strand interacts specifically with both the adjacent base on the said fourth strand and the base on the said third strand, the base to which the said fourth strand base is bound; it is an isolated, purified, artificial or synthetic quadruplex; each strand is heteropolymeric with a G-C content between 25% and 75% ; each strand is heteropolymeric with a G-C content between 10% and 90%, and furthermore the combined frequencies therein of purine-pyrimidine dimers and pyrimidine-purine dimers exceeds 25% ; it is not in a cell (and not in a virus); each said strand independently comprises a heteropolymeric nucleic acid or a heteropolymeric nucleic acid analogue; each said strand independently comprises DNA or RNA; each said strand independently comprises a heteropolymeric nucleic acid analogue containing an uncharged or partially charged backbone; one of said second strand or said fourth strand comprises DNA and the other of said second strand or said fourth strand comprises RNA, mRNA, hnRNA, rRNA, tRNA or cDNA ; the second strand and said fourth strand are parallel homologous to each other; a major groove of said first strand and said second strand is placed in a minor groove of said third strand and said fourth strand; the second strand and said fourth strand are parallel complementary to each other; a major groove of said first strand and said second strand is placed in a minor groove of said third strand and said fourth strand ; each nucleobase binds to no more than two other nucleobases; no strand is contiguous with another strand; the multiplex

structure is substantially free of Hoogsteen bonding; the multiplex structure is substantially free of G-G quartets ; the first strand and said second strand are 5 to 50 base pairs long; the third strand and said fourth strand are genomic DNA; the third strand and said fourth strand include a haplotype in genomic DNA; the third strand and fourth strand are PCR amplified products; wherein said multiplex structure is free of solid support; the multiplex structure is bound to a solid support (where the solid support is either electrically conductive or is not electrically conductive); wherein the multiplex structure further comprises a therapeutic, prophylactic or diagnostic agent bound to at least one of said first strand, said second strand, said third strand and said fourth strand; wherein the first strand and said second strand are each 5 to 30 bases long and said third strand and said fourth strand are each 8 to 3.3×10^9 base pairs long; wherein the fourth sequence contains 25% to 75% purine bases and 75% to 25% pyrimidine bases in any order (preferably wherein the frequency of purine-pyrimidine dimers plus the frequency of pyrimidine-purine dimers exceeds 25e) ; the first and second Watson-Crick duplexes (see the method of making a quadruplex in the Summary of the Invention section) each have a G-C content between 30% and 70%; both strands of the first Watson-Crick duplex are DNA (especially where all strands of the quadruplex are DNA); the accelerator reagent binds to a base in the first Watson-Crick duplex, said base being one to which a base in the second duplex binds; the accelerator reagent binds to a base in the first or second Watson-Crick duplexes, said base not being part of the quadruplex; the accelerator reagent binds to a phosphate backbone of the first or second Watson-Crick duplex; the accelerator reagent binds to more than one site on one of the first or second Watson-Crick duplexes, each site either on a base or on a phosphate backbone; the accelerator agent binds to one site on the Watson-Crick duplex, said site either on a base or on a phosphate backbone; the accelerator agent binds to a base in the first Watson-Crick duplex and to a base on the second Watson-Crick duplex; the accelerator agent binds to the minor groove of the first and/or second Watson-Crick duplex ;

the accelerator agent forms a bond between part of the first Watson-Crick duplex and part of the second Watson-Crick duplex.

Additional aspects of the invention

The invention provides triplex complexes comprising a single-stranded probe bound to a double-stranded nucleic acid target, wherein the probe comprises a heteropolymeric nucleic acid or a heteropolymeric nucleic acid analog, and all base triplets of the complex are members selected from the group consisting of A-T-A, T-A-T, U-A-T, T-A-U, A-U-A, U-A-U, G-C-G and C-G-C.

Unlike certain Hoogsteen triplexes disclosed by the prior art, the triplexes of the invention are stable at pH values greater than 7.6. Moreover, the inventive triplexes do not require the presence of homopyrimidine sequences or homopurine sequences, as in certain prior art triplexes. For example, the target sequence can contain 25% to 75% purine bases and 75% to 25% pyrimidine bases in any order.

Preferably the single-stranded nucleic acid or nucleic acid analog of the triplex is 5 to 30 bases long and the double-stranded nucleic acid target is 8 to 3.3×10^9 base pairs long.

Triplex formation according to the invention is suitable for a variety of uses. For example, probes covalently bound to a double-stranded nucleic acid cleaving agent can be used to specifically cleave target sequences of double-stranded nucleic acids. Probes covalently bound to a chemotherapeutic agent can be used to specifically treat target sequences of double-stranded nucleic acids.

In preferred embodiments, the invention provides a rapid, sensitive, environmentally friendly, and safe method for assaying binding between a double-stranded target and a single-stranded probe, wherein the target comprises a nucleic acid sequence or a nucleic acid analog sequence and the probe

comprises a nucleic acid sequence or a nucleic acid analog sequence.

Unlike certain prior art assays, the invention not only detects the presence of specific probe-target binding, but also provides qualitative and quantitative information regarding the nature of interaction between a probe and target. Thus, the invention enables the practitioner to distinguish among a perfect match, a one base pair mismatch, a two base pair mismatch, a three base pair mismatch, a one base pair deletion, a two base pair deletion and a three base pair deletion arising between a base sequence in the probe and in a strand of the double-stranded target.

Embodiments of the invention comprise calibrating the measured signal (e. g., fluorescent intensity) for a first probe target mixture against the same type of signal exhibited by other probes combined with the same target, wherein each of the other probes differs from the first probe by at least one base.

A calibration curve can be generated, wherein the magnitude of the measured signal (e. g., fluorescent intensity) is a function of the binding affinity between the target and probe.

As the binding affinity between the target and a plurality of different probes varies with the number of mismatched bases, the nature of the mismatch (es) (A-G vs. A-C vs. T-G vs. T-C, etc.), the location of the mismatch (es) within the triplex, etc., the assay of the invention can be used to sequence the target.

In embodiments, the signal measured can be the fluorescent intensity of a fluorophore included in the test sample. In such embodiments, the binding affinity between the probe and target can be directly or inversely correlated with the intensity, depending on whether the fluorophore signals hybridization through signal quenching or signal amplification. Under selected conditions, the fluorescent intensity generated by

intercalating agents can be directly correlated with probe-target binding affinity, whereas the intensity of preferred embodiments employing a non-intercalating fluorophore covalently bound to the probe can be inversely correlated with probe-target binding affinity. The fluorescent intensity decreases for non-intercalating fluorophores as the extent of matching between the probe and target increases, preferably over a range inclusive of 0-2 mismatches and/or deletions, more preferably over a range inclusive of 0-3 mismatches and/or deletions.

The invention enables quantifying the binding affinity between probe and target. Such information can be valuable for a variety of uses, including designing antisense drugs with optimized binding characteristics.

Unlike prior art methods, the assay of the invention is preferably homogeneous. The assay can be conducted without separating the probe-target complex from the free probe and target prior to detecting the magnitude of the measured signal.

The assay does not require a gel separation step, thereby allowing a great increase in testing throughput. Quantitative analyses are simple and accurate. Consequently the binding assay saves a lot of time and expense, and can be easily automated.

Furthermore, it enables binding variables such as buffer, pH, ionic concentration, temperature, incubation time, relative concentrations of probe and target sequences, intercalator concentration, length of target sequences, length of probe sequences, and possible cofactor requirements to be rapidly determined.

The assay can be conducted in, e. g., a solution within a well, on an impermeable surface or on a biochip.

Moreover, the inventive assay is preferably conducted without

providing a signal quenching agent on the target or on the probe.

Although the inventors have previously disclosed the advantages of fluorescent intensity assays for hybridization (see, e. g., U. S. Patent Application No. 09/224,505, filed December 31, 1998), assays according to the present invention specifically detect triplexes of the probe and the double-stranded target, thus obviating the need to denature the target. While nucleic acid (and nucleic acid analog) probes have been known to form triplexes with certain limited classes of targets (see, e. g., Floris et al., supra, Dervan et al., supra, Egholm et al., 365 Nature 566(1993), and Tomac et al., 118 J. Am. Chem. Soc. 5544 (1996)), it is surprising that the inventors have been able to specifically assay triplexes formed between single-stranded nucleic acid (e. g., ssDNA and RNA) probes and double-stranded nucleic acid (e. g., dsDNA) targets, wherein the interaction between the probes and targets is based on Watson Crick base pairing (at least in the sense that A binds to T (or U, in the case of RNA) and G binds to C), rather than the very limited Hoogsteen model of triplex hybridization of, e.g., Dervan et al. The term "Watson-Crick triplex", which is employed herein, is intended to crystallize these differences by limiting the nature of base pairing between the single-stranded probe and the double-stranded target to A-T-A, T-A-T, U-A-T, T-A-U, A-U-A, U-A-U, G-C-G and/or C-G-C (including C⁺-G-C, and/or any other ionized species of base). These three-member groups are hereinafter denoted Watson-Crick base triplets and the resulting structures denoted Watson-Crick triplexes.

Suitable probes for use in the inventive assay include, e. g., ssDNA, RNA, PNA and other nucleic acid analogs having uncharged or partially-charged backbones. Probe sequences having any length from 8 to 20 bases are preferred since this is the range within which the smallest unique DNA sequences of prokaryotes and eukaryotes are found. Probes of 12 to 18 bases are

particularly preferred since this is the length of the smallest unique sequences in the human genome. In embodiments, probes of 5 to 30 bases are most preferred. However, a plurality of shorter probes can be used to detect a nucleotide sequence having a plurality of non-unique target sequences therein, which combine to uniquely identify the nucleotide sequence. The length of the probe can be selected to match the length of the target.

The inventors have discovered the surprising development that they were able to specifically assay a wide-variety of triplexes formed in a Watson-Crick base-pair dependent manner between single-stranded nucleic acid (e. g., ssDNA, RNA, ssPNA and other analogs of DNA or RNA) probes and double-stranded nucleic acid (e. g., dsDNA) targets. The inventors have discovered that triplex formation and/or stabilization is enhanced by the presence of an intercalating agent in the sample being tested.

The inventors have discovered that Watson-Crick triplex formation and/or stabilization is enhanced by the presence of cations in the sample being tested. Suitable cations include, e. g., monovalent cations, such as Na^+ (preferably at a concentration of 50mM to 125mM), K^+ , and other alkali metal ions; divalent cations, such as alkaline earth metal ions (e. g., Mg^{+2} and Ca) and divalent transition metal ions (e. g., Mn , Ni , Cd^{+2} , Co^{+2} and Zn^{+2}) ; and cations having a positive charge of at least three, such as $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{+3}$, trivalent spermidine and tetravalent spermine. Mn^{+2} is preferably provided at a concentration of 10mM to 30mM. Mg^{+2} is preferably provided at a concentration of 15mM to 20mM. Ni^{+2} is preferably provided at a concentration of about 20mM. In embodiments, Mg^{+2} and Mn^{+2} are provided in combination at a concentration of 10mM each, 15mM each or 20mM each (i. e., 10-20 mM each).

The amount of cation added to the medium in which the triplex forms depends on a number of factors, including the nature of the cation, the concentration of probe, the concentration of

target, the presence of additional cations and the base content of the probe and target. The preferred cation concentrations and mixtures can routinely be discovered experimentally.

The instant invention does not require the use of radioactive probes, which are hazardous, tedious and time-consuming to use, and need to be constantly regenerated.

Probes of the invention are preferably safe to use and stable for years. Accordingly, probes can be made or ordered in large quantities and stored.

In embodiments, the probe is labeled with a multi-molecule signaling complex or a redox pair, or with a label that elicits chemiluminescent or electrochemiluminescent properties.

It is preferred that the probe or target (preferably the probe) have a fluorescent label covalently bound thereto. The label is preferably a non-intercalating fluorophore. In such embodiments, the fluorophore is preferably bound to the probe at either end. Preferred fluorescent markers include biotin, rhodamine and fluorescein, and other markers that fluoresce when irradiated with exciting energy.

The excitation wavelength is selected (by routine experimentation and/or conventional knowledge) to correspond to this excitation maximum for the fluorophore being used, and is preferably 200 to 1000 nm. Fluorophores are preferably selected to have an emission wavelength of 200 to 1000 nm. In preferred embodiments, an argon ion laser is used to irradiate the fluorophore with light having a wavelength in a range of 400 to 540 nm, and fluorescent emission is detected in a range of 500 to 750 nm.

The assay of the invention can be performed over a wide variety of temperatures, such as, e. g., from 5°C to 85°C. Certain prior art assays require elevated temperatures, adding cost and delay to the assay. On the other hand, the invention can be

conducted at room temperature or below (e. g., at a temperature below 25°C).

The reliability of the invention is independent of guanine and cytosine content in said target. Since G-C base pairs form three hydrogen bonds, while A-T base pairs form only two hydrogen bonds, target and probe sequences with a higher G or C content are more stable, possessing higher melting temperatures.

Consequently, base pair mismatches that increase the GC content of the hybridized probe and target region above that present in perfectly matched hybrids may offset the binding weakness associated with a mismatched probe. Triplexes containing every possible base pair mismatch between the probe and the target proved to be more unstable than perfectly matched triplexes, always resulting in lower fluorescent intensities than did perfectly complementary hybrids, when an intercalating fluorophore was used.

The inventive assay is extremely sensitive, thereby obviating the need to conduct PCR amplification of the target.

For example, it is possible to assay a test sample having a volume of about 20 microliters, which contains about 10 femtomoles of target and about 10 femtomoles of probe.

Embodiments of the invention are sensitive enough to assay targets at a concentration of $5 \times 10^{-9}M$, preferably at a concentration of not more than $5 \times 10^{-1}M$. Embodiments of the invention are sensitive enough to employ probes at a concentration of $5 \times 10^{-9}M$, preferably at a concentration of not more than $5 \times 10^{-1}M$. It should go without saying that the foregoing values are not intended to suggest that the method cannot detect higher concentrations.

The medium in which triplexes form can be any conventional

medium known to be suitable for preserving nucleotides. See, e.g., Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Lab Manual", Vol. 2 (1989). For example, the liquid medium can comprise nucleotides, water, buffers and standard salt concentrations. When divalent cations are used exclusively to promote triplex formation, chelators such as EDTA or EGTA should not be included in the reaction mixtures.

Specific binding between complementary bases occurs under a wide variety of conditions having variations in temperature, salt concentration, electrostatic strength, and buffer composition.

Examples of these conditions and methods for applying them are known in the art.

Unlike many Hoogsteen-type triplexes, which are unstable or non-existent at pH levels above about 7.6, the Watson-Crick triplexes of the invention are stable over a wide range of pH levels, preferably from about pH 5 to about pH 9.

It is preferred that triplexes be formed at a temperature of about 5°C to about 25°C for about one hour or less. Longer reaction times are not required, but incubation for up to 24 hours in most cases did not adversely affect the triplexes. The fast binding times of Watson-Crick triplexes of the invention contrast with the much longer binding times for Hoogsteen triplex-based assays.

Although not required, it is possible to facilitate triplex formation in solution by using certain reagents in addition to cations. Preferred examples of these reagents include single stranded binding proteins such as RecA protein, T4 gene 32 protein, *E. coli* single stranded binding protein, major or minor nucleic acid groove binding proteins, viologen and intercalating substances such as ethidium bromide, actinomycin D, psoralen, and angelicin. Such facilitating reagents may

prove useful in extreme operating conditions, for example, under abnormal pH levels or extremely high temperatures.

The inventive assay can be used to, e.g., identify accessible regions in folded nucleotide sequences, to determine the number of mismatched base pairs in a hybridization complex, and to map genomes.

The inventors may sometimes herein suggest that Watson-Crick triplexes result from hybridization of the probe to duplex target. While fluorophores tethered to the probe produced quenched fluorescent emissions upon being exposed to duplex targets containing a strand of Watson-Crick complementary bases, which indicates the occurrence of some kind of binding event, the inventors are not sure that what occurs in the Watson-Crick triplex is best described as hybridization in the sense traditionally associated with Watson-Crick duplex formation.

While the formation of a Watson-Crick triplex may sometimes be referred to as a hybridization event herein, that is merely for convenience and is not intended to limit the scope of the invention with respect to how the formation of a Watson-Crick triplex can be best characterized.

Unlike the quadruplexes discussed in the Background Section above, the preferred multiplex structures of the invention contain at least four strands of nucleic acid bonded together according to traditional Watson-Crick bonding rules.

As used herein, the term "Watson-Crick bonding" is intended to define specific association between opposing pairs of nucleic acid (and/or nucleic acid analogue) strands via matched, opposing bases. While the formation of a Watson-Crick quadruplex may sometimes be referred to as a hybridization event herein, that is merely for convenience and is not intended to limit the scope of the invention with respect to

how the formation of a Watson-Crick quadruplex can be best characterized.

- The multiplex structures of the invention are preferably quadruplexes. Each strand of the multiplex independently comprises a nucleic acid or a nucleic acid analogue. Suitable nucleic acids include, e. g., DNA or RNA. Preferred nucleic acid analogues contain an uncharged or partially charged backbone (i. e., a backbone having a charge that is not as negative as a native DNA backbone).

In certain embodiments, one of the second and fourth strands of the four-stranded quadruplex comprises DNA and the other of the second and fourth strands comprises RNA, mRNA, hnRNA, rRNA, tRNA or cDNA.

In certain embodiments, the second strand and the fourth strand are parallel homologous to each other. In these embodiments, a major groove of the first and second strands is placed in a minor groove of the third and fourth strands.

In other embodiments, the second and fourth strands are parallel complementary to each other. In these embodiments, which possess "nested complementarity", a major groove of the first and second strands is placed in a minor groove of the third and fourth strands.

In certain embodiments, each nucleobase binds to no more than two other nucleobases. In some of these embodiments, the bases of the second strand specifically bond (via Watson-Crick rules) to the matching bases of the first strand and to the matching bases of the fourth strand, and the bases of the fourth strand specifically bond (via Watson-Crick rules) to the matching bases of the third strand and to the matching bases of the second strand, wherein the bases of the first and third strands bind to no more than one other base each. Thus, in addition to the traditional Watson-Crick base pairs, such embodiments include the following Watson-Crick base triplets: A-T-A, T-A-T,

U-A-T,

T-A-U, A-U-A, U-A-U, G-C-G and/or C-G-C (including C⁺-G-C, and/or any other ionized species of base).

In certain embodiments, it is believed that opposing bases of the first and third strands also bind to each other, in addition to: (a) the binding between opposing bases of the first and second strands; (b) the binding between opposing bases of the third and fourth strands; and (c) the binding between opposing bases of the second and fourth strands.

In certain embodiments of the multiplex structure of the invention, no strand is contiguous with another strand. That is, there are at least four separate strands. Although folded conformations and the like (e. g., hairpin turns, etc.) are within the scope of the invention, folded portions of a single strand do not make the strand count more than once toward the minimum of four separate strands.

Multiplex structures of the invention preferably do not rely on Hoogsteen bonding or G-G quartets for maintenance of the multiplex structure, although insignificant amounts of Hoogsteen bonding and/or G-G quartets may be present. That is, multiplex structures of the invention are preferably substantially free of Hoogsteen bonding, and substantially free of G-G quartets.

In certain embodiments, the first and second strands of the multiplex are 5 to 50 bases long (more preferably 5 to 30 bases long) and the third and fourth strands are 8 to 3.3×10^9 base pairs long. For example, the first and second strands can constitute a double-stranded probe and the third and fourth strands can constitute a double-stranded target, such as genomic DNA, which can contain a haplotype.

In embodiments, the third strand and the fourth strand are PCR amplified products.

The multiplexes of the invention can be present in solution, on a solid support, in vitro or in vivo. The solid support can be electrically conductive (e. g., an electrode) or non-conductive.

Quadruplex formation according to the invention is suitable for a variety of uses. For example, double-stranded probes covalently bound to a double-stranded nucleic acid cleaving agent can be used to specifically cleave target sequences of double stranded nucleic acids. Double-stranded probes covalently bound to a chemotherapeutic agent can be used to specifically treat target sequences of double-stranded nucleic acids. Thus, the invention encompasses multiplex structures further comprising a therapeutic, prophylactic or diagnostic agent bound to at least one of the first, second, third and fourth strands.

In addition, multiplexes of the invention are suitable for use in nanoengineering, such as to provide electrical circuitry on a molecular (i. e., nanoscale) level. Further details regarding nanoengineering with nucleic acids can be found in U. S.

Patent No. 5,948,897 to Sen et al. and the references cited therein.

Multiplex structures of the invention can be provided by a method comprising: providing a hybridization medium comprising the first strand, the second strand, the third strand, the fourth strand, water, a buffer and a promoter; and incubating the hybridization medium for an incubation time effective to hybridize the second strand to the fourth strand.

The hybridization medium can include any conventional medium known to be suitable for preserving nucleotides. See, e. g., Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Lab Manual," Vol. 2 (1989). For example, the medium can comprise nucleotides, water, buffers and standard salt concentrations. When divalent

cations are used exclusively to promote quadruplex formation, chelators such as EDTA or EGTA should not be included in the reaction mixtures.

Specific binding between complementary bases occurs under a wide variety of conditions having variations in temperature, salt concentration, electrostatic strength, and buffer composition.

Examples of these conditions and methods for applying them are known in the art.

Unlike many Hoogsteen-type multiplexes, which are unstable or non-existent at pH levels above about 7.6, the Watson-Crick multiplexes of the invention are stable over a wide range of pH levels, preferably from about pH 5 to about pH 9.

Moreover, the inventive multiplexes do not require the presence of homopyrimidine sequences or homopurine sequences, as in certain prior art quadruplexes. For example, the target sequence can contain 25% to 75% purine bases and 75% to 25% pyrimidine bases in any order.

It is preferred that multiplexes be formed at a temperature of about 5°C to about 25°C for about two hours or less. The incubation time is preferably less than five minutes, even at room temperature. Longer reaction times are not required, but incubation for up to 24 hours in most cases did not adversely affect the quadruplexes. The fast binding times of Watson-Crick quadruplexes of the invention contrast with the much longer binding times for Hoogsteen quadruplexes.

The promoter in the hybridization medium is preferably an intercalating agent or a cation. The intercalating agent can be, e. g., a fluorophore, such as a member selected from the group consisting of YOYO-1, TOTO-1, ethidium bromide, ethidium homodimer-1, ethidium homodimer-2 and acridine.

Suitable cations include, e. g., monovalent cations, such as Na^+ (preferably at a concentration of 50mM to 125mM), K^+ , and other alkali metal ions; divalent cations, such as alkaline earth metal ions (e. g., Mg^{+2} and Ca^{+2}) and divalent transition metal ions (e.g., Mn^{+2} , Ni^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} and Zn ; and cations having a positive charge of at least three, such as Co^{+3} (RTI $(\text{NH}_3)_6^{+3}$, trivalent spermidine and tetravalent spermine. Mn^{+2} is preferably provided at a concentration of 10mM to 45mM. Mg^{+2} is preferably provided at a concentration of 10mM to 45mM. Ni^{+2} is preferably provided at a concentration of about 20mM. In embodiments, Mg^{+2} and Mn^{+2} are provided in combination at a concentration of 10mM each, 15mM each, 20mM each, 25mM each, 30mM each, 35mM each, or 40 mM each (i. e., 10-40 mM each).

The amount of cation added to the medium in which the multiplex forms depends on a number of factors, including the nature of the cation, the concentration of probe, the concentration of target, the presence of additional cations and the base content of the probe and target. The preferred cation concentrations and mixtures can routinely be discovered experimentally.

Although not required, other promoters include, e. g., single stranded binding proteins such as RecA protein, T4 gene 32 protein, *E. coli* single stranded binding protein, major or minor nucleic acid groove binding proteins, viologen and additional intercalating substances such as actinomycin D, psoralen, and angelicin. Such facilitating reagents may prove useful in extreme operating conditions, for example, under abnormal pH levels or extremely high temperatures.

The invention also enables a method in which hybridization of the second strand to the fourth strand inactivates an activity associated with at least one of the third strand and the fourth strand. Thus, at least one of the first strand and the second strand further comprises a pharmaceutical agent, wherein hybridization of the second strand to the fourth strand places the pharmaceutical agent an effective distance from a target on

the third strand, the fourth strand or on another molecule associated with at least one of the third strand and the fourth strand. The pharmaceutical agent is preferably a member selected from the group consisting of nucleic acids designed to bind promoter sequences of clinically relevant genes, nucleic acids designed to bind clinically relevant genes, or nucleic acids designed to bind origin of replication sites of pathogens.

In preferred embodiments, the invention provides a rapid, sensitive, environmentally friendly, and safe method for assaying binding between a single-stranded or double-stranded target and a double-stranded probe, wherein the target comprises a nucleic acid sequence or a nucleic acid analogue sequence and the probe comprises a nucleic acid sequence or a nucleic acid analogue sequence.

The inventive assay can be used to, e.g., identify accessible regions in folded nucleotide sequences, to determine the number of mismatched base pairs in a hybridization complex, and to map genomes.

The invention not only detects the presence of specific probe-target binding, but also provides qualitative and quantitative information regarding the nature of interaction between a probe and target. Thus, the invention enables the practitioner to distinguish among a perfect match, a one base pair mismatch, a two base pair mismatch, a three base pair mismatch, a one base pair deletion, a two base pair deletion and a three base pair deletion arising between a sequence in the double-stranded probe and in a sequence in the double-stranded target.

Embodiments of the invention comprise calibrating the measured signal (e. g., fluorescence, chemiluminescence, electrochemiluminescence or electrical properties) for a first probe-target mixture against the same type of signal exhibited by other probes combined with the same target, wherein each of the other probes differs from the first probe by at least one

base.

A calibration curve can be generated, wherein the magnitude of the measured signal (e. g., fluorescent intensity) is a function of the binding affinity between the target and probe.

As the binding affinity between the target and a plurality of different probes varies with the number of mismatched bases, the nature of the mismatch (es) (A-G vs. A-C vs. T-G vs. T-C, etc.), the location of the mismatch (es) within the quadruplex, etc., the assay of the invention can be used to sequence the target.

In embodiments, the signal measured can be the fluorescent emission intensity of a fluorophore included in the test sample.

In such embodiments, the binding affinity between the probe and target can be directly or inversely correlated with the emission intensity, depending on whether the fluorophore signals hybridization through signal quenching or signal amplification.

Under selected conditions, the fluorescent emission intensity generated by intercalating agents can be directly correlated with probe-target binding affinity, whereas the emission intensity of preferred embodiments employing a non-intercalating fluorophore covalently bound to the probe can be inversely correlated with probe-target binding affinity. The fluorescent emission intensity decreases for non-intercalating fluorophores as the extent of matching between the probe and target increases, preferably over a range inclusive of 0-2 mismatches and/or deletions, more preferably over a range inclusive of 0-3 mismatches and/or deletions.

The invention enables quantifying the binding affinity between probe and target. Such information can be valuable for a

variety of uses, including designing antisense drugs with optimized binding characteristics.

The assay of the invention is preferably homogeneous. The assay can be conducted without separating the probe-target complex from the free probe and free target prior to detecting the magnitude of the measured signal. The assay does not require a gel separation step, thereby allowing a great increase in testing throughput. Quantitative analyses are simple and accurate. Consequently the binding assay saves a lot of time and expense, and can be easily automated. Furthermore, it enables binding variables such as buffer, pH, ionic concentration, temperature, incubation time, relative concentrations of probe and target sequences, intercalator concentration, length of target sequences, length of probe sequences, and possible cofactor (i. e., promoter) requirements to be rapidly determined.

The assay can be conducted in, e. g., a solution within a well or microchannel, on an impermeable surface or on a biochip.

In certain embodiments, the third and fourth strands are provided in the hybridization medium before the first and second strands, and the first and second strands are provided in dehydrated form prior to rehydration by contact with the hybridization medium.

Moreover, the inventive assay is preferably conducted without providing a signal quenching agent on the target or on the probe.

Although the inventors have previously disclosed the advantages of fluorescent intensity assays for hybridization (see, e.g., U. S. Patent Application No. 09/224, 505, filed December 31, 1998), certain embodiments of the inventive assay specifically detect quadruplexes of the probe and the double-stranded target, thus obviating the need to denature the target. It is surprising that the inventors have been able to

specifically assay quadruplexes formed between double-stranded probes and double-stranded targets, wherein the interaction between the probes and targets is based on Watson-Crick base pairing (at least in the sense that A binds to T (or U, in the case of RNA) and G binds to C), rather than the very limited Hoogsteen model of quadruplex hybridization of, e.g., Pitner et al., supra.

Suitable probes for use in the inventive assay include, e.g., dsDNA, dsRNA, DNA: RNA hybrids, dsPNA, PNA: DNA hybrids and other double-stranded nucleic acid analogues having uncharged or partially-charged backbones. Probe sequences having any length from 8 to 20 bases are preferred since this is the range within which the smallest unique DNA sequences of prokaryotes and eukaryotes are found. Probes of 12 to 18 bases are particularly preferred since this is the length of the smallest unique sequences in the human genome. In embodiments, probes of 5 to 30 bases are most preferred. However, a plurality of shorter probes can be used to detect a nucleotide sequence having a plurality of non-unique target sequences therein, which combine to uniquely identify the nucleotide sequence. The length of the probe can be selected to match the length of the target.

The instant invention does not require the use of radioactive probes, which are hazardous, tedious and time-consuming to use, and need to be constantly regenerated.

Probes of the invention are preferably safe to use and stable for years. Accordingly, probes can be made or ordered in large quantities and stored.

In embodiments, the probe is labeled with a multi-molecule signaling complex or a redox pair, or with a label that elicits chemiluminescent or electrochemiluminescent properties.

When a fluorescent intercalator is not present in the hybridization medium, it is preferred that the probe or target

(preferably the probe) have a fluorescent label covalently bound thereto. The label is preferably a non-intercalating fluorophore or an intercalating fluorophore. In such embodiments, the fluorophore is preferably bound to the probe at either end.

Preferred fluorescent markers include biotin, rhodamine, acridine and fluorescein, and other markers that fluoresce when irradiated with exciting energy.

The excitation wavelength is selected (by routine experimentation and/or conventional knowledge) to correspond to this excitation maximum for the fluorophore being used, and is preferably 200 to 1000 nm. Fluorophores are preferably selected to have an emission wavelength of 200 to 1000 nm. In preferred embodiments, an argon ion laser is used to irradiate the fluorophore with light having a wavelength in a range of 400 to 540 nm, and fluorescent emission is detected in a range of 500 to 750 nm.

The assay of the invention can be performed over a wide variety of temperatures, such as, e.g., from 5°C to 85°C. Certain prior art assays require elevated temperatures, adding cost and delay to the assay. On the other hand, the invention can be conducted at room temperature or below (e.g., at a temperature below 25°C).

The reliability of the invention is independent of guanine and cytosine content in said target. Since G-C base pairs form three hydrogen bonds, while A-T base pairs form only two hydrogen bonds, target and probe sequences with a higher G or C content are more stable, possessing higher melting temperatures.

Consequently, base pair mismatches that increase the GC content of the hybridized probe and target region above that present in perfectly matched hybrids may offset the binding weakness associated with a mismatched probe.

The inventive assay is extremely sensitive, thereby obviating the need to conduct PCR amplification of the target.

For example, it is possible to assay a test sample having a volume of about 20 microliters, which contains about 10 femtomoles of target and about 10 femtomoles of probe.

Embodiments of the invention are sensitive enough to assay targets at a concentration of $5 \times 10^{-9}M$, preferably at a concentration of not more than $5 \times 10^{-1}M$. Embodiments of the invention are sensitive enough to employ probes at a concentration of $5 \times 10^{-9}M$, preferably at a concentration of not more than $5 \times 10^{-1}M$. It should go without saying that the foregoing values are not intended to suggest that the method cannot detect higher concentrations.

The ratio of probe (e.g., first and second strands) to target (e.g., third and fourth strands) is 30: 1 to 1: 1, preferably about 10: 1.

The Examples will show that YOYO-1, a known minor groove inhabiting intercalator of duplex DNA, can facilitate and signal triplex association or binding of a DNA oligo with a duplex target, which is indicative of the degree of complementarity, as ascertained on the basis of Watson-Crick base pair recognition between the bases on the oligo and the bases of the complementary sequence in the duplex target.

The triplex binding observed can not be a version of the homopyrimidine triplex motif, well characterized in the literature, due to that complexes' requirement for high acid conditions. Similarly, if our typical wild type 33% GC content 15-mer oligo was evaluated as a binding partner to the "purine richstrand" in the duplex target, as is the requirement for the homopurine triplex motif, our oligo would be mismatched by 9 bases in either the oligo sequence or the putative binding site on the purine rich strand of the target duplex.

The YOYO-1 intercalator has been reported by Johansen and Jacobsen (1998) as inhabiting the minor groove of duplex DNA based upon NMR spectroscopic studies. It is also reported that YOYO-1 acted to locally decondense the B conformation of the duplex DNA by 106 resulting in an overall helical repeat of 13 base pairs rather than the 10 base pairs usually found in a B conformation helical repeat.

As a fluorophore, YOYO-1's emission was greatly enhanced by the addition of complementary oligo to the medium bearing the duplex target. The enhanced emission associated with the interaction of the oligo and the duplex can be credited either to the YOYO-1 being present in the duplex minor groove and emitting light more energetically upon the contacting of the oligo with the duplex or to the YOYO-1 finding a second hospitable place to locate itself in the groove created by the oligo and the complementary strand in the duplex when the respective bases thereof contact one another. It is also possible that both events are occurring. Further studies, such as X-ray crystallography and NMR spectroscopy will establish the possible locations and interactions of YOYO-1 with the Natural Triplex.

Johansen and Jacobsen (1998) concluded that the decondensation of the duplex DNA by 106 is caused by the bisintercalation of the YOYO-1 chromophore while the polypropylene amine linker chain remains in the minor groove of the duplex.

This may be part of the mechanism whereby the target is decondensed 106, a relaxation which will be expressed out from the site of the YOYO-1 interaction in both directions. It may also be possible that the +4 cationic nature of YOYO-1 located in the minor groove between the backbone of the duplex results in relaxation of the repulsion between the phosphate anionic charges in the immediate vicinity of the YOYO-1 binding site, causing the backbone strands to move closer to one another in the vicinity of the YOYO-1. Should a second YOYO-1 locate itself

near a YOYO-1 present in the duplex minor groove, by inhabiting the groove created by the oligo and the complementary strand when contacting one another in the minor groove, that YOYO-1 would also act in reducing the anionic repulsion between the oligo backbone and the complementary sequence's region of the backbone.

We also observed that reagents, which condense duplex DNA have the ability to facilitate triplex formation. In addition to the well-known ability of monovalent, divalent, and multivalent cations to condense duplex DNA, our results suggest that cations form bridges which make possible binding between bases in the oligo and bases in the complementary strand of the duplex. We showed this by first forming triplexes facilitated by cations and then destroying the bridging structures. The result of continued lasing of the medium in which the cations and triplex were present was the rapid disappearance of all triplex structures.

Our experience with triplexes facilitated by YOYO-1 is that they are readily formed at room temperature and persist for many hours when formed. Over time, mismatched oligos continue the same lower level of fluorophore emission indicating the same level of triplex formation. Cations on the other hand appear to result in transitory conditions, which are conducive to triplex or quadruplex formations. The cations included intercalators such as YOYO-1, metal center cations such as $MgCl_2$ or cationic peptides such as spermidine, all of which act on the conformation by interacting with anionic charges to result in the modification of the conformation of the duplex DNA target. The results varied with cation species, concentration or the presence of several species at varying concentrations.

We have shown that appropriate concentrations of organic solvents allow modification of the target duplex DNA, which allows triplexes to occur.

The transitory nature of much of triplex and quadruplex formation is congruent with the organism's requirement that many processes involving the accessing of sequence information from duplex DNA be easily reversible that is activated and terminated. Nevertheless, such formations are sufficiently stable so that diagnostic and other assays can be based upon them.

We have therefore discovered that it is condensation or decondensation of the duplex DNA by whatever means, which makes possible recognition between the oligo and the complementary sequence sufficient to achieve a contacting of at least one base on the oligo with a base in the complementary strand of the duplex target. There are probably a number of departures from the position usually enjoyed by adjacent base pairs in a sequence when the size of the helical repeat is modified by condensation or decondensation. This realignment of stacked base pairs in the modified helix most likely allows for a sufficient change in electron orbits from that present within the base stack of an unmodified double helix, to allow binding of the third strand to the complementary strand to commence.

Duplex modification by either condensation or decondensation may occur in a rather homogeneous fashion with all anionic charges in the dsDNA and vicinity affected at generally the same time or the modification may be localized. In the latter case, a series of greatly varying modifications will occur in the DNA base pairs and backbones progressively distant from the locus of modification. In either case conditions can be created to allow a binding event between a base on the oligo and a base in the complementary strand of the duplex to generate triplex pairing.

Once such a binding has been initiated it can be understood how the two flanking sequences of bases on the oligo might be swung into position to bind to bases in the flanking sequences of the complementary strand of the duplex.

While our experiments show great stability in the triplexes facilitated by YOYO-1, many other reagents have effects on the conformation of the duplex DNA, which result in Natural Triplexes being formed transiently. These triple helix structures continue to progress into conformations which are less favorable to triplex maintenance, resulting in loss of the triplex structure.

Any agent capable of acting to modify the conformation of target dsDNA must be monitored as to its effects over time to establish concentrations and incubation times suitable in the conditions of temperature, pH, etc. selected. This application teaches many methods of evaluating such reagents, which can be used or modified by those skilled in the art so as to practice what is herein taught.

The invention will be illustrated in more detail with reference to the Examples that follow, but it should be understood that the present invention is not deemed to be limited thereto.

EXAMPLES

The invention will be illustrated in more detail with reference to the following Examples, but it should be understood that the present invention is not deemed to be limited thereto.

Example 1

Example 1 demonstrates that the assay of the invention can discriminate between perfectly complementary dsDNA: ssDNA complexes and dsDNA: ssDNA complexes containing 1 bp, 2 bp and 3 bp mismatches or deletions when a cationic DNA intercalator, YOYO-1 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), is present. NMR spectroscopic analyses of the mechanism of interaction between YOYO-1 and dsDNA have shown that the intercalation of YOYO-1 results in a localized decondensation of the dsDNA helix by 106

generating an overall helical repeat of 13 base pairs as opposed to the normal 10 base pair helical repeat in non-condensed B conformation dsDNA [J. Biomolec. Struct. and Dynamics 16, 205-222 (1998)].

Complementary sense and antisense 50-mer ssDNA target sequences, derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene [Nature 380, 207 (1996)] were synthesized on a DNA synthesizer (Expedite 8909, PerSeptive Biosystems) and purified by HPLC.

Equimolar amounts of the complementary oligonucleotides were heated at 95°C for 10 min and allowed to anneal gradually as the temperature cooled to 21°C over 1.5 hours. DsDNA oligonucleotides were dissolved in ddH₂O at a concentration of 1 pmole/ 1.

Sequence for the sense strand of the wild-type target DNA (SEQ ID NO :1) was: 5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT CAT CTT TGG TGT TTC
CTA TGA TGA ATATA-3'

Sequence for the antisense strand of the wild-type target DNA (SEQ ID NO :1) was: 5'-TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC CAA AGA TGA TAT TTT CTT TAA TGG TGCCA-3'

SEQ ID NO : 2 was a 50-mer mutant dsDNA target sequence identical to wild-type target DNA (SEQ ID NO :1) except for a one base pair mutation (underlined) at amino acid position 507 at which the wild-type sense strand sequence CAT was changed to CGT.

Sequence for the sense strand of SEQ ID NO: 2 was: 5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT CGT CTT TGG TGT TTC CTA TGA TGA ATATA-3'
Sequence for the antisense strand of SEQ ID NO : 2 was: 5'-TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC CAA AGA CGA TAT TTT CTT TAA TGG TGCCA-3'

SEQ ID NO : 3 was a 50-mer mutant dsDNA target sequence

identical to wild-type target DNA (SEQ ID NO :1) except for a consecutive two base pair mutation (underlined) at amino acid positions 506 and 507 at which the wild-type sense strand sequence CAT was changed to ACT.

Sequence for the sense strand of SEQ ID NO : 3 was: 5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT ACT CTT TGG TGT TTC CTA TGA TGA ATA TA-3'
Sequence, for the antisense strand of SEQ ID NO : 3 was: 5'-TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC CAA AGA GTA TAT TTT CTT TAA TGG TGCCA-3'

SEQ ID NO : 4 was a 50-mer mutant dsDNA target sequence identical to wild-type target DNA (SEQ ID NO :1) except for a consecutive three base pair mutation (underlined) at amino acid positions 506 and 507 at which the wild-type sense strand sequence CAT was changed to ACG.

Sequence for the sense strand of SEQ ID NO : 4 was: 5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT ACG CTT TGG TGT TTC CTA TGA TGA ATATA-3'
Sequence for the antisense strand of SEQ ID NO : 4 was: 5'-TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC CAA AGC GTA TAT TTT CTT TAA TGG TGCCA-3'

SEQ ID NO : 5 was a 47-mer mutant dsDNA target sequence identical to wild-type target DNA (SEQ ID NO :1) except for a consecutive three base pair deletion (indicated by three dots) at amino acid positions 507 and 508 at which the wild-type sense strand sequence CTT is deleted.

Sequence for the sense strand of SEQ ID NO :5 was: 5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT CAT... TGG TGT TTC CTA TGA TGA ATA TA-3'
Sequence for the antisense strand of SEQ ID NO : 5 was: 5'-TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC CA... A TGA TAT TTT CTT TAA TGG TGCCA-3'

Probe No. 1 was a 15-mer ssDNA probe designed to be completely complementary to a 15 nucleotide segment of the sense strand of the 50-mer wild-type target DNA (SEQ ID NO :1), overlapping amino acid positions 505 to 510 [Nature 380,207(1996)]. The chirality of the probe was opposite or antiparallel to that of the sense strand in the target. Probe No.1 was synthesized on a

DNA synthesizer, purified by HPLC, and dissolved in ddH₂O at a concentration of 1 pmole/. 1.

Sequence for Probe No.1 was: 5'-CAC CAA AGA TGATAT-3'. The hybridization reaction mixture (120 μ l) contained the following : 6 pmol of target dsDNA, 6 pmol of ssDNA probe, 0.5 x TBE and 500 nM of the DNA intercalator YOYO-1 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). The reaction mixtures were incubated at room temperature (21°C) for 5 minutes, placed into a quartz cuvette, irradiated with an argon ion laser beam having a wavelength of 488 nm and monitored repeatedly for fluorescent emission as the temperature increased with time, in a heated chamber. Concurrent temperature measurements of the samples were achieved by a software-controlled temperature probe placed directly into each sample. Maximum fluorescent intensities were plotted as a function of temperature for each sample analyzed.

Figure 1 illustrates that the highest fluorescent intensities were achieved when the wild-type 50-mer non-denatured dsDNA target sequence (SEQ ID NO :1) was reacted with the 15-mer ssDNA Probe No. 1 from 30°C to 85°C. At temperatures below 65°C, the T_m of the 50-mer wild-type dsDNA, dsDNA: ssDNA complexes were formed, enhanced by the DNA intercalator YOYO-1. As the temperature increased above 65°C, the dsDNA: ssDNA complexes converted to ssDNA: ssDNA complexes. Clearly YOYO-1 was able to intercalate and fluoresce efficiently in both types of complexes.

In contrast, incompletely complementary probe and target combinations generating a 1 bp mismatch (SEQ ID NO : 2 + Probe No. 1), a consecutive 2 bp mismatch (SEQ ID NO : 3 + Probe No. 1), a consecutive 3 bp mismatch (SEQ ID NO : 4 + Probe No. 1) and a 3 bp deletion (SEQ ID NO : 5 + Probe No. 1) resulted in fluorescent intensities that were 57%, 94%, 97% and 98% lower at 30°C, and 47%, 79%, 92% and 91% lower at 65°C, respectively, than that observed with the perfectly matched sequences (Fig.1). Control samples comprising 50-mer dsDNA targets plus 500 nM YOYO-1 exhibited levels of fluorescence which were at or

below the level of fluorescence observed with 3 bp mismatched complexes at 30°C (data not shown). The level of fluorescence emitted by the ssDNA probe No. 1 plus 500 nM YOYO-1 sample was identical to that emitted by YOYO-1 alone (data not shown). As the temperature increased above 65°C, the degree of discrimination between perfect match and the base pair mismatches decreased, indicative of the gradual breakdown of the dsDNA: ssDNA structure. By 85°C, the fluorescent intensities achieved by a 1 bp mismatch, a 2 bp mismatch, a 3 bp mismatch and a 3 bp deletion were 40%, 63%, 92% and 83% lower than that obtained by the perfect match (Fig. 1).

At any given temperature, the characteristic level of fluorescence emitted by each complex was monitored over time and was stable between 5 minutes and 24 hours.

The presence of the DNA decondensing agent, YOYO-1, allowed a ssDNA probe to be used to differentiate between perfectly complementary dsDNA: ssDNA complexes and those containing 1 bp, 2 bp or 3 bp mismatches or deletions, without the requirement for prior denaturation of dsDNA targets.

Example 2

To ensure that the fluorescent intensity assay using a DNA decondensing agent, ssDNA probes and non-denatured dsDNA targets, would apply to probe and target DNAs possessing dramatically different percent GC contents (and potentially different annealing temperatures), new 15-mer ssDNA probes and 50-mer dsDNA target sequences were synthesized, purified and annealed as above. Both ssDNA probes and dsDNA targets were dissolved in ddH₂O at a concentration of 1 pmole/. 1.

SEQ ID NO : 6 was a 50-mer dsDNA target sequence modified from SEQ ID NO : 1, wherein the percent GC content was changed from 30% to 52%.

Sequence for the sense strand of the wild-type target DNA (SEQ ID NO : 6) was: 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CAT CTC TGG TGT

GTC

CTA CGA TGA CTCTG-3'

Sequence for the antisense strand of the wild-type target DNA (SEQID NO : 6) was :5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGCTC-3'

SEQID NO : 7 was a 50-mer mutant dsDNA target sequence identical to SEQ ID NO : 6, except for a one base pair mutation (underlined), at which the sense strand sequence CTC was changed to CTT.

Sequence for the sense strand of mutant SEQID NO : 7 was:5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CAT CTT TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTCTG-3'

Sequence for the antisense strand of mutant SEQ ID NO : 7 was: 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAA AGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGCTC-3'

SEQID NO : 8 was a 50-mer mutant dsDNA target sequence identical to SEQ ID NO : 6, except for a one base pair mutation (underlined), at which the sense strand sequence CAT was changed to CGT.

Sequence for the sense strand of mutant SEQID NO : 8 was: 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CGT CTC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTCTG-3'

Sequence for the antisense strand of mutant SEQ ID NO : 8 was: 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA CGA CAG TGT CTG TCA TGG TGCTC-3' .

SEQ ID NO : 9 was a 50-mer mutant dsDNA target sequence identical to SEQ ID NO : 6, except for a one base pair mutation (underlined), at which the sense strand sequence CAT was changed to CTT.

Sequence for the sense strand of mutant SEQ ID NO : 9 was: 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CTT CTC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTCTG-3'

Sequence for the antisense strand of mutant SEQ ID NO : 9 was: 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA AGA CAG TGT CTG TCA TGG TGCTC-3'

SEQ ID NO : 10 was a 50-mer mutant dsDNA target sequence identical to SEQ ID NO : 6, except for a one base pair mutation (underlined), at which the sense strand sequence CTC was changed to CCC.

Sequence for the sense strand of mutant SEQ ID NO : 10 was: -53- 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CAT CCC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTCTG-3'

Sequence for the antisense strand of mutant SEQ ID NO : 10 was: 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG GGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGCTC-3'

SEQ ID NO : 11 was a 50-mer mutant dsDNA target sequence identical to SEQ ID NO : 6, except for a one base pair mutation (underlined), at which the sense strand sequence CTC was changed to CGC.

Sequence for the sense strand of mutant SEQ ID NO : 11 was: 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CAT CGC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTCTG-3'

Sequence for the antisense strand of mutant SEQ ID NO : 11 was: 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG CGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGCTC-3'

SEQ ID NO : 12 was a 50-mer mutant dsDNA target sequence identical to SEQ ID NO : 6, except for a consecutive two base

pair mutation (underlined), at which the sense strand sequence CAT was changed to ACT.

Sequence for the sense strand of mutant SEQ ID NO : 12 was: 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT ACT CTC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTCTG-3'

Sequence for the antisense strand of mutant SEQ ID NO : 12 was :5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA GTA CAG TGT CTG TCA TGG TGCTC-3'

SEQ ID NO : 13 was a 50-mer dsDNA target sequence modified from SEQ ID NO :1, wherein the percent GC content was changed from 30% to 72%.

Sequence for the sense strand of the wild-type target DNA (SEQ ID NO : 13) was: 5'-GAG CAC CCT CCC AGG CAC GGT CGT CCC TGG TGC GAC CTC CGA CGA GCGTG-3'

Sequence for the antisense strand of the wild-type target DNA (SEQ ID NO : 13) was: 5'-CAC GCT CGT CGG AGG TCG CAC CAG GGA CGA CCG TGC CTG GGA GGG TGCTC-3'

SEQ ID NO : 14 was a 50-mer mutant dsDNA target sequence identical to SEQ ID NO : 13, except for a one base pair mutation (underlined), at which the sense strand sequence CGT was changed to CAT.

Sequence for the sense strand of mutant SEQ ID NO : 14 was: 5'-GAG CAC CCT CCC AGG CAC GGT CAT CCC TGG TGC GAC CTC CGA CGA GCGTG-3'

Sequence for the antisense strand of mutant SEQ ID NO : 14 was:5'-CAC GCT CGT CGG AGG TCG CAC CAG GGA TGA CCG TGC CTG GGA GGG TGCTC-3'

SEQ ID NO : 15 was a 50-mer mutant dsDNA target sequence

identical to SEQ ID NO : 13, except for a consecutive two base pair mutation (underlined), at which the sense strand sequence CGT was changed to ATT.

* Sequence for the sense strand of mutant SEQ ID NO : 15 was:
5'-GAG CAC CCT CCC AGG CAC GGT ATT CCC TGG TGC GAC CTC CGA CGA
GCGTG-3'

Sequence for the antisense strand of mutant SEQ ID NO : 15
was: 5'-CAC GCT CGT CGG AGG TCG CAC CAG GGA ATA CCG TGC CTG GGA
GGG TGCTC-3'

Probe No. 2 was a 15-mer ssDNA probe designed to be completely complementary to a 15 nucleotide segment of the sense strand of the 50-mer wild-type target DNA (SEQ ID NO : 6). The chirality of the probe was opposite or antiparallel to that of the sense strand in the target.

Sequence for Probe No. 2 was: 5'-CAC CAG AGA TGA CAG-3'
Probe No. 3 was a 15-mer ssDNA probe designed to be completely complementary to a 15 nucleotide segment of the sense strand of the 50-mer wild-type target DNA (SEQ ID NO : 13). The chirality of the probe was opposite or antiparallel to that of the sense strand in the target.

Sequence for Probe No. 3 was: 5'-CAC CAG GGA CGACCG-3'
The hybridization assay conditions were identical to that described in Example 1.

When the ssDNA Probe No. 2 (with a 53% GC content) was reacted with the 50-mer wild-type dsDNA target (SEQ ID NO : 6) and mutant dsDNA targets (SEQ ID NO : 8 and SEQ ID NO : 12), dsDNA: ssDNA complexes were formed at low temperatures under non-denaturing conditions (Fig. 2A). While perfectly matched DNA complexes achieved the highest fluorescent intensities, incompletely complementary complexes with a 1 bp mismatch (SEQ

ID NO : 8 + Probe No. 2) and a consecutive 2 bp mismatch (SEQ ID NO : 12 + Probe No.2) produced fluorescent intensities that were 63% and 95% lower, respectively, than that observed with the perfectly matched sequences at 30 C (Fig. 2A). As the temperature increased, the gradual breakdown of the dsDNA: ssDNA complex occurred, resulting in diminished fluorescent intensities and less discrimination between perfect match and the base pair mismatches. By 85 C, very little difference in fluorescence was seen between perfectly matched sequences and those containing base pair mismatches (Fig.2A).

Similarly, in the presence of YOYO-1, dsDNA: ssDNA complexes were formed when the ssDNA Probe No. 3 (possessing a 73% GC content) was reacted with the corresponding 50-mer wild-type dsDNA target (SEQ ID NO : 13) and mutant dsDNA targets (SEQ ID NO : 14 and SEQ ID NO : 15). The fluorescent intensities for a 1 bp mismatched DNA complex (SEQ ID NO : 14 + Probe No. 3) and a consecutive 2 bp mismatched DNA complex (SEQ ID NO : 15 + Probe No.3) were 48% and 64% lower, respectively, than that obtained by the perfectly matched sequences at 30 C (Fig. 2B). Fluorescence of all samples decreased as the temperature increased from 30 C to 85 C, indicative of diminished YOYO-1 binding and dsDNA: ssDNA complex breakdown.

Regardless of the percent GC content of the ssDNA probes and dsDNA targets, YOYO-1 was able to facilitate dsDNA: ssDNA complex formation under non-denaturing conditions, to allow accurate discrimination between perfectly complementary sequences and those containing 1 or 2 bp mutations.

Example 3

The next examples will demonstrate the specificity of the assay utilizing different DNA condensing agents to promote and stabilize complex formation with non-denatured dsDNA targets and ssDNA-F probes.

Probe No. 4 was a 15-mer antiparallel ssDNA probe identical to

Probe No. 1 except it had an attached fluorescein moiety at the 5' position. Probe No. 4 was synthesized on a DNA synthesizer, purified by HPLC, and dissolved in ddH₂O at a concentration of 1 pmole/ μ l.

Sequence for Probe No. 4 was: 5'-Flu-CAC CAA AGA TGA TAT-3'. The hybridization reaction mixture (401) contained the following: 0.4 pmoles of target dsDNA, 4 pmoles of 5'-fluorescein labeled ssDNA Probe No. 4, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 10 mM to 125 mM NaCl. The reaction mixtures were incubated at room temperature (21°C) for 1 hour, without prior denaturation of dsDNA targets. Samples were placed into a quartz cuvette, irradiated with an argon ion laser beam having a wavelength of 488 nm and monitored for fluorescent emission. The maximum fluorescent intensities occurred at a wavelength of 525 nm, the emission wavelength for fluorescein. The intensity of fluorescent emission was plotted as a function of wavelength for each sample analyzed.

In the absence of NaCl or presence of 10 mM or 25 mM NaCl, no binding between the dsDNA targets and the antiparallel ssDNA-F probe was detected (data not shown).

After a 1 hour incubation in the presence of 50 mM NaCl, dsDNA: ssDNA-F complexes consisting of perfectly complementary sequences (SEQ ID NO :1 + Probe No. 4) formed readily, resulting in a 49% decrease in fluorescent emission intensity compared to that emitted by the control Probe No. 4 (labeled ssDNA-F) (Fig.3). By contrast, incompletely complementary dsDNA: ssDNA-F complexes containing a 1 bp G-T mismatch (SEQ ID NO : 2 + Probe No.4) yielded a 1% decrease in fluorescent emission intensity compared to that exhibited by the Probe No. 4 control sample.

The presence of 75 mM, 100 mM and 125 mM NaCl in the reaction mixture also resulted in fluorescent emission quenching consistent with significant amounts of complex formation between the perfectly matched SEQ ID NO :1 target and

380

antiparallel Probe No. 4, and significantly less quenching when the 1 bp G-T mismatched SEQ IDN0, :, 2 target and Probe No. 4 were present, producing similar fluorescent intensities to that observed in the presence of 50 mM NaCl (data not shown).

Use of monovalent cations, which are known DNA condensing agents, facilitated DNA complex formation between non-denatured dsDNA targets and fluorescently labeled antiparallel ssDNA probes, to allow reliable differentiation between perfectly complementary DNA sequences and those containing a single 1 bp mismatch. The reaction occurred at room temperature within 1 hour of incubation at a ratio of probe to target of 10 to 1. The dsDNA targets and ssDNA probe used in this example contained a 33% GC content, and did not contain homopurine or homopyrimidine stretches of DNA. Despite the presence of 6 pyrimidine bases interspersed within the 15 nucleotide ssDNA probe, dsDNA: ssDNA complexes formed readily in a sequence specific manner.

Example 4

To ensure that the fluorescent intensity assay, which used 5'-fluorescein labeled ssDNA probes and non-denatured dsDNA targets in the presence of DNA condensing agents such as cations, would apply to probe and target DNAs possessing dramatically different percent GC contents (and potentially different annealing preferences), 15-mer ssDNA-F probes and 50-mer dsDNA target sequences (with varying percent GC contents) were synthesized, purified and annealed as above. Both ssDNA-F probes and dsDNA targets were dissolved in ddH₂O at a concentration of 1 pmole/μl.

Probe No. 5 was a 15-mer antiparallel ssDNA probe identical to Probe No. 2 except it had an attached fluorescein moiety at the 5' position.

Sequence for Probe No. 5 was: 5'-Flu-CAC CAG AGA TGA CAG-3'
Probe No. 6 was a 15-mer antiparallel ssDNA probe identical to

Probe No. 3 except it had an attached fluorescein moiety at the 5' position.

Sequence for Probe No. 6 was: 5'-Flu-CAC CAG GGA CGA CCG-3' The assays performed in Example 3 were facilitated by the addition of monovalent cations in the reaction mixtures. The specificity of the assay was further examined utilizing divalent cations (instead of monovalent cations) to promote complex formation with dsDNA targets and ssDNA-F probes possessing various percent GC contents.

The hybridization reaction mixture (40 μ l) contained the following: 0.4 pmoles of target dsDNA, 4 pmoles of 5'fluorescein labeled ssDNA probe, 10mM Tris-HCl, pH 7.5, and 5mM to 30mM MnCl₂ or 5mM to 30mM MgCl₂ or 5mM to 30mM NiCl₂. The reaction mixtures were incubated at room temperature (21°C) for 1 hour, without prior denaturation of dsDNA targets. Samples were placed into a quartz cuvette, irradiated with an argon ion laser beam having a wavelength of 488 nm and monitored for fluorescent emission. The maximum fluorescent intensities occurred at a wavelength of 525 nm, the emission wavelength for fluorescein. The intensity of fluorescent emission was plotted as a function of wavelength for each sample analyzed.

When the ssDNA-F Probe No. 5 (with a 53% GC content) was incubated with the 50-mer wild-type dsDNA target (SEQ ID NO : 6) and mutant dsDNA targets (SEQ ID NO : 7 to SEQ ID NO : 12) in the presence of 10mM MnCl₂, dsDNA : ssDNA-F complexes were formed at room temperature under non-denaturing conditions. While perfectly matched DNA complexes yielded the maximum decrease in fluorescent intensity (a 43% decrease after a 1 hour incubation), the less stable dsDNA : ssDNA-F complexes containing a 1 bp T-G mismatch (SEQ ID NO : 7 + Probe No. 5) produced a fluorescent intensity that was 20% lower than that observed with Probe No. 5 alone after a 1 hour incubation (Fig. 4). DsDNA : ssDNA-F complexes that resulted in a 1 bp G-T mismatch (SEQ ID NO : 8 +

352

Probe No. 5), a 1 bp T-T mismatch (SEQ ID NO : 9 + Probe No. 5), a 1 bp C-A mismatch (SEQ ID NO : 10 + Probe No. 5) and a consecutive 2 bp A-G and C-T mismatch (SEQ ID NO : 12 + Probe No. 5) were all less stable than the perfectly matched dsDNA: ssDNA-F complex (SEQ ID NO : 6 + Probe No. 5) yielding fluorescent intensities in between that observed for Probe No. 5 alone and that observed for the perfectly matched DNA complex (data not shown). Except for the 1 bp T-T mismatched dsDNA: ssDNA-F complex, which was the least stable (resulting in only a 5% decrease in fluorescent intensity after 1 hour), all of the other mismatched DNA complexes generated very similar fluorescent intensities. Only the dsDNA: ssDNA-F complex that contained a 1 bp G-A mismatch (SEQ ID NO : 11 + Probe No. 5) yielded a fluorescent intensity lower than that produced by the perfectly matched dsDNA: ssDNA-F complex (data not shown).

The inclusion of 20mM MgCl₂ or 20mM MnCl₂ or 20mM NiCl₂ also facilitated dsDNA: ssDNA-F complex formation when the ssDNA-F Probe No. 6 (possessing a 73% GC content) was reacted with the corresponding 50-mer wild-type dsDNA target (SEQ ID NO : 13) and mutant dsDNA target (SEQ ID NO : 14) for 1 hour (data not shown).

As expected, the perfectly matched dsDNA: ssDNA-F complexes generated the maximum decreases in fluorescent intensity, while the less stable 1 bp A-C mismatched dsDNA: ssDNA-F complexes (SEQ ID NO: 14 + Probe No. 6) produced intermediate levels of fluorescence (data not shown).

Perfectly matched dsDNA: ssDNA-F complexes (possessing a 33% GC content) (SEQ ID NO : 1 + Probe No. 4) formed readily within 1 hour in the presence of 10mM MnCl₂, resulting in a 57% decrease in fluorescent intensity compared to that emitted by Probe No. 4 alone (data not shown). These reaction conditions were highly unfavorable for dsDNA: ssDNA-F complexes that contained a 1 bp G-T mismatch (SEQ ID NO : 2 + Probe No. 4),

resulting in an increased fluorescence compared to that observed by Probe No. 4 alone (data not shown).

Regardless of the percent GC content of the dsDNA targets and ssDNA probes, the addition of divalent cations such as Mn, Mg+2 or Ni+2 promoted dsDNA: ssDNA complex formation under nondenaturing conditions, to allow accurate discrimination between perfectly complementary sequences and those containing 1 bp mutations.

Example 5

The dsDNA: ssDNA complex formation assays in Examples 3 and 4 were performed in the presence of one type of monovalent or divalent cation. The next Examples will demonstrate the reliability of the assay of the invention to differentiate between perfect matches and 1 bp mismatches in dsDNA: ssDNA complexes when combinations of divalent cations were used as promoting agents for complex formation.

The hybridization reaction mixture (40Al) contained the following: 0.4 pmoles of target dsDNA, 4 pmoles of 5'fluorescein labeled ssDNA probe, 10 mM Tris-HCL, pH 7.5, and 5mM to 20mM each of MgCl₂ and MnCl₂. The reaction mixtures were incubated at room temperature (21°C) for 1 hour, without prior denaturation of dsDNA targets. Samples were placed into a quartz cuvette, irradiated with an argon ion laser beam having a wavelength of 488 nm and monitored for fluorescent emission. The intensity of fluorescence was plotted as a function of wavelength for each sample analyzed.

When the antiparallel ssDNA-F Probe No. 6 (with a 73% GC content) was incubated for 1 hour with the 50-mer wild-type dsDNA target (SEQ ID NO : 13) in the presence of 20mM MgCl₂ and 20mM MnCl₂, perfectly complementary dsDNA: ssDNA-F complexes were formed efficiently, generating a 46% decrease in fluorescence compared to that emitted by Probe No. 6 alone (Fig. 5A). These reaction conditions were highly unfavorable

for dsDNA: ssDNA-F complexes that contained a 1 bp A-C mismatch (SEQ ID NO : 14 + Probe No. 6), resulting in a 3% reduction in fluorescence compared to that observed with Probe No. 6 alone (Fig. 5A). Very similar results were obtained when the same samples were incubated for 1 hour in the presence of 10mM MgCl₂ and 10mM MnCl₂, or 15mM MgCl₂ and 15 mM MnCl₂ (data not shown). The, addition of 5mM MgCl₂ and 5mM MnCl₂ was insufficient to allow complex formation between the antiparallel ssDNA-F Probe No. 6 and all dsDNA targets tested following a 1 hour incubation (data not shown).

When the antiparallel ssDNA-F Probe No. 4 (with a 33% GC content) was incubated with the wild-type dsDNA target (SEQ ID NO :1) or mutant dsDNA targets (SEQ ID NO : 2 and SEQ ID NO : 3), in the presence of 10mM MgCl₂ and 10mM MnCl₂, minimal DNA complex formation was observed (data not shown). However, incubation in the presence of 15mM MgCl₂ and 15mM MnCl₂ for 1 hour facilitated perfectly matched dsDNA: ssDNA-F (SEQ ID NO :1 + Probe No. 4) complex formation, as evidenced by the 49% decrease in fluorescent intensity observed, compared to that obtained by Probe No. 4 (Fig.5B). DsDNA: ssDNA-F complexes that resulted in a 1 bp G-T mismatch (SEQ ID NO : 2 + Probe No. 4) or a 3 bp deletion (SEQ ID NO : 3 + Probe No. 4) were very unstable in the presence of 15mM MgCl₂ and 15mM MnCl₂, yielding a 2% decrease in fluorescence and a 5% increase in fluorescence, respectively, compared to that emitted by Probe No. 4 alone (Fig.5B).

Treatment with 20mM MgCl₂ and 20mM MnCl₂ for 1 hour, resulted in a 68%, a 48% and a 6% reduction in fluorescence for perfectly matched dsDNA: ssDNA-F complexes, and for dsDNA: ssDNA-F complexes containing a 1 bp G-T mismatch or a 3 bp deletion, respectively, compared to that observed with Probe No. 4 alone (data not shown).

As illustrated in Fig.5C, in the presence of 10mM MgCl₂ and 10mM MnCl₂, the dsDNA: ssDNA-F complexes possessing a 53% GC

content and containing perfectly complementary sequences (SEQ ID

NO : 6 + Probe No. 5) or a 1 bp T-G mismatch (SEQ ID NO : 7 + ProbeNo. 5) generated fluorescent intensities after an 1 hour incubation that were 68% and 20% lower, respectively, than that emitted by the antiparallel Probe No. 5 alone.

When the antiparallel ssDNA-F Probe No. 5 (with a 53% GC content) was incubated for 1 hour with the 50-mer wild-type dsDNA target (SEQ ID NO : 6) in the presence of 15mM MgCl₂ and 15mM MnCl₂, perfectly complementary dsDNA : ssDNA-F complexes were formed very efficiently, generating a 74% decrease in fluorescence compared to that achieved by Probe No. 5 alone (Fig. 5D). By contrast, dsDNA: ssDNA-F complexes that contained a 1 bp T-G mismatch (SEQ ID NO : 7 + Probe No.5) were much less stable in the presence of 15mM MgCl₂ and 15mM MnCl₂, yielding a 15% decrease in fluorescence compared to that emitted by Probe No. 5 alone after a 1 hour incubation (Fig.5D). Similarly, dsDNA: ssDNA-F complexes that resulted in a 1 bp G-T mismatch (SEQ ID NO : 8 + Probe No. 5), a 1 bp C-A mismatch (SEQ ID NO : 10 + Probe No. 5), a 1 bp G-A mismatch (SEQ ID NO : 11 + Probe No. 5) and a consecutive 2 bp A-G and C-T mismatch (SEQ ID NO : 12 + Probe No.5) were all much less stable than the perfectly matched DNA complex (data not shown). When Probe No. 5 (containing a 53% GC content) was reacted with the dsDNA target SEQ ID NO : 3 (containing a 33% GC content), a 3% increase in fluorescence was observed compared to that obtained by Probe No. 5 alone (Fig.5D), indicative of no DNA complex formation. This result was expected considering this probe and target combination would result in a 5 bp mismatch.

Collectively, Examples 3, 4 and 5 demonstrated that the addition of condensing agents such as monovalent cations or divalent cations (on their own or in combination), promoted DNA complex formation between dsDNA targets and fluorescently-labeled ssDNA probes, possessing dramatically different percent GC contents, to allow accurate and reliable discrimination between perfectly complementary sequences and those containing

various 1 bp mutations.

Example 6

DsDNA: ssDNA complexes facilitated by YOYO-1 readily form at room temperature within 5 minutes of incubation and generate fluorescent emissions at the same level of intensity for hours.

Complexes containing base pair mismatches similarly emit fluorescent signals, which persist, indicating the same level of complex formation over time. To examine the rate of formation, stability and rate of disassociation of dsDNA: ssDNA complexes formed in the presence of condensing agents such as cations, time course experiments were performed.

The hybridization reaction mixture (40/tel) contained the following: 0.4 pmoles of non-denatured target dsDNA, 4 pmoles of 5'-fluorescein labeled ssDNA probe, 10mM Tris-HCL, pH 7.5, and 10 mM MgCl₂ and 10mM MnCl₂. The reaction mixtures were incubated at room temperature (21°C) for various periods ranging from 1 minute to 2 hours. Following incubation, samples were placed into a quartz cuvette, irradiated once with an argon ion laser beam having a wavelength of 488 nm and monitored for fluorescent emission. Further fluorescent measurements were taken of the same samples after subsequent multiple laser irradiation, at the indicated times (Fig. 6). The intensity of fluorescence was plotted as a function of time for each sample analyzed.

The fluorescence emitted by control samples comprising 4 pmoles of Probe No. 5 plus 10mM MgCl₂ and 10mM MnCl₂, in the absence of target dsDNA, dramatically decreased 3-fold within just 5 minutes of incubation (data not shown), and then steadily declined at a much slower rate within the next few hours (Fig. 6A). This effect we refer to as "Cationic Quench". This inhibition of fluorescence, associated with increased incubation periods of ssDNA-F probes with specific cations, occurred routinely in the presence of divalent cations, but not in the presence of monovalent cations (data not shown). This

observation makes evident the importance of incubating the control sample in an experiment under exactly the same conditions that the test samples of an experiment are reacted. Multiple lasing of each ssDNA-F control sample after varying periods of incubation inhibited further quenching of the fluorophore, resulting in a steady level of fluorescence thereafter (Fig. 6A).

This result was entirely unanticipated.

When the antiparallel ssDNA-F Probe No. 5 was incubated with the 50-mer wild-type dsDNA target (SEQ ID NO : 6) in the presence of 10mM MgCl₂ and 10mM MnCl₂, dsDNA: ssDNA-F complex formation was evident after 15 minutes of incubation resulting in a decrease in fluorescence, which was 6% greater than the progressive cationic quench of the control Probe No. 5 (Fig. 6B).

Complex formation was greatly indicated after 30 and 60 minutes of incubation of SEQID NO : 6 with Probe No. 5 in the presence of 10mM MgCl₂ and 10mM MnCl₂, generating a 76% and 61% decrease in fluorescence, respectively, compared to that achieved by the cationically quenched Probe No. 5 alone (Fig. 6B). After 90 and 120 minutes of incubation in the presence of 10mM MgCl₂ and 10mM MnCl₂, no complex formation was being signaled (Fig. 6B). The level of fluorescent emission seen at 90 and 120 minutes was wholly attributable to the cationic quench effect (compare Figs. 6A and 6B).

By contrast, dsDNA: ssDNA-F complexes that contained a 1 bp T-G mismatch (SEQ ID NO : 7 + Probe No. 5) formed at a slower rate and were much less stable once formed in the presence of 10 mM MgCl₂ and 10mM MnCl₂. The 1 bp T-G mismatched complex was first observed after 30 minutes of incubation, and appeared to have been eliminated after 60 minutes of incubation (Fig. 6C). Once again, the probe was antiparallel to the complementary strand in the duplex (Fig. 6C).

Multiple laser irradiation of perfectly complementary dsDNA:ssDNA-F complexes (SEQ ID NO : 6 + Probe No. 5) formed after 30 minutes or 60 minutes of incubation in the presence of 10mM MgCl₂ and 10mM MnCl₂ resulted in fluorescent emissions consistent with the destruction of these complexes at a rate characteristic for DNA complexes containing an antiparallel ssDNA probe (Fig.6B). When a subsequent measurement was made at 45 minutes after lasing of the perfectly complementary complex at 30 minutes, the emission intensity level was 1869, testimony to the rapidity with which the complex was destroyed (data not shown). The level of fluorescent emission, after multiple lasing, returned to the cationically quenched values observed by the uncomplexed Probe No. 5 alone control (compare Figs. 6A and 6B). The only exception was the perfectly matched complexes formed after 15 minutes of incubation and repeated irradiated thereafter (Fig.6B). In this case the fluorescent emission was not consistent with the destruction of the complexes (Fig. 6B), even though further cationic quench of Probe No. 5, when multiply irradiated after a 15 minute incubation, was totally inhibited (Fig. 6A).

DsDNA: ssDNA-F complexes containing a 1 bp T-G mismatch (SEQ ID NO : 7 + Probe No. 5) were similarly apparently destroyed by multiple lasing (Fig. 6C).

An experiment was performed to determine the basis for the effect of multiple lasing on the complexes. It was found that when fresh cations were added to the reaction mixture which had been lased twice, the inhibition of cationic quench in fluorescence emitted by the ssDNA-F probe could not be reversed and further cationic quench did not occur upon further incubation, strongly suggesting that the ssDNA-F probe was inactivated by multiple irradiation, by a yet unknown mechanism (data not shown). Similarly, when fresh ssDNA-F probes were added to the reaction mixture which had been lased twice, after normalizing for the increased fluorescent emission of the fresh probe, no subsequent progressive cationic

quenching was observed upon further incubation of the reaction mixture, strongly suggesting that the lased cations were somehow disabled (data not shown).

Example 7

Examples 1-6 demonstrated dsDNA: ssDNA complex formation in a sequence specific manner between dsDNA targets and ssDNA probes facilitated by either DNA decondensing agents such as YOYO-1 or by DNA condensing agents such as monovalent or divalent cations.

The next examples will examine the rate of formation, stability and rate of disassociation of dsDNA: dsDNA complexes formed in the presence of various cations. These examples will show how the species of cation, the concentration of each cation, and the combination of different cations at different concentrations influence the rate of formation, stability and rate of disassociation of dsDNA: dsDNA complexes formed.

Complementary sense and antisense 15-mer ssDNA probe sequences were synthesized on a DNA synthesizer and purified by HPLC. Equimolar amounts of the complementary oligonucleotides were heated at 95°C for 10 min and allowed to anneal gradually as the temperature cooled to 21°C over 1.5 hours. DsDNA oligonucleotides were dissolved in ddH₂O at a concentration of 1 pmole/μl.

Probe No. 7 was a 15 bp dsDNA probe with an attached fluorescein moiety at each 5' position, designed to be completely homologous to a 15 bp segment of the 50-mer wild-type target DNA (SEQ ID NO : 6). The antisense strand of Probe No. 7 was identical to Probe No. 5.

Sequence for the sense strand of Probe No. 7 was: 5 S-Flu-CTG TCA TCT CTGGTG-3'

Sequence for the antisense strand of Probe No. 7 was: 5'-Flu-CAC CAG AGA TGA CAG-3'

The hybridization reaction mixture (40pl) contained the following: 0.4 pmoles of, non-denatured target dsDNA, 4 pmoles of 5'-fluorescein labeled dsDNA probe, 10 mMTris-HCL, pH 7.5, 70mM to 90mM KCl and 0mM to 20mM NaCl. The reaction mixtures were incubated at room temperature (21°C) for various periods ranging from 1 minute to 2 hours. Following incubation, samples were placed into a quartz cuvette, irradiated once with an argon ion laser beam having a wavelength of 488 nm and monitored for fluorescent emission. The intensity of fluorescence was plotted as a function of time for each sample analyzed.

The fluorescence emitted by control samples, comprising 4 pmoles of Probe No. 7 plus 90mM KCl in the absence of target dsDNA, remained relatively constant throughout the 120 minute incubation, indicating that no cationic quenching of the dsDNA-F probe was occurring in the presence of the monovalent KCL (Fig.7A). When the dsDNA-F Probe No. 7 was incubated with the 50-mer wild-type dsDNA target (SEQ ID NO : 6) and mutant dsDNA target (SEQ ID NO : 7) in the presence of 90mM KCl, dsDNA:dsDNA-F complexes were formed at room temperature under non-denaturing conditions within just 15 minutes of incubation and persisted for at least 120 minutes (Fig. 7A). Maximum discrimination between perfectly matched and 1 bp mismatched dsDNA: dsDNA-F complexes was observed after 30 and 45 minutes of incubation in the presence of 90 mM KCL, generating fluorescent intensities that were 27% and 3% lower, respectively after 30 minutes, and 34% and 15% lower, respectively after 45 minutes, than that emitted by Probe No. 7 alone (Fig. 7A).

In the presence of 70mM KCl and 20mM NaCl, the dsDNA: dsDNA-F complexes containing perfectly matched sequences (SEQ ID NO : 6 + Probe No. 7) or a 1 bp mismatch (SEQ ID NO : 7 + Probe No. 7)

produced fluorescent intensities that were 47% and 19% lower, respectively after 30 minutes, and 35% and 14% lower, respectively after 45 minutes, than that achieved by Probe No. 7 alone (Fig.7B). A small amount of cationic quench of the dsDNA

F Probe No. 7 control sample was observed over the 120 minute incubation in the presence of 70mM KCl and 20mM NaCl (Fig.7B).

This minimal cationic quench was caused by the inclusion of NaCl, which when present alone causes a similar progressive fluorescence quench of Probe No. 7 (data not shown).

The presence of 80mM KCl and 10mM NaCl, preferentially promoted perfectly matched dsDNA: dsDNA-F complex formation between the wild-type dsDNA target (SEQ ID NO : 6) and dsDNA-F Probe No. 7, resulting in a decrease in fluorescent emission of 18%, 48% and 34% after a 30 minute, 45 minute and 60 minute incubation, respectively, compared to the fluorescence emitted by the control Probe No. 7 sample at these times (Fig. 7C). By contrast, formation of the 1 bp mismatched dsDNA: dsDNA-F complexes (SEQ ID NO : 7 + Probe No. 7) was very inefficient throughout the entire 120 minute incubation in the presence of 80 mM KCl and 10mM NaCl, as evidenced by the low 1% to 5% reduction in fluorescence observed with these mismatched complexes compared to that exhibited by Probe No. 7 (Fig. 7C).

Therefore the inclusion of monovalent cations such as KCl and NaCl at close to physiological concentrations promoted DNA complex formation between non-denatured dsDNA targets and fluorescently-labeled dsDNA probes. Complex formation occurred on the basis of homologous base pair recognition, with a measurable and significantly greater amount of complex formation between fully matched homologous duplex strands. The reaction occurred at room temperature within relatively short incubation periods of 15 minutes to 60 minutes at a ratio of probe to target of 10 to 1. The dsDNA targets and dsDNA probe used in this example were homologous, contained 53% GC content, and did not contain homopurine or homopyrimidine stretches on

any

DNA

strand.

The assay of the invention was able to identify perfectly matched dsDNA sequences and those containing a pair of mismatched bases, using dsDNA probes.

Example 8

The assays performed in Example 7 were facilitated by the addition of monovalent cations in the reaction mixtures. This example will demonstrate the rate of formation, stability and rate of dissociation of dsDNA: dsDNA complexes formed in the presence of divalent cations. The reaction conditions were identical to that described in Example 7, except that KCl and NaCl was replaced with 30mM to 40mM each of MgCl₂ and MnCl₂.

The control dsDNA-F Probe No. 7 sample exhibited a progressive reduction in fluorescence with increased time of incubation in the presence of 30mM MgCl₂ and 30mM MnCl₂ (Fig. 8A) or 40mM MgCl₂ and 40mM MnCl₂ (Fig. 8B). This cationic quench was similar to that observed with ssDNA-F Probe No. 5 in the presence of 10mM MgCl₂ and 10mM MnCl₂ (Fig. 6A).

When the dsDNA-F Probe No. 7 was incubated with the 50-mer wild-type dsDNA target (SEQ ID NO :6) in the presence of 30mM MgCl₂ and 30mM MnCl₂, dsDNA: dsDNA-F complex formation was evident after 60 minutes of incubation resulting in a decrease in fluorescence, which was 13% greater than the progressive cationic quench of the control Probe No. 7 (Fig. 8A). Complex formation was greatly indicated after 75 minutes of incubation of

	SEQ	ID
--	-----	----

NO : 6 with Probe No. 7 in the presence of 30mM MgCl₂ and 30mM MnCl₂, generating an 81% decrease in fluorescence, compared to that achieved by the cationically quenched Probe No. 7 alone (Fig. 8A). DsDNA: dsDNA-F complexes that contained a 1 bp mismatch (SEQ ID NO : 7 + Probe No. 7) also formed after 60 minutes and 75 minutes of incubation in the presence of 30mM MgCl₂ and 30mM MnCl₂, generating a 16% and 30% decrease in

fluorescence, respectively, compared to that achieved by the cationically quenched Probe No. 7 alone (Fig. 8A). After 90 and 120 minutes of incubation in the presence of 30mM MgCl₂ and 30mM MnCl₂, no complex formation was being signaled (Fig. 8A). After 90 minutes, the level of fluorescence observed was wholly attributable to the cationic quench effect (Fig. 8A).

In the presence of 40mM MgCl₂ and 40mM MnCl₂, the dsDNA: dsDNA-F complexes containing perfectly matched sequences (SEQ ID NO : 6 + Probe No. 7) or a 1 bp mismatch (SEQ ID NO : 7 + probe No. 7) produced fluorescent intensities that were 17% lower and 4% higher, respectively after 60 minutes, 36% and 22% lower, respectively after 75 minutes, and 57% lower and 0.2 % higher, respectively after 90 minutes, than that emitted by the cationically quenched Probe No. 7 alone (Fig. 8B). After 120 minutes of incubation in the presence of 40mM MgCl₂ and 40mM MnCl₂, no complex formation was being signaled (Fig. 8B).

The addition of divalent cations, such as MgCl₂ and MnCl₂, facilitated DNA complex formation between non-denatured dsDNA targets and fluorescently-labeled dsDNA probes, to allow accurate discrimination between perfectly matched homologous sequences and those containing 1 bp mutations. Approximately double the concentration of both MgCl₂ and MnCl₂ was required for the formation of dsDNA: dsDNA complexes compared to that required for the formation of dsDNA: ssDNA complexes. The rate of formation of the dsDNA: dsDNA complexes was slower in the presence of divalent cations than in the presence of monovalent cations. Once formed the divalent cation induced dsDNA: dsDNA complexes seemed to be stable over a shorter time period.

Example 9

The rate of formation, stability and rate of dissociation of dsDNA: dsDNA complexes formed in the presence of monovalent and divalent cations was examined next. The hybridization reaction mixture (40/.1l) contained the following: 0.4 pmoles of nondenatured target dsDNA, 4 pmoles of 5'-fluorescein labeled dsDNA probe, 10mM Tris-HCl, pH 7.5, 60mM to 80mM KCl, 10mM to

20 mM NaCl, 30mM MgCl₂ and 30mM MnCl₂. The reaction mixtures were incubated at room temperature (21°C) for various periods ranging from 1 minute to 150 minutes. Following incubation, samples were placed into a quartz cuvette, irradiated once with an argon ion laser beam having a wavelength of 488 nm and monitored for fluorescent emission. The intensity of fluorescence was plotted as a function of time for each sample analyzed.

The presence of various KCl and NaCl concentrations together with 30mM MgCl₂ and 30mM MnCl₂, resulted in a cationic quench in fluorescence of control dsDNA-F Probe No. 7 (Fig. 9) that was very similar to that observed in the presence of only the divalent cations (Fig. 8). It seems that the inclusion of the monovalent cations did not affect the cationic quench of the dsDNA-F probe by the divalent cations.

When the dsDNA-F Probe No. 7 was incubated with the 50-mer wild-type dsDNA target (SEQ ID NO : 6) and mutant dsDNA target (SEQ ID NO : 7) in the presence of 60mM KCl, 20mM NaCl, 30mM MgCl₂ and 30mM MnCl₂, dsDNA: dsDNA-F complexes were formed at room temperature under non-denaturing conditions within just 15 minutes of incubation and persisted for at least 150 minutes (Fig. 9A). Maximum discrimination between perfectly matched and 1 bp mismatched dsDNA: dsDNA-F complexes was observed after 30, 45 and 150 minutes of incubation, generating fluorescent intensities that were 43% and 16% lower, respectively after 30 minutes, 38% and 16% lower, respectively after 45 minutes, and 65% and 1% lower, respectively after 150 minutes, than that emitted by the cationically quenched Probe No. 7 alone (Fig. 9A).

In the presence of 70mM KCl, 20mM NaCl, 30mM MgCl₂ and 30mM MnCl₂, the dsDNA: dsDNA-F complexes containing perfectly matched sequences (SEQ ID NO : 6 + Probe No. 7) or a 1 bp mismatch (SEQ ID NO : 7 + Probe No. 7) produced fluorescent intensities that

were 17% and 1% lower, respectively after 60 minutes, 48% and 11% lower, respectively after 75 minutes, 22% and 3% lower, respectively after 90 minutes, and 34% and 2% lower, respectively after 120 minutes, than that achieved by the cationically quenched Probe No. 7 alone (Fig. 9B).

The presence of 80mM KCl, 10mM NaCl, 30mM MgCl₂ and 30mM MnCl₂, preferentially promoted perfectly matched dsDNA: dsDNA-F complex formation between the wild-type dsDNA target (SEQID NO : 6) and dsDNA-F Probe No. 7, after 30 minutes to 120 minutes of incubation. The perfectly matched dsDNA: dsDNA-F complexes generated a decrease in fluorescent emission of 27%, 43%, 29% and 52% after a 60 minute, 75 minute, 90 minute and 120 minute incubation, respectively, compared to the fluorescence emitted by the cationically quenched Probe No. 7 sample at these times (Fig.9C). By contrast, formation of the 1 bp mismatched dsDNA: dsDNA-F complexes (SEQ ID NO : 7 + Probe No. 7) was very inefficient following a 45 minute to 90 minute incubation in the presence of 80mM KCl, 10mM NaCl, 30mM MgCl₂ and 30mM MnCl₂, as evidenced by the low 2% to 3% reduction in fluorescence observed with these mismatched complexes compared to that exhibited by the cationically quenched Probe No. 7 (Fig. 9C). Minimal 1 bp mismatched dsDNA: dsDNA-F complex formation occurred after 120 minutes of incubation, resulting in a 14% decrease in fluorescence compared to that emitted by the cationically quenched Probe No. 7.

The presence of both monovalent and divalent cations promoted dsDNA: dsDNA complex formation at a faster rate than did divalent cations alone. Once formed the complexes facilitated by both types of cations persisted for a longer time than did the complexes promoted by either monovalent cations or divalent cations separately. Maximum discrimination between perfectly matched and 1 bp mismatched dsDNA: dsDNA-F complexes was observed for a longer time interval in the presence of both monovalent and divalent cations. Therefore physiological concentrations of KCl, NaCl and MgCl₂ preferentially facilitated complex formation

between fully matched homologous duplex strands, on the basis of homologous base pair recognition.

Example 10

Examples 3-6 demonstrated dsDNA: ssDNA complex formation in a sequence specific manner between dsDNA targets and ssDNA probes facilitated by DNA condensing agents such as monovalent or divalent cations. The next example will examine the rate of formation, stability and rate of disassociation of dsDNA: ssDNA complexes formed in the presence of the multivalent cation, spermidine (possessing a charge of +3), which is also capable of condensing DNA.

The hybridization reaction mixture (40Al) contained the following: 0.2 pmoles of non-denatured target dsDNA, 2 pmoles of 5'-fluorescein labeled ssDNA probe, 10mM Tris-HCl, pH 7.5, and 1 mM spermidine. The reaction mixtures were incubated at room temperature (21°C) for various periods ranging from 1 minute to 2 hours. Following incubation, samples were placed into a quartz cuvette, irradiated once with an argon ion laser beam having a wavelength of 488 nm and monitored for fluorescent emission. The intensity of fluorescence was plotted as a function of time for each sample analyzed.

The control ssDNA-F Probe No. 5 exhibited a progressive reduction in fluorescence with increased incubation time in the presence of 1mM spermidine (Fig.10). This cationic quench was not as pronounced as that observed when the same probe was incubated in the presence of 10mM MgCl₂ and 10mM MnCl₂, especially within the first 5 minutes of incubation (Fig. 6A).

Perfectly complementary dsDNA: ssDNA-F complex formation between the dsDNA target (SEQ ID NO : 6) and the ssDNA-F Probe No.5 was indicated after just 15 and 30 minutes of incubation in the presence of 1mM spermidine, generating a 11% and 20% decrease in fluorescence, respectively, compared to that achieved by the cationically quenched Probe No. 5 alone (Fig. 10). After 45 minutes of incubation in the presence of 1mM

spermidine, minimal complex formation was being signaled (Fig. 10).

The inclusion of 1mM spermidine was highly unfavourable for dsDNA: ssDNA-F complex formation that contained a 1 bp T-G mismatch (SEQID NO : 7 + Probe No. 5), as evidenced by an increased fluorescence of 11% and 7% compared to that observed by the cationically quenched Probe No. 5 after 15 minutes and 30 minutes of incubation, respectively (Fig. 10). Minimal complex formation involving incompletely complementary sequences appeared only after 75 minutes of incubation in the presence of 1mM spermidine and disappeared by 120 minutes.

The addition of the DNA condensing agent, spermidine, facilitated rapid dsDNA: ssDNA complex formation between perfectly matched sequences under non-denaturing conditions, to allow differentiation between perfectly complementary sequences and those containing a 1 bp mutation.

Example 11

Many different agents besides cations are capable of condensing dsDNA. Example 11 demonstrates the rate of formation, stability and rate of disassociation of dsDNA: ssDNA complexes formed in the presence of ethanol, another type of DNA condensing agent.

The hybridization reaction mixture (40 μ l) contained the following: 0.2pmoles of non-denatured target dsDNA, 2 pmoles of 5'-fluorescein labeled ssDNA probe, 10mM Tris-HCl, pH 7.5, and 10% ethanol. The reaction mixtures were incubated at room temperature (21°C) for various periods ranging from 1 minute to 90 minutes. Following incubation, samples were placed into a quartz cuvette, irradiated once with an argon ion laser beam having a wavelength of 488 nm and monitored for fluorescent emission. The intensity of fluorescence was plotted as a function of time for each sample analyzed.

Unlike divalent or multivalent cations, the addition of 10% ethanol did not result in a quench in fluorescence emitted by

the control ssDNA-F Probe No. 5, but actually caused a slight increase in fluorescence of the probe over time (Fig. 11).

The presence of 10% ethanol preferentially promoted perfectly complementary dsDNA: ssDNA-F complex formation between the wild-type dsDNA target (SEQ ID NO : 6) and ssDNA-F Probe No. 5 following a 15 minute to 60 minute incubation (Fig.11). By contrast, formation of the 1 bp T-G mismatched dsDNA: ssDNA-F complex (SEQ ID NO : 7 + Probe No. 5) was very inefficient during this incubation time in the presence of 10% ethanol. The fluorescent intensities produced by the perfectly matched complexes and 1 bp mismatched complexes were 11% and 2% lower, respectively after 15 minutes, 12% and 1% lower, respectively after 30 minutes, 25% and 2% lower, respectively after 45 minutes, and 13% and 7% lower, respectively after 60 minutes, than that emitted by the Probe No. 5 control (Fig.11). No significant dsDNA: ssDNA-F complex formation was observed after a 75 minute incubation in the presence of 10% ethanol.

The addition of low concentrations of ethanol, facilitated DNA complex formation between non-denatured dsDNA targets and fluorescently-labeled ssDNA probes, to allow discrimination between perfectly complementary sequences and those containing a 1 bp mutation.

Example 12

Example 12 demonstrates that the assay of the invention can discriminate between perfectly complementary dsDNA: ssDNA complexes and dsDNA: ssDNA complexes containing every type of 1 bp mismatch possible, when the cationic DNA intercalator YOYO-1 is present.

Complementary sense and antisense 15-mer ssDNA probes were synthesized on a DNA synthesizer, purified by HPLC, and dissolved in ddH₂O at a concentration of 1 pmole/μl. Probe No.1 was a 15mer ssDNA probe designed to be completely complementary to a 15 nucleotide segment of the sense strand of the 50-mer wild-type target DNA (SEQ ID NO :1), overlapping amino acid

positions 505 to 510 [Nature 380,207 (1996)]. The chirality of the probe was opposite or antiparallel to that of the sense strand in the target. Mutant probes (Probe No. 8 to Probe No. 16) were identical in sequence to Probe No. 1 except for a 1 base mutation (underlined).

Sequence for Probe No. 1 was: 5'-CAC CAA AGA TGA TAT-3'
 Sequence for Probe No. 8 was: 5'-CAC CAA AGA AGA TAT-3'
 Sequence for Probe No. 9 was: 5'-CAC GAA AGA TGATAT-3'
 Sequence for Probe No. 10 was: 5'-CAC CAA ACA TGA TAT-3'
 Sequence for Probe No. 11 was: 5'-CAC CAT AGA TGA TAT-3'
 Sequence for Probe No. 12 was: 5'-CAC CAG AGA TGA TAT-3'
 Sequence for Probe No. 13 was: 5'-CAC CAC AGA TGA TAT-3'
 Sequence for Probe No. 14 was : 5'-CAC CAA AGA CGA TAT-3'
 Sequence for Probe No. 15 was: 5'-CAC CAA AAA TGA TAT-3'
 Sequence for Probe No. 16 was: 5'-CAC AAA AGA TGA TAT-3'

Probe No. 17 was a 15-mer ssDNA probe designed to be completely complementary to a 15 nucleotide segment of the antisense strand of the 50-mer wild-type target DNA (SEQ ID NO :1), overlapping amino acid positions 505 to 510 [Nature 380, 207 (1996)]. The chirality of the probe was opposite or antiparallel to that of the antisense strand in the target.

Mutant probes (Probe No. 18 to Probe No. 26) were identical in sequence to Probe No. 17 except for a 1 base mutation (underlined).

Sequence for Probe No. 17 was: 5'-ATA TCA TCT TTGGTG-3'
 Sequence for Probe No. 18 was: 5'-ATA TCT TCT TTGGTG-3'
 Sequence for Probe No. 19 was: 5'-ATA TCA TCT TTCGTG-3'
 Sequence for Probe No. 20 was: 5'-ATA TCA TGT TTGGTG-3'
 Sequence for Probe No. 21 was: 5'-ATA TCA TCT ATGGTG-3'
 Sequence for Probe No. 22 was: 5'-ATA TCA TCT CTGGTG-3'
 Sequence for Probe No. 23 was: 5'-ATA TCA TCT GTGGTG-3'
 Sequence for Probe No. 24 was: 5'-ATA TCG TCT TTGGTG-3'
 Sequence for Probe No. 25 was: 5'-ATA TCA TTT TTGGTG-3'

Sequence for Probe No. 26 was: 5'-ATA TCA TCT TTTGTG-3'

The hybridization reaction mixture (40 μ l) contained the following: 2 pmoles of target dsDNA, 2 pmoles of ssDNA probe, 0.5 x TBE and 500 nM of the DNA intercalator YOYO-1. The reaction mixtures were incubated at room temperature (21 C) for 5 minutes, without prior denaturation of dsDNA targets. Samples were placed into a quartz cuvette, irradiated with an argon ion laser beam having a wavelength of 488 nm and monitored for fluorescent emission. The intensity of fluorescent emission was plotted as a function of wavelength for each sample analyzed.

The 50-mer wild-type non-denatured dsDNA target (SEQ ID NO : 1) was reacted with the 15-mer wild-type antisense ssDNA Probe No. 1 and various 15-mer 1 base mutated antisense ssDNA probes (Probe No. 8 to Probe No. 16), that would generate every type of 1 bp mismatch possible. As expected, the highest fluorescent emission intensities were generated by the dsDNA: ssDNA complexes consisting of perfectly complementary sequences (SEQ ID NO :1 + Probe No. 1) (Figures 12A and 12B). DsDNA: ssDNA complexes that resulted in a 1 bp A-A mismatch (SEQ ID NO :1 + Probe No. 8), a 1 bp G-G mismatch (SEQ ID NO :1 + Probe No. 9), a 1 bp C-C mismatch (SEQ ID NO :1 + Probe No. 10), a 1 bp T-T mismatch (SEQ ID NO :1 + Probe No. 11), a 1 bp T-G mismatch (SEQ ID NO :1 + Probe No. 12), a 1 bp T-C mismatch (SEQ ID NO :1 + Probe No. 13), a 1 bp A-C mismatch (SEQ ID NO :1 + Probe No. 14), a 1 bp C-A mismatch (SEQ ID NO :1 + Probe No. 15), and a 1 bp G-A mismatch (SEQ ID NO :1 + Probe No. 16) produced fluorescent emission intensities that were 63%, 66%, 50%, 47%, 49%, 79%, 57%, 51% and 71% lower, respectively, than that emitted by the perfectly matched dsDNA: ssDNA complexes (Figures 12A and 12B).

The triple strand assay was also evaluated by reacting the 50-mer wild-type non-denatured dsDNA target (SEQ ID NO :1) with the 15-mer wild-type sense ssDNA Probe No. 17 and various 15-mer 1 base mutated sense ssDNA probes (Probe No. 18 to Probe No. 26), that would generate every type of 1 bp mismatch

possible. The perfectly complementary dsDNA: ssDNA triple strand complexes (SEQ ID NO :1 + Probe No. 17) containing a sense strand probe (Figures 12C and 12D) formed with similar efficacy as the perfectly complementary triple strand complexes (SEQ ID NO :1 + Probe No. 1) containing an antisense strand probe (Figures 12A and 12B).

DsDNA: ssDNA complexes that resulted in a 1 bp T-T mismatch (SEQ ID NO :1 + Probe No. 18), a 1 bp C-C mismatch (SEQ ID NO :1 + Probe No. 19), a 1 bp G-G mismatch (SEQ ID NO :1 + Probe No. 20), a 1 bp A-A mismatch (SEQ ID NO :1 + Probe No. 21), a 1 bp C-A mismatch (SEQ ID NO :1 + Probe No. 22), a 1 bp G-A mismatch (SEQ ID NO :1 + Probe No. 23), a 1 bp G-T mismatch (SEQ ID NO :1 + Probe No. 24), a 1 bp T-G mismatch (SEQ ID NO :1 + Probe No. 25), and a 1 bp T-C mismatch (SEQ ID NO :1 + Probe No. 26) produced fluorescent emission intensities that were 63%, 67%, 76%, 59%, 54%, 57%, 59%, 56% and 82% lower, respectively, than that emitted by the perfectly matched dsDNA: ssDNA complexes (Figures 12C and 12D).

The variability in the fluorescent emission intensities observed between the various 1 bp mismatches depended more on the particular base pair mismatch than the change in percent GC content of the mutant triple strand sequences (Fig.12). The results of Figure 12 confirmed the reliability of the triple strand assay to identify all possible 1 bp mismatches with great accuracy when antisense or sense ssDNA probes were reacted with non-denatured dsDNA targets in the presence of the DNA decondensing agent YOYO-1.

While the invention has been described in detail and with reference to specific examples thereof, it will be apparent to one skilled in the art that various changes and modifications can be made therein without departing from the spirit and scope thereof.

CLAIMS

1. A method of creating a nucleic acid multiplex, said method comprising the steps of:

1) creating a mixture comprising water, a Watson-Crick duplex, a sufficient number of single-stranded mixed base sequence molecules to form a multiplex that includes the Watson-Crick duplex, and an accelerator agent that increases a rate or amount of multiplex formation, said multiplex being a triplex or quadruplex, wherein said single-stranded molecule or molecules are selected so that, if in a multiplex, they would each be related to all other strands of the multiplex by adherence to base pairing rules, said rules being either Watson-Crick basepairing rules or homologous binding base-pairing rules; and

2) incubating said mixture to allow the multiplex to form, each strand of said multiplex related to all other strands of the multiplex by adherence to base-pairing rules; provided that, within the multiplex, the Watson-Crick duplex added in step (1) is heteropolymeric with a G-C content between 10% and 90%.

2. A method of Claim 1 wherein the multiplex created is a triplex, in step (1) the sufficient number of single-stranded molecules is 1, and in step (2) the triplex is formed.

3. A method of Claim 1 wherein the duplex substantially retains its double-helical structure and the single-stranded molecule resides in a groove of that double-helical structure.

4. A method of Claim 3 wherein the single-stranded molecule is related to one strand of the duplex by Watson-Crick base-pairing rules and to the second strand of the duplex by homologous binding base-pairing rules.

5. A method of Claim 4 wherein the duplex substantially retains its double-helical structure and the single-stranded molecule resides in a groove of that double-helical structure.

6. A method of Claim 1 where, within the multiplex, the Watson-Crick duplex added in step (1) is heteropolymeric with a G-C content between 10% and 90%, and furthermore the combined frequencies therein of purine-pyrimidine dimers and pyrimidinepurine dimers exceeds 25%.

7. A method of Claim 1 wherein steps (1) and (2) are performed with the nucleic acid strands and/or duplexes not in a cell.

8. A method of Claim 1 wherein step (2) is performed without the assistance of a protein.

9. A method of Claim 1 wherein in step (1), the water is added so that it accounts, on a volume basis, for at least 50 percent of the final volume of the mixture.

10. A method of Claim 1 wherein in step (1), the water is added so that it accounts, on a volume basis, for at least 80 percent of the final volume of the mixture.

11. A method of Claim 1 wherein in step (1), the water is added so that it accounts, on a volume basis, for all of the liquid added to the mixture.

12. A method of Claim 1 wherein step (2) is performed at a temperature or temperatures above the freezing temperature of the aqueous solution and at not more than 85°C.

13. A method of Claim 12 wherein step (2) is performed at a temperature or temperatures between 5°C and 30°C.

14. A method of Claim 13 wherein step (2) is performed at a temperature or temperatures between 15°C and 25°C.

15. A method of Claim 1 wherein in step (1), a cation is added as the accelerator agent.

16. A method of Claim 15 wherein said cation is Na⁺ provided at a concentration of 50mM to 125mM.

17. A method of Claim 15 wherein said cation is selected from the group consisting of Mn²⁺ provided at a concentration of 10mM to 45mM, Mg²⁺ provided at a concentration of 10mM to 45mM, and Ni²⁺ provided at a concentration of 20mM.

18. A method of Claim 1 wherein in step (1) an intercalator is added as an accelerator agent.

375

19. A method of Claim 18 wherein the intercalator is a fluorescent intercalator.

20. A method of Claim 19 wherein the fluorescent intercalator is selected from the group consisting of YOYO-1, TOTO-1, YOYO-3, TOTO-3, POPO-1, BOBO-1, POPO-3, BOBO-3, LOLO-1, JOJO-1, cyanine dimers, YO-PRO-1, TO-PRO-1, YO-PRO-3, TO-PRO-3, TO-PRO-5, PO-PRO-1, BO-PRO-1, PO-PRO-3, BO-PRO-3, LO-PRO-1, JO PRO-1, cyanine monomers, ethidium bromide, ethidium homodimer-1, ethidium homodimer-2, ethidium derivatives, acridine, acridine orange, acridine derivatives, ethidium-acridine heterodimer, ethidium monoazide, propidium iodide, SYTO dyes, SYBR Green 1, SYBR dyes, Pico Green, SYTOX dyes, and 7-aminoactinomycin D.

21. The method of Claim 1 wherein the accelerator agent is a non-intercalating fluorophore.

22. A method of Claim 21 wherein the non-intercalating fluorophore is selected from the group consisting of biotin, rhodamine, Alexa dyes, BODIPY dyes, biotin conjugates, thiolreactive probes, fluorescein and derivatives including but not limited to the caged probes, Oregon Green, Rhodamine Green, QSY dyes.

23. A method of Claim 1 wherein in step(1) the accelerator agent is an intercalator that binds to the minor and/or major groove of the Watson-Crick duplex.

24. The method of Claim 1 wherein in step (1) the accelerator agent at 25°C is a liquid.

25. The method of Claim 24 wherein in step (1) the accelerator agent is an organic liquid soluble in water.

26. The method of Claim 1 wherein in step (1) an accelerator agent that is a condensation agent as regards the Watson-Crick duplex is added.

27. The method of Claim 1 wherein in step (1) an accelerator agent that is a decondensation agent as regards the Watson-Crick duplex is added.

28. A method of detecting a triplex, said method comprising the method of Claim 2 and further comprising an additional step (3) in which the triplex is detected.

29. A method of Claim 1 wherein the multiplex created is a quadruplex, in step (1) the Watson-Crick duplex is a first Watson-Crick duplex, and in step (1) the sufficient number of single-stranded molecules is 2, those single-stranded molecules are in a second Watson-Crick duplex, and in step (2) the quadruplex is formed from said first and second duplexes. Preferably step (1) is done with the two single-stranded molecules already in the second Watson-Crick duplex.

30. A method of detecting a quadruplex, said method comprising the method of Claim 29 and further comprising an additional step (3) in which the quadruplex is detected.

31. A triplex comprising a single-stranded probe bound to a double-stranded nucleic acid target, wherein said probe comprises a heteropolymeric nucleic acid or a heteropolymeric nucleic acid analog, and all base triplets of said triplex are members selected from the group consisting of A-T-A, T-A-T, U-

A-T,

T-A-U,

A-U-A, U-A-U, G-C-G and C-G-C.

32. A triplex of Claim 31 wherein the double-stranded nucleic acid target substantially retains its double-helical structure and the heteropolymeric nucleic acid or analog resides in a groove of that double-helical structure.

33. A triplex of Claim 31 wherein the heteropolymeric nucleic acid and analog each have a G-C content between 10% and 90%.

34. A triplex of Claim 33 wherein the double-stranded nucleic acid target substantially retains its double-helical structure and the heteropolymeric nucleic acid or analog resides in a groove of that double-helical structure.

35. A quadruplex comprising: a first strand containing a first sequence of nucleobases; a second strand containing a second sequence of nucleobases, wherein said second strand is associated with said first strand by Watson-Crick bonding; a third strand containing a third sequence of nucleobases; and a fourth strand containing a fourth sequence of nucleobases, wherein said fourth strand is associated with said third strand by Watson-Crick bonding.

36. A quadruplex of Claim 35 wherein each of said four strands is heteropolymeric with a G-C content between 10% and 90%.

37. A quadruplex of Claim 35 wherein either (1) the

second and fourth strands are aligned in a parallel 3'to 5' direction and binding between those 2 strands is according to homologous base-pairing rules or (2) the first and third strands are aligned in a parallel 5'to 3'direction and binding between those 2 strands is according to homologous base-pairing rules or (3) the second and fourth strands are aligned in a parallel 3'to 5' direction and binding between said second and fourth strands is according to homologous base-pairing rules and furthermore the first and third strands are aligned in a parallel 5 to 3' direction and binding between said first and third strands is according to homologous base-pairing rules.

38. A quadruplex of Claim 37 wherein each of said four strands is heteropolymeric with a G-C content between 10% and 90%.

39. A quadruplex of Claim 35 wherein either (1) the second and fourth strands are aligned in a parallel 3'to 5'direction and binding between those 2 strands is according to Watson-Crick base-pairing rules or (2) the first and third strands are aligned in a parallel 5'to 3'direction and binding between those 2 strands is according to Watson-Crick base-pairing rules or (3) the second and fourth strands are aligned in a parallel 3'to 5' direction and binding between said second and fourth strands is according to Watson-Crick base-pairing rules and furthermore the first and third strands are aligned in a parallel 5'to 3' direction and binding between said first and third strands is according to Watson-Crick base-pairing rules.

40. A quadruplex of Claim 39 wherein each of said four strands is heteropolymeric with a G-C content between 10% and 90%.

41. A quadruplex of Claim 35 wherein either (1). the first and fourth strands are aligned in anti-parallel 5'to 3' and

3' to 5'directions, respectively, and binding between the 2 strands is according to Watson-Crick base-pairing rules or (2) the second and third strands are aligned in anti-parallel 3'to 5'and 5'to 3'directions, respectively, and binding between those 2 strands is according to Watson-Crick base-pairing rules or (3) the first and fourth strands are aligned in anti-parallel 5'to 3'and 3' to 5'directions, respectively, and binding between said first and fourth strands is according to Watson-Crick base-pairing rules and furthermore the second and third strands are aligned in anti-parallel 3'to 5'and 5'to 3'directions, respectively, and binding between said second and third strands is according to Watson-Crick base-pairing rules.

42. A quadruplex of Claim 41 wherein each of said four strands is heteropolymeric with a G-C content between 10% and 90%.

43. A quadruplex of Claim 35 wherein either (1) the first and fourth strands are aligned in anti-parallel 5' to 3'and 3' to 5'directions, respectively, and binding between those 2 strands is according to homologous base-pairing rules or (2) the second and third strands are aligned in anti-parallel 3'to 5' and 5' to 3' directions, respectively, and binding between those 2 strands is according to homologous base-pairing rules or (3) the first and fourth strands are aligned in anti-parallel 5'to 3' and 3'to 5' directions, respectively, and binding between said first and fourth strands is according to homologous base-pairing rules and furthermore the second and third strands are aligned in anti-parallel 3'to 5' and 5'to 3'directions, respectively, and binding between said second and third strands is according to homologous base-pairing rules.

44. A quadruplex of Claim 43 wherein each of said four

strands is heteropolymeric with a G-C content between 10% and 90%.

45. The quadruplex of Claim 35 wherein each interacting base of the said first strand interacts specifically with both the adjacent base on the said third strand and with the base on the said fourth strand, the base to which the said third strand base is bound.

46. A quadruplex of Claim 45 wherein each of said four strands is heteropolymeric with a G-C content between 10% and 90%.

47. The quadruplex of Claim 35 wherein each interacting base of the said second strand interacts specifically with both the adjacent base on the said fourth strand and the base on the said third strand, the base to which the said fourth strand base is bound.

48. A quadruplex of Claim 47 wherein each of said four strands is heteropolymeric with a G-C content between 10% and 90%.

49. The method of Claim 2, said method further comprising a step (3) in which the triplex is detected.

50. The method of Claim 29, said method further comprising an additional step (3) in which the quadruplex is detected.

51. The method of Claim 49, wherein said method

discriminates between a perfect base-pairing-rules match, a one-base mismatch or deletion, and a 2-base mismatch or deletion, between the duplex and the single-stranded molecule in the triplex.

52. The method of Claim 50, wherein said method discriminates between a perfect base-pairing-rules match, a one-base mismatch or deletion, and a 2-base mismatch or deletion, between the first and second Watson-Crick duplexes.

53. A method of detecting a triplex, said method comprising: providing a target double-stranded nucleic acid or nucleic acid analogue comprising a target sequence, wherein said target sequence contains at least one purine base and at least one pyrimidine base; providing a probe comprising a nucleic acid sequence or a nucleic acid analog sequence; providing an accelerator agent; adding said probe, said target sequence and said accelerator agent to a medium to provide a test sample containing a triplex complex comprising said probe bound to said target sequence, wherein all base triplets of said complex are members selected from the group consisting of A-T-A, T-A-T, U-A-T, T-A-U, A-U-A, U-A-U, G-C-G and C-G-C; irradiating said test sample with exciting radiation to cause the test sample to emit fluorescent radiation; detecting an intensity of said fluorescent radiation, wherein said intensity is correlated with a binding affinity between said probe and said target sequence; and determining from said intensity an extent of matching between said probe and said target sequence; wherein said method is a homogeneous assay conducted without providing a signal quenching agent on said target sequence or on said probe.

54. A method of detecting a triplex, said method comprising: providing a target nucleic acid or nucleic acid analogue having a target sequence, wherein said target sequence

contains at least one purine base and at least one pyrimidine base; providing a double-stranded probe comprising a nucleic acid sequence or a nucleic acid analog sequence; providing a hybridization accelerator agent; adding said probe, said target and said hybridization accelerator agent to a medium to provide a test sample containing a Watson-Crick triplex comprising said probe bound to said target sequence; irradiating said test sample with exciting radiation to cause test sample to emit fluorescent radiation; detecting an intensity of said fluorescent radiation, wherein said intensity is correlated with a binding affinity between said probe and said target sequence; and determining from said intensity an extent of matching between said probe and said target sequence wherein said method is a homogeneous assay conducted without providing a signal quenching agent on said target sequence or on said probe.

55. A method of detecting a quadruplex, said method comprising: providing a target nucleic acid or nucleic acid analogue having a target sequence, wherein said target sequence contains at least one purine base and at least one pyrimidine base; providing a double-stranded probe comprising a nucleic acid sequence or a nucleic acid analog sequence; providing a hybridization accelerator agent; adding said probe, said target and said hybridization accelerator agent to a medium to provide a test sample containing a Watson-Crick quadruplex comprising said probe bound to said target sequence; irradiating said test sample with exciting radiation to cause test sample to emit fluorescent radiation; detecting an intensity of said fluorescent radiation, wherein said intensity is correlated with a binding affinity between said probe and said target sequence; and determining from said intensity an extent of matching between said probe and said target sequence wherein said method is a homogeneous assay conducted without providing a signal quenching agent on said target sequence or on said probe.

COLO 14114 841 001 4

DLM / ID 000003 / WPC 14114

383

NIT : 800176089-2

SUBPUNTADELLA Y LINDA
Modificación : 04/03/04
Fecha (NIT): 2004-03-16 17:05:04
Tramite : 011 MCT-001261 3/3 Fase Final 1-5 Contribución
Dependencia: 2030 DIVISION DE MARCAS COMERCIALES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 16,256
FECHA : MARZO 1 DE 2004

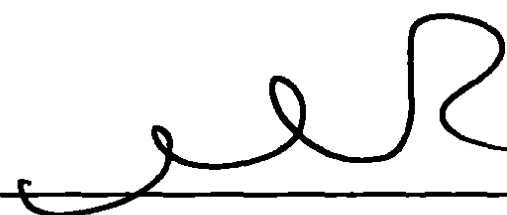
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	20338560	01/03/2004	31,169,400.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
12	MARCAS Y LEYAS COMERCIALES	87,000.00
	TOTAL :	\$ 87,000.00

SON: OCHENTA Y SIETE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Colo 00002-000-038-8

384



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Folio ~~412~~

2020
Bogotá D C

Doctor(a)
EMILIO FERRERO.
Apoderado(a)

REFERENCIA:	Radicación N°	04-3755
	Solicitud internacional	PCT/FR02/02338
	Fecha limite de inicio en fase nacional	20/01/2004
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio N°	470
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en el asunto, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486, de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y comercio, se envía el extracto de la solicitud a la oficina de comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo dispone el artículo 40 de la referida Decisión 486.

Cúmplase
Dado en Bogotá D C,

20 JUN. 2005

20 JUN 2005

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe División de Nuevas Creaciones.

202028

Al contestar favor indique el número de radicación consignado en el sticker

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10
Commutador: 3 820840 Fax: 3 505220
Sede CAN: Tr. 40A No. 38-50 3153265 al 69
Fax: 3 505220. Línea 9800-910 165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia