



Industria y Comercio
S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

07-40955

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

ENSAYO GENOMICO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

INGENEUS INC.

DOMICILIO

CIUDAD DE BELICE, BELICE

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

24-04-2007

(FORMA P-10)

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETI

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-040935- -00000-0000

Fecha: 2007-04-24 16:21:20

Dep. 2020 NUECREACIONI

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 209

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:**

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **INGENEUS INC.**
sociedad constituida y existente bajo las leyes
de Belice.Dirección: c/o Deloitte Corporate Services, 40A,
Central American Boulevard,
Ciudad de Belice,
BeliceDomicilio: Ciudad de Belice,
Belice**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____

Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 88 50
E-mail: clientes@camvp.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____Número **438.019** T.P **31.929**

4

**INVENTOR (ES)
(72)**1. **Glen H. ERIKSON**
P.O. Box N-3001,
Nassau,
Bahamas2. **Jasmine I. DAKSIS**
36 Cartier Crescent,
Richmond Hill,
Ontario L4C 2N2,
Canadá

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/IB2005/053162Fecha: 23 de septiembre de 2005Publicación Internacional No. WO 2006/033088 A3Fecha: 30 de marzo de 2006

6

TÍTULO (54)**ENSAYO GENOMICO**

7

Clasificación Internacional (51) C12Q 1/68

8

PrioridadSI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

24 de septiembre de 2004

(31) Número de Solicitud

60/612.670

9

Comprobante de pago No.: 07-30,136**Fecha:** 16 de abril de 2007

10

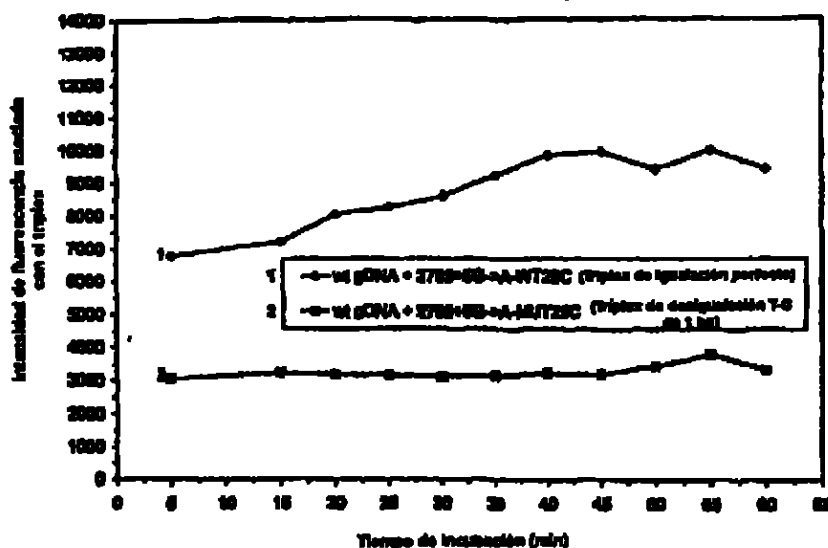
Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 482.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

FIG. 1. Fluorescencia asociada con el triplex de muestras de ADN genómicas humanas analizadas en la presencia de 800nM YOYO-1 y 40nM TMA-Cl (en donde YOYO-1 se adhiere al dúplex)



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

EMILIO FERRERO

FIRMA:

Emilio Ferrero

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

NNJ

3

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ **Publicación Internacional WO 2006/033088 A3**

Descripción:

Páginas 61 en el idioma original

Páginas 100 en español

Reivindicaciones: Número (s) 69

Figuras: Número (s) 5

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.**

3. ☒ **Listado de Secuencias.**

4. ☒ **Extracto de publicación.**

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA
FASE INTERNACIONAL**

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
30 March 2006 (30.03.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/033088 A3

(51) International Patent Classification:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/IB2005/053162

(22) International Filing Date:
23 September 2005 (23.09.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/612,670 24 September 2004 (24.09.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): IN-
GENEUS INC. [BZ/BZ]; c/o Deloitte Corporate Services,
40A, Central American Boulevard, Belize City (BZ).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ERIKSON, Glen,
H. [CA/BS]; P.O. Box N-3001, Nassau (BS). DAKSIS,
Jasmine, I. [CA/CA]; 36 Cartier Crescent, Richmond Hill,
Ontario L4C 2N2 (CA).

(74) Agent: TENER, David, M.; Caesar, Rivisa, Bernstein,
Cohen & Pokotilow, Ltd., Seven Penn Center, 11th floor,
1635 Market Street, Philadelphia, PA 19103 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GR, GU, HK, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv))

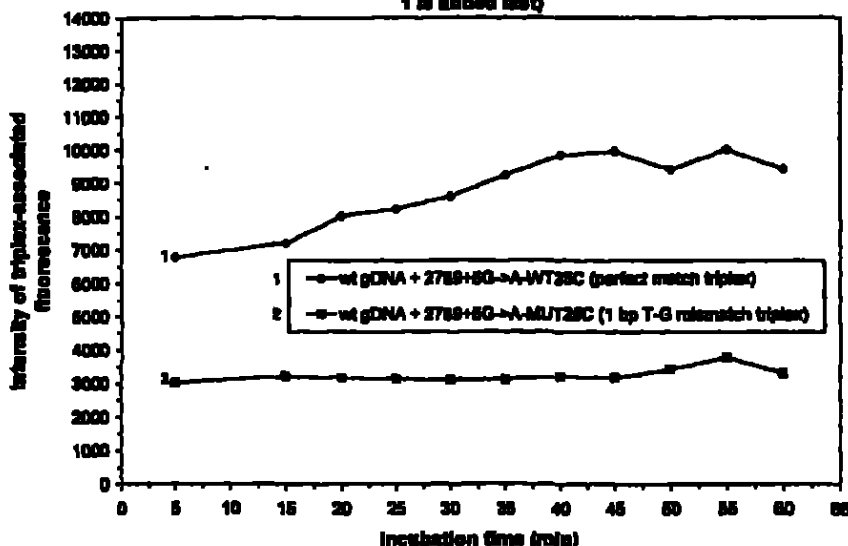
Published:

— with international search report

[Continued on next page]

(54) Title: GENOMIC ASSAY

Triplex-associated fluorescence from human genomic DNA samples
assayed in the presence of 600 nM YOYO-1 and 45 mM TMA-Cl (wherein YOYO-
1 is added last)



(57) Abstract: A method of detecting a nucleic acid sequence in a genomic sample, includes: providing the genomic sample containing a target nucleic acid sequence of a duplex nucleic acid; providing, a probe containing a probe nucleic acid sequence; providing a hybridization mixture containing the genomic sample, the probe, a hybridization promoting agent and labels; incubating the hybridization mixture; irradiating the incubated mixture with radiation effective to stimulate at least some of the labels to emit energy; and detecting from a fluorescent signal whether the probe perfectly matches the target nucleic acid sequence, wherein the detecting is completed within sixty minutes of the hybridization mixture providing, and the method is conducted without denaturing and without PCR amplifying the duplex nucleic acid. A kit for practicing the method includes the probe, the hybridization promoting agent, and labels.



(88) Date of publication of the international search report:
6 July 2006

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

TITLE OF THE INVENTION:

GENOMIC ASSAY

SPECIFICATION

BACKGROUND OF THE INVENTION

1. FIELD OF INVENTION

The invention relates to assays of genomic material, and more particularly to a method and a kit for detecting duplex, triplex and/or quadruplex hybridization of nucleic acids.

2. DESCRIPTION OF RELATED ART

We have previously disclosed specifically bound Watson-Crick quadruplexes and other specifically bound non-canonical quadruplexes, triplexes and duplexes in, e.g., U.S. Patent No. 6,656,692 and U.S. Patent No. 6,927,027. Those publications provide ample guidance regarding the selection of appropriate hybridization conditions to obtain any of the various multiplexes disclosed therein, including parallel or antiparallel duplexes, triplexes or quadruplexes binding in the homologous or Watson-Crick motif. See also U.S. Patent No. 6,420,115 to Erikson et al., U.S. Patent No. 6,403,313 to Daksis et al. and copending U.S. Patent Application Publication No. 2004/0180345, published September 16, 2004.

Despite the foregoing developments, it is desired to provide additional means for assaying nucleic acids which are sensitive, robust and reliable. It is particularly desired to provide methods, and kits for assaying nucleic acid sequences of genomic samples. It is further desired to provide means for direct detection of nucleic acid sequences in genomic samples without amplifying the nucleic acid sequences. It is still further desired to improve the sensitivity and more accurately and reliably identify the signal emitted by the binding reaction of interest.

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

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

Accordingly, the invention provides a method of detecting a nucleic acid sequence in a genomic sample, said method comprising:

providing the genomic sample comprising a target nucleic acid sequence of a duplex nucleic acid;

providing a probe comprising a probe nucleic acid sequence;

providing a hybridization mixture comprising the genomic sample, the probe, a hybridization promoting agent and labels;

incubating the hybridization mixture to provide an incubated mixture comprising a complex of the target nucleic acid sequence, the probe and the labels;

irradiating the incubated mixture with radiation effective to stimulate at least some of the labels to emit energy; and

5 detecting from a fluorescent signal whether the probe perfectly matches the target nucleic acid sequence, to thereby detect whether the nucleic acid sequence is present in the genomic sample,

wherein the detecting is completed within sixty minutes of providing the hybridization mixture, and the method is conducted without denaturing the duplex nucleic acid and without
10 PCR amplification of the duplex nucleic acid.

Further provided is a method of detecting a nucleic acid sequence in a genomic sample, said method comprising:

providing the genomic sample comprising a target nucleic acid sequence of a single stranded or double-stranded nucleic acid;

15 providing a probe comprising a probe nucleic acid sequence;

providing a hybridization mixture comprising the genomic sample, the probe, a hybridization promoting agent and labels;

incubating the hybridization mixture to provide an incubated mixture comprising a complex of the target nucleic acid sequence, the probe and the labels;

20 applying energy to the incubated mixture effective to elicit a signal from the hybridization mixture; and

detecting from the signal whether the probe perfectly matches the target nucleic acid sequence, to thereby detect whether the nucleic acid sequence is present in the genomic sample,

wherein the detecting is completed within sixty minutes of providing of the hybridization mixture, and the method is conducted without denaturing the duplex nucleic acid and without
25 PCR amplification of the duplex nucleic acid.

Also provided is a kit for practicing the method of the invention.

BRIEF DESCRIPTION OF SEVERAL VIEWS OF THE DRAWINGS

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

Figs. 1, 2, 3, 4 and 5 are graphs of fluorescent intensity against incubation time showing the waxing and/or waning of fluorescent intensity over time.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

8

We have previously disclosed the specific binding of a heteropolymeric strand to duplex nucleic acid and the specific binding of duplex nucleic acid to other duplex nucleic acid. Our disclosure provides the means by which sequences of bases in naturally occurring duplexes may be rendered specifically reactive to a sequence of bases in a third strand while remaining stably paired in the duplex, a previously unrecognized fact of capital importance. See, e.g., U.S. Patent No. 6,656,692 and U.S. Patent No. 6,927,027. We have also disclosed that heteropolymeric nucleic acids (and/or their analogues) can specifically bind to each other by homologous base bonding as well as by Watson-Crick base interaction, and that base bonding is not limited to strands having antiparallel directionality relative to each other. *Id.* Thus, heteropolymeric nucleic acids (and/or their analogues) can specifically bind to each other with parallel or antiparallel directionality, wherein the bases bond by homologous base bonding and/or Watson-Crick base bonding rules. Our disclosure of binding motif preference of nucleic acids was similarly unrecognized previously and is likewise of capital importance. All of the foregoing specific complexes are readily reproducible having been detected in vitro using readily available instruments and reagents used under mild and permissive conditions.

We have previously disclosed that pre-incubation of the probe with a probe incubation agent and/or the target with a target incubation agent can increase discrimination of the signal to be detected from background signals (i.e., interference or background noise) by: (a) increasing binding affinity or signal strength of perfectly matched target and probe; and/or (b) decreasing binding affinity or signal strength of mismatched target and probe. See U.S. Patent Application Publication No. 2004/0180345.

We now disclose several other parameters, including probe length, probe concentration, target concentration and label concentration, whose adjustment can achieve unexpected beneficial effects.

Accordingly, the invention provides a method for assaying nucleic acid binding, wherein at least one of the foregoing parameters is adjusted for beneficial effect.

In addition, we now disclose a method that enables detection of a nucleotide polymorphism in a genomic target, such as human dsDNA, without amplification of the target. Unlike any other methods of which we are aware, the present method can be conducted in less than sixty minutes, and preferably less than fifteen minutes, at a non-denaturing temperature.

The invention encompasses the use and/or formation of novel duplex, triplex and/or quadruplex complexes of nucleic acids (and/or analogues thereof).

Nucleic acid strands have inherent directionality. The conventional wisdom holds that strands of opposite directionality, i.e., which are antiparallel in their orientation to one another, form a duplex through Watson-Crick complementary binding of their respective bases. The bonding together of probe and the target nucleic acid sequence solely as two antiparallel strands obeying Watson-Crick base pairing rules is therefore excluded from certain embodiments of the invention.

Certain duplexes according to the invention, on the other hand, comprise two strands of nucleic acid (and/or nucleic acid analogues) hybridized in parallel relation to one another, wherein specific binding is either through homologous base pairing or Watson-Crick base pairing. Conventional wisdom holds that such duplexes do not exist, or at least would be extremely unstable due to, e.g., backbone irregularities necessitated by the conformational requirements of parallel base bonding.

Even more surprising is our discovery that under appropriate hybridization conditions, homologous bonding, preferably promoted and signaled by YOYO-1, demonstrates specificity and stability rivaling that of Watson-Crick complementary antiparallel duplex.

The invention also encompasses duplexes containing two strands of nucleic acid (and/or nucleic acid analogues) hybridized in antiparallel relation to one another, wherein specific binding is through homologous base pairing.

As used herein, the terms "Watson-Crick base pairing", "complementary base pairing" and the like are intended to define specific association between opposing or adjacent pairs of nucleic acid and/or nucleic acid analogue strands via matched bases (e.g., A:T; G:C and/or A:U). In the context of non-canonical complexes described herein, including parallel duplexes, parallel and antiparallel triplexes, and parallel and antiparallel quadruplexes, terms like "Watson-Crick base bonding" and "complementary base bonding" are intended to denote bonding between A and T, A and U and/or G and C, but not necessarily in the edgewise, planar conformation first described by Watson and Crick. In addition to the conventional binding motif first proposed by Watson and Crick (the "W-C motif"), and conformational variants thereof encompassed by the foregoing definition of Watson-Crick base bonding, the present invention encompasses complexes formed by homologous base bonding. In homologous base bonding, bases bond specifically with identical bases rather than complementary bases. Thus, in the "homologous motif", homologous base pairs include A:A, G:G, C:C, T:T, U:U, and T:U.

The binding by the bases of nucleic acid strands is affected or conditioned by a number of factors, particularly the binding potential of the strands pursuant to either the W-C motif or homologous motif, and ionic conditions (e.g., salt concentration and/or type). Salty conditions

tend to favor the formation of Watson-Crick bonding over homologous bonding. Homologous motif quadruplexes are favored over W-C motif quadruplexes under identical buffer conditions.

Each strand in a complex of the invention can comprise any sequence of nucleobases and/or nucleobase analogues, provided the nucleobases are related to the nucleobases to which they are to specifically bind by either the W-C motif or the homologous motif. Contrary to certain teachings of the prior art, the target and probe need not be homopolymeric to achieve binding, even in the case of triplex or quadruplex formation. Thus, in certain embodiments, the probe nucleobases are arranged in a heteropolymeric probe sequence of interspersed purines and pyrimidines, and the target nucleobases are arranged in a target sequence at least partially complementary or partially homologous to the probe sequence. For example, the probe sequence can contain 25% to 75% purine bases and 75% to 25% pyrimidine bases in any order. Complexes of the invention can form from heteropolymeric sequences, which as defined herein, mean sequences containing at least one purine nucleobase or purine analogue and at least one pyrimidine nucleobase or pyrimidine analogue in at least their hybridizing segments. Such heteropolymeric sequences preferably lack homopolymeric fragments greater than 5 bases long. Other nucleobases are also suitable for use in the invention, such as, e.g., synthetic analogues of naturally occurring bases, which have specific Watson-Crick and/or homologous binding affinities to other bases. In addition to duplexes, complexes of the invention also include triplexes and quadruplexes, wherein opposing heteropolymeric strands are linked by Watson-Crick complementary bases or by homologous bases, and the relative directionality of the bound sequences is parallel or antiparallel to one another.

A probe strand can specifically bind in the major or minor groove of a double-stranded target. Further, the bases of a single-stranded probe can interact specifically with bases on one or both strands of a double-stranded target. Similarly, the bases of each strand of a double-stranded probe can interact specifically with bases on one or both strands of a double-stranded target in quadruplex complexes of the invention. Thus, in certain triplex embodiments of the invention, at least one base of the probe is bonded to at least one base or base pair of the target by Watson-Crick complementary base interaction and/or by homologous base interaction, such that the complex is a triplex, and in certain quadruplex embodiments of the invention, at least one base of the probe is bonded to at least one base or base pair of the target by Watson-Crick complementary base interaction and/or by homologous base interaction, such that the complex is a quadruplex.

In certain triplex and quadruplex embodiments, each nucleobase binds to one or two other nucleobases. Thus, in addition to the traditional duplex Watson-Crick base pairs and the duplex homologous base pairs described above, such embodiments include the following Watson-Crick base binding triplets: A:T:A, T:A:T, U:A:U, 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), and/or the following homologous base triplets: A:A:T, T:T:A, U:U:A, T:U:A, A:A:U, U:T:A, G:G:C and/or C:C:G (including C:C⁺:G, and/or any other ionized species of base).

Thus, in certain quadruplex embodiments wherein the probe is defined as a duplex of first and second antiparallel strands associated by Watson-Crick base pairings, and the target is defined as a similarly structured duplex of a third and a fourth strand, it is believed that the 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 triplex and quadruplex structures of the invention, no binding sequence of bases is contiguous with another binding sequence of bases. That is, there are at least three separate strands. Although folded conformations and the like (e.g., hairpin turns, etc.) are within the scope of the invention (particularly but not limited to RNA interference embodiments, where hairpin design has been found to be advantageous for causing interference based on conventional Watson-Crick duplex binding of RNA targets—see Hemann et al., "An *epi-allelic* series of *p53* hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes in vivo." *Nat. Genet.* 2003 Mar; 33(3):396-400), folded portions of a single strand do not make the strand count more than once toward the minimum of three separate strands.

Complexes of the invention preferably do not rely on Hoogsteen bonding (including reverse Hoogsteen bonding) or G quartets for maintenance of the complex structure, although Hoogsteen bonding (including reverse Hoogsteen bonding) and/or G quartets may be present. That is, complexes of the invention are preferably substantially free of Hoogsteen bonding (including reverse Hoogsteen bonding), and substantially free of G quartets.

Each strand of the complex independently comprises a nucleic acid having a deoxyribose phosphate or ribose phosphate backbone (e.g., DNA, RNA, mRNA, hnRNA, rRNA, tRNA or cDNA) or a nucleic acid backbone or base analogue. 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), and include, e.g., PNA and LNA. Certain embodiments

are free of PNA. For increased stability, probes can be provided in a phosphotriester form, to inhibit degradation during use.

Unlike certain complexes particularly associated with PNA, triplexes of the invention do not depend upon a strand invasion mechanism.

5 At least a portion of the complex is isolated, purified, artificial or synthetic.

In embodiments, a portion of the complex is a PCR amplified product. However, preferred embodiments of the invention are free of PCR amplification and products thereof.

The complexes of the invention can be present in solution, on a solid support, *in vitro*, *in vivo* or *in silico*. The solid support can be electrically conductive (e.g., an electrode) or non-conductive. In certain embodiments, the solid support is a silver island film or other material that takes advantage of fluorophore-metal interactions to enhance sensitivity, as taught by Alan et al., Metal-enhanced fluorescence: an emerging tool in biotechnology." Current Opinion in Biotechnology 2005, 16:55-62. In addition, the complexes can be optically mapped or sequenced after being elongated, as taught in U.S. Patents Nos. 6,147,198 and 5,720,928 to

15 Schwartz.
 Specific binding between nucleic acids occurs under a wide variety of conditions having
 variations in temperature, salt concentration, electrostatic strength, buffer composition and
 relative molar concentration of the nucleic acids. Examples of these conditions and methods for
 applying them are known in the art.

20 We have previously disclosed conditions particularly suitable for providing our unique
 and specific complexes, in the context of nucleic acid analysis and otherwise. See, e.g., U.S. Patent No. 6,656,692 and U.S. Patent No. 6,927,027. We now further elaborate upon our previous teachings regarding said conditions.

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

30 As shown in the Examples described below, we have unexpectedly discovered that economies of genomic target material handling can be achieved without commensurate sacrifice in assay signal. Thus, it is surprisingly possible to reduce the amount of genomic target material in the inventive assay without causing a proportionate decrease in the specificity or sensitivity of the assay. In some cases, reducing the amount of genomic material appears to increase the specificity and/or sensitivity of the assay. Similarly, under some conditions reduced amounts of hybridization promoters or labels result in enhanced signal emission.

Without wishing to be bound by any theories, we have a possible explanation for this phenomenon. We believe that there are at least two opposing constraints that dictate the optimum number of labels intercalated in a complex. The intensity of fluorescence emitted by the complex increases with the number of labels intercalated therein. However, the number of labels per complex is limited by the number of sites available to the labels, and perhaps more importantly, by the mutual charge repulsion between proximal labels. Thus, if a saturation label to complex (or target) ratio were achieved, adding additional target to the system would be expected to reduce the ratio below the saturation point. Each complex would then include less than the maximum number of labels, resulting in reduced fluorescence per complex. Reduced fluorescence per complex can result in an overall reduction in fluorescence (when the increase in the number of fluorescent complexes is outweighed by the reduction in fluorescence of each complex), or an increase in fluorescence less than proportionate to the increase in the number of complexes (when the increase in the number of fluorescent complexes outweighs the reduction in fluorescence of each complex). We further believe that duplex DNA acts somewhat to shield charge repulsion between intercalated labels in the minor groove of the duplex and those clustered near the third strand or duplex probe creating the opportunity for a hyper-dense label concentration in the complex. These labels are then believed to interact when radiated on a donor-donor energy migration model because of their proximity. See, e.g., U.S. Patent No. 6,911,310 for additional information regarding donor-to-donor energy transfer systems. We have also observed that some labels, such as the intercalator YOYO-1, are capable of various intensities of emissions, depending on the structure of the complex into which they are intercalated. This may be because they are quenched by hydration. It may be that the triple-stranded structure, when formed, provides an enhanced dehydrated environment for the intercalated labels over that existing when intercalators inhabited the duplex prior to the approach of the third strand which binds to form the triplex. It may also be that the formation of a triplex stabilized by intercalated labels may cause local DNA collapse, which in turn contributes to yet greater dehydration of the labels and yet greater emissions from those labels.

The following language is used herein based on the foregoing understanding of the invention.

A complex saturating amount of label is a concentration of label at least sufficient to achieve a maximum in a graph of fluorescent intensity against label concentration at a fixed nucleic acid concentration.

A target saturating amount of probe is a concentration of probe at least sufficient to bond to all targets in the hybridization medium. This theoretical value may be adjusted based on

experimental data (e.g., titrating the probe in a hybridization mixture of fixed target concentration). In practice, the theoretical value may not be identical to the empirically derived value, due to factors like self-binding of the probes, non-specific binding to the substrate, etc. The expression "target saturating amount" as used herein refers to the empirically derived amount unless otherwise stated.

The target saturating amount of probe can also be expressed as a probe to target ratio. This ratio is preferably about 1:1 to about 10^{12} :1.

The absolute concentrations of probe and label in the hybridization mixture are generally selected based on the suspected concentration of target in the mixture. 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 80 microliters, which contains about 19 yoctomoles of human genomic target and about 3.2 pmoles of probe. Embodiments of the invention are sensitive enough to assay human genomic targets at a concentration of 2.4×10^{-18} M, preferably at a concentration of not more than 2.4×10^{-19} M. Embodiments of the invention are sensitive enough to employ probes at a concentration of 4×10^{-7} M; preferably at a concentration of not more than 4×10^{-8} M. It should go without saying that the foregoing values are not intended to suggest that the method cannot detect higher or lower concentrations of target or that the probe concentration cannot be higher or lower. In particularly preferred embodiments, unamplified genomic targets can be detected at their native concentrations. The inventive assay is sensitive enough to detect single nucleotide polymorphisms (SNPs) and/or multiple nucleotide polymorphisms in human genomic samples weighing 4 ng to 75 pg, which contain approximately 604 copies to 11 copies (1.3×10^{-17} M to 2.4×10^{-19} M in an 80 μ l hybridization mixture) of the nucleic acid target sequence. Thus, in certain embodiments, the assay if carried out in a reaction mixture of 80 μ l is conducted on a genomic sample containing less than 700 copies of the target nucleic acid sequence, and preferably about 150 to about 300 copies of the target nucleic acid sequence (sometimes referred to hereinafter as "the target"). Similarly, in an 80 μ l reaction mixture we have detected a characteristic sequence present in 5 copies of *Bacillus globigii* target nucleic acid.

The targets need not be partially or completely purified to achieve such sensitivity. In preferred embodiments, a biological specimen is obtained from an organism or cell, and a genomic sample is prepared from the specimen by lysis or digesting or removing at least a portion of (and most preferably substantially all) non-nucleic acid material, such as histones and the like, from the DNA. Suitable sources of genomic material for use in the invention include

but are not limited to eukaryotes, plants, animals, vertebrates, fish, mammals, humans, microbes and viruses.

Optionally, genomic DNA in the genomic sample can be amplified by a multiple displacement amplification method, preferably that disclosed in U.S. Patent No. 6,617,137 B2 to Dean et al., wherein denaturing conditions are avoided.

While certain prior assay methods require the DNA of the genomic sample to be digested to facilitate access to the target nucleic acid sequence(s), the present invention enables the direct detection of target nucleic acid sequence(s) that constitute an infinitesimal portion of the complete genome without requiring the genomic DNA to be segmented into smaller sequences. Thus, the present invention can detect target nucleic acid sequences when the genomic sample comprises a genomic target that is not fractionated or is only partially fractionated. In certain embodiments, the genomic sample comprises at least 1%, preferably at least 10%, more preferably 100% of a complete genome. In certain embodiments, the target nucleic acid sequence can be detected in genomic sequences more than 2 kb long, preferably more than 5 kb long. Accordingly, the length of the genomic material containing the target nucleic acid sequence is not an assay limiting factor. Preferably, the target nucleic acid sequence is in single- or double-stranded genomic material having a length from 8-bp to 3.3×10^9 bp long. Target nucleic acid sequence length should preferably be sufficiently long that the target nucleic acid sequence is unique in the sample (although a plurality of non-unique, shorter, sequences within a genome can be targeted to uniquely identify properties of the genome). Preferred target nucleic acid sequences are 8 to 200 bases in length, more preferably 15 to 30 bases in length. The target nucleic acid sequence can be unamplified genomic material, amplified from genomic material or synthetic. The target nucleic acid sequence can be all or part of the genome of the organism or cell from which the genomic material was extracted, or can belong to a pathogen present (or previously present) in the organism or cell. Thus, the invention is not only suitable for diagnosing genetic mutations, but also for detecting nucleic acids of pathogens that infect a host organism or cell.

The assay of the invention is also suitable for detecting non-genomic targets, such as cDNA, particularly for the purposes of screening cDNA libraries.

The assay can detect the presence of one or more targets using one or more probes. The use of a plurality of different probes to detect a plurality of different targets is particularly useful for detecting haplotypes.

We have previously disclosed that probes are preferably 2 to 200 bases long, and more preferably 5 to 30 bases long, and can be single or double-stranded. Since then, we have

unexpectedly discovered ways in which probe length can be adjusted to increase the sensitivity and specificity of detection. For example, in the systems described in the Examples, 25-mer and 30-mer probes outperformed 15-mer and 20-mer probes, with 25-mer probes sometimes providing the greatest sensitivity and specificity when detecting the presence of a SNP is the objective. Accordingly, triplex forming probes may be optimally specific for SNP detection when 25-mer long which differs from duplex forming probes which are optimally specific for SNP detection when they are shorter rather than longer.

Without wishing to be bound by any theories, we offer a possible explanation for this phenomenon. Assuming, for example, that labels are able to bind within the minor groove of a probe-target complex at sites separated by 11 bases, we would expect a 25-mer probe-target complex to have 2 minor-groove binding labels per complex, while a 15-mer probe-target complex would be expected to have only 1 minor-groove binding label per complex. This might explain why a 25-mer probe would outperform a 15-mer probe. The 30-mer probe-target complex would be expected to have the same number of minor-groove binding labels as the 25-mer probe-target complex (2 labels), but the 30-mer probe would not be as sensitive to nucleotide polymorphisms, since fluorescent intensity is correlated with binding affinity, and a base mismatch would be more destabilizing to a 25-mer than to a 30-mer. An alternative theory assumes that the labels are mutually repulsive as a first function of distance (F_1) and that the labels are capable of enhancing the fluorescence of adjacent labels (e.g., via FRET, fluorescent resonance energy transfer or via DDEM, donor-donor energy migration) as a second function of distance (F_2), wherein F_1 is inversely related to F_2 . There may be a concentration or range of concentrations of charged labels, which allow maximum intercalation of the probe-target complex and maximum FRET-like emission or DDEM. It is possible that the addition of the probe to the target can provide additional intercalation sites for the labels, but the number and location of such sites are constrained by mutual repulsion between the labels. Thus, probes below a certain length (which we expect will vary somewhat depending on the nature of the probe, target, labels and environment) might not provide adequate shielding of the mutually repulsive charges of proximal labels, and/or might not provide favorable sites for FRET-like or DDEM interaction between labels in the minor groove or intercalated between bases of the target.

For example, assume that labels are able to intercalate every 20 bases throughout the double-stranded target, and that the distance between these labels is too great to support FRET-like or DDEM interaction. If FRET-like or DDEM interaction does occur between such intercalated labels of the target and labels associated with the probe (e.g., by binding in the

minor groove, intercalating between probe and target bases, etc.), alignment of the probe-associated labels with the target associated labels would be most likely for longer probes. Probe strands of sufficient length may allow a sufficient number of the labels to come into such close proximity to one another that energy transfer or energy migration between the labels can enhance emission from the probe:target complex and hence detection.

Accordingly, probes of the invention are preferably single-stranded nucleic acids or nucleic acid analogues of 15 to 30 bases in length, wherein discrimination of the signal from background signals is maximized by energy transfer or energy migration between or among intra-target intercalated labels and probe-target intercalated labels. More preferably, the probe has a length optimized for energy transfer or energy migration. Preferably, the length is greater than 15 bases. Still more preferably, the probe is 20-30 bases in length.

Suitable probes for use in the inventive assay include, e.g., ssDNA, RNA, ssPNA, LNA, dsDNA, dsRNA, DNA:RNA hybrids, dsPNA, PNA:DNA hybrids and other single and double-stranded nucleic acids and nucleic acid analogues comprising uncharged, partially-charged, sugar:phosphate, and/or peptide backbones in whole or in part or base analogues in whole or in part. In certain embodiments, the length of the probe can be selected to match the length of the target. 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 certain embodiments of the invention, blocking probes can be used in addition to the probes intended to bind the target nucleic acid sequence. See, e.g., U.S. Patent No. 6,110,676.

The probe and target are hybridized in the presence of a hybridization promoting agent (HPA). HPAs are generally ions that have been found to improve the specificity and/or alacrity with which the assay can be performed. We have also found that HPAs can be used for extended duration assays to stabilize the intensity of fluorescence emitted from control samples containing probe or label. Suitable HPAs include, but are not limited to, cations of $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$, $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{HCl}$, NaCl , Na_2SO_4 , Na_2HPO_4 , and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Preferred HPAs include the water structure-making substances (i.e., kosmotropes or kosmotropic agents) disclosed in U.S. Patent No. 6,783,932 B2 to Fresco et al.

The benefits of the use of one or more HPAs in a reaction mixture and the best concentrations for use under any selected assay conditions may be determined experimentally using the present disclosure as a guide. Preferred concentrations for selected HPAs include, but are not limited to, the following: 50 to 80 mM NaCl , 10 to 60 mM Na_2SO_4 , 50 mM Na_2HPO_4 , 125 to 250 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 30 mM Trimethylammoniumchloride (or trimethylamine

hydrochloride), 30 to 52.5 mM tetramethylammoniumchloride (TMA-Cl), each added separately or 50 mM TMA-Cl in combination with 10 to 20 mM NaCl. U.S. Patent No. 6,783,932 B2 to Fresco et al. teaches the use of much higher concentrations of kosmotropes to stabilize triplexes based on polypurine sequences. While such higher concentrations are within the scope of the present invention, they are not required to stabilize the specific heteropolymeric triplexes and quadruplexes of the present invention.

In certain embodiments, the HPA is also a fluorescent label. In such embodiments, the use of a non-HPA label or additional HPA-labels is optional. HPAs additional to the HPA-label are also optional. The HPA-label is preferably an intercalating label, more preferably a dimeric cyanine dye, and even more preferably YOYO-1.

The labels of the invention (whether functioning solely as markers, solely as HPAs, or as HPAs and markers) are preferably intercalating fluorophores. Preferred labels are members 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-bridged heterodimer, ethidium monoazide, propidium iodide, SYTO dyes, SYBR Green 1, SYBR dyes, Pico Green, SYTOX dyes and 7-aminoactinomycin D. Most preferably, the labels are cyanine dyes or homo- or heterodimers of cyanine dyes that give enhanced fluorescence when associated with nucleic acids, such as those described in U.S. Patents Nos. 4,883,867 (Lee), 5,582,977 (Yue et al.), 5,321,130 (Yue et al.), and 5,410,030 (Yue et al.), including nucleic acid stains commercially available under the trademarks TOTO, BOBO, POPO, YOYO, TO-PRO, BO-PRO, PO-PRO and YO-PRO from Molecular Probes, Inc., Eugene, OR. Of these, YOYO-1 (sometimes referred to herein as "YOYO") is the most preferred.

Non-intercalating labels are also suitable for use in the invention. Preferred examples of such labels include biotin, rhodamine, fluorescein, and other labels or label pairs that by fluorescence or the absence of fluorescence signal whether they are bound in a target/probe complex when irradiated with exciting energy.

The invention further encompasses the use of labels that emit non-fluorescent signals. Such labels include luminescent agents, scattered-light detectable particles (see, e.g., U.S. Patent No. 6,214,560 to Yguerabide et al.), magnetic labels (see, e.g., Chemla et al. "Ultrasensitive magnetic biosensor for homogeneous immunoassay." *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* vol. 97, 14268-14272 (2000)), etc. In certain embodiments, the labels are those disclosed in U.S. Patent

No. 5,939,256 to Yamamoto et al., which cause a detectable change by reaction or interaction with the complex itself, or which are mutually interactive in the presence of a multiplex helical structure, thereby causing a detectable change. In certain embodiments, the labels are redox sets (e.g., redox pairs) of two-part probes, as disclosed in U.S. Patent No. 6,361,942 B1 to Coull et al. In certain embodiments, the labels are quantum dots.

It is also within the scope of the invention to use labels adapted for fluorescence anisotropy methods of detection, such as disclosed by U.S. Patent No. 5,593,867 to Walker et al.

In certain embodiments, labels are not required. For example, hybridization can be detected by drawing the hybridization complex through a nanopore, applying an electric field, and monitoring the nanopore for current changes, as disclosed in U.S. Patent Application Publication No. 2003/0099951 A1 to Akesson et al.

It is also possible to detect differences between melting profiles of similar complexes to determine whether the complexes are identical. See, e.g., U.S. Patent Application Publication No. 2003/0157507 A1 to Lipsky et al. In such embodiments, minor groove binders can also be

used to level the melting temperatures of probes, so that they exhibit comparable binding affinities for targets and comparable denaturation profiles for denaturation assays. See U.S.

Patent No. 6,683,173 B2 to Dempcy et al.

The label, probe, target and HPA are combined to provide the hybridization mixture, along with any additional components, such as water, at least one buffer, etc. The order of

addition of the components to the hybridization mixture need not be critical; but significant information about the target may be obtained if the order of addition to reaction mixtures is varied and the label emissions monitored and compared. For example, the HPA (and/or HPA-label) can be added to a solution which already contains the multiplex to be stabilized, or can be added along with one or more strands. Moreover, the components of the hybridization

mixture can be in the form of discrete compounds or composites of the otherwise individual components. Examples of such composites include, e.g., HPA, HPA-label and/or label covalently bonded to or intercalated within the probe and/or the target. In certain embodiments,

the composite can be an "oligonucleotide-quencher-fluorescent-dye conjugate" of the type disclosed in U.S. Patent Application Publication No. 2004/0081959 A9 to Reed et al. Such

embodiments can further comprise the minor groove binders (MGBs) of Reed et al. The MGBs of Reed et al. are also suitable for addition as discrete components of the hybridization mixture, and are expected to facilitate multiplex formation without increasing background noise from non-specific fluorescence. See also U.S. Patent Application Publication No. 2004/0058322 A1 to Hegneth et al.

The order of addition of components to the hybridization mixture can be significant in certain embodiments. However, we have not found that the order of addition need be so significant as to render the method inoperable under any specific order of addition. Rather, we have found that altering the order of addition can identify a preferred order of addition, which results in improved results relative to less preferred orders of addition. For example, we have unexpectedly discovered that adding the target nucleic acid sequence (e.g., contained in the genomic sample) to the hybridization mixture last can result in enhanced specificity and sensitivity. This is particularly surprising considering that adding the label to the hybridization mixture last is more preferred for certain other embodiments.

The order of addition can also be significant when some or all of the components are electrically pre-treated in accordance with the teachings of our earlier U.S. Patent Application Publication No. 2003/0170659. For example, a buffered solution might be electrically pre-treated before combining the probe with other components to form the hybridization mixture. Electrical pre-treatment can enhance the sensitivity and/or specificity of the assay.

The hybridization mixture may be incubated for a period of time to allow hybridization to occur. Incubation is conducted over a period of time less than 60 minutes, preferably, less than 15 minutes, more preferably not more than 10 minutes, even more preferably about 5 minutes or less, most preferably 1 minute or less. Incubation is preferably conducted at a non-denaturing temperature, and more preferably is conducted at temperature(s) within the range of 20 to 40°C. As used herein, the term "non-denaturing temperature" refers to a temperature insufficient to denature the double-stranded target nucleic acid sequence, and explicitly encompasses temperatures at least as high as 40°C. Temperatures sufficient to denature the target are not preferred as they add cost, delay and unnecessary complexity to the method.

The hybridization mixture is irradiated with coherent light preferably at or near the wavelength of maximum excitation of the label after incubation and then monitored for fluorescence if the hybridization mixture contains a fluorophore. For YOYO (i.e., YOYO-1), an excitation wavelength of 488 nm is preferred. It has been discovered that the power density of the light irradiating the test sample is important, and should preferably be set to deliver about 84 W/cm²/sec radiation when the label is YOYO-1. Unduly high power densities, whether delivered from lasers or bright light sources, can not only abolish the assay, but also damage the reagents such that the test sample cannot be subsequently assayed using appropriately powered radiation. This is so because YOYO-1 can act as a photocleavage agent if suitably stimulated. Lasers are the most preferred radiation source. Instruments powered by "bright light" sources, such as Xenon bulbs, that generate pulsed or continuous bright light, even if subsequently

filtered, are less suitable to carry out the assay using YOYO-1 and generally generate unintelligible results. Filtered "bright light" is not equivalent to laser stimulation. Very low watt power photo diodes, such as that present in a Turner Design "TD" Picofluor instrument, powered by 4 AAA batteries, can be used to carry out the assay to measure YOYO-1 fluorescent emissions.

One or more different light sources can be employed to irradiate the labels. Irradiating the labels with a plurality of beams of light of different wavelengths is particularly useful where labels having different excitation characteristics are employed. For example, laser light of 488 nm can be applied to excite YOYO-1 labels targeted to detecting one target sequence while laser light of another wavelength is applied to excite other labels present.

In an alternative embodiment, the specificity of the assay can be improved by digesting any duplex in the hybridization medium that might otherwise generate a non-specific signal. Duplex target in the triplex is protected from digestion, as taught by U.S. Patent No. 6,458,540 B1 to Ramberg. Tolum et al., "A real-time DNase assay (ReDA) based on PicoGreen fluorescence," *Nucleic Acids Res.* 2003; Sep. 15; 31(18):e111 shows that intercalators in duplex need not halt digestion, whereas intercalation and stabilization of triplex DNA may. In certain embodiments of the invention, a separation step is conducted prior to detecting the signal emitted from the hybridization medium. This step separates unbound probes from probe-target complexes. Preferably, the separation step comprises the use of a polycationic solid support as taught in U.S. Patent No. 5,599,667.

The hybridization mixture may be monitored one or more times for label emission after being irradiated one or more times. The signal measured is preferably the fluorescent intensity emitted from the hybridization mixture. In such embodiments, the binding affinity between the probe and target can be directly or inversely correlated with the intensity, depending on whether the label signals hybridization through signal quenching or signal emission. Thus, the fluorescent intensity generated by intercalating agents is directly correlated with probe-target binding affinity, whereas the fluorescent intensity of embodiments employing non-intercalating fluorophores covalently bound to the probe may be inversely correlated with probe-target binding affinity. In certain embodiments, the fluorescent intensity increases (or decreases for non-intercalators) along with the extent of matching between the probe and target, 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.

Embodiments of the invention comprise calibrating the measured signal against reference signals to determine whether the probe is a perfect match for the target nucleic acid

sequence. 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 nucleic acid sequence and the probe. As the binding affinity between the target nucleic acid sequence and the probe 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 hybridization complex, etc., the method of the invention can be used to detect whether the probe and target nucleic acid sequence are a perfect match or a mismatch and ultimately to sequence the target nucleic acid sequence.

The emitted signal can be serially collected and evaluated as a function of time as well as instantaneously. For example, a change in the fluorescent signal with respect to time can be monitored to better determine whether the probe perfectly matches the target nucleic acid sequence in a hybridization mixture containing an intercalating label, wherein an increase in the fluorescent signal with respect to time ("waxing") indicates a perfect match and a decrease in the fluorescent signal with respect to time ("waning") indicates a lack of a perfect match. Similarly, waxing and waning signals generated by a hybridization mixture containing a non-intercalating label may indicate an imperfect match and a perfect match, respectively. Although under some circumstances the signal intensity of a mixture lacking a perfect match does not decrease over time, it is still possible to distinguish between perfect matches and mismatches where the signal emitted by the mismatch mixture changes at a lower rate than that of the match mixture, or the signal emitted by the mismatch mixture shows evidence of discontinuous changes and regressions.

The invention encompasses the use of one or more of the foregoing signal measurement and data analysis protocols. The use of more than one of the protocols can enhance the reliability of the assay. Other parameters of the assay (e.g., order of addition to the hybridization mixture, length of probe, etc.) can also be varied to check for consistency across multiple protocols, to enhance assay reliability.

Detection of the fluorescent signal is preferably completed within 60 minutes of providing the hybridization mixture, more preferably less than 15 minutes, even more preferably about 10 minutes, still more preferably within about 5 minutes. The entire method is preferably conducted in less than 60 minutes, more preferably less than 15 minutes, still more preferably less than 10 minutes, even more preferably in about 5 minutes or less, at a non-denaturing temperature.

The reliability of the invention is independent of guanine and cytosine content in either the probe or the target. In the traditional W-C motif, 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 method of the invention is useful for detecting genetic mutations, including SNPs, with an unprecedented combination of speed and reliability. Nucleic acid sequence repeats, insertions and/or deletions can also be detected. The method is also useful for detecting a morphological status of an organism or cell from which a genomic sample is obtained. The morphological status preferably comprises information regarding: (a) a stage of development; (b) higher order structure; (c) binding events; and/or (d) a disease state.

The method can be conducted within a biological cell.

The invention comprises in addition to the foregoing methods a kit for practicing those methods. The kit preferably comprises: sample collection means for collecting the genomic sample; the probe; the hybridization promotion agent; and the labels.

Suitable sample collection means include but are not limited to syringes, cups, vials, sponges, swabs, sticks, capillary tubes, absorbent sheets, membrane, film, microwell, cofutar, beads, chips, etc.. Preferably, the sample collection means is adapted to collect tissue, buccal cells, blood, fluid, sputum, urine and/or feces.

In certain embodiments, a molecular identification tag is added to the sample to provide a kit and method of marking a biological sample for purposes of tracking its history and providing a definitive audit trail. The tag is at least one molecule capable of detection. Preferably, the tag is a nucleic acid or nucleic acid analogue sequence that has been functionalized with at least one detectable label (preferably spin labels or quantum dots) and optionally with at least one cross-linking agent. Sample collection means used in the method and kit would preferably include the tag (e.g., cross-linked to a support surface) and have a bar code or other means for identifying which tag is uniquely associated with the sample. See, e.g., U.S. Patent No. 6,153,389, which discloses identification tags for PCR-based assays.

In certain embodiments, the probe is provided on a support selected from the group consisting of a bead, a plate, a membrane, a film, a microwell, an electrode, a column or a capillary tube.

The probe, labels and HPAs of the kit are essentially the same as for the method.

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.

EXAMPLES

Example 1

In this Example, we compare triplex assay signals emitted when 15-mer or 25-mer single strand oligonucleotide probes are used to assay duplex amplicon targets. Genomic dsDNA was extracted from a human blood sample using a QIAamp DNA blood purification kit (QIAGEN, Mississauga, Canada) as per manufacturer's instructions. A 491 bp dsDNA fragment (SEQ ID NO:1), corresponding to a clinically significant region of exon 10 of the cystic fibrosis gene [Genomics 10, 214-228 (1991)], was PCR-amplified. A 20-mer upper primer and a 20-mer lower primer were synthesized on a DNA synthesizer (Expedite 8909, PerSeptive Biosystems), cartridge purified and dissolved in ddH₂O. Sequence for the 20-mer upper primer: 5'-GCA GAG TAC CTG AAA CAG GA-3' (SEQ ID NO:2). Sequence for the 20-mer lower primer: 5'-CAT TCA CAG TAG CTT ACC CA-3' (SEQ ID NO:3). 100 pmole of each primer was mixed with 1 µg genomic dsDNA in a 100 µl PCR reaction mix using a Taq PCR Master Mix Kit (QIAGEN, Mississauga, Canada). The following PCR cycle parameter was used: 1 cycle of 94°C x 5 min, 25 cycles of (93°C x 30 sec, 48°C x 30 sec, 72°C x 45 sec), 1 cycle of 72°C x 7 min. The size of the PCR fragment was confirmed by gel electrophoresis. No purification of the sample to remove trace amounts of residual primers or genomic DNA was performed. The concentration of the PCR-amplified 491 bp dsDNA target, with residual primers and genomic DNA, was determined by UV spectroscopy and a 1 pmole/µl stock solution was prepared. Antisense 15-mer or 25-mer ssDNA probe sequences, derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene were synthesized on a DNA synthesizer (Expedite 8909, PerSeptive Biosystems), cartridge purified and dissolved in ddH₂O at a concentration of 1 pmole/µl.

Probe CF01-15 (SEQ ID NO:4) was a 15-mer ssDNA probe designed to be completely complementary to a 15 nucleotide segment of the sense strand of the wild-type PCR-amplified 491 bp dsDNA target (SEQ ID NO:1), overlapping amino acid positions 505 to 510 [Genomics 10, 214-228 (1991)].

The sequence for probe CF01-15 (SEQ ID NO:4) was: 5'-CAC CAA AGA TGA TAT-3'.

Probes CF10-15 and CF09-15 were 15-mer mutant ssDNA probes identical in sequence to wild-type probe CF01-15, except for a one base mutation (underlined).

The sequence for probe CF10-15 (SEQ ID NO:5) was: 5'-CAC CAA AGA CGA TAT-3'.

The sequence for probe CF09-15 (SEQ ID NO:6) was: 5'-CAC CAG AGA TGA

TAT-3'.

Probe CF01-25 (SEQ ID NO:7) was a 25-mer ssDNA probe designed to be completely complementary to a 25 nucleotide segment of the sense strand of the wild-type PCR-amplified 491 bp dsDNA target (SEQ ID NO:1), overlapping amino acid positions 504 to 512 [Genomics 10, 214-228 (1991)].

The sequence for probe CF01-25 (SEQ ID NO:7) was: 5'-TAG GAA ACA CCA AAG ATG ATA TTT T-3'.

Probes CF10-25 and CF09-25 were 25-mer mutant ssDNA probes identical in sequence to wild-type probe CF01-25, except for a one base mutation (underlined).

The sequence for probe CF10-25 (SEQ ID NO:8) was: 5'-TAG GAA ACA CCA AAG ACG ATA TTT T-3'.

The sequence for probe CF09-25 (SEQ ID NO:9) was: 5'-TAG GAA ACA CCA CAG ATG ATA TTT T-3'.

Triplex assays, signaled by fluorescent intercalators such as YOYO-1, have been performed with stimulating radiation from several lasers, including a Melles Griot 50 mW argon ion laser, Model 532-AP, a 25 mW Ion Laser Technology argon ion laser, Model 5490 AGM-00, a 20 mW Coherent solid state laser, Model Sapphire 488-20 OEM, a Genexus Analyzer containing a Melles Griot 15 mW argon ion laser, Model 35-IMA-415-120 and a Genexus Analyzer containing a 20 mW Coherent solid state laser, Model Sapphire 488-20 OEM. All of these lasers were configured to deliver between 80–84 W/cm²/sec radiation at a wavelength of 488 nm.

The reaction mixture (80 μ l) contained the following: 0.05 pmoles of PCR-amplified 491 bp dsDNA target, 1.25 pmoles of 15-mer or 25-mer ssDNA probe, 0.5 x TBE and 150 nM of the DNA intercalator YOYO-1 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). The reaction mixtures referred to in this and all other examples were 80 μ l final volumes and were incubated at room temperature (RT), unless otherwise indicated. Following a 5 minute incubation at RT (24°C) the reaction mixtures were placed into Corning No Bind Surface 384-well plates (black with clear bottom) and irradiated with the Genexus Analyzer 15 mW argon ion laser having a wavelength of 488 nm. 10 mW of laser light irradiates the samples from the bottom of each well. Irradiation occurred at a sampling interval of 60 microns at settings of 20 hertz, 32% PMT and 10 μ A/V sensitivity. Fluorescent emissions were monitored and again upon irradiation after a further 10 minutes of incubation. This Genexus Analyzer was used in all accompanying Examples, unless otherwise indicated.

The ssDNA probes, when incubated with YOYO-1 as a control, produced a relatively high level of fluorescence as compared to that of the dsDNA target control incubated with YOYO-1. In each control the same amount of YOYO-1 was present as in the related reaction mixture. High level of fluorescence from the ssDNA probe control was a result of the formation of complexes stabilized and signaled by YOYO-1. The 25-mer probe control produced a much higher level of fluorescence than did the 15-mer probe control (Table 1).

Perfectly matched DNA triplexes consisting of the 491 bp dsDNA (SEQ ID NO:1) and 15-mer probe CF01-15, formed in the presence of 150 nM YOYO-1 (sample 4), produced very intense fluorescent emissions after both 5 min and 15 min of incubation (Table 1). The emission from a one bp A-C mismatched dsDNA:ssDNA 15-mer triplex (491 bp dsDNA + probe CF10-15) (sample 6) was 96.2% and 95.4% less after a 5 min and a 15 min incubation, respectively, than from the perfectly matched 15-mer triplex (sample 4), when normalized for variations in ssDNA probe control emissions. The emission from a one bp T-C mismatched dsDNA:ssDNA 15-mer triplex (491 bp dsDNA + probe CF09-15) (sample 8) was 98.2% and 98.8% less after a 5 min and a 15 min incubation, respectively, than from the perfectly matched 15-mer triplex (sample 4), when normalized for variations in ssDNA probe control emissions. Perfectly matched DNA 25-mer triplexes consisting of the 491 bp dsDNA (SEQ ID NO:1) and probe CF01-25, formed in the presence of 150 nM YOYO-1 (sample 10), produced intense fluorescent emissions after 5 min and after 15 min of incubation (Table 1). Complexing the dsDNA target with matched 25-mer ssDNA probes resulted in a greatly enhanced emission as compared to that arising upon the binding of the dsDNA target to matched 15-mer ssDNA probes. Accordingly, the use of 25-mer probes resulted in a more sensitive triplex assay of the duplex target than did use of 15-mer probes. Incompletely complementary probe and target complexes, containing a 1 bp A-C mismatch (491 bp dsDNA + probe CF10-25) (sample 12) or a 1 bp T-C mismatch (491 bp dsDNA + probe CF09-25) (sample 14) produced emission intensities that were 98.0% or 100% lower, respectively after 5 min of incubation, and 98.5% or 100% lower, respectively after 15 min of incubation, than those observed with the perfectly matched 25-mer triplexes (sample 10), when normalized for variations in ssDNA probe control emissions (Table 1). These data support the surprising conclusion that the 25-mer probes can be more specific than the 15-mer probes in detecting SNPs in duplex targets. It is remarkable, unexpected and highly useful that a 1 bp mismatch in a 25 base triplex can be more destabilizing than a 1 bp mismatch in a 15 base triplex. To further delineate this counter intuitive fact, we compared perfectly matched triplexes formed with the duplex target and 15, 20, 25, 27, 30 or 35 mer oligo probes under conditions described above. We empirically determined 25-mer probes

to be the most specific under the conditions of the reaction. Longer triplex forming probes can accordingly be more specific than shorter triplex forming probes.

It can occur that a mismatched triplex, formed when a 25-mer probe is complexed with a duplex target in the presence of YOYO-1, produces emission which is less than the probe control emission (compare samples 13 and 14) (Table 1). This result can occur because, while YOYO-1 can facilitate self-association of the probes giving rise to an emission upon irradiation, such self-association and the complex with YOYO-1 appears to disperse upon introduction of the duplex target without a large enough offsetting gain in fluorescence from YOYO-1 intercalation into the minor groove of the duplex target and into new grooves created by any mismatched triplex formed. Assay emissions from mismatched triplexes, which are less than emissions from the relevant probe control emission provide a very desirable characteristic of a homogeneous in solution SNP assay. In this case, the method results in a binary assay signal for SNPs present in genomic dsDNA targets.

Example 2. This Example compares quadruplex assay signals emitted when either 15-mer or 25-mer dsDNA probes have been pre-incubated with YOYO-1 at various temperatures prior to addition to the reaction mixture.

Duplex probes were created out of complementary sense and antisense 15-mer or 25-mer sequences, derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene, which were synthesized on a DNA synthesizer, cartridge purified and then dissolved in ddH₂O at a concentration of 1 pmole/ μ l. Equimolar amounts of complementary oligonucleotides were heated at 95°C for 10 min and allowed to anneal gradually in the presence of 10 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA and 100 mM NaCl, as the temperature cooled to 21°C over 1.5 hours. DsDNA oligos were diluted in ddH₂O at a concentration of 1 pmole/ μ l.

Ds probe CF01-15 (SEQ ID NO:10) comprised a 15-mer dsDNA probe designed to be homologous to a 15 nucleotide segment of the wild-type PCR-amplified 491 bp dsDNA target (SEQ ID NO:1), overlapping amino acid positions 505 to 510 [Genomics 10, 214-228 (1991)].

The sequence for the sense strand of ds probe CF01-15 (SEQ ID NO:10) was: 5'-ATA TCA TCT TTG GTG-3'.

Ds probe CF10-15 and ds probe CF09-15 comprised 15-mer mutant dsDNA probes identical in sequence to wild-type ds probe CF01-15, except for a one bp mutation (underlined).

The sequence for the sense strand of ds probe CF10-15 (SEQ ID NO:11) was: 5'-ATA TCG TCT TTG GTG-3'.

The sequence for the sense strand of ds probe CF09-15 (SEQ ID NO:12) was: 5'-ATA TCA TCT GTG GTG-3'.

Ds probe CF01-25 (SEQ ID NO:13) was a 25-mer dsDNA probe designed to be homologous to a 25 nucleotide segment of the wild-type PCR-amplified 491 bp dsDNA target (SEQ ID NO:1), overlapping amino acid positions 504 to 512 [Genomics 10, 214-228 (1991)].

The sequence for the sense strand of ds probe CF01-25 (SEQ ID NO:13) was: 5'-AAA ATA TCA TCT TTG GTG TTT CCT A-3'.

Ds probe CF10-25 and ds probe CF09-25 were 25-mer mutant dsDNA probes identical in sequence to wild-type ds probe CF01-25, except for a one bp mutation (underlined).

The sequence for the sense strand of ds probe CF10-25 (SEQ ID NO:14) was: 5'-AAA ATA TCG TCT TTG GTG TTT CCT A-3'.

The sequence for the sense strand of ds probe CF09-25 (SEQ ID NO:15) was: 5'-AAA ATA TCA TCT GTG GTG TTT CCT A-3'.

We have previously disclosed in, e.g., U.S. Patent No. 6,656,692 and U.S. Patent Application Publication No. 2003/0113716, that duplex probes, which are homologous to duplex targets, will bind specifically and detectably to such duplex targets. Duplex probes and duplex targets may also specifically and detectably bind if there exists Watson-Crick correspondence between proximal bases in the complex. Such "nested-complementary" binding can less readily occur than homologous quadruplex binding however.

1.25 pmoles of wild-type or mutant dsDNA probe were pre-incubated in 0.5 x TBE buffer with 30 nM YOYO-1 either at RT (24°C) or at 30°C (on a hot plate) for 1 hr prior to the addition of 0.05 pmoles of PCR-amplified 491 bp dsDNA target (SEQ ID NO:1) and 70 nM YOYO-1. The 80 µl reaction mixtures were then incubated either at RT or at 30°C for 5 minutes, placed into a quartz cuvette, irradiated with a Coherent solid state laser having a wavelength of 488 nm and monitored immediately for fluorescent emission. The laser irradiation period was 70 msec and delivered 80 W/cm² radiation. The emitted light was collected by Ocean Optics CCD and documented by Ocean Optics software.

Pre-incubation of the dsDNA probe controls with 30 nM YOYO-1 for 1 hr at 30°C, greatly reduced the emission intensity of each dsDNA probe control. When pre-incubated probe as described was added to the reaction mixtures, the highest emission intensities were produced by dsDNA:dsDNA quadruplexes consisting of perfectly matched parallel homologous duplexes (491 bp dsDNA + ds probe CF01-15 and 491 bp dsDNA + ds probe CF01-25). Additionally, incubation of the reaction mixture at 30°C resulted in enhanced emissions from samples

containing matched 15-mer or 25-mer homologous quadruplexes, than did the same complexes incubated at RT. The perfectly matched homologous quadruplex emission gains were most evident when 25-mer dsDNA probes were used in the reactions incubated at 30°C (data not shown). Sensitivity and specificity of a YOYO-1 promoted and signaled SNP assay can accordingly be enhanced by pre-incubation of the probe prior to addition to the reaction mixture and also by incubation of the reaction mixture at non-denaturing temperatures higher than RT.

Incompletely homologous probe and target combinations generating a 1 bp A-C mismatched complex (491 bp dsDNA + ds probe CF10-15) or a 1 bp T-C mismatched complex (491 bp dsDNA + ds probe CF09-15) resulted in quadruplex associated fluorescent emission intensities that were 61.3% or 67.8% lower, respectively, after 5 min of incubation at RT, than those emitted from the perfectly matched parallel homologous quadruplexes at RT. One bp A-C mismatched quadruplexes (491 bp dsDNA + ds probe CF10-25) or one bp T-C mismatched quadruplexes (491 bp dsDNA + ds probe CF09-25) produced quadruplex associated fluorescent emission intensities that were both 100% lower after 5 min of incubation at RT, than those emitted from the perfectly matched quadruplexes at RT. Greater specificity was observed when dsDNA target was complexed with homologous 25-mer dsDNA probes, than when complexed with homologous 15-mer dsDNA probes to dsDNA target. Accordingly longer duplex probes can be more specific than shorter duplex probes. For SNP assaying 25-mer duplex probes are preferred.

The quadruplex associated fluorescent intensities emitted from a one bp A-C mismatched dsDNA:dsDNA quadruplex formed with a 15-mer probe (491 bp dsDNA + ds probe CF10-15) or formed with a 25-mer probe (491 bp dsDNA + ds probe CF10-25) were 41.5% and 85.2% lower, respectively, after a 5 min incubation at 30°C, than those emitted from the perfectly matched quadruplexes at 30°C. The quadruplex associated fluorescent intensities emitted from a one bp T-C mismatched dsDNA:dsDNA quadruplex formed with a 15-mer probe (491 bp dsDNA + ds probe CF09-15) or formed with a 25-mer probe (491 bp dsDNA + ds probe CF09-25) were both 100% lower after a 5 min incubation at 30°C, than those emitted from the perfectly matched quadruplexes at 30°C.

Pre-incubation of the 25-mer dsDNA probe with 30 nM YOYO-1 for 1 hr at 30°C prior to quadruplex formation at 30°C resulted in greater sensitivity and specificity than that achieved after pre-incubation of the 25-mer duplex probe with 30 nM YOYO-1 for 1 hr at RT or than that achieved after pre-incubation of a 15-mer dsDNA probe with 30 nM YOYO-1 at 30°C for 1 hour. Significant intensity gains of YOYO-1 emission were observed for perfectly matched

quadruplexes formed with either 15-mer dsDNA probes or with 25-mer dsDNA probes when the reaction mixtures were incubated at 30°C instead of RT. The gains were most pronounced when 25-mer dsDNA parallel homologous probes were used. Accordingly, ds 25-mer probes can be more sensitive and specific than comparable ds 15-mer probes.

5

Example 3

This Example describes triplex formation of purified human genomic dsDNA targets reacted with 15-mer, 20-mer, 25-mer or 30-mer ssDNA probes at RT in the presence of YOYO-1.

10

Human genomic dsDNA was extracted from a blood sample using a QIAamp DNA blood purification kit (QIAGEN, Mississauga, Canada), as per manufacturer's instructions. The concentration of the genomic dsDNA was determined by UV spectroscopy.

Antisense 15-mer, 20-mer or 25-mer ssDNA probes, with sequences derived from exon 10 of the human cystic fibrosis (CFTR) gene, were synthesized on a DNA synthesizer, cartridge purified and dissolved in ddH₂O at a concentration of 1 pmole/ μ l. Probe Delta F508-WT15C (SEQ ID NO:4) was a 15-mer wild-type ssDNA probe identical in sequence to probe CB01-15. Probe Delta F508-MUT15C (SEQ ID NO:16) was a 15-mer mutant ssDNA probe designed to be complementary to a 15 nucleotide segment of the sense strand of exon 10 of the human cystic fibrosis gene, except for a consecutive three base deletion at amino acid positions 507 and 508 where the wild-type antisense sequence AAG is deleted.

20

The sequence for probe Delta F508-MUT15C (SEQ ID NO:16) was: 5'-AAC ACC AAT GAT ATT-3'.

25

Probe Delta F508-WT20C (SEQ ID NO:17) was a 20-mer wild-type ssDNA probe designed to be complementary to a 20 nucleotide segment of the sense strand of exon 10 of the human cystic fibrosis gene, overlapping amino acid positions 506 to 512.

The sequence for probe Delta F508-WT20C (SEQ ID NO:17) was: 5'-TAG GAA ACA CCA AAG ATG AT-3'.

30

Probe Delta F508-MUT20C (SEQ ID NO:18) was a 20-mer mutant ssDNA probe designed to be complementary to a 20 nucleotide segment of the sense strand of exon 10 of the human cystic fibrosis gene, except for a consecutive three base deletion at amino acid positions 507 and 508 where the wild-type antisense sequence AAG is deleted.

The sequence for probe Delta F508-MUT20C (SEQ ID NO:18) was: 5'-ATA GGA AAC ACC AAT GAT AT-3'.

Probe Delta F508-WT25C (SEQ ID NO:7) was a 25-mer wild-type ssDNA probe identical in sequence to probe CF01-25.

Probe Delta F508-MUT25C (SEQ ID NO:19) was a 25-mer mutant ssDNA probe designed to be complementary to a 25 nucleotide segment of the sense strand of exon 10 of the human cystic fibrosis gene, except for a consecutive three base deletion at amino acid positions 507 and 508 where the wild-type antisense sequence AAG is deleted.

The sequence for probe Delta F508-MUT25C (SEQ ID NO:19) was: 5'-ATA GGA AAC ACC AAT GAT ATT TTC T-3'.

The reaction mixture (80 µl) contained the following: 500 pg of human genomic dsDNA target (approximately 75 copies), 3.2 pmoles of either 15-mer, 20-mer or 25-mer ssDNA probe, 0.5 x TBE and 600 nM YOYO-1. Fluorescent emissions from the reaction mixtures were detected using the Genexus Analyzer comprising a 15 mW argon ion laser and PMT settings of 34% after 5, 15, 30, 45 and 60 minutes of incubation.

The ssDNA probe controls produced high levels of fluorescent emission in the presence of 600 nM YOYO-1 as compared to that emitted from the genomic dsDNA target control also comprising 600 nM YOYO-1. 25-mer probe controls exhibited higher levels of fluorescence than did the comparable 20-mer or 15-mer probe controls (Table 2). Fluorescence emission values from the reaction mixtures were normalized to identify triplex-associated signal by subtracting the appropriate probe control emission value from the relevant reaction mixture emission, both of which were monitored over time.

Heteropolymeric perfectly matched DNA triplexes, consisting of genomic dsDNA and 25-mer Delta F508-WT25C probe (sample 5), formed and were detected after as little as a 5 min incubation in the presence of 600 nM YOYO-1 (Table 2). It is truly remarkable that perfect match triplex related emissions can be significantly greater than the combined emissions of genomic dsDNA target control and probe control. It is also remarkable that under certain conditions, the emission levels of these perfectly matched DNA triplexes (sample 5) were essentially stable at various time points up to 55 min following the initial 5 min incubation and first laser measurement (Table 2 and data not shown). The observation that the detected triplex complexes formed in the first 5 minutes were stably detected throughout the 60 minute period strongly suggests that equilibrium of the genomic target and the other reagents had been substantially achieved after only five minutes of incubation at RT. The foregoing observations constitute evidence against the "random collision" model of nucleic acid binding. Time constraints imposed by manual handling steps have precluded us from monitoring triplex formation with genomic targets during incubations shorter than 5 minutes.

The triplex-associated fluorescent emission intensities produced by a gDNA:ssDNA triplex containing a 3 bp mismatch (genomic dsDNA + probe Delta F508-MUT25C) (sample 6) were 90.1%, 92.9%, 92.5% and 91.6% lower after 5, 15, 30 and 45 minute incubations, respectively, than those emitted by the perfectly matched triplex (sample 5) (Table 2). These results clearly demonstrate the capability to assay human genomic dsDNA homogeneously in solution, at RT, after as little as 5 minutes of incubation, using unlabeled oligo ssDNA probes and YOYO-1. Such heteropolymeric triplexes can be formed to detect SNPs in human genomic samples, a sequence in a human genomic sample, or the presence or genotype of another organism or pathogen in a sample also containing human genomic dsDNA. The assay provides for the direct detection of a signal related to the triplex complex. We sometimes refer to the complex as the INGENEUS TRIPLEX and the assay capability disclosed in this invention as the Genomic Assay.

Heteropolymeric perfectly matched DNA triplexes, consisting of genomic dsDNA and 20-mer Delta F508-WT20C probe (sample 10), also formed and were detected after a 5 minute incubation in the presence of 600 nM YOYO-1 (Table 2). The efficiency of perfect match triplex formation following a 5 minute incubation with YOYO-1 appeared to be significantly less, as evidenced by the level of fluorescent emission; when 20-mer ssDNA probes were used, rather than 25-mer ssDNA probes. The triplex-associated fluorescent intensities for a 20-mer triplex containing a 3 bp mismatch (genomic dsDNA + probe Delta F508-MUT20C) (sample 11) were 43.0%, 77.6%, 85.9% and 95.5% lower after 5, 15, 30 and 45 minute incubations, respectively, than those emitted by the comparable perfectly matched 20-mer triplex (sample 10) (Table 2). Although the level of discrimination between perfectly matched 20-mer triplexes and 3 bp mismatched triplexes comprised of genomic dsDNA and 20-mer ssDNA probes was noticeably lower than that observed for triplexes comprised of genomic dsDNA and 25-mer ssDNA probes after a 5 minute incubation, incubation up to 45 minutes resulted in a progressive increase in discrimination levels between matched and mismatched 20-mer triplexes (Table 2). This was attributed to a steady increase of perfect match 20-mer triplex formation over time coincident with a progressive decline of mismatched 20-mer triplex formation. This pattern continued and was monitored during the period of 45 and 60 minutes of incubation (data not shown). After 45 minutes of incubation the discrimination levels between matched and mismatched triplexes composed of genomic dsDNA and 20-mer ssDNA probes were equivalent to the discrimination levels between matched and mismatched triplexes composed of genomic dsDNA and 25-mer ssDNA probes (Table 2), though with lower triplex-associated fluorescent emission signals.

Significantly lower levels of fluorescence emissions from 15-mer perfect match triplex were observed when genomic dsDNA and probe Delta F508-WT15C (sample 15) were incubated for 5 minutes in the presence of 600 nM YOYO-1 (Table 2). Fluorescence emissions observed from 3 bp mismatched 15-mer triplexes comprised of genomic dsDNA and probe
5 Delta F508-MUT15C (sample 16) were higher after short incubation than that of the perfectly matched 15-mer triplexes (sample 15). However, after 45 minutes of incubation in the presence of 600 nM YOYO-1, mismatched 15-mer triplex-associated fluorescence had declined sufficiently that the triplex-associated fluorescent emission from the 3 bp mismatched 15-mer triplex (sample 16) was 83.1% lower than that of the perfectly matched 15-mer triplex (sample
10 15) (Table 2). This discrimination was maintained following 60 minutes of incubation (data not shown).

The above results clearly demonstrate the astonishing efficiency of the heteropolymeric triplex assay to detect SNP mismatches in non-denatured, non-amplified, human genomic dsDNA targets, preferably when using YOYO-1 and 25-mer ssDNA probes. The sensitivity of
15 the heteropolymeric triplex assay of genomic dsDNA targets is astonishing considering that 500 pg of genomic dsDNA, approximately 75 copies, was assayed homogeneously in a reaction mixture final volume of 80 µl. SNPs in human genomic targets weighing from 2 ng to 100 pg, approximately 302 copies to 15 copies, have similarly been assayed in solution using varied
20 YOYO-1 concentrations.

Antisense 20-mer, 25-mer or 30-mer ssDNA probes, with sequences derived from exon
4 of the human methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, were synthesized on a DNA synthesizer, cartridge purified and dissolved in ddH₂O at a concentration of 1 pmole/µl.

Probe C677T-WT20C (SEQ ID NO:20) was a 20-mer wild-type ssDNA probe designed to be complementary to a 20 nucleotide segment of the sense strand of exon 4 of the human
25 MTHFR gene [Nature Genetics 7, 195-200 (1994)].

The sequence for probe C677T-WT20C (SEQ ID NO:20) was: 5'-TGA TGA TGA AAT CGG CTC CC-3'.

Probe C677T-MUT20C (SEQ ID NO:21) was a 20-mer mutant ssDNA probe identical in sequence to wild-type probe C677T-WT20C, except for a one base mutation (underlined).
30 The MTHFR 677 polymorphism is a cytosine to thymine substitution in the sense strand of the MTHFR gene, resulting in an alanine to valine substitution in the MTHFR enzyme.

The sequence for probe C677T-MUT20C (SEQ ID NO:21) was: 5'-TGA TGA TGA AAT CGA CTC CC-3'.

Probe C677T-WT25C (SEQ ID NO:22) was a 25-mer wild-type ssDNA probe designed to be complementary to a 25 nucleotide segment of the sense strand of exon 4 of the human MTHFR gene.

The sequence for probe C677T-WT25C (SEQ ID NO:22) was: 5'-TGA TGA TGA
5 AAT CGG CTC CCG CAG A-3'.

Probe C677T-MUT25C (SEQ ID NO:23) was a 25-mer mutant ssDNA probe identical in sequence to wild-type probe C677T-WT25C, except for a one base mutation (underlined).

The sequence for probe C677T-MUT25C (SEQ ID NO:23) was: 5'-TGA TGA TGA
10 AAT CGA CTC CCG CAG A-3'.

Probe C677T-WT30C (SEQ ID NO:24) was a 30-mer wild-type ssDNA probe designed to be complementary to a 30 nucleotide segment of the sense strand of exon 4 of the human MTHFR gene.

The sequence for probe C677T-WT30C (SEQ ID NO:24) was: 5'-GCG TGA TGA
TGA AAT CGG CTC CCG CAG ACA-3'.

15 Probe C677T-MUT30C (SEQ ID NO:25) was a 30-mer mutant ssDNA probe identical in sequence to wild-type probe C677T-WT30C, except for a one base mutation (underlined).

The sequence for probe C677T-MUT30C (SEQ ID NO:25) was: 5'-GCG TGA TGA
TGA AAT CGA CTC CCG CAG ACA-3'.

The reaction mixtures (80 µl) contained the following: 1 ng or 2 ng of human genomic
20 dsDNA target (approximately 151 copies or 302 copies, respectively); 3.2 pmoles of either 20-mer, 25-mer or 30-mer ssDNA probe, 0.5 x TBE and 500 nM YOYO-1. Fluorescent emissions of the reaction mixtures were monitored with the Genexus Analyzer 15 mW argon ion laser at a setting of 30% PMT after 5, 15, 30, 45 and 60 minutes of incubation, as described in Example 1.

Very different fluorescence emission levels were observed for the wild-type and mutant
25 ssDNA probe controls, due to differences in levels of self-hybridization characteristic of each probe sequence in the presence of YOYO-1 under these conditions (Table 3). 30-mer probes exhibited higher levels of fluorescence than did the 25-mer or 20-mer probes. Fluorescence emissions from reaction mixtures were normalized to identify triplex-associated signal by subtracting the appropriate probe control emission value from the related reaction mixture
30 emission, both of which were monitored over time.

Heteropolymeric perfectly matched 30-mer and 25-mer triplexes, consisting of genomic dsDNA and either probe C677T-WT30C or probe C677T-WT25C (samples 5 and 10 in Table 3, respectively), formed during a 5 minute incubation in the presence of 500 nM YOYO-1. The perfect match 30-mer and 25-mer triplex-associated signal levels were both significantly greater

than the combined fluorescence signals of target genomic dsDNA control plus related probe controls after only 5 minutes of incubation. That the 30-mer and 25-mer triplex complexes formed and were directly detected after 5 minutes of incubation and that the detection signals were stable throughout the ensuing 55 minute period (Table 3) suggests that equilibrium had been substantially achieved after only five minutes of incubation. Using half the amount of genomic dsDNA target, i.e. 1 ng instead of 2 ng in the genomic triplex assay, surprisingly did not result in a proportionate decline in triplex-associated signal emitted from the perfectly matched 30-mer or 25-mer triplex complexes formed (data not shown). Perfectly matched 25-mer triplexes formed with similar efficacy, as evidenced by the comparable levels of reaction mixture fluorescent emissions (data not shown). Based on the level of triplex-associated fluorescent emission, perfectly matched 25-mer triplexes formed more efficiently than did perfectly matched 30-mer triplexes, under the reaction conditions tested (compare samples 10 and 5 in Table 3).

The triplex-associated fluorescent emission from a 1 bp C-A mismatched 30-mer triplex in a reaction mixture comprised of 2 ng genomic dsDNA and probe C677T-MUT30C (sample 6) was 90.4%, 92.6%, 92.4%, and 93.3% lower after 5, 15, 30 and 45 minute incubations, respectively, than that emitted from the reaction mixture containing the perfectly matched 30-mer triplex (sample 5), each evaluated after comparable incubation (Table 3). Similarly, when 1 ng genomic dsDNA was reacted with probe C677T-MUT30C to form a 1 bp C-A mismatched 30-mer triplex, the triplex-associated fluorescent emission from this mismatched triplex was 80.2%, 84.9%, 86% and 87.3% lower after 5, 15, 30 and 45 minute incubations, respectively, than that emitted from the reaction mixture containing the perfectly matched 30-mer triplex, each evaluated after comparable incubation (data not shown). These results clearly demonstrate the efficiency of the signal emitted by the INGENEUS TRIPLEX using 30-mer ssDNA probes to detect SNP mismatches in human genomic dsDNA targets. It is remarkable that a 1 bp mismatch in a 30-mer INGENEUS TRIPLEX can be so destabilizing to allow such high levels of discrimination between perfectly matched 30-mer triplexes and mismatched 30-mer triplexes in the presence of YOYO-1 and a human genomic DNA sample.

When 2 ng genomic dsDNA was reacted with probe C677T-MUT25C to form a 1 bp C-A mismatched 25-mer triplex (sample 11, Table 3), the triplex-associated fluorescent emission from the reaction mixture containing this mismatched triplex was 98.1%, 99.0%, 99.3% and 99.4% lower after 5, 15, 30 and 45 minute incubations, respectively, than that emitted by the reaction mixture containing the perfectly matched 25-mer triplex (sample 10). The fluorescent emission from a reaction mixture containing a 1 bp C-A mismatched 25-mer triplex comprised

of 1 ng genomic dsDNA and probe C677T-MUT25C was 91.4%, 93.7%, 94.4% and 95.2% lower after 5, 15, 30 and 45 minute incubations, respectively, than that emitted by a reaction mixture containing the perfectly matched 25-mer triplex (data not shown). These results collectively demonstrate the high level of specificity of the heteropolymeric triplex assay when practised with either 30-mer or 25-mer ssDNA probes and YOYO-1 to detect SNP mismatches in human genomic dsDNA targets.

The efficiency of formation of heteropolymeric perfectly matched 20-mer triplexes in reaction mixtures containing either 2 ng or 1 ng of genomic dsDNA and probe C677T-WT20C (sample 15 in Table 3 and data not shown, respectively) was significantly less than those formed with comparable 25-mer or 30-mer probes. Although the level of discrimination between perfectly matched 20-mer triplexes (sample 15) and 1 bp mismatched triplexes (sample 16) comprised of genomic dsDNA and 20-mer ssDNA probes was noticeably lower than that observed for triplexes comprised of genomic dsDNA and 25-mer or 30-mer ssDNA probes after a 5 minute incubation, incubation up to 45 minutes resulted in a progressive increase in discrimination levels between matched and mismatched 20-mer triplexes (Table 3). The above results demonstrate that 25-mer or 30-mer ssDNA probes are clearly preferred over shorter length probes of 15 or 20 bases for the heteropolymeric triplex assay of samples containing human genomic DNA.

Example 4

Example 4 demonstrates the effect of electrical pretreatment of test medium on subsequent heteropolymeric triplex formation between ssDNA probes, YOYO-1 and human genomic dsDNA targets. Previously we have disclosed the advantages of electrical pretreatment of medium before addition to a reaction mixture containing targets of less complexity than human genomic dsDNA. See U.S. Patent Application Publication No. 2003/0170659.

Test medium comprising 0.7 X TBE in a 1.5 ml microcentrifuge tube was either untreated or electrically pretreated prior to use. Test medium was electrically pretreated by means of two platinum/iridium electrodes 2 mm apart immersed in the test medium. Forty 500 msec pulses of nine volts of DC current, separated by 10 second intervals, were applied to 56 µl of test medium consisting of 0.7 X TBE. Immediately after the final pulse of DC current, 3.2 pmoles of heteropolymeric 25-mer ssDNA probe (SEQ ID NO:7 or SEQ ID NO:19), 500 pg of human genomic dsDNA target (approximately 75 copies) and YOYO-1 were added to the untreated and electrically pretreated test media to produce reaction mixtures with a final volume of 80 µl. The final buffer concentration was 0.5 X TBE, and the final YOYO-1 concentration

was 600 nM. Fluorescent emissions were monitored with the PMT set at 30% after 5, 15, 30, 45 and 60 minutes of incubation.

While reaction mixtures containing perfectly matched DNA triplexes (genomic dsDNA + probe Delta F508-WT25C) emitted the highest fluorescent intensity, reaction mixtures containing incompletely complementary triplexes with a 3 bp mismatch (genomic dsDNA + probe Delta F508-MUT25C) produced triplex-associated fluorescent emissions that were 54.7%, 79.9%, 84.7%, 98.6% and 90.5% lower after 5, 15, 30, 45 and 60 minutes of incubation, respectively, than those emitted by the perfectly matched triplexes in the untreated medium after comparable incubation (data not shown).

Application of forty 9V pulses to the test medium prior to addition of test components resulted in approximately a 2-fold decrease in fluorescent emission levels of ssDNA probe control, as compared to that observed with the same control in untreated test medium. No difference however in the fluorescence emission from the genomic dsDNA control followed from electrical pretreatment of the test medium. Electrical pretreatment of the test medium as described dramatically enhanced the signal emitted from reaction mixtures containing perfectly matched heteropolymeric 25-mer triplex formation, in this case to the extent of a 9250% increase as compared to that observed with the same perfectly matched triplex formed in untreated test medium (data not shown). Signal emitted from three bp mismatched triplex formation (genomic dsDNA + probe Delta F508-MUT25C) was also significantly increased by the application of forty 9V pulses to the test medium, such that the triplex-associated fluorescent emission from the reaction mixtures containing 3 bp mismatched complexes in the pretreated medium was only 17.4% lower after a 5 minute incubation, than that obtained by the perfectly matched complexes (data not shown). The extraordinary high levels of fluorescent emission of both matched and mismatched heteropolymeric 25-mer DNA triplexes were not only sustained over time, but increased slightly throughout the 60 minute incubation period monitored.

This dramatic increase in emitted triplex-associated signal demonstrates a dramatic ability to increase the sensitivity of the triplex assay using 25-mer ssDNA probes and YOYO-1 by practising electrical pretreatment of test medium prior to addition of analyte and reagents. Such increased sensitivity will allow for detection of far fewer than 75 copies of a sequence of interest present in a reaction mixture having a final volume of 80 µl even in the presence of human genomic background.

Example 5

This Example demonstrates the ability of the INGENEUS TRIPLEX to form specifically on human genomic dsDNA targets, purified from blood or saliva, over a range of target concentrations reacted with 25-mer ssDNA probes in the presence of YOYO-1.

5 Human genomic dsDNA was extracted from a human blood sample using a QIAamp DNA blood purification kit (QIAGEN, Mississauga, Canada) or from human saliva using an Oragene DNA collection kit (DNA Genotek, Ottawa, Canada) as per manufacturer's instructions. The concentration of the genomic dsDNA was determined by UV spectroscopy.

10 Antisense 25-mer ssDNA probes, with sequences derived from exon 10 of the human factor V gene or sequences derived from intron 14b of the human cystic fibrosis (CFTR) gene, were synthesized on a DNA synthesizer, cartridge purified and dissolved in ddH₂O at a concentration of 1 pmole/ μ l.

Probe FVL-WT25C (SEQ ID NO:26) was a 25-mer wild-type ssDNA probe designed to be complementary to a 25 nucleotide segment of the sense strand of exon 10 of the human factor V gene. The sequence for probe FVL-WT25C (SEQ ID NO:26) was: 5'-CCC TCT GTA TTC CTC GGC TGT GCA G-3'. Probe FVL-MUT25C (SEQ ID NO:27) was a 25-mer mutant ssDNA probe identical in sequence to wild-type probe FVL-WT25C, except for a one base mutation (underlined) corresponding to the Factor V Leiden (FVL) mutation, G1691A [Nature 362:64-67 (1994)]. This mutation results in the substitution of glutamine for arginine at position 506 in the amino acid sequence of the coagulation factor V protein.

The sequence for probe FVL-MUT25C (SEQ ID NO:27) was: 5'-CCC TCT GTA TTC CTT GCC TGT CCA G-3'.

25 Probe 2789+5G->A-WT25C (SEQ ID NO:28) was a 25-mer wild-type ssDNA probe designed to be complementary to a 25 nucleotide segment of the sense strand of exon 14b and intron 14b of the human CFTR gene.

The sequence for probe 2789+5G->A-WT25C (SEQ ID NO:28) was: 5'-AAT AGG ACA TGG AAT ACT CAC TTT C-3'.

30 Probe 2789+5G->A-MUT25C (SEQ ID NO:29) was a 25-mer mutant ssDNA probe identical in sequence to wild-type probe 2789+5G->A-WT25C, except for a one base mutation (underlined) corresponding to the 2789+5G->A mutation in intron 14b of the human CFTR gene.

The sequence for probe 2789+5G->A-MUT25C (SEQ ID NO:29) was: 5'-AAT AGG ACA TGG AAT ATT CAC TTT C-3'.

The reaction mixture (80 μ l) contained the following: amounts from 75 pg to 4 ng of human genomic dsDNA target (approximately 11 copies to 604 copies), 3.2 pmoles of 25-mer ssDNA probe, 0.5 x TBE and 500 nM YOYO-1. Fluorescent emission from the reaction mixtures were monitored with a PMT setting of 30% after 5, 15, 30, 45 and 60 minutes of incubation.

Different fluorescence emission levels were observed for the wild-type and mutant ssDNA probe controls. Fluorescence emission values from reaction mixtures were normalized to identify triplex-associated signal by subtracting the appropriate probe control emission value, both of which were monitored over time.

Heteropolymeric perfectly matched 25-mer triplexes, consisting of either 2 ng, 1 ng, 500 pg or 200 pg genomic dsDNA (purified from blood) and probe FVL-WT25C (samples 5, 8, 11 and 14 in Table 4, respectively), formed during a 5 minute incubation in the presence of 500 nM YOYO-1. The perfect match 25-mer triplex signal levels were all significantly greater than the combined fluorescence signals of target genomic dsDNA control and wild-type probe control after only 5 minutes of incubation. When 1 ng genomic dsDNA was present in the reaction mixture there was a progressive increase in perfectly matched 25-mer triplex fluorescence emission (sample 8, Table 4) throughout the 60 minute incubation period. While decreasing concentrations of genomic dsDNA controls produced progressively diminished fluorescent emissions, decreasing genomic dsDNA concentrations in the reaction mixture did not result in a proportionate decline in triplex-associated emissions from the perfectly matched 25-mer triplex formed (Table 4).

The triplex-associated fluorescent emissions from reaction mixtures containing a 1 bp G-T mismatched 25-mer triplex and genomic targets weighing between 2 ng and 200 pg and probe FVL-MUT25C (samples 6, 9, 12 and 15 in Table 4) were all 100% lower after 5, 15, 30, 45 and 60 minute incubations than those emitted by the reaction mixtures containing perfectly matched 25-mer triplexes and comparable amounts of genomic dsDNA and probe FVL-WT25C (samples 5, 8, 11 and 14, respectively, in Table 4). As discussed in Example 1, YOYO-1 facilitated self-association of the probes appears to be greatly diminished upon introduction of the genomic duplex target resulting in a decline in YOYO-1 emission, without a sufficiently large offsetting gain in fluorescence from intercalation into the duplex target and any mismatched triplex formation. This may result in the fluorescent emissions from reaction mixtures containing

mismatched genomic DNA triplexes being less than the emissions from comparable probe controls.

Heteropolymeric perfectly matched 25-mer triplexes, in reaction mixtures containing either 4 ng, 2 ng, 1 ng, 500 pg, 200 pg, 100 pg or 75 pg genomic dsDNA (purified from blood) and 3.2 pmoles of probe CFTR 2789+5G->A-WT25C formed with efficiency similar to the perfectly matched 25-mer triplexes composed of genomic dsDNA and probe FVL-WT25C (shown in Table 4) after a 5 minute incubation in the presence of 500 nM YOYO-1 (data not shown). The CFTR perfect match 25-mer triplex-associated emissions were all significantly greater than the combined fluorescence emission of target genomic dsDNA control and related probe control emission. As was usual under the assay conditions employed, the triplex-associated emissions from the reaction mixtures were stable throughout the 60 minute incubation period (data not shown).

The triplex-associated fluorescent emission from a reaction mixture containing a 1 bp T-G mismatched 25-mer triplex comprised of between 4 ng and 75 pg genomic dsDNA and probe 2789+5G->A-MUT25C, were all 100% lower after 5, 15, 30, 45 and 60 minute incubations than those emitted by the reaction mixtures containing perfectly matched 25-mer triplexes comprising comparable amounts of genomic target DNA and after being normalized to the relevant probe control value (data not shown).

The above results clearly demonstrate the astonishing efficiency and sensitivity of the INGENEUS TRIPLEX to enable the Genomic Assay to directly detect various mismatches in various genes in non-denatured, non-amplified, human genomic dsDNA targets, over a broad range of genomic dsDNA concentrations. The foregoing assay capability is all the more astonishing as it allows no more than 75 pg of genomic dsDNA, approximately 11 copies, to be assayed for SNPs on equipment available to researchers that has not been optimized for sensitivity of detection, or to work with final volumes less than 80 μ l.

Numerous SNPs have been successfully assayed using the Genomic Assay using essentially the same assay protocol described in this Example. On occasion, variations in reagent concentrations or protocol were made. The SNPs assayed include Factor V Leiden G1691A, MTHFR C677T, CFTR delta F508, CFTR delta I507, CFTR 2789+5G->A, CFTR 3849+10kbC->T, CFTR 3659delC, CFTR G551D, CFTR 621+1G->T, CFTR R1162X, CFTR 1717-1G->A, CFTR A455E, CFTR G542X, CFTR N1303K, CFTR R560T and CFTR W1282X. Seventy-five percent of the target sequences in the duplex targets assayed in the above-mentioned Genomic Assays contained one or more regions of 4 or 5 alternating purine

and pyrimidine bases, which under mild conditions may form regions of Z DNA. This Z DNA potential resulted in no assay difficulty in carrying out Genomic Assays.

In all these instances human genomic dsDNA samples purified from blood were assayed. Genomic triplex assays were also performed for the CFTR 2789+5G→A mutation using genomic dsDNA purified from saliva samples, which had been stored at RT for 1 week following incubation at 50°C for 30 min. The 50°C incubation is recommended by the manufacturer of the Oragene kit to allow long-term storage of saliva samples at RT.

Table 5 compares the assay results obtained from human genomic dsDNA purified from saliva to those of human genomic dsDNA purified from blood. Either 4 ng or 2 ng of human genomic dsDNA was assayed using 3.2 pmoles of probe 2789+5G→A-WT25C (samples 5 and 8 in Table 5). Emissions from the reaction mixtures indicated that matched triplexes formed with equivalent efficiency (samples 5 and 8 in Table 5 and data not shown) after a 5 minute incubation, in the presence of 500 nM YOYO-1. The triplex-associated emissions were stable throughout the 45 minute period that they were monitored.

The triplex-associated fluorescent emissions from reaction mixtures containing a 1 bp T-G mismatched 25-mer triplex comprised of 4 ng genomic dsDNA and probe 2789+5G→A-WT25C (sample 6, Table 5) were 94.9%, 93.1%, 94.1% and 93.8% lower after 5, 15, 30 and 45 minute incubations, respectively, than those emitted by the reaction mixtures containing perfectly matched 25-mer triplexes (sample 5 in Table 5). Similarly when 2 ng genomic dsDNA was reacted with the same probe to form a 1 bp T-G mismatched 25-mer triplex (sample 9, Table 5), the triplex-associated fluorescent emissions were 100%, 97.7%, 100% and 100% lower after 5, 15, 30 and 45 minute incubations, respectively, than those emitted by the reaction mixtures containing perfectly matched 25-mer triplexes (sample 8, Table 5).

The above results demonstrate that the Genomic Assay of human genomic DNA purified from saliva can be as efficient and specific as one in which the human genomic DNA is purified from blood. Extensive purification of genomic DNA, as occurs when using Qiagen kits, may therefore not be a requirement for the triplex assay of samples containing human genomic dsDNA. The acquisition of human genomic DNA for assay from saliva offers clear advantages in handling, storing and shipping over acquisition from blood. In side by side comparisons, 1 ml of peripheral blood purified by Qiagen kit yielded more than enough human genomic DNA to carry out over 9,000 triplex assays as described in these Examples, if 3 ng were assayed per reaction. A typical sputum sample, semi-purified with an Oragene kit, produced enough human genomic DNA for over 7,000 triplex assays to be performed.

It is observed that all of the data in these Examples is consistent with the conclusion that YOYO-1 molecules complexed with a triplex nucleic acid emit more light than they do when complexed with duplex nucleic acid.

5 Example 6

This Example describes a SNP assay of human genomic dsDNA targets reacted with 25-mer ssDNA probes in which the waxing and/or waning of emissions are monitored over time and evaluated.

Human genomic dsDNA was extracted from a human blood sample and quantitated as described in Example 3. Antisense 25-mer ssDNA probes, with sequences derived from intron 19 of the human CFTR gene, were synthesized on a DNA synthesizer, cartridge purified and dissolved in ddH₂O at a concentration of 1 pmole/ μ l.

Probe 3849+10kbC->T-WT25C (SEQ ID NO:30) was a 25-mer wild-type ssDNA probe designed to be complementary to a 25 nucleotide segment of the sense strand of intron 19 of the human CFTR gene. The sequence for probe 3849+10kbC->T-WT25C (SEQ ID NO:30) was: 5'-GFG TCT TAC TCG CCA TTT TAA TAG T-3'. Probe 3849+10kbC->T-MUT25C (SEQ ID NO:31) was a 25-mer mutant ssDNA probe identical in sequence to wild-type probe 3849+10kbC->T-WT25C, except for a one base mutation (underlined) corresponding to the 3849+10kbC->T mutation in intron 19 of the human CFTR gene.

The sequence for probe 3849+10kbC->T-MUT25C (SEQ ID NO:31) was: 5'- GTG TCT TAC TCA CCA TTT TAA TAC T-3'.

The reaction mixtures (80 μ l) contained the following: 2 ng of human genomic dsDNA target (approximately 302 copies), 3.2 pmoles of 25-mer ssDNA probe, 0.5 x TBE, 500 nM YOYO-1 and either 40 mM or 45 mM of the kosmotropic cation tetramethylammonium chloride (TMA-Cl). In each experiment the reaction mixtures were formed in duplicate, one had YOYO-1 added last to the reaction mixture. In the other reaction mixture, all components of the reaction mixture had been mixed before genomic DNA was added. In all cases reaction mixtures were incubated for 5 min and irradiated. Fluorescent emissions of the reaction mixtures were monitored with the Genexus Analyzer 15 mW argon ion laser at a setting of 32% PMT after 5, 15, 30, 45 and 60 minutes of incubation, as described in Example 1.

In the presence of 45 mM or 40 mM TMA-Cl the fluorescent emissions from the wild-type and mutant ssDNA probe controls for each SNP assayed were similar after 5 min of

incubation (Tables 6, 7 and data not shown) and remained steady over a further 55 min time course. Only the triplex-associated emission values obtained following 15 to 60 min of incubation of reaction mixtures are shown in Tables 6 and 7.

The triplex-associated emissions from duplicate perfectly matched 25-mer triplexes in reaction mixtures consisting of genomic DNA and probe 2789+5G->A-WT25C (samples 5 and 9, Table 6), monitored after a 15 min incubation in the presence of 45 mM TMA-Cl and 500 nM YOYO-1, were similar whether YOYO-1 or gDNA had been added last to the reaction mixtures. Under both triplex assay protocols the perfectly matched triplex-associated emissions dramatically increased when monitored over a 60 min time period (Table 6, Figs. 1 and 2).

The triplex-associated emissions from duplicate mismatched 25-mer triplexes in reaction mixtures consisting of genomic DNA and probe 2789+5G->A-MUT25C (samples 6 and 10, Table 6), monitored after a 15 min incubation in the presence of 45 mM TMA-Cl and 500 nM YOYO-1, were similar whether YOYO-1 or gDNA had been added last to the reaction mixtures and produced emissions that were 55% or 54% lower than reaction mixtures containing perfectly matched triplexes (samples 5 and 9, respectively, Table 6). The triplex-associated emissions from the mismatched triplexes formed in the reaction mixture to which YOYO-1 had been added last, retained relatively constant when monitored over a 60 min time period (sample 6, Table 6 and Fig. 1). Since the corresponding perfectly matched triplex-associated emissions increased significantly over the monitoring period, the level of discrimination between perfectly matched triplex signals and 1 bp mismatched signals increased from 55% to 65% in the reaction mixtures to which YOYO-1 had been added last. The triplex-associated emissions from the mismatched triplexes formed in the reaction mixture to which gDNA had been added last, increased slightly over time (sample 10, Table 6 and Fig. 2). However, the rate of increase of triplex-associated emission for the mismatched triplexes in these reaction mixtures was much less than that from reaction mixtures containing comparable perfectly matched triplexes, such that the level of discrimination between perfectly matched triplex-associated signals and 1 bp mismatched triplex-associated signals increased from 54% to 60% when monitored over the time period.

The triplex-associated emissions from perfectly matched 25-mer triplexes in reaction mixtures consisting of genomic DNA and probe 3849+10kbC->T-WT25C (samples 5 and 9, Table 7), monitored after a 15 min incubation in the presence of 40 mM TMA-Cl and 500 nM YOYO-1, were similar whether YOYO-1 or gDNA had been added last to the reaction mixtures. Under both triplex assay protocols, the perfectly matched triplex-associated emissions increased when monitored until the 60 min time point (Table 7, Figs. 3 and 4).

In the reaction mixture containing 40 mM TMA-Cl, to which YOYO-1 had been added last, the triplex-associated emissions from a mismatched 25-mer triplex consisting of genomic DNA and probe 3849+10kbC->T-MUT25C (sample 6, Table 7) was 70%, 84%, 90%, 94%, 99%, 98%, 100%, 100%, 100%, 100% and 100% lower after 5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 and 60 min of incubation, respectively, than that emitted from a similarly monitored reaction mixture containing the perfectly matched 25-mer triplex (sample 5, Table 7). In the reaction mixture containing 40 mM TMA-Cl, to which gDNA had been added last, the triplex-associated emissions from a mismatched 25-mer triplex consisting of genomic DNA and probe 3849+10kbC->T-MUT25C (sample 10, Table 7) was 49%, 55%, 62%, 66%, 69%, 72%, 73%, 76%, 85% and 88% lower after 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 and 60 min of incubation, respectively, than those emitted from a similarly monitored reaction mixture containing the perfectly matched 25-mer triplex (sample 9, Table 7).

Accordingly the addition of specific concentrations of TMA-Cl or one or more kosmotropic cations added separately or in combination to an assay reaction mixture can result in a progressive increase in signal emissions if perfect match binding is occurring, while mismatch binding may result in a progressive decline in signal emissions from an assay reaction mixture (Table 7, Figs 3 and 4, and data not shown). Thus reaction mixtures can be selected in which increases in discrimination levels between perfect match binding and mismatch binding can be monitored over time. Monitoring can as well be directed to observe high, constant or increasing levels of binding associated signal from reaction mixtures, under which mismatch binding signals are low. Consequently there are advantages in carrying out assays in duplicate employing various protocols or reagents so as to obtain signal whose several characteristics confirm the scoring of the sample. We refer to these methods of detecting matched or mismatched binding collectively as the "waxing and waning" methods. It is very useful to generate fluorescent signal Genomic Assays, which are not dependent merely on relative gains in emission intensities, but also can employ rates and direction of change of significant emissions over time.

When 2 ng of genomic DNA was reacted with either 25-mer Delta F508-WT25C probe or 25-mer Delta F508-MUT25C probe in reaction mixtures containing 40 mM TMA-Cl and 500 nM YOYO-1, and either YOYO-1 or gDNA had been added last to the reaction mixtures, waxing and waning of perfect match triplex-associated emissions and mismatch triplex-associated emissions was observed over the 60 min incubation period (data not shown). In this instance triplex-associated emissions were also monitored after 24 hr of incubation of reaction

45

mixtures. The waxing and waning emission pattern was evident after 24 hr of incubation (data not shown).

When 2 ng of genomic DNA was reacted with either 25-mer FVL-WT25C probe or 25-mer FVL-MUT25C probe in reaction mixtures containing 50 mM TMA-Cl, 20 mM NaCl and 500 nM YOYO-1, and either YOYO-1 or gDNA had been added last to the reaction mixtures, the waxing and waning emission pattern was observed upon monitoring the reaction mixtures over 24 hours (data not shown).

Numerous kosmotropic cations have been used in conjunction with 500 nM YOYO-1 to improve the specificity of the Genomic Assay and also enhance the waxing and waning of triplex-associated emissions. These include 50 to 80 mM NaCl, 10 to 60 mM Na₂SO₄, 50 mM Na₂HPO₄, 125 to 250 mM (NH₄)₂SO₄, 30 mM TrisMA-Cl, 30 to 52.5 mM TMA-Cl, each added separately or 50 mM TMA-Cl in combination with 10 to 20 mM NaCl. The benefits of the use of one or more kosmotropic cations in a reaction mixture and the best concentrations for use under any selected assay conditions may be determined experimentally.

It is accordingly clear that a Genomic Assay may be performed by forming the INGENEUS TRIPLEX in two or more reaction mixtures assembled in accordance with two or more protocols which are calculated to produce triplex-associated emissions monitored over time, which allow for multiple emission characteristics to be observed and evaluated to allow for more accurate assaying.

Example 7

This Example demonstrates the ability of the INGENEUS TRIPLEX to form specifically on pathogenic genomic dsDNA targets reacted with 25-mer ssDNA probes in the presence of YOYO-1 and an excess of human genomic dsDNA.

A suspension of vegetative *Bacillus globigii* (BG) cells was supplied by Dycor Technologies Ltd. (Edmonton, Alberta, Canada). One ml of BG was pelleted by centrifugation for 5 min at 5000 x g (7500 rpm), resuspended in 20 µl Bacterial Cell Releasing Agent (New Horizons, Columbus, MD), and incubated at RT for 5 min. The lysed bacteria were then resuspended in 160 µl buffer AL (supplied in the QIAamp DNA mini purification kit, QIAGEN, Mississauga, Canada), and incubated at 56°C with 20 µl proteinase K for 30 min. Isolation of the BG genomic dsDNA was completed with the QIAamp DNA purification kit, as per manufacturer's instructions. The concentration of the BG genomic dsDNA was determined by UV spectroscopy. Human genomic dsDNA was extracted from a human blood sample and quantitated as described in Example 3.

Antisense 25-mer ssDNA probes, with sequences complementary to a 25 nucleotide segment of the sense strand of the Bgl I restriction endonuclease (bglIR) gene or the sporulation-specific SASP protein (csgA) gene from *B. globigii*, were synthesized on a DNA synthesizer, cartridge purified and dissolved in ddH₂O at a concentration of 1 pmole/ μ l.

5 The sequence for probe bglIR-WT25C (SEQ ID NO:32) was: 5'-TAT TTT GAT TAT AGG ACA TGA AGA T-3'.

 The sequence for probe csgA-WT25C (SEQ ID NO:33) was: 5'-GCA AAT AAC CGA GTG TAA CAT CCA T-3'.

 The reaction mixtures (80 μ l) contained the following: 0.46 pg of BG genomic dsDNA (100 copies), 3.2 pmoles of 25-mer ssDNA probe, 0.5 x TBE, 40 mM TMA-Cl, between 500 and 300 nM YOYO-1 and either the presence or absence of 2 ng of human genomic dsDNA target (approximately 302 copies). In all cases YOYO-1 was added last to the reaction mixtures, which were incubated for 5 min and irradiated. Fluorescent emissions of the reaction mixtures were monitored with the Genexus Analyzer 15 mW argon ion laser at a setting of 32% PMT after 5, 15, 25, 35, 45, 55 and 65 minutes of incubation, as described in Example 1. In the presence of 40 mM TMA-Cl, the fluorescence emission levels for both the bglIR-WT25C and csgA-WT25C ssDNA probe controls increased as the YOYO-1 concentration was increased in the reaction mixture (Table 8 and data not shown), indicative of the level of probe self-hybridization at the different YOYO-1 concentrations. The fluorescence emission level of each probe control remained constant throughout the 65 minute incubation period. As expected, the fluorescence emission levels of the human genomic DNA controls decreased slightly with decreasing YOYO-1 concentration and remained relatively constant throughout the 65 minute incubation period (Table 8). No fluorescent signal was observed for BG genomic DNA controls monitored at PMT settings of 32% (Table 8) or 34% (data not shown), reflecting the very low copy number of BG gDNA assayed. At a 36% PMT setting, the BG gDNA controls gave fluorescence emission values slightly above that of the YOYO-1 controls, at each YOYO-1 concentration assayed (data not shown). Fluorescence emission values from reaction mixtures were normalized to identify triplex-associated signal by subtracting the appropriate probe control emission value, both of which were monitored over time.

30 Heteropolymeric perfectly matched 25-mer triplexes, consisting of 100 copies of BG genomic dsDNA and probe bglIR-WT25C, formed during a 5 minute incubation in the presence of 500, 400 or 300 nM YOYO-1 (samples 5, 10 and 15 in Table 8, respectively). The perfect match reaction mixture signal emission levels were all significantly greater than the combined fluorescence signals of target BG genomic dsDNA control or probe control. The efficiency of

triplex formation improved as the YOYO-1 concentration was decreased from 500 nM to 300 nM in the reaction mixtures containing 100 copies of BG genomic DNA. When 300 nM YOYO-1 was present in the reaction mixture there was a progressive increase in perfectly matched 25-mer triplex fluorescence emission (sample 15, Table 8) throughout the first 35 minutes of incubation, after which a plateau in fluorescence emission was observed. When 200 copies of BG genomic DNA were assayed with the bglIR-WT2C probe, efficient triplex formation was also observed in the presence of 500 – 300 nM YOYO-1 after 5 minutes of incubation, with 400 nM and 500 nM being the preferred YOYO-1 concentration in the 80 µl reaction mixtures (data not shown). BG genomic DNA ranging in concentration from 1000 copies to 30 copies per 80 µl was also successfully assayed with the csgA-WT25C probe (data not shown). As little as 10 copies of BG genomic DNA in a reaction volume of 80 µl was reproducibly assayed with the bglIR-WT2C probe in the presence of 300 nM YOYO-1, clearly demonstrating the extreme sensitivity of the INGENEUS TRIPLEX assay for detecting pathogens (data not shown).

Even more remarkable is the ability of the INGENEUS TRIPLEX to specifically assay 100 copies of bacterial genomic DNA amidst a huge human genomic DNA background. Heteropolymeric perfectly matched triplexes, formed between the 100 copies of BG genomic dsDNA and probe bglIR-WT25C, formed during a 5-minute incubation in the presence of 300 nM YOYO-1, 40 mM TMA-Cl and 302 copies of human genomic DNA (sample 17 in Table 8).

Moreover, there was a progressive increase in BG triplex fluorescence emission throughout the 65 minutes of incubation. The fluorescence emission of the reaction mixtures shown in Table 8 was also monitored after 24 hours of incubation. While the BG triplex-associated fluorescence observed in the absence of background human genomic DNA slightly decreased after 24 hours of incubation, the BG triplex-associated fluorescence observed in the presence of excess human genomic DNA continued to increase throughout the 24 hours of incubation. The ability to homogeneously assay 0.33 copies of bacterial genomic DNA for each copy of human genomic DNA present demonstrates the extreme sensitivity of the INGENEUS TRIPLEX assay for detecting pathogens in no more than 5 minutes.

Example 8

This Example demonstrates the ability to assay wild-type homozygous, mutant heterozygous or mutant homozygous human genomic dsDNA samples for the MTHFR C677T mutation.

Human genomic dsDNA that was either wild-type homozygous, mutant heterozygous or mutant homozygous with respect to MTHFR C677T, was extracted from patient blood samples

and quantitated as described in Example 3. Antisense 25-mer ssDNA probes, with sequences derived from exon 4 of the human MTHFR gene, were prepared as described in Example 3.

The reaction mixtures (80 μ l) contained the following: 1 ng or 2 ng of human genomic dsDNA target (approximately 151 copies or 302 copies, respectively), 3.2 pmoles of either wild-type or mutant 25-mer ssDNA probe, 0.5 X TBE and 500 nM YOYO-1. Fluorescent emissions of the reaction mixtures were monitored with the Genesys Analyzer 15 mW argon ion laser at a setting of 30% PMT after 5, 15, 30, 45 and 60 minutes of incubation, as described in Example 1.

Different fluorescence emission levels were observed for the wild-type probe C677T-WT25C (SEQ ID NO:22) and mutant probe C677T-MUT25C (SEQ ID NO:23) controls, due to differences in levels of self hybridization which are characteristic of each probe sequence in the presence of YOYO-1 (data not shown). Fluorescence emission values from the reaction mixtures were normalized to identify triplex-associated signal by subtracting the appropriate probe control emission value from the relevant reaction mixture emission, both of which were measured after the same duration of incubation.

Heteropolymeric perfectly matched DNA triplexes in reaction mixtures comprised of either wild-type homozygous human genomic dsDNA and wild-type probe C677T-WT25C or mutant homozygous human genomic dsDNA and mutant probe C677T-MUT25C, formed efficiently and were detected after just 5 min of incubation in the presence of 500 nM YOYO-1 (samples 1 and 4, respectively, in Fig. 5). The efficiency of matched triplex formation, signaled by the appearance of triplex associated fluorescence, was slightly greater in the reaction mixtures comprised of 1 ng mutant homozygous genomic dsDNA and mutant probe C677T-MUT25C (sample 4, Fig. 5), than that of the reaction mixtures comprised of 1 ng wild-type homozygous genomic dsDNA and wild-type probe C677T-WT25C (sample 1, Fig. 5) after 5 min of incubation. The triplex-associated fluorescent emissions of the matched triplexes (sample 4, Fig. 5) decreased slightly over a 60 min incubation period monitored, whereas the triplex-associated fluorescent emissions of the matched triplexes (sample 1, Fig. 5) remained relatively constant over time. The triplex-associated fluorescent emission intensities observed from reaction mixtures containing either of the two perfectly matched triplexes were more similar when 2 ng, instead of 1 ng, of genomic dsDNA was present in the reaction mixtures (data not shown).

When 1 ng mutant heterozygous human genomic dsDNA was reacted with mutant probe C677T-MUT25C (sample 3, Fig. 5), the triplex-associated fluorescent emissions were 77%, 80%, 85%, 88% and 90% lower after 5, 15, 30, 45 and 60 min incubation, respectively, than that emitted from the reaction mixture containing the perfectly matched triplex comprised of 1 ng

wild-type homozygous human genomic dsDNA and wild-type probe C677T-WT25C (sample 1, Fig. 5), each evaluated after comparable periods of incubation.

The triplex-associated fluorescent emissions from 1 bp C-A mismatch triplexes in a reaction mixture comprised of 1 ng wild-type homozygous human genomic dsDNA and mutant probe C677T-MUT25C (sample 2, Fig. 5) were 92%, 95%, 98%, 98% and 98% lower after 5, 15, 30, 45 and 60 min incubation, respectively, than those emitted from the reaction mixture containing the perfectly matched triplexes comprised of 1 ng wild-type homozygous human genomic dsDNA and wild-type probe C677T-WT25C (sample 1, Fig. 5), each evaluated after comparable periods of incubation. The triplex-associated fluorescent emissions from 1 bp C-A mismatch triplexes in a reaction mixture comprised of 1 ng mutant homozygous human genomic dsDNA and wild-type probe C677T-WT25C (sample 5, Fig. 5) were all 100% lower after 5, 15, 30, 45 and 60 min incubation, respectively, than those emitted from the reaction mixture containing the perfectly matched triplexes comprised of 1 ng mutant homozygous human genomic dsDNA and mutant probe C677T-MUT25C (sample 4, Fig. 5); each evaluated after comparable periods of incubation.

The above results demonstrate the high efficiency and specificity of the method of assaying wild-type homozygous, mutant heterozygous or mutant homozygous human genomic dsDNA samples. These results were obtained using antisense 25-mer wild-type and mutant probes for MTHFR C677T. Comparable results were observed when analogous reactions were performed using sense 25-mer wild-type and mutant probes for MTHFR C677T (data not shown). The sensitivity of the assay was further demonstrated when human genomic dsDNA targets, ranging in weight from 2 ng to 200 pg, were successfully assayed with wild-type probe C677T-WT25C and mutant probe C677T-MUT25C in a final reaction volume of 80 µl (data not shown).

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.

TABLE 1. Comparison of triplex assays using 15-mer and 25-mer ssDNA probes

Target = CF 491 bp dsDNA amplicon
15-mer probes = CF01-15 (normal), CF10-15 (mutant), CF09-15 (mutant)
25-mer probes = CF01-25 (normal), CF10-25 (mutant), CF09-25 (mutant)
150 nM YOYO-1 is present in each sample

Sample Probe : target = 25 : 1	Fluorescence on Genexus argon laser @ PMT 32 after 5 min	Minus ssDNA	% of change relative to perfect match row 4	% of change relative to perfect match row 10	Fluorescence on Genexus argon laser @ PMT 32 after 15 min	Minus ssDNA	% of change relative to perfect match row 4	% of change relative to perfect match row 10
1) YOYO-1 (150 nM)	0				0			
2) 491 bp (0.05 pmole)	0				10			
3) CF01-15 (1.25 pmole)	530				223			
4) CF01-15 + 491 bp (perfect)	25128	24598			24764	24541		
5) CF10-15 (1.25 pmole)	293				240			
6) CF10-15 + 491 bp (1 bp A-C)	1239	946	-96.2		1375	1135	-95.4	
7) CF09-15 (1.25 pmole)	1848				1787			
8) CF09-15 + 491 bp (1 bp T-C)	2303	455	-98.2		2082	295	-98.8	
9) CF01-25 (1.25 pmole)	3086				2979			
10) CF01-25 + 491 bp (perfect)	35647	32561			37148	34169		
11) CF10-25 (1.25 pmole)	663				459			
12) CF10-25 + 491 bp (1 bp A-C)	1307	644	-98.0		982	523	-98.5	
13) CF09-25 (1.25 pmole)	8538				8005			
14) CF09-25 + 491 bp (1 bp T-C)	6430	<0	-100		6039	<0	-100	

51

TABLE 2. Comparison of triplex assays of human genomic dsDNA using 15-mer, 20-mer or 25-mer ssDNA probes

Target = human genomic dsDNA, WT for CFTR
15-mer probes = delta F508-WT15C (wild-type), delta F508-MUT15C (mutant)
20-mer probes = delta F508-WT20C (wild-type), delta F508-MUT20C (mutant)
25-mer probes = delta F508-WT25C (wild-type), delta F508-MUT25C (mutant)
600 nM YOYO-1 is present in each sample

Sample	Fluorescence on Genexxus argon laser @ PMT 34 after 5 min	Minus ssDNA	% of change relative to perfect match	Fluorescence on Genexxus argon laser @ PMT 34 after 15 min	Minus ssDNA	% of change relative to perfect match
1) YOYO-1 (600 nM)	207			211		
2) delta F508-WT25C (3.2 pmole) (antisense)	13680			9381		
3) delta F508-MUT25C (3.2 pmole) (antisense)	9169			8696		
4) wt gDNA (500 pg)	2723			2674		
5) wt gDNA (500 pg) + delta F508-WT25C (perfect)	21217	7537		18698	9317	
6) wt gDNA (500 pg) + delta F508-MUT25C (3 bp AAG del)	3913	744	-90.1	9355	659	-92.9
7) delta F508-WT20C (3.2 pmole) (antisense)	6293			5826		
8) delta F508-MUT20C (3.2 pmole) (antisense)	767			809		
9) wt gDNA (500 pg)	2481			2381		
10) wt gDNA (500 pg) + delta F508-WT20C (perfect)	7155	862		6820	994	
11) wt gDNA (500 pg) + delta F508-MUT20C (3 bp AAG del)	1258	491	-43.0	1032	223	-77.6
12) delta F508-WT15C (3.2 pmole) (antisense)	3825			3639		
13) delta F508-MUT15C (3.2 pmole) (antisense)	4597			4549		
14) wt gDNA (500 pg)	2505			2495		
15) wt gDNA (500 pg) + delta F508-WT15C (perfect)	4416	591		4067	428	
16) wt gDNA (500 pg) + delta F508-MUT15C (3 bp AAG del)	5741	1144	+93.5	5509	960	+124

5+

TABLE 2. Continued

Sample	Fluorescence on Geneax argon laser @ PMT 34 after 30 min	Minus ssDNA	% of change relative to perfect match	Fluorescence on Geneax argon laser @ PMT 34 after 45 min	Minus ssDNA	% of change relative to perfect match
1) YOYO-1 (600 nM)	187			207		
2) delta F508-WT25C (3.2 pmole) (antisense)	8116			7455		
3) delta F508-MUT25C (3.2 pmole) (antisense)	8363			8120		
4) wt gDNA (500 pg)	2802			2798		
5) wt gDNA (500 pg) + delta F508-WT25C (perfect)	17776	9660		17380	9925	
6) wt gDNA (500 pg) + delta F508-MUT25C (3 bp AAG del)	9092	729	- 92.5	8953	833	- 91.6
7) delta F508-WT20C (3.2 pmole) (antisense)	5435			5193		
8) delta F508-MUT20C (3.2 pmole) (antisense)	826			802		
9) wt gDNA (500 pg)	2324			2300		
10) wt gDNA (500 pg) + delta F508-WT20C (perfect)	6652	1217		6549	1356	
11) wt gDNA (500 pg) + delta F508-MUT20C (3 bp AAG del)	997	171	- 85.9	863	61	- 95.5
12) delta F508-WT15C (3.2 pmole) (antisense)	3528			3459		
13) delta F508-MUT15C (3.2 pmole) (antisense)	4398			5098		
14) wt gDNA (500 pg)	2534			2490		
15) wt gDNA (500 pg) + delta F508-WT15C (perfect)	4089	561		4139	680	
16) wt gDNA (500 pg) + delta F508-MUT15C (3 bp AAG del)	5384	986	+ 75.8	5213	115	- 83.1

47

52

52

53

TABLE 3. Comparison of triplex assays of human genomic dsDNA using 20-mer, 25-mer or 30-mer ssDNA probes

Target = human genomic dsDNA, WT for MTHFR.
20-mer probes = C677T-WT20C (wild-type), C677T-MUT20C (mutant).
25-mer probes = C677T-WT25C (wild-type), C677T-MUT25C (mutant).
30-mer probes = C677T-WT30C (wild-type), C677T-MUT30C (mutant).
500 nM YOYO-1 is present in each sample

Sample	Fluorescence on Genexxus argon laser @ PMT 30 after 5 min	Minus ssDNA	% of change relative to perfect match	Fluorescence on Genexxus argon laser @ PMT 30 after 15 min	Minus ssDNA	% of change relative to perfect match
1) YOYO-1 (500 nM)	0			0		
2) C677T-WT30C (3.2 pmole) (antisense)	24304			22982		
3) C677T-MUT30C (3.2 pmole) (antisense)	1795			1537		
4) wt gDNA (2 ng)	2501			2234		
5) wt gDNA (2 ng) + C677T-WT30C (perfect)	38355	14051		37063	14081	
6) wt gDNA (2 ng) + C677T-MUT30C (1 bp C-A)	3138	1343	- 90.4	2575	1038	- 92.6
7) C677T-WT25C (3.2 pmole) (antisense)	7856			7397		
8) C677T-MUT25C (3.2 pmole) (antisense)	1435			1241		
9) wt gDNA (2 ng)	2045			1596		
10) wt gDNA (2 ng) + C677T-WT25C (perfect)	31234	23378		30865	23468	
11) wt gDNA (2 ng) + C677T-MUT25C (1 bp C-A)	1882	447	- 98.1	1474	233	- 99.0
12) C677T-WT20C (3.2 pmole) (antisense)	221			69		
13) C677T-MUT20C (3.2 pmole) (antisense)	3297			2639		
14) wt gDNA (2 ng)	2084			1883		
15) wt gDNA (2 ng) + C677T-WT20C (perfect)	1324	1100		854	785	
16) wt gDNA (2 ng) + C677T-MUT20C (1 bp C-A)	4245	948	- 13.8	3083	444	- 43.4

48

54

54

TABLE 3. Continued

Sample	Fluorescence on Genexis argon laser @ PMT 30 after 30 min	Minus ssDNA	% of change relative to perfect match	Fluorescence on Genexis argon laser @ PMT 30 after 45 min	Minus ssDNA	% of change relative to perfect match
1) YOYO-1 (500 nM)	0			0		
2) C677T-WT30C (3.2 pmole) (antisense)	22609			22302		
3) C677T-MUT30C (3.2 pmole) (antisense)	1304			1141		
4) wt gDNA (2 ng)	2162			2101		
5) wt gDNA (2 ng) + C677T-WT30C (perfect)	36679	14070		36279	13977	
6) wt gDNA (2 ng) + C677T-MUT30C (1 bp C-A)	2377	1073	-92.4	2078	937	-93.3
7) C677T-WT25C (3.2 pmole) (antisense)	7060			6834		
8) C677T-MUT25C (3.2 pmole) (antisense)	1141			979		
9) wt gDNA (2 ng)	1518			1518		
10) wt gDNA (2 ng) + C677T-WT25C (perfect)	30392	23332		30697	23863	
11) wt gDNA (2 ng) + C677T-MUT25C (1 bp C-A)	1303	162	-99.3	1111	132	-99.4
12) C677T-WT20C (3.2 pmole) (antisense)	24			4		
13) C677T-MUT20C (3.2 pmole) (antisense)	2345			2163		
14) wt gDNA (2 ng)	1788			1651		
15) wt gDNA (2 ng) + C677T-WT20C (perfect)	694	670		490	486	
16) wt gDNA (2 ng) + C677T-MUT20C (1 bp C-A)	2575	230	-65.7	2185	22	-95.5

54

54

TABLE 4. Comparison of triplex assays of human genomic daDNA at varying amounts

Target = human genomic daDNA, WT for FVL
25-mer probes = FVL-WT25C (wild-type), FVL-MUT25C (mutant)
500 nM YOYO-1 is present in each sample

Sample	Fluorescence on Genexus argon laser @ PMT 30 after 5 min	Minus ssDNA	% of change relative to perfect match	Fluorescence on Genexus argon laser @ PMT 30 after 15 min	Minus ssDNA	% of change relative to perfect match
1) YOYO-1 (500 nM)	0			0		
2) FVL-WT25C (3.2 pmole) (antisense)	6206			6035		
3) FVL-MUT25C (3.2 pmole) (antisense)	44456			44427		
4) wt gDNA (2 ng)	3409			3421		
5) wt gDNA (2 ng) + FVL-WT25C (perfect)	26341	20135		26355	20320	
6) wt gDNA (2 ng) +FVL-MUT25C (1 bp G-T)	34222	<0	-100	33941	<0	-100
7) wt gDNA (1 ng)	1198			1348		
8) wt gDNA (1 ng) + FVL-WT25C (perfect)	20409	14203		21450	15415	
9) wt gDNA (1 ng) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	25049	<0	-100	24984	<0	-100
10) wt gDNA (500 pg)	4			6		
11) wt gDNA (500 pg) + FVL-WT25C (perfect)	23757	17551		23451	17416	
12) wt gDNA (500 pg) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	25594	<0	-100	25480	<0	-100
13) wt gDNA (200 pg)	7			0		
14) wt gDNA (200 pg) + FVL-WT25C (perfect)	20925	14719		20874	14839	
15) wt gDNA (200 pg) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	22325	<0	-100	22378	<0	-100

50

8

1

SS

56

W/O 2006/033088

TABLE 4. Continued

Sample	Fluorescence on Genex argon laser @ PMT 30 after 30 min	Minus ssDNA	% of change relative to perfect match	Fluorescence on Genex argon laser @ PMT 30 after 45 min	Minus ssDNA	% of change relative to perfect match
1) YOYO-1 (500 nM)	0			0		
2) FVL-WT25C (3.2 pmole) (antisense)	5803			5518		
3) FVL-MUT25C (3.2 pmole) (antisense)	44650			44101		
4) wt gDNA (2 ng)	3687			3642		
5) wt gDNA (2 ng) + FVL-WT25C (perfect)	26378	20575		26041	20523	
6) wt gDNA (2 ng) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	34069	<0	- 100	33633	<0	- 100
7) wt gDNA (1 ng)	1474			1598		
8) wt gDNA (1 ng) + FVL-WT25C (perfect)	22017	16214		21862	16344	
9) wt gDNA (1 ng) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	25098	<0	- 100	24793	<0	- 100
10) wt gDNA (500 pg)	8			14		
11) wt gDNA (500 pg) + FVL-WT25C (perfect)	23417	17614		23159	17641	
12) wt gDNA (500 pg) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	25514	<0	- 100	25347	<0	- 100
13) wt gDNA (200 pg)	0			0		
14) wt gDNA (200 pg) + FVL-WT25C (perfect)	20852	15049		20698	15180	
15) wt gDNA (200 pg) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	22441	<0	- 100	22353	<0	- 100

PCT/IB2005/053162

56

TABLE 4. Continued

Sample	Fluorescence on Genesys argon laser @ PMT 30 after 60 min	Minus ssDNA	% of change relative to perfect match
1) YOYO-1 (500 nM)	0		
2) FVL-WT25C (3.2 pmole) (antisense)	5505		
3) FVL-MUT25C (3.2 pmole) (antisense)	44534		
4) wt gDNA (2 ng)	3619		
5) wt gDNA (2 ng) + FVL-WT25C (perfect)	26024	20519	
6) wt gDNA (2 ng) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	33801	< 0	- 100
7) wt gDNA (1 ng)	1643		
8) wt gDNA (1 ng) + FVL-WT25C (perfect)	22005	16500	
9) wt gDNA (1 ng) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	24913	< 0	- 100
10) wt gDNA (500 pg)	16		
11) wt gDNA (500 pg) + FVL-WT25C (perfect)	23240	17735	
12) wt gDNA (500 pg) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	25483	< 0	- 100
13) wt gDNA (200 pg)	0		
14) wt gDNA (200 pg) + FVL-WT25C (perfect)	20720	15215	
15) wt gDNA (200 pg) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	22448	< 0	- 100

57

57

68

W/O 2006/033068

TABLE 5. Triplex assays of human genomic dsDNA obtained from saliva
Target = human genomic dsDNA, WT for CFTR
25-mer probes = 2789+5G->A-WT25C (wild-type), 2789+5G->A-MUT25C (mutant)
500 nM YOYO-1 is present in each sample

Sample	Fluorescence on Genexis argon laser @ PMT 30 after 5 min	minus ssDNA	% of change relative to perfect match	Fluorescence on Genexis argon laser @ PMT 30 after 15 min	minus ssDNA	% of change relative to perfect match
1) YOYO-1 (500 nM)	0			0		
2) 2789+5G->A-WT25C (3.2 pmole) (antisense)	23291			22608		
3) 2789+5G->A-MUT25C (3.2 pmole) (antisense)	22894			22071		
4) wt gDNA (4 ng)	1530			1856		
5) wt gDNA (4 ng) + 2789+5G->A-WT25C (perfect)	44651	21360		43624	21016	
6) wt gDNA (4 ng) + 2789+5G->A-MUT25C (1 bp T-G)	23893	1089	- 94.9	23531	1460	- 93.1
7) wt gDNA (2 ng)	21			19		
8) wt gDNA (2 ng) + 2789+5G->A-WT25 (perfect)	38650	15359		38142	15534	
9) wt gDNA (2 ng) + 2789+5G->A-MUT25 (1 bp T-G)	22453	<0	- 100	22430	359	- 97.7

Sample	Fluorescence on Genexis argon laser @ PMT 30 after 30 min	minus ssDNA	% of change relative to perfect match	Fluorescence on Genexis argon laser @ PMT 30 after 45 min	minus ssDNA	% of change relative to perfect match
1) YOYO-1 (500 nM)	0			0		
2) 2789+5G->A-WT25C (3.2 pmole) (antisense)	22243			21877		
3) 2789+5G->A-MUT25C (3.2 pmole) (antisense)	21847			21714		
4) wt gDNA (4 ng)	1959			2102		
5) wt gDNA (4 ng) + 2789+5G->A-WT25C (perfect)	42950	20707		42412	20535	
6) wt gDNA (4 ng) + 2789+5G->A-MUT25C (1 bp T-G)	23077	1230	- 94.1	22806	1092	- 93.8
7) wt gDNA (2 ng)	18			18		

PCT/IB2005/053162

54

59

8) wt gDNA (2 ng) + 2789+5G->A-WT25 (perfect)	37707	15464		37351	15474	
9) wt gDNA (2 ng) + 2789+5G->A-MUT25 (1 bp T-G)	21835	< 0	- 100	21541	< 0	- 100

TABLE 6. Triplex assays of human genomic dsDNA employing alternative reaction protocols
Target = human genomic dsDNA, WT for CFTR
25-mer probes = 2789+5G->A-WT25C (wild-type), 2789+5G->A-MUT25C (mutant)
500 nM YOYO-1 and 45 mM TMA-Cl are present in each sample

Sample	Fluorescence on Genexxus argon laser @ PMT 32 after 5 min	Triplex-associated emission at 5 min	% of change relative to perfect match	Triplex-associated emission at 15 min	% of change relative to perfect match
1) YOYO-1 (500 nM)	0				
2) 2789+5G->A-WT25C (3.2 pmole/80 ul)	21363				
3) 2789+5G->A-MUT25C (3.2 pmole/80 ul)	20717				
4) wt gDNA (2 ng/80 ul)	4182				
5) wt gDNA (2 ng/80 ul) + 2789+5G->A-WT25C (perfect) *	28146	6783		7210	
6) wt gDNA (2 ng/80 ul) + 2789+5G->A-MUT25C (1bp T-G) *	23757	3040	- 55	3221	- 55
7) 2789+5G->A-WT25C (3.2 pmole/77.9 ul)**	22575				
8) 2789+5G->A-MUT25C (3.2 pmole/77.9 ul)**	20696				
9) wt gDNA (2 ng/80 ul) + 2789+5G->A-WT25C (perfect)**				7728	
10) wt gDNA (2ng/80ul) + 2789+5G->A-MUT25C (1bp T-G)**				3560	- 54

* Probe + gDNA is mixed, then YOYO-1 is added. Reaction mixture is incubated for 5 min and then irradiated.
** Probe + YOYO-1 control is mixed, incubated for 5 min and irradiated. Then gDNA is added and the reaction mixture is incubated for 5 min and irradiated.

59

60

TABLE 6. Continued

Sample	Triplex-associated emission at 20 min	% of change	Triplex-associated emission at 25 min	% of change	Triplex-associated emission at 30 min	% of change
5) wt gDNA (2 ng/80 ul) + 2789+5G->A-WT25C (perfect) *	8035		8239		8608	
6) wt gDNA (2 ng/80 ul) + 2789+5G->A-MUT25C (1bp T-G) *	3176	- 60	3145	- 62	3120	- 64
9) wt gDNA (2 ng/80 ul) + 2789+5G->A-WT25C (perfect)**	9378		9867		10225	
10) wt gDNA (2ng/80ul) + 2789+5G->A-MUT25C (1bp T-G)**	4334	- 54	4918	- 50	5027	- 51

Sample	Triplex-associated emission at 35 min	% of change	Triplex-associated emission at 40 min	% of change	Triplex-associated emission at 45 min	% of change
5) wt gDNA (2 ng/80 ul) + 2789+5G->A-WT25C (perfect) *	9239		9848		9965	
6) wt gDNA (2 ng/80 ul) + 2789+5G->A-MUT25C (1bp T-G) *	3141	- 66	3219	- 67	3183	- 68
9) wt gDNA (2 ng/80 ul) + 2789+5G->A-WT25C (perfect)**	10485		10702		11028	
10) wt gDNA (2ng/80ul) + 2789+5G->A-MUT25C (1bp T-G)**	4908	- 53	5217	- 51	4770	- 57

Sample	Triplex-associated emission at 50 min	% of change	Triplex-associated emission at 55 min	% of change	Triplex-associated emission at 60 min	% of change
5) wt gDNA (2 ng/80 ul) + 2789+5G->A-WT25C (perfect) *	9419		10022		9435	
6) wt gDNA (2 ng/80 ul) + 2789+5G->A-MUT25C (1bp T-G) *	3432	- 64	3802	- 62	3318	- 65
9) wt gDNA (2 ng/80 ul) + 2789+5G->A-WT25C (perfect)**	11603		12147		12752	
10) wt gDNA (2ng/80ul) + 2789+5G->A-MUT25C (1bp T-G)**	4925	- 58	5925	- 51	5121	- 60

* Probe + gDNA is mixed, then YOYO-1 is added. Reaction mixture is incubated for 5 min and then irradiated.
** Probe + YOYO-1 control is mixed, incubated for 5 min and irradiated. Then gDNA is added and the reaction mixture is incubated for 5 min and irradiated.

60

TABLE 7. Triplex assays of human genomic dsDNA employing alternative reaction protocols

Target = human genomic dsDNA, WT for CFTR
25-mer probes = 3849+10kbC->T-WT25C (wild-type), 3849+10kbC->T-MUT25C (mutant)
500 nM YOYO-1 and 40 mM TMA-Cl are present in each sample

Sample	Fluorescence on Genexxus argon laser @ PMT 32 after 5 min	Triplex-associated emission at 5 min	% of change relative to perfect match	Triplex-associated emission at 15 min	% of change relative to perfect match
1) YOYO-1 (500 nM)	0				
2) 3849+10kbC->T-WT25C (3.2 pmole/80 ul)	20055				
3) 3849+10kbC->T-MUT25C (3.2 pmole/80 ul)	20399				
4) wt gDNA (2 ng/80 ul)	7091				
5) wt gDNA (2 ng/80 ul) + 3849+10kbC->T-WT25C (perfect) *	30228	10173		10115	
6) wt gDNA (2 ng/80 ul) + 3849+10kbC->T-MUT25C (1bp A-C) *	23481	3082	- 70	1614	- 84
7) 3849+10kbC->T-WT25C (3.2 pmole/77.9 ul)**	22696				
8) 3849+10kbC->T-MUT25C (3.2 pmole/77.9 ul)**	20253				
9) wt gDNA (2 ng/80 ul) + 3849+10kbC->T-WT25C (perfect)**				10264	
10) wt gDNA (2ng/80ul) + 3849+10kbC->T-MUT25C (1bp A-C)**				5218	- 49

* Probe + gDNA is mixed, then YOYO-1 is added. Reaction mixture is incubated for 5 min and then irradiated.

** Probe + YOYO-1 control is mixed, incubated for 5 min and irradiated. Then gDNA is added and the reaction mixture is incubated for 5 min and irradiated.

2

62

TABLE 7. Continued

Sample	Triplex-associated emission at 20 min	% of change	Triplex-associated emission at 25 min	% of change	Triplex-associated emission at 30 min	% of change
5) wt gDNA (2 ng/80 uI) + 3849+10kbC->T-WT25C (perfect) *	10279		10335		10503	
6) wt gDNA (2 ng/80 uI) + 3849+10kbC->T-MUT25C (1bp A-C) *	977	-90	603	-94	113	-99
9) wt gDNA (2 ng/80 uI) + 3849+10kbC->T-WT25C (perfect)**	10458		10492		10476	
10) wt gDNA (2ng/80uI) + 3849+10kbC->T-MUT25C (1bp A-C)**	4662	-55	3944	-62	3546	-66

Sample	Triplex-associated emission at 35 min	% of change	Triplex-associated emission at 40 min	% of change	Triplex-associated emission at 45 min	% of change
5) wt gDNA (2 ng/80 uI) + 3849+10kbC->T-WT25C (perfect) *	10625		10737		10847	
6) wt gDNA (2 ng/80 uI) + 3849+10kbC->T-MUT25C (1bp A-C) *	227	-98	<0	-100	<0	-100
9) wt gDNA (2 ng/80 uI) + 3849+10kbC->T-WT25C (perfect)**	10233		10778		10551	
10) wt gDNA (2ng/80uI) + 3849+10kbC->T-MUT25C (1bp A-C)**	3216	-69	3025	-72	2833	-73

Sample	Triplex-associated emission at 50 min	% of change	Triplex-associated emission at 55 min	% of change	Triplex-associated emission at 60 min	% of change
5) wt gDNA (2 ng/80 uI) + 3849+10kbC->T-WT25C (perfect) *	10945		10872		10695	
6) wt gDNA (2 ng/80 uI) + 3849+10kbC->T-MUT25C (1bp A-C) *	<0	-100	<0	-100	<0	-100
9) wt gDNA (2 ng/80 uI) + 3849+10kbC->T-WT25C (perfect)**	10973		11699		12112	
10) wt gDNA (2ng/80uI) + 3849+10kbC->T-MUT25C (1bp A-C)**	2592	-76	1788	-85	1499	-88

* Probe + gDNA is mixed, then YOYO-1 is added. Reaction mixture is incubated for 5 min and then irradiated.
** Probe + YOYO-1 control is mixed, incubated for 5 min and irradiated. Then gDNA is added and the reaction mixture is incubated for 5 min and irradiated.

57

62

63

W/O 2006/033088

TABLE 8. Triplex assays of *Bacillus globigii* genomic dsDNA

Target = *Bacillus globigii* genomic dsDNA
25-mer probe = bgIIIR-WT25C (wild-type for *B. globigii*)
40 mM TMA-Cl was present in each sample
500 nM YOYO-1 was present in samples 1-5, 400 nM YOYO-1 was present in samples 6-10, 300 nM YOYO-1 was present in samples 11-17

Sample	Fluorescence on Genexus argon laser @ PMT 32 after 5 min	Minus control	Fluorescence on Genexus argon laser @ PMT 32 after 15 min	Minus control
1) YOYO-1 (500 nM)	0		0	
2) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul)	0		0	
3) human gDNA (302 copies/80 ul)	6004		5837	
4) bgIIIR-WT25C (3.2 pmole/80 ul) (antisense)	16704		16521	
5) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul) + bgIIIR-WT25C *	19137	2433	18583	2062
6) YOYO-1 (400 nM)	0		0	
7) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul)	0		0	
8) human gDNA (302 copies/80 ul)	5872		5964	
9) bgIIIR-WT25C (3.2 pmole/80 ul) (antisense)	22045		22429	
10) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul) + bgIIIR-WT25C *	26141	4096	26075	3646
11) YOYO-1 (300 nM)	0		0	
12) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul)	0		0	
13) human gDNA (302 copies/80 ul)	5321		5330	
14) bgIIIR-WT25C (3.2 pmole/80 ul) (antisense)	28663		28582	
15) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul) + bgIIIR-WT25C *	35536	6873	36076	7494
16) human gDNA (302 copies/80 ul) + bgIIIR-WT25C *	40732		40568	
17) BG gDNA (100 copies) + hgDNA (302 copies) + bgIIIR-WT25C *	43378	2646	43237	2669

* Probe + gDNA were mixed, then YOYO-1 was added. Reaction mixtures were incubated for 5 min and then irradiated.

PCT/IB2006/033162

63

64

TABLE 8. Continued

Sample	Fluorescence on Genexus argon laser @ PMT 32 after 25 min	Minus control	Fluorescence on Genexus argon laser @ PMT 32 after 35 min	Minus control
1) YOYO-1 (500 nM)	0		0	
2) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul)	0		0	
3) human gDNA (302 copies/80 ul)	5693		5764	
4) bgIIIR-WT25C (3.2 pmole/80 ul) (antisense)	15724		15443	
5) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul) + bgIIIR-WT25C *	17945	2221	17601	2158
6) YOYO-1 (400 nM)	0		0	
7) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul)	0		0	
8) human gDNA (302 copies/80 ul)	6107		5961	
9) bgIIIR-WT25C (3.2 pmole/80 ul) (antisense)	21801		21647	
10) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul) + bgIIIR-WT25C *	25297	3496	25175	3528
11) YOYO-1 (300 nM)	0		0	
12) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul)	0		0	
13) human gDNA (302 copies/80 ul)	5225		5326	
14) bgIIIR-WT25C (3.2 pmole/80 ul) (antisense)	28103		28113	
15) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul) + bgIIIR-WT25C *	35810	7707	35886	7773
16) human gDNA (302 copies/80 ul) + bgIIIR-WT25C *	40238		40436	
17) BG gDNA (100 copies) + hgDNA (302 copies) + bgIIIR-WT25C *	43219	2981	43390	2954

* Probe + gDNA were mixed, then YOYO-1 was added. Reaction mixtures were incubated for 5 min and then irradiated.

64

65

W/O 2006/033088

TABLE 8. Continued

Sample	Fluorescence on Genexxus argon laser @ PMT 32 after 45 min	Minus control	Fluorescence on Genexxus argon laser @ PMT 32 after 55 min	Minus control
1) YOYO-1 (500 nM)	0		0	
2) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul)	0		0	
3) human gDNA (302 copies/80 ul)	5617		5537	
4) bgIIIR-WT25C (3.2 pmole/80 ul) (antisense)	14902		14669	
5) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul) + bgIIIR-WT25C *	17027	2125	16669	2000
6) YOYO-1 (400 nM)	0		0	
7) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul)	0		0	
8) human gDNA (302 copies/80 ul)	5812		5939	
9) bgIIIR-WT25C (3.2 pmole/80 ul) (antisense)	21365		21232	
10) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul) + bgIIIR-WT25C *	24722	3357	24633	3401
11) YOYO-1 (300 nM)	0		0	
12) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul)	0		0	
13) human gDNA (302 copies/80 ul)	5209		5215	
14) bgIIIR-WT25C (3.2 pmole/80 ul) (antisense)	27708		27606	
15) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul) + bgIIIR-WT25C *	35339	7631	35190	7584
16) human gDNA (302 copies/80 ul) + bgIIIR-WT25C *	39743		39816	
17) BG gDNA (100 copies) + hgDNA (302 copies) + bgIIIR-WT25C *	42781	3038	42705	2889

* Probe + gDNA were mixed, then YOYO-1 was added. Reaction mixtures were incubated for 5 min and then irradiated.

PCT/IB2006/053162

108

TABLE 8. Continued

Sample	Fluorescence on Genexxus argon laser @ PMT 32 after 65 min	Minus control	Fluorescence on Genexxus argon laser @ PMT 32 after 24 hr	Minus control
1) YOYO-1 (500 nM)	0		0	
2) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul)	0		0	
3) human gDNA (302 copies/80 ul)	5521		5706	
4) bgIIIR-WT25C (3.2 pmole/80 ul) (antisense)	14435		11225	
5) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul) + bgIIIR-WT25C *	16383	1948	11571	346
6) YOYO-1 (400 nM)	0		0	
7) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul)	0		0	
8) human gDNA (302 copies/80 ul)	5709		5996	
9) bgIIIR-WT25C (3.2 pmole/80 ul) (antisense)	21053		20366	
10) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul) + bgIIIR-WT25C *	24368	3315	22730	2364
11) YOYO-1 (300 nM)	0		0	
12) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul)	0		0	
13) human gDNA (302 copies/80 ul)	5119		5011	
14) bgIIIR-WT25C (3.2 pmole/80 ul) (antisense)	27517		29294	
15) <i>B. globigii</i> gDNA (100 copies/80 ul) + bgIIIR-WT25C *	35074	7557	35604	6310
16) human gDNA (302 copies/80 ul) + bgIIIR-WT25C *	39480		41000	
17) BG gDNA (100 copies) + hgDNA (302 copies) + bgIIIR-WT25C *	42644	3164	45031	4031

* Probe + gDNA were mixed, then YOYO-1 was added. Reaction mixtures were incubated for 5 min and then irradiated.

37
67

CLAIMS

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of detecting a nucleic acid sequence in a genomic sample, said method comprising:
 - 5 providing the genomic sample comprising a target nucleic acid sequence of a duplex nucleic acid;
 - providing a probe comprising a probe nucleic acid sequence;
 - providing a hybridization mixture comprising the genomic sample, the probe, a hybridization promoting agent and labels;
 - 10 incubating the hybridization mixture to provide an incubated mixture comprising a complex of the target nucleic acid sequence, the probe and the labels;
 - irradiating the incubated mixture with radiation effective to stimulate at least some of the labels to emit energy; and
 - 15 detecting from a fluorescent signal whether the probe perfectly matches the target nucleic acid sequence, to thereby detect whether the nucleic acid sequence is present in the genomic sample,
 - wherein the detecting is completed within sixty minutes of providing the hybridization mixture, and the method is conducted without denaturing the duplex nucleic acid and without PCR amplification of the duplex nucleic acid.
- 20 2. The method of claim 1, wherein a single or multiple nucleotide polymorphism is detected.
3. The method of claim 1, wherein more than one said nucleic acid sequence are detected in the genomic sample by more than one said probe.
4. The method of claim 3, wherein a haplotype is detected.
- 25 5. The method of claim 1, wherein a morphological status of an organism or cell from which the genomic sample was obtained is detected, said morphological status comprising at least one of information regarding a stage of development and information regarding a disease state.
6. The method of claim 1, wherein the genomic sample comprises less than 700
30 copies of the target nucleic acid sequence.
7. The method of claim 6, wherein the genomic sample comprises about 150 to about 300 copies of the target nucleic acid sequence.

8. The method of claim 6, wherein the genomic sample consists essentially of contents of a single cell.
9. The method of claim 1, wherein the detecting is conducted in a biological cell.
10. The method of claim 1, wherein the genomic sample is more than 5 kb in length.
- 5 11. The method of claim 1, wherein the genomic sample is undigested throughout the method.
12. The method of claim 1, wherein the target nucleic acid sequence belongs to a pathogen present or previously present in an organism or a cell from which the genomic sample is obtained.
- 10 13. The method of claim 1, wherein the probe, if unitary, is a single-stranded nucleic acid or nucleic acid analogue of 15 to 30 bases in length.
14. The method of claim 1, wherein the hybridization promoting agent is an intercalating label.
- 15 15. The method of claim 14, wherein the intercalating label comprises dimeric cyanine dyes.
16. The method of claim 15, wherein the intercalating label consists of YOYO-1.
17. The method of claim 1, wherein the labels are intercalating fluorophores which also constitute the hybridization promoting agent.
18. The method of claim 1, wherein the hybridization promoting agent is a kosmotrope.
- 20 19. The method of claim 1, wherein the hybridization promoting agent is a cation of a compound selected from the group consisting of $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$, $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{HCl}$, NaCl , Na_2SO_4 , Na_2HPO_4 , and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
20. The method of claim 1, wherein the labels are non-intercalating fluorophores.
- 25 21. The method of claim 1, wherein the incubation period is from one to ten minutes, and the method is completely practiced in less than fifteen minutes.
22. The method of claim 1, wherein the hybridization mixture is maintained at a temperature of 20 to 40°C throughout the incubation period.
23. The method of claim 1, wherein at least one base of the probe binds to a base or a base pair of the target by Watson-Crick complementary base interaction and/or by homologous base interaction, such that the complex is a triplex.
- 30

24. The method of claim 1, wherein at least one base of the probe binds to a base or a base pair of the target by Watson-Crick complementary base interaction and/or by homologous base interaction, such that the complex is a quadruplex.

5 25. The method of claim 1, wherein the probe and the target nucleic acid sequence do not bond together solely as antiparallel strands obeying Watson-Crick base pairing rules.

26. The method of claim 1, wherein the radiation is a laser beam having a power density of about 84 W/cm²/sec.

10 27. The method of claim 1, wherein the fluorescent signal is compared with a reference fluorescent signal to determine whether the probe is a perfect match for the target nucleic acid sequence.

15 28. The method of claim 1, wherein the detecting comprises monitoring a change in the fluorescent signal over time to determine whether the probe perfectly matches the target nucleic acid sequence, and wherein an increase in the fluorescent signal over time indicates a perfect match and a decrease in the fluorescent signal over time indicates a lack of a perfect match.

20 29. The method of claim 1, wherein the probe is provided in the hybridization mixture in a target saturating amount, said target saturating amount being a probe concentration in excess of a target concentration, and the labels are provided in the hybridization mixture in a complex saturating amount, said complex saturating amount being a label concentration above which discrimination of the signal from background signals changes at a first rate less than a second rate at which the label concentration changes.

30. The method of claim 1, wherein the probe has a length effective to optimize energy transfer or migration.

25 31. The method of claim 30, wherein discrimination of the fluorescent signal from background signals is maximized by energy transfer or energy migration between intra-target intercalated labels and probe-target intercalated labels.

32. The method of claim 30, wherein the probe is 20-30 bases or base pairs in length.

33. The method of claim 1, wherein a length of the probe is selected so as to maximize an intensity of the fluorescent signal.

30 34. The method of claim 1, wherein the probe is provided in the hybridization mixture in a target saturating amount, the labels are provided in the hybridization mixture in a complex saturating amount, and the probe has a length effective to optimize energy transfer or migration.

35. The method of claim 1, wherein a preliminary mixture comprising a buffer and water is subjected to an applied electric charge effective to enhance a sensitivity of the method, and at least a portion of the preliminary mixture is subsequently incorporated into the hybridization mixture.
- 5 36. The method of claim 1, wherein the genomic sample is added to the hybridization mixture after the probe, the hybridization promoting agent and the labels.
37. The method of claim 1, wherein the hybridization promoting agent or the labels are added to the hybridization mixture last.
38. The method of claim 1, wherein the genomic sample is purified, semipurified,
10 unpurified or diluted.
39. The method of claim 1, wherein levels of gene product expression in a genomic sample are detected or gene product expressions of at least two genomic samples are compared.
40. The method of claim 1, wherein the hybridization mixture further comprises a plurality of probes that bind to sequences of the genomic sample adjacent to the target nucleic
15 acid sequence.
41. The method of claim 1, wherein the probe comprises an emission quencher and at least one of the labels.
42. The method of claim 1, wherein the probe is modified by at least one linked moiety.
- 20 43. The method of claim 1, wherein the labels comprise FET, FRET, energy migration or redox sets.
44. The method of claim 1, wherein the labels comprise quantum dots.
45. The method of claim 1, wherein nucleic acid sequence repeats, insertions or deletions are detected.
- 25 46. The method of claim 1, wherein the detecting is repeated under varied conditions of the hybridization mixture.
47. The method of claim 1, wherein a cancerous or disease state of an organism or cell from which the genomic sample was obtained is detected, or pregnancy of the organism is determined.
- 30 48. The method of claim 1, wherein the genomic sample is obtained from a human sample of tissue, buccal cells, blood, fluid, sputum, urine or feces, and labeled with a molecular identification tag adapted to identify a source of the genomic sample.

49. The method of claim 1, wherein the probe is provided on a support selected from the group consisting of a bead, a plate, a membrane, a film, a microwell, an electrode, a column and a capillary tube.
50. The method of claim 1, wherein the probe is provided on a silver island film.
51. A kit for practicing the method of claim 1, said kit comprising:
the probe;
the hybridization promoting agent; and
the labels.
52. The kit of claim 51, further comprising a container in which the hybridization mixture is provided.
53. The kit of claim 52, wherein the container is adapted to collect sputum or the kit further comprises a sputum collection device.
54. The kit of claim 52, wherein the container comprises a molecular identification tag adapted to identify a source of the genomic sample.
55. The kit of claim 51, wherein the probe is provided on a support selected from the group consisting of a bead, a plate, a membrane, a film, a microwell, an electrode, a column and a capillary tube.
56. The kit of claim 55, wherein the support is a silver island film.
57. The kit of claim 51, wherein the probe is single-stranded and contains a hairpin, or is double-stranded.
58. The kit of claim 51, wherein the labels comprise dimeric cyanine dyes.
59. The kit of claim 51, wherein the labels and the hybridization promoting agent consist of YOYO-1.
60. The kit of claim 51, wherein the hybridization promoting agent is at least one compound selected from the group consisting of $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$, $(\text{CH}_3)_2\text{N}\cdot\text{HCl}$, NaCl , Na_2SO_4 , Na_2HPO_4 , and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
61. A method of detecting a nucleic acid sequence in a genomic sample, said method comprising:
providing the genomic sample comprising a target nucleic acid sequence of a single-stranded or double-stranded nucleic acid;
providing a probe comprising a probe nucleic acid sequence;
providing a hybridization mixture comprising the genomic sample, the probe, a hybridization promoting agent and labels;

incubating the hybridization mixture to provide an incubated mixture comprising a complex of the target nucleic acid sequence, the probe and the labels;

applying energy to the incubated mixture effective to elicit a signal from the hybridization mixture; and

5 detecting from the signal whether the probe perfectly matches the target nucleic acid sequence, to thereby detect whether the nucleic acid sequence is present in the genomic sample, wherein the detecting is completed within sixty minutes of providing of the hybridization mixture, and the method is conducted without denaturing the duplex nucleic acid and without PCR amplification of the duplex nucleic acid.

10 62. The method of claim 61, wherein subsequent to the incubating step and prior to the applying energy step, the incubated mixture is further incubated under conditions such that the probe dissociates from the target nucleic acid sequence, and wherein the detecting step comprises determining from the signal whether the probe is dissociated from the target nucleic acid sequence and the conditions of incubation, so as to determine whether the probe perfectly
15 matches the target nucleic acid sequence.

63. The method of claim 1, wherein subsequent to the incubating step and prior to the applying energy step, the incubated mixture is further incubated under conditions such that the probe dissociates from the target nucleic acid sequence, and wherein the detecting step comprises determining from the signal whether the probe is dissociated from the target nucleic
20 acid sequence and the conditions of incubation, so as to determine whether the probe perfectly matches the target nucleic acid sequence.

64. The method of claim 1, wherein the probe comprises one or more parts, and at least one of the parts is 5 to 30 bases in length.

65. The method of claim 1, wherein a separation step is performed before the
25 irradiating step.

66. The method of claim 1, further comprising a step of providing at least one blocking probe to suppress binding of the probe to a non-target sequence of the genomic sample.

67. The method of claim 1, wherein the complex acts as a photonic structure for collecting photonic energy and transferring energy to a signal emitting label.

30 68. The method of claim 1, wherein the steps of the method are repeated more than once to provide more than hybridization mixture and more than one fluorescent signal, provided that each hybridization mixture is formed by combining the genomic sample, the probe, the hybridization promoting agent and the labels in a different sequence.

.....

69. The method of claim 1, wherein the detecting comprises monitoring a change in fluorescence anisotropy of the fluorescent signal over time to determine whether the probe perfectly matches the target nucleic acid sequence.

74

FIG. 1. Triplex-associated fluorescence from human genomic DNA samples assayed in the presence of 500 nM YOYO-1 and 45 mM TMA-Cl (wherein YOYO-1 is added last)

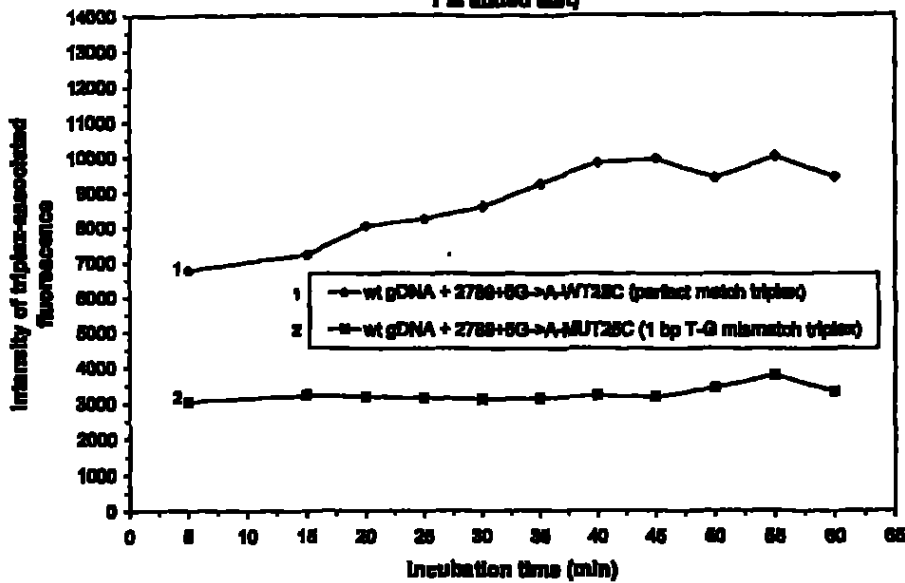


FIG. 2. Triplex-associated fluorescence from human genomic DNA samples assayed in the presence of 500 nM YOYO-1 and 45 mM TMA-Cl (wherein genomic DNA is added last)

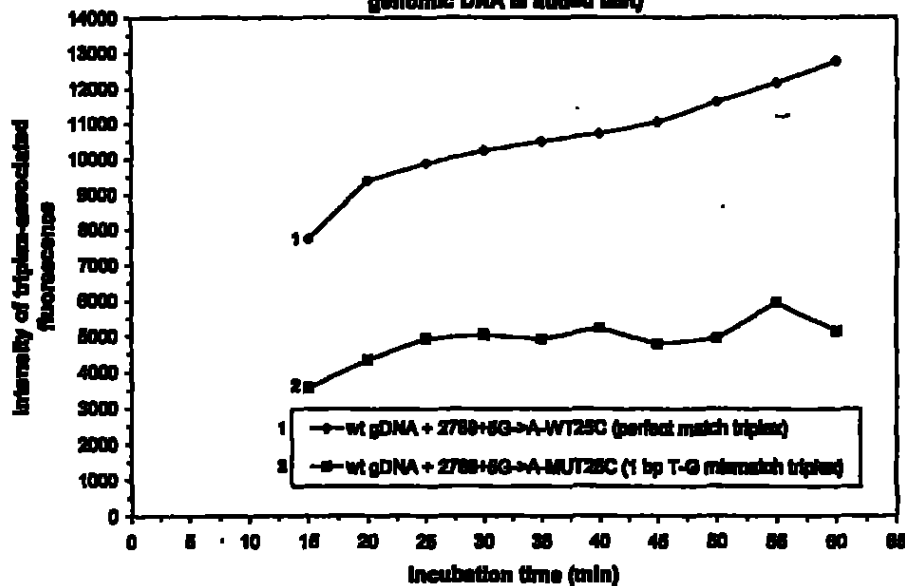


FIG. 3. Triplex-associated fluorescence from human genomic DNA samples assayed in the presence of 500 nM YOYO-1 and 40 mM TMA-Cl (wherein YOYO-1 is added last)

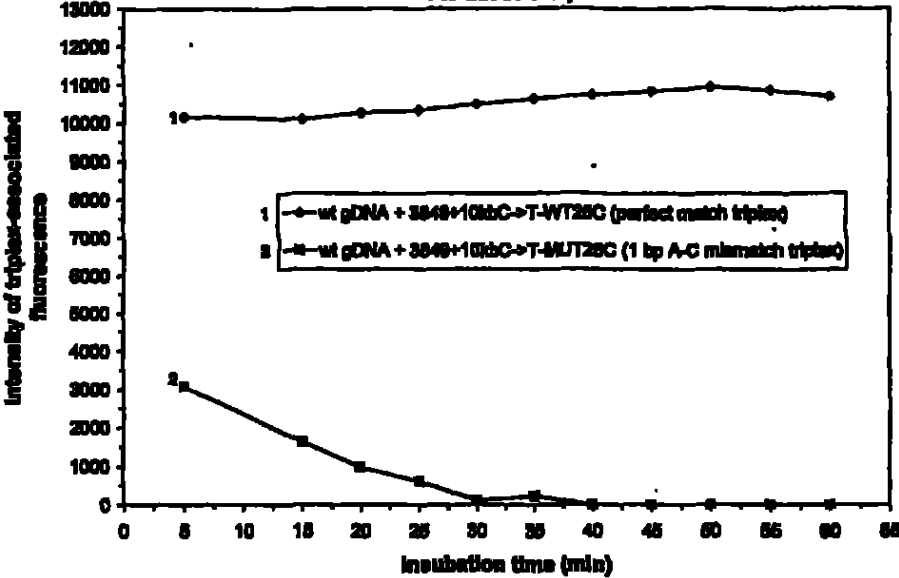
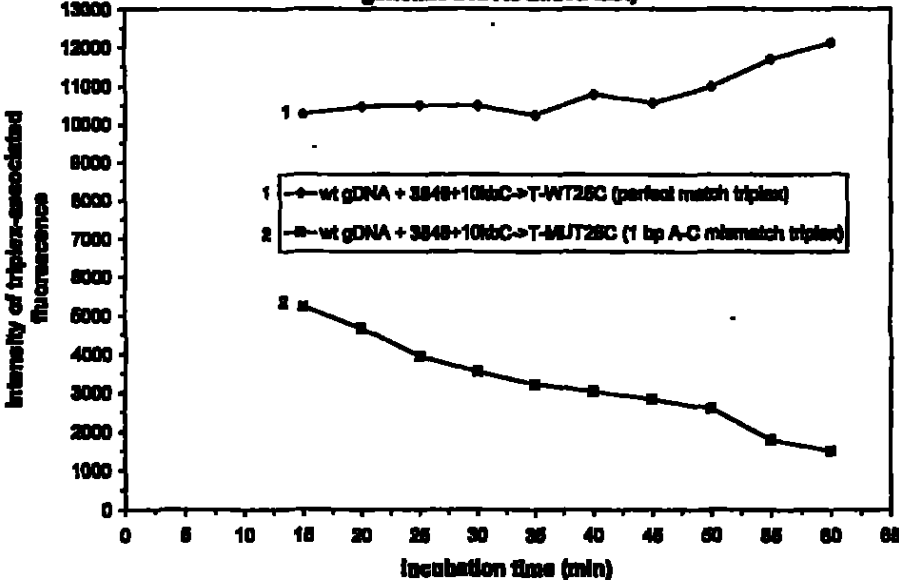
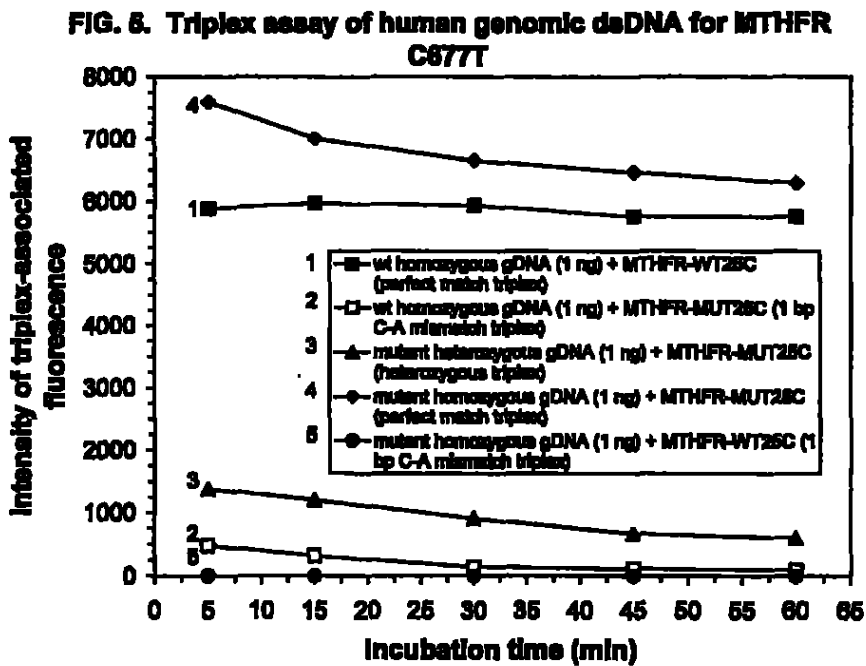


FIG. 4. Triplex-associated fluorescence from human genomic DNA samples assayed in the presence of 500 nM YOYO-1 and 40 mM TMA-Cl (wherein genomic DNA is added last)





SEQUENCE LISTING

PCT	<110> Erikson, Gler Dakota. Tamm	1/8	PCT/IB2005/053162
	Paper Copy (NOT for submission)		
	<130> E1047/20251		
	<150> US 60/612,670		
	<151> 2004-09-24		
	<160> 33		
	<170> PatentIn version 3.3		
	<210> 1		
	<211> 491		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 1		
	gcagagttacc tgaacacagga agtatttttaa atattttttaa tcaaatgagt taatagaatc	60	
	tttaoaaata agaataataa cttctgctta ggtatgatat tggaggcaag tgaatcctga	120	
	gogtgatttg ataattgacct aataatgatg ggtttttattt ccagacttca ottotaatga	180	
	tgattatggg agaactggag ccttcagagg gtaaaattaa gcacagtggg agaatttcac	240	
	tctgtttctca gttttcctgg attatgcctg gcaaattaa agaaatatc atcttttggtg	300	
	tttcttatga tgaatataga tacagaagag tcatcaagag atgcaacta gaagaggtaa	360	
	gaactatgt gaactctttt tgattatgca tatgaacct tcaactacc caattatat	420	
	atttggtcc atattaatc ggttagtota catatattta tgtttcctct atgggtaagc	480	
	tactgtgaat g	491	
	<210> 2		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Synthetic		
	<400> 2		
	gcagagttacc tgaacacagga	20	
	<210> 3		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Synthetic		
	<400> 3		
	cattoacagt agcttaocca	20	
	<210> 4		
	<211> 15		
	<212> DNA		
	<213> Synthetic		

78

	<400> 4 caccaagat gatat	15
		PCT/IB2005/053162
PCT	<210> 4 <213> Synthetic	2/8 Paper Copy ((NOT for submission)
	<400> 5 caccaagac gatat	15
	<210> 6 <211> 15 <212> DNA <213> Synthetic	
	<400> 6 caccacagat gatat	15
	<210> 7 <211> 25 <212> DNA <213> Synthetic	
	<400> 7 taggaacac caagatgat atttt	25
	<210> 8 <211> 25 <212> DNA <213> Synthetic	
	<400> 8 taggaacac caagacgat atttt	25
	<210> 9 <211> 25 <212> DNA <213> Synthetic	
	<400> 9 taggaacac cacagatgat atttt	25
	<210> 10 <211> 15 <212> DNA <213> Synthetic	
	<400> 10 atatatcttt tggtg	15
	<210> 11 <211> 15 <212> DNA <213> Synthetic	

2/1

	<400> 11 atatacgtcgtt tgggtg	15
		PCT/IB2005/053162
PCT	<210> 12	3/8
	Paper Copy ((NOT for submission)	
	<213> Synthetic	
	<400> 12 atatacgtcgtt tgggtg	15
	<210> 13	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Synthetic	
	<400> 13 aaaatatcat ctttggtggtt tcta	25
	<210> 14	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Synthetic	
	<400> 14 aaaatatcgt ctttggtggtt tcta	25
	<210> 15	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Synthetic	
	<400> 15 aaaatatcat ctgtggtggtt tcta	25
	<210> 16	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> Synthetic	
	<400> 16 aacaccaatg atatt	15
	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Synthetic	
	<400> 17 taggaanacac caaagatgat	20
	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Synthetic	

20

<400> 18			
ataggaaccc ccaatgatat			
		4/8	PCT/IB2005/053162
PCT		Paper Copy ((NOT for submission)	
<212> DNA			
<213> Synthetic			
<400> 19			
ataggaaccc ccaatgatat tttct			25
<210> 20			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> Synthetic			
<400> 20			
tgatgatgaa atcggtccc			20
<210> 21			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> Synthetic			
<400> 21			
tgatgatgaa atcgactccc			20
<210> 22			
<211> 25			
<212> DNA			
<213> Synthetic			
<400> 22			
tgatgatgaa atcggtccc gcaga			25
<210> 23			
<211> 25			
<212> DNA			
<213> Synthetic			
<400> 23			
tgatgatgaa atcgactccc gcaga			25
<210> 24			
<211> 30			
<212> DNA			
<213> Synthetic			
<400> 24			
gcgtgatgat gaaatggct cccgcagaca			30
<210> 25			
<211> 30			
<212> DNA			
<213> Synthetic			

81

PCT	<400> 25		
	gogtgatgat gaaatcgact ccgcgcagaca		
		5/8	PCT/IB2005/053162
		Paper Copy ((NOT for submission)	
	<211> 25		
	<212> DNA		
	<213> Synthetic		
	<400> 26		
	ccctctgtat tcctcgctg tccag		25
	<210> 27		
<211> 25			
<212> DNA			
<213> Synthetic			
<400> 27			
ccctctgtat tcctcgctg tccag		25	
<210> 28			
<211> 25			
<212> DNA			
<213> Synthetic			
<400> 28			
aataggacat ggaatactca ctttc		25	
<210> 29			
<211> 25			
<212> DNA			
<213> Synthetic			
<400> 29			
aataggacat ggaatattca ctttc		25	
<210> 30			
<211> 25			
<212> DNA			
<213> Synthetic			
<400> 30			
gtgtcttact cgcattttta atact		25	
<210> 31			
<211> 25			
<212> DNA			
<213> Synthetic			
<400> 31			
gtgtcttact caccattttta atact		25	
<210> 32			
<211> 25			
<212> DNA			
<213> Synthetic			

WO 2006/033088

PCT/IB2005/053162

	<400> 32				25
	tatttttgatt ataggacatg aagat				PCT/IB2005/053162
			5/6		
PCT	<213> 33				
			Paper Copy ((NOT for submission)		
	<213> 33		Synthetic		
	<400> 33				25
	gaaataacc gagtgtaaca tccat				

ENSAYO GENÓMICO

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. CAMPO DE LA INVENCION

La invencion se relaciona a ensayos de material genómico, y más particularmente a un método y a un equipo para detectar la hibridación dúplex, tríplex y/o cuádruplex de ácidos nucleicos.

2. DESCRIPCION DE LA TECNICA RELACIONADA

Los inventores han divulgado previamente cuádruplexos de Watson-Crick específicamente enlazados y otros cuádruplexos, tríplexos y dúplexos no canónicos específicamente enlazados en, por ejemplo, la patente norteamericana No. 6,656,692 y la patente norteamericana No. 6,927,027. Esas publicaciones proporcionan amplia guía que considera la selección de las condiciones de hibridación apropiadas para obtener cualquiera de los diversos multiplexos divulgados en la misma, incluyendo dúplexos, tríplexos o cuádruplexos paralelos o antiparalelos que enlazan en la porción homóloga o de Watson-Crick. Ver también la patente norteamericana No. 6,420,115 de Erikson y colaboradores, patente norteamericana No. 6,403,313 de Daksis y colaboradores y la publicación de solicitud de patente norteamericana copendiente No. 2004/180345, publicada el 16 de Septiembre de 2004.

A pesar de los desarrollos anteriores, se desean proporcionar medios adicionales para analizar ácidos nucleicos que sean sensibles, robustos y confiables. Particularmente se desean proporcionar métodos, y equipos para analizar secuencias de ácido nucleico de muestras genómicas. Además se desean proporcionar medios para la

detección directa de secuencias de ácido nucleico en muestras genómicas sin amplificar las secuencias de ácido nucleico. Todavía además se desea mejorar la sensibilidad e identificar más precisamente y confiablemente la señal emitida por la
5 reacción de enlace de interés.

Todas las referencias citadas en la presente son incorporadas en la misma por referencia en sus totalidades.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Por consiguiente, la invención proporciona un
10 método para detectar una secuencia de ácido nucleico en una muestra genómica, el método que comprende:

proporcionar la muestra genómica que comprende una secuencia de ácido nucleico objetivo de un ácido nucleico dúplex;

15 proporcionar una sonda que comprende una secuencia de ácido nucleico de sonda;

proporcionar una mezcla de hibridación que comprende la muestra genómica, la sonda, un agente de promoción de hibridación y marcas;

20 incubar la mezcla de hibridación para proporcionar una mezcla incubada que comprende un complejo de la secuencia de ácido nucleico objetivo, la sonda y las marcas;

irradiar la mezcla incubada con radiación efectiva para estimular por lo menos algunas de las marcas para emitir
25 energía; y

detectar de una señal fluorescente si la sonda perfectamente iguala a la secuencia de ácido nucleico objetivo, para de esta manera detectar si la secuencia de ácido nucleico está presente en la muestra genómica,

30 en donde la detección se completa dentro de sesenta

minutos de proporcionar la mezcla de hibridación, y el método se conduce sin desnaturalizar el ácido nucleico dúplex y sin amplificación de PCR del ácido nucleico dúplex.

Además se proporciona un método para detectar una
5 secuencia de ácido nucleico en una muestra genómica, el método que comprende:

proporcionar la muestra genómica que comprende una secuencia de ácido nucleico objetivo de un ácido nucleico de una sola hebra o de doble hebra;

10 proporcionar una sonda que comprende una secuencia de ácido nucleico de sonda;

proporcionar una mezcla de hibridación que comprende la muestra genómica, la sonda, un agente de promoción de hibridación y marcas;

15 incubar la mezcla de hibridación para proporcionar una mezcla incubada que comprende un complejo de la secuencia de ácido nucleico objetivo, la sonda y las marcas;

aplicar energía a la mezcla incubada efectiva para inducir una señal a partir de la mezcla de hibridación; y

20 detectar de la señal si la sonda perfectamente igual a la secuencia de ácido nucleico objetivo, para de esta manera detectar si la secuencia de ácido nucleico está presente en la muestra genómica,

en donde la detección se completa dentro de sesenta
25 minutos de proporcionar la mezcla de hibridación, y el método se conduce sin desnaturalizar el ácido nucleico dúplex y sin amplificación de PCR del ácido nucleico dúplex.

También se proporciona un equipo para practicar el método de la invención.

30 **BREVE DESCRIPCIÓN DE VARIAS VISTAS DE LOS DIBUJOS**

La invención será descrita en conjunción con los siguientes dibujos en los cuales números de referencias similares designan elementos similares y en donde:

Las Figs. 1, 2, 3, 4 y 5 son gráficas de intensidad
5 fluorescente contra el tiempo de incubación que muestra el incremento y/o menguamiento de la intensidad fluorescente a través del tiempo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los inventores han divulgado previamente el enlace
10 específico de la hebra heteropolimérica al ácido nucleico dúplex y el enlace específico del ácido nucleico dúplex a otro ácido nucleico dúplex. La descripción de los inventores proporciona los medios mediante los cuales las secuencias de bases en dúplexos que ocurren naturalmente se pueden hacer
15 específicamente reactivos a una secuencia de base en una tercera hebra mientras que permanecen establemente emparejados en el dúplex, un hecho previamente no reconocido de capital importancia. Ver, por ejemplo, la patente norteamericana No. 6,656,692 y la patente norteamericana No.
20 6,927,027. Los inventores también han divulgado que los ácidos nucleicos heteropoliméricos (y/o sus análogos) pueden enlazarse específicamente entre sí mediante la unión de base homóloga así como mediante la interacción de base de Watson-Crick, y que la unión de base no está limitada a hebras que
25 tienen direccionalidad antiparalela con relación entre sí. Id. Así, los ácidos nucleicos heteropoliméricos (y/o sus análogos) pueden enlazarse específicamente entre sí con direccionalidad paralela o antiparalela, en donde las bases se unen mediante la unión de base homóloga y/o las reglas de
30 unión de base de Watson-Crick. La descripción de los

inventores de la preferencia de porción de enlace de los ácidos nucleicos fue de manera similar no reconocida previamente y es del mismo modo de capital importancia. Todos los complejos específicos anteriores son fácilmente reproductibles habiéndose detectado in vitro utilizando instrumentos fácilmente disponibles y reactivos utilizados bajo condiciones leves y permisivas.

Los inventores han divulgado previamente que la pre-incubación de la sonda con un agente de incubación de sonda y/o el objetivo con un agente de incubación objetivo puede incrementar la discriminación de la señal a ser detectada de las señales antecedentes (es decir, el ruido de interferencia o antecedentes) al (a) incrementar la afinidad de enlace o la intensidad de señal del objetivo y la sonda perfectamente igualados; y/o (b) disminuir la afinidad de enlace o intensidad de señal del objetivo y sonda desigualado. Ver, la publicación de solicitud de patente norteamericana No. 2004/0180345.

Los inventores ahora divulgan otros diversos parámetros, incluyendo la longitud de la sonda, la concentración de sonda, la concentración objetivo y la concentración de marca, cuyo ajuste puede lograr efectos benéficos inesperados.

Por consiguiente, la invención proporciona un método para analizar el enlace de ácido nucleico, en donde por lo menos uno de los parámetros anteriores se ajusta para el efecto benéfico.

Además, los inventores ahora divulgan un método que permite la detección de un polimorfismo de nucleótido en un objetivo genómico, tal como un dsDNA humano, sin

amplificación del objetivo. Distinto a cualquiera de otros métodos de los cuales los inventores están concientes, el presente método se puede conducir en menos de sesenta minutos, y de preferencia menos de quince minutos, en una
5 temperatura sin desnaturalización.

La invención comprende el uso y/o la formación de complejos dúplex, tríplex y/o cuádruplex novedosos de ácidos nucleicos (y/o análogos de los mismos).

Las hebras de ácido nucleico tienen direccionalidad
10 inherente. La sabiduría convencional mantiene que las hebras de direccionalidad opuesta, es decir, que son antiparalelas en su orientación entre sí, forman un dúplex a través del enlace complementario de Watson-Crick de sus bases respectivas. La unión conjunta de la sonda y la secuencia de
15 ácido nucleico objetivo solamente como dos hebras antiparalelas que cumplen con las reglas de emparejamiento de base de Watson-Crick por lo tanto es excluida de ciertas modalidades de la invención.

Ciertos duplexos de acuerdo con la invención, por
20 otra parte, comprenden dos hebras de ácido nucleico (y/o análogos de ácido nucleico) hibridados en relación paralela entre sí, en donde el enlace específico es ya sea a través del emparejamiento de base homóloga o el emparejamiento de base de Watson-Crick. La sabiduría convencional sostiene que
25 tales duplexos no existen, o por lo menos serían extremadamente inestables debido a, por ejemplo, irregularidades de la cadena principal necesitadas por los requerimientos conformacionales de la unión de base paralela.

Aun más sorprendente es el descubrimiento de los
30 inventores que bajo condiciones de hibridación apropiadas, la

bases homólogas incluyen A:A, G:G, C:C, T:T, U:U y T:U.

El enlace por las bases de hebras de ácido nucleico es afectado o condicionado por un número de factores, particularmente el potencial de enlace de las hebras conforme a ya sea la porción de W-C o la porción homóloga, y condiciones iónicas (por ejemplo, concentración y/o tipo de sal). Las condiciones salinas tienden a favorecer la formación de la unión de Watson-Crick sobre la unión homóloga. Los cuádruplexos de porción homóloga son favorecidos sobre los cuádruplexos de porción W-C bajo condiciones de solución reguladora idéntica.

Cada hebra en un complejo de la invención puede comprender cualquier secuencia de nucleobases y/o análogos de nucleobase, siempre y cuando las nucleobases sean relacionadas a las nucleobases a las cuales se enlazan específicamente por ya sea la porción de W-C o la porción homóloga. Contrario a ciertas enseñanzas de la técnica previa, el objetivo y la sonda no necesitan ser homopoliméricos para lograr el enlace, aún en el caso de la formación de tríplex o cuádruplex. Así, en ciertas modalidades, las nucleobases de sondas se arreglan en una secuencia de sonda heteropolimérica de purina interdispersadas y pirimidinas, y las nucleobases objetivas se arreglan en una secuencia objetivo por lo menos parcialmente complementario o parcialmente homóloga a la secuencia de sonda. Por ejemplo, la secuencia de sonda puede contener 25% a 75% de bases de purina y 75% a 25% de bases de pirimidina en cualquier orden. Los complejos de la invención pueden formarse de secuencias heteropoliméricas, que, como se definió en la presente, significan secuencias que contienen

por lo menos una nucleobase de purina o análogo de purina y por lo menos una nucleobase de pirimidina o análogo de pirimidina en por lo menos su segmentos de hibridación. Tales secuencias heteropoliméricas de preferencia carecen de
5 fragmentos homopoliméricos de largo mayores que 5 bases. Otras nucleobases también son adecuadas para el uso en la invención, tales como, por ejemplo, análogos sintéticos de bases que ocurren naturalmente, que tienen afinidades de enlace de Watson-Crick y/u homóloga a otras bases.

10 Además de los duplexos, los complejos de la invención también incluyen triplexos y cuádruplexos, donde hebras heteropoliméricas opuestas son enlazadas por bases complementarias de Watson-Crick o por bases homólogas, y la direccionalidad relativa de las secuencias enlazadas es
15 paralela o antiparalela entre sí.

Una hebra de sonda puede enlazarse específicamente en la hendidura mayor o menor de un objetivo de doble hebra. Además, las bases de una sonda de una sola hebra pueden interactuar específicamente con bases en una o ambas hebras
20 de un objetivo de doble hebra. De manera similar, las bases de cada hebra de una sonda de doble hebra pueden interactuar específicamente con bases en una o ambas hebras de un objetivo de doble hebra en complejos cuádruplex de la invención. Así, en ciertas modalidades de triplex de la
25 invención, por lo menos una base de la sonda es unida por lo menos una base o par de bases del objetivo mediante la interacción de base complementaria de Watson-Crick y/o mediante la interacción de base homóloga, tal que el complejo es un tríplex, y en ciertas modalidades cuádruplex de la
30 invención, por lo menos una base de la sonda es unida a por

Ciertas modalidades están libres de PNA. Para la estabilidad incrementada, las sondas se pueden proporcionar en una forma de fosfotriéster, para inhibir la degradación durante el uso.

Distinto a ciertos complejos particularmente asociados con PNA, los triplexos de la invención no dependen
5 de un mecanismo de invasión de hebra.

Por lo menos una porción del complejo es aislada, purificada, artificial o sintética.

En modalidades, una porción del complejo es un
10 producto amplificado por PCR. Sin embargo, las modalidades preferidas de la invención están libres de amplificación por PCR y productos del mismo.

Los complejos de la invención se pueden presentar en solución, sobre un soporte sólido, *in vitro*, *in vivo* o *in*
15 *silico*. El soporte sólido puede ser eléctricamente conductor (por ejemplo un electrodo) o no conductor. En ciertas modalidades, el soporte sólido es una película de isla de plata u otro material que toma ventaja de las interacciones de fluoróforo-metal para aumentar la sensibilidad, como es
20 enseñado por Aslan y colaboradores, Metal-enhanced fluorescence: an emerging tool in biotechnology". Current Opinion in Biotechnology 2005, 16:55-62. Además, los complejos pueden ser ópticamente mapeados o secuenciados después de ser alargados, como es enseñado en las patentes
25 norteamericanas Nos. 6,147,198 y 5,720,928 de Schwartz.

El enlace específico entre los ácidos nucleicos ocurre bajo una amplia variedad de condiciones que tienen variaciones en la temperatura, concentración de sal, resistencia a la electrostática, composición de la solución
30 reguladora y concentración molar relativa de los ácidos

nucleicos. Ejemplos de estas condiciones y métodos para aplicarlos son conocidos en la técnica.

Los inventores han divulgado previamente condiciones particularmente adecuadas para proporcionar los
5 complejos únicos y específicos de estos inventores, en el contexto del análisis de ácido nucleico y de otra manera. Ver, por ejemplo, la patente norteamericana No. 6,656,692 y la patente norteamericana No. 6,927,027. Los inventores ahora además elaboran en sus enseñanzas previas considerando tales
10 condiciones.

Distinto a muchos complejos de tipo Hoogsteen, que son inestables o no existentes en niveles de pH arriba de aproximadamente 7.6, los complejos de la invención son estables sobre una amplia gama de niveles de pH, de
15 preferencia de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 9.

Como se muestra en los ejemplos descritos enseguida, los inventores han descubierto inesperadamente que la economía del manejo del material objetivo genómico se puede lograr sin el sacrificio proporcionado en la señal de
20 ensayo. Así, es sorprendentemente posible reducir la cantidad de material objetivo genómico en el ensayo invertido sin causar una disminución proporcionada en la especificidad o sensibilidad del ensayo. En algunos casos, la reducción de la cantidad de material genómico se presenta para incrementar la
25 especificidad y/o sensibilidad del ensayo. De manera similar, bajo las mismas condiciones cantidades reducidas de promotores de hibridación o marcas dan por resultado la emisión de señal aumentada.

Sin que se desee que sea relacionado por cualquiera
30 de las teorías, los inventores tienen una explicación posible

para este fenómeno. Los inventores creen que hay por lo menos dos restricciones opuestas que dictan el número óptimo de marcas intercaladas en un complejo. La intensidad de fluorescencia emitida por el complejo se incrementa con el

5 número de marcas intercaladas en el mismo. Sin embargo, el número de marcas por complejo es limitado por el número de sitios disponibles a las marcas, y quizás más importantemente, por la repulsión de carga mutua entre marcas próximas. Así, si se lograra una relación de saturación de

10 marca a complejos (u objetivos), la adición del objetivo adicional del sistema sería esperado que reduzca la relación por debajo del punto de saturación. Cada complejo luego incluiría menos que el número mínimo de marcas, dando por resultado fluorescencia reducida por complejo. La

15 fluorescencia reducida por complejo puede dar por resultado una reducción total en la fluorescencia (cuando el incremento en el número de complejos fluorescentes es sobrepasado por la reducción en la fluorescencia de cada complejo) o un incremento en la fluorescencia menor que el proporcionado al

20 incremento del número de complejos (cuando el incremento en el número de complejos fluorescentes sobrepasan la reducción en la fluorescencia de cada complejo). Los inventores además creen que el DNA dúplex actúa un poco para proteger la reproducción de carga contra las marcas intercaladas en la

25 epidura menor que el dúplex y aquellas agrupadas cerca de la tercera hebra o la sonda dúplex creando la oportunidad para una concentración de marca hiper-densa en el complejo. Esas marcas luego se creen que interactúan cuando se radian con un modelo de migración de energía de donador:donador debido a su

30 proximidad. Ver, por ejemplo, la patente norteamericana No

6,911,310 para información adicional que considera los sistemas de transferencia de energía de donador-a-donador.

Los inventores también han observado que algunas marcas, tal como el intercalador YOYO-1, son capaces de
5 varias intensidades de emisiones, dependiendo de la estructura del complejo en el cual son intercalados. Esto puede ser debido que son apagados por hidratación. Puede ser que la estructura de triple hebra, cuando se forma, proporciona un ambiente deshidratado inventado para las
10 marcas intercaladas sobre las que existen cuando los intercaladores inhabitaron el dúplex antes del procedimiento de la primera hebra que enlaza para formar el tríplex. También puede ser que la formación de un tríplex estabilizado por marcas intercaladas puede causar colapso del DNA local,
15 que a su vez contribuye a todavía más grande deshidratación de las marcas y todavía emisiones más grandes de esas marcas.

El siguiente lenguaje se utiliza en la presente basado en el entendimiento anterior de la invención.

Una cantidad de saturación de complejo de la marca
20 es una concentración de marca por lo menos suficiente para lograr un máximo en una gráfica de intensidad fluorescente contra la concentración de marca en una concentración de ácido nucleico fijada.

Una cantidad de saturación objetivo de sonda es una
25 concentración de sonda por lo menos suficiente para enlazar a todos los objetivos en el medio de hibridación. Este valor teórico se puede ajustar basado en datos experimentales (por ejemplo, la titulación de la sonda en una mezcla de divulgación de concentración objetivo fijada). En la
30 práctica, el valor teórico no puede ser idéntico al valor

empíricamente derivado, debido a factores similares al autoenlace de las sondas, enlace no específico al sustrato, etc. La expresión "cantidades de saturación objetivo" como se utiliza en la presente se refiere a la cantidad empíricamente derivada a menos que se establezca de otra manera.

La cantidad de saturación objetivo de la sonda también se puede expresar como una relación de sonda a objetivo. Esta relación es de preferencia de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10^{12} :1.

Las concentraciones absolutas de sonda y marca en la mezcla de hibridación generalmente se seleccionan en base a la concentración sospechada de objetivo en la mezcla. El ensayo invertido es extremadamente sensible, obviando de esta manera la necesidad para conducir la amplificación de PCR del objetivo. Por ejemplo, es posible analizar una muestra de prueba que tiene un volumen de aproximadamente 80 microlitros, que contiene aproximadamente 19 yoctomoles de objetivo genómico humano y aproximadamente 3.2 pmoles de sonda. Las modalidades de la invención son bastante sensibles para analizar objetivos genómicos humanos a una concentración de 2.4×10^{-18} M, de preferencia una concentración de no más de 2.4×10^{-19} M. Las modalidades de la invención son bastante sensibles para emplear sondas a una concentración de 4×10^{-7} M, de preferencia a una concentración de no más de 4×10^{-8} M. Esto debe ir sin decir que los valores anteriores no se proponen para sugerir que el método no puede detectar concentraciones más altas o más bajas de objetivo o que la concentración de sonda no puede ser más alta o más baja.

En modalidades particularmente preferidas, los objetivos genómicos no amplificados pueden ser detectados en

unión homóloga, de preferencia promovida es señalizada por YOYO-1, demuestra especificidad y estabilidad que rivaliza a aquella del dúplex antiparalelo complementario de Watson-Crick.

5 La invención también comprende duplexos que contienen dos hebras de ácido nucleico (y/o análogos de ácido nucleico) hibridados en relación paralelo entre sí, en donde el enlace específico es a través del emparejamiento de base homóloga.

10 Como se utiliza en la presente, los términos "emparejamiento de base de Watson-Crick", "emparejamiento de base complementaria" y los similares se proponen para definir a la asociación específica entre pares opuestos o adyacentes de hebras de ácido nucleico y/o análogo de ácido nucleico por
15 la vía de bases igualadas (por ejemplo, A:T; G:C y/o A:U). En el contexto de complejos no canónicos descritos en la presente, incluyendo duplexos paralelos, triplexos paralelos y antiparalelos y cuadrupeplexos paralelos y antiparalelos, los términos similares a "unión de base de Watson-Crick" y "unión
20 de base complementaria" se proponen para denotar la unión entre A y T, A y U y/o G y C, pero no necesariamente en la conformación plana, de lado, primero descrito por Watson-Crick. Además de la porción de enlace convencional primero propuesta por Watson-Crick (la "porción W-C" y las variantes
25 conformacionales de la misma comprendidas por la definición anterior de la unión de la unión de Watson-Crick, la presente invención comprende complejos formados por la unión de base homóloga. En la unión de base homóloga, las bases se unen específicamente con bases idénticas antes que bases
30 complementarias. Así, en la "porción homóloga" las pares de

lo menos una base o par de bases del objetivo mediante la interacción de base complementaria de Watson-Crick y/o mediante la interacción de base homóloga, tal que el complejo es un cuádruplex.

5 En ciertas modalidades de tríplex y cuádruplex, cada nucleobase enlaza a una o dos de otras nucleobases. Así, además de los pares de base de Watson-Crick dúplex tradicionales y los pares de bases homólogas dúplex descritas en lo anterior, tales modalidades incluyen los siguientes
10 triplete de base de 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 cualquiera de otras especies ionizadas de bases) y/o los siguientes triplete de bases homólogos: A:A:T, T:T:A, U:U:A, T:U:A, A:A:U, U:T:A, G:G:C y/o C:C:G (incluyendo C:C⁺:G, y/o
15 cualquiera de otras especies ionizadas de base).

Así, en ciertas modalidades de cuádruplex en donde la sonda es definida como un dúplex de la primera y la segunda hebra antiparalela asociadas por los emparejamientos de base Watson-Crick, y el objetivo es definido como un
20 dúplex similarmente estructurado de una tercera y una cuarta hebra, se cree que las bases de la primera y la tercera hebra también se enlazan entre sí, además de: (a) el enlace entre las bases opuestas de la primera y la segunda hebra; (b) el enlace entre las bases opuestas de la tercera y la cuarta
25 hebra; y (c) el enlace entre las bases opuestas de la segunda y la cuarta hebra.

En ciertas modalidades de la estructura de tríplex y cuádruplex de la invención, ninguna secuencia de enlace de bases está contigua con otras secuencias de enlace de bases.
30 Esto es, hay por lo menos tres hebras separadas. Aunque las

conformaciones plegadas y los similares (por ejemplo, vueltas de horquilla, etc.) están dentro del alcance de la invención (particularmente pero no limitado a modalidades de interferencia de RNA, donde el diseño de horquilla se ha encontrado que es ventajoso para ocasionar la interferencia basada en el enlace de dúplex de Watson-Crick convencional de objetivos de RNA - ver Hemann y colaboradores, "An epiallelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes in vivo" Nat. Genet. 2003 Mar; 33(3):396-400), porciones plegadas de una sola hebra no hacen el conteo de hebra más de una vez hacia el mínimo de tres hebras separadas.

Los complejos de la invención de preferencia no dependen de la unión de Hoogsteen (incluyendo la unión de Hoogsteen inversa) y/o cuartetos G para el mantenimiento de la estructura compleja, aunque la unión de Hoogsteen (incluyendo la unión de Hoogsteen inversa) y/o cuartetos de G puede estar presente. Esto es, los complejos de la invención de preferencia están sustancialmente libres de la unión de Hoogsteen (incluyendo la unión de Hoogsteen inversa) y sustancialmente libre de cuartetos G.

Cada hebra del complejo independientemente comprende un ácido nucleico que tiene una cadena principal de deoxirribosa fosfato o ribosa fosfato (por ejemplo, DNA, RNA, mRNA, hnRNA, rRNA, tRNA o cDNA) o una cadena principal de ácido nucleico o base análoga. Los análogos de ácido nucleico preferidos incluyen una cadena principal no cargada o parcialmente cargada (es decir, una cadena principal que tiene una carga que no está negativa como una cadena principal del DNA nativa) e incluye, por ejemplo, PNA y LNA.

sus concentraciones nativas. El ensayo inventivo es bastante sensible para detectar polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y/o polimorfismos de múltiples nucleótidos en muestras genómicas humanas que pesan 4 ng a 75 pg, que contienen
5 aproximadamente 604 copias a 11 copias (1.3×10^{-17} M a 2.4×10^{-19} M en una mezcla de hibridación de 80 μ l) de la secuencia objetivo de ácido nucleico. Así, en ciertas modalidades, el ensayo se llevó a cabo en una mezcla de reacción de 80 μ l se conduce en una muestra genómica que contiene menos de 700
10 copias de la secuencia de ácido nucleico objetivo, y de preferencia aproximadamente 150 a aproximadamente 300 copias de la secuencia de ácido nucleico objetivo (algunas veces referida después en la presente como "el objetivo"). De manera similar, en una mezcla de reacción de 80 μ l los
15 inventores han detectado una secuencia característica presente en 5 copias de ácido nucleico objetivo de *Bacillus globigii*.

Los objetivos no necesitan ser parcialmente o completamente purificados para lograr tal sensibilidad. En
20 modalidades preferidas, una muestra biológica se obtiene de un organismo o célula, y una muestra genómica se prepara de la muestra mediante lisis o digestión o la remoción de por lo menos una porción de (y mucho más de preferencia sustancialmente todo) el material no de ácido nucleico, tales
25 como histonas y los similares, del DNA. Las fuentes adecuadas de material genómico para el uso en la invención incluyen pero no están limitadas a eucariotes, plantas, animales, vertebrados, peces, mamíferos, humanos, microbios y virus.

Opcionalmente, el DNA genómico en la muestra
30 genómica se puede amplificar mediante un método de

amplificación de múltiple desplazamiento, de preferencia a aquel divulgado en la patente norteamericana No. 6,617,137 B2 de Dean y colaboradores, en donde se evitan las condiciones de desnaturalización.

5 Mientras que ciertos métodos de ensayo previo requieren que el DNA de la muestra genómica se ha digerido para facilitar el acceso a la(s) secuencia(s) de ácido nucleico objetivo, la presente invención permite la detección directa de la(s) secuencia(s) de ácido nucleico objetivo que
10 constituye una porción infinitesimal del genoma completo sin requerir que el DNA genómico sea segmentado en secuencias más pequeñas. Así, la presente invención puede detectar secuencias de ácido nucleico objetivo cuando la muestra genómica comprende un objetivo genómico que no es fraccionado
15 o es solo parcialmente fraccionado. En ciertas modalidades, la muestra genómica comprende por lo menos 1%, de preferencia por lo menos 10%, más de preferencia 100% de un genoma completo. En ciertas modalidades, la secuencia de ácido nucleico objetivo se puede detectar en secuencias genómicas
20 de más de 2 kb de largo, de preferencia más de 5 kb de largo. Por consiguiente, la longitud del material genómico que contiene la secuencia de ácido nucleico objetivo no es un factor limitativo del ensayo. De preferencia, las secuencia de ácido nucleico objetivo es un material genómico de una
25 sola o doble hebra que tiene una longitud de 8 bp a 3.3×10^9 bp de largo.

 La longitud de la secuencia de ácido nucleico objetivo de preferencia debe ser suficientemente larga de modo que la secuencia de ácido nucleico objetivo sea única en
30 la muestra (aunque una pluralidad de secuencias no únicas,

más cortas dentro de un genoma pueden ser dirigidas para identificar únicamente propiedades del genoma). La secuencia de ácido nucleico objetivo preferida son de 8 a 200 bases en longitud, más de preferencia 15 a 30 bases en longitud. La
5 secuencia de ácido nucleico objetivo puede ser material genómico no amplificado, amplificado de material genómico o sintético. La secuencia de ácido nucleico objetivo puede ser todo o parte del genoma del organismo celular de la cual se extrajo el material genómico, o puede pertenecer a un
10 patógeno presente (o previamente presente) en el organismo o célula. Así, la invención no es solamente adecuada para diagnosticar mutaciones genéticas, pero también para detectar ácidos nucleicos de patógenos que infectan un organismo hospedero o célula.

15 El ensayo de la invención también es adecuado para detectar objetivos no genómicos, tal como cDNA, particularmente para los propósitos de clasificar librerías de cDNA.

20 El ensayo puede detectar la presencia de uno o más objetivos utilizando una o más sondas. El uso de una pluralidad de diferentes sondas para detectar una pluralidad de diferentes objetivos es particularmente útil para detectar haplotipos.

25 Los inventores han divulgado previamente que las sondas son de preferencia de 2 a 200 bases de largo, y más de preferencia de 5 a 30 bases de largo, y pueden ser de una sola o de doble hebra. Desde entonces, los inventores han descubierto inesperadamente maneras en las cuales la longitud de la sonda se puede ajustar para incrementar la sensibilidad
30 y especificidad de detección. Por ejemplo, en los sistemas

descritos en los ejemplos, las sondas de 25-mer y 30-mer que abarcan las sondas de 15-mer y 20-mer, con sondas de 25-mer algunas veces que proporcionan la sensibilidad y especificidad más grandes cuando se detecta la presencia de un SNP es el objetivo. Por consiguiente, las sondas que forman triplex pueden ser opcionalmente específicas para la detección de SNP cuando son de 25-mer de largo lo cual difiere que las sondas que forman dúplex que son óptimamente específicas para la detección de SNP cuando más cortas antes que más largas.

Sin que se desee que sea relacionado con cualquiera de las teorías, los inventores ofrecen una explicación posible para este fenómeno. Asumiendo, por ejemplo, que las marcas son capaces de enlazar con la hendidura menor de un complejo de sonda-objetivo en sitios separados por 11 bases, los inventores esperarían un complejo de sonda-objetiva de 25-mer que tiene 2 marcas de enlace de hendidura menor por complejo, mientras que un complejo de sonda-objetivo de 15-mer sería esperado que tenga solamente una marca de enlace de hendidura menor por complejo. Esto podría explicar porque una sonda de 25-mer se desempeñaría para una sonda de 15-mer. El complejo de sonda-objetivo de 125-mer sería esperado que tenga el mismo número de marcas de enlace de hendidura menor como el complejo de sonda-objetivo de 25-mer (2 marcas), pero la sonda de 30-mer, no sería tan sensible como los polimorfismos de nucleótido, puesto que la intensidad fluorescente está correlacionada con la afinidad de enlace, y una desigualación de bases sería más desestabilizante a un 25-mer que a un 30-mer.

Una teoría alternativa asume que las marcas son

mutuamente repulsivas en una primera función de las distancias (F_1) y que las marcas son capaces de aumentar la fluorescencia de marcas adyacentes (por ejemplo, por la vía de FRET, transferencia de energía de resonancia fluorescente o por la vía de DDEM, migración de energía de donador:donador) como una segunda función de las distancias (F_2), en donde F_1 está inversamente relacionado a F_2 . Puede haber una concentración o intervalo de concentraciones de marcas cargadas, que permiten la intercalación máxima del complejo de sonda:objetivo y la emisión similar a FRET máxima o DDEM. Es posible que la adición de la sonda objetivo pueda proporcionar sitios de intercalación adicionales para las marcas, pero el número y la ubicación de tales sitios son restringidos por la repulsión mutua entre las marcas. Así, las sondas por debajo de una cierta longitud (que los inventores esperarán que varían un poco dependiendo de la naturaleza de la sonda, objetivo, marcas y medio ambiente) no pueden proporcionar protección adecuada de las cargas mutuamente repulsivas de las marcas próximas y/o no podrían proporcionar sitios favorables para la interacción similar a FRET o DDEM entre las marcas en la hendidura menor o intercalada entre las bases del objetivo.

Por ejemplo, se asume que las marcas son capaces de intercalarse cada 20 bases por todo el objetivo de doble hebra, y que la distancia entre estas marcas es demasiado grande para soportar la interacción similar a FRET o DDEM. Si la interacción similar a FRET o DDEM ocurre entre tales marcas intercaladas del objetivo y las marcas asociadas con la sonda (por ejemplo, al enlazar en la hendidura menor, la intercalación entre las bases de la sonda y el objetivo,

etc.), la alineación de las marcas asociadas de la sonda con las marcas asociadas con el objetivo probablemente serían para sondas más largas. Las hebras de sonda de longitud suficiente pueden transmitir un número suficiente de las
5 marcas que entren en tal proximidad estrecha entre sí de modo que la transferencia de energía entre las marcas puede aumentar la emisión del complejo de sonda:objetivo y por consiguiente la detección.

Por consiguiente, las sondas de la invención de
10 preferencia son ácidos nucleicos de una sola hebra o análogos de ácido nucleico de 15 a 30 bases en longitud, en donde la discriminación de la señal de las señales antecedentes es maximizada por la transferencia de energía a la migración de energía entre o además de las marcas intercaladas intra-
15 objetivo y las marcas intercaladas de sonda-objetivo. Más de preferencia, la sonda tiene el objetivo optimizado para transferencia de energía o la migración de energía. De preferencia, la longitud es más grande que 15 bases. Pero aún más de preferencia, la sonda es de 20-30 bases en longitud.

20 Las sondas adecuadas para el uso en el ensayo inventivo incluye, por ejemplo, ssDNA, RNA, ssPNA, LNA, dsDNA, dsRNA, híbridos de DNA:RNA, dsPNA, híbridos de PNA:DNA y otros ácidos nucleicos de una sola y doble hebra y análogos de ácido nucleico que comprenden cadenas principales de
25 azúcar fosfato y/o péptido no cargadas, parcialmente cargadas por completo o en parte o análogos de base por completo o en parte. En ciertas modalidades, la longitud de la sonda se puede seleccionar para igualar la longitud del objetivo.

Las sondas de la invención de preferencia son
30 seguidas de utilizar y estables por años. Por consiguiente,

105

las sondas se pueden hacer u ordenar en grandes cantidades y almacenar.

En ciertas modalidades de la invención, las sondas de bloqueo se pueden utilizar además de las sondas propuestas para enlazar la secuencia de ácido nucleico objetivo. Ver, 5 por ejemplo, la patente norteamericana No. 6,110,676.

La sonda y el objetivo se hibridan en la presencia de un agente de promoción de hibridación (HPA). Los HPAs son generalmente iones que se han encontrado que mejoran la 10 especificidad y/o presteza con la cual el ensayo se pueda realizar. Los inventores también han encontrado que los HPAs se pueden utilizar para la duración extendida de los ensayos para estabilizar la intensidad de fluorescencia emitida de las muestras de control que contiene la sonda o marca. Los 15 HPAs adecuados incluyen, pero no están limitados a, cationes de $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$, $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{HCl}$, NaCl , Na_2SO_4 , Na_2HPO_4 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Los HPAs preferidos incluyen las estructuras que hacen estructura de agua (es decir, agentes cosmotropos o cosmotrópicos) divulgados en la patente norteamericana No. 6,783,932 B2 de 20 Fresco y colaboradores.

Los beneficios del uso de uno o más HPAs en una mezcla de reacción y las mejores concentraciones para el uso bajo cualquiera de las condiciones de ensayos adicionales se pueden determinar experimentalmente utilizando la presente 25 descripción como una guía. Las concentraciones preferidas para los HPAs seleccionados incluyen, pero no están limitados a, lo siguiente: NaCl 50 a 80 mM, NaSO_4 10 a 60 mM, Na_2HPO_4 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 125 a 250 mM, Trimetilamoniocloruro 30 mM (o clorhidrato de trimetilamina), tetrametilamoniocloruro 35 a 30 52.5 mM (TMA-Cl) cada uno adicionado por separado o TMA-Cl 50

mM en combinación con NaCl 10 a 20 mM. La patente norteamericana No. 6,783,932 B2 de Fresco y colaboradores enseña el uso de concentraciones mucho más altas de cosmótopos para estabilizar triplexos basados en secuencias
5 de polipurina. Mientras que tales concentraciones más altas están dentro del alcance de la presente invención, ellas no son requeridas para estabilizar los triplexos y cuadruplexos heteropoliméricos específicos de la presente invención.

En ciertas modalidades, el HPA también es una marca
10 fluorescente. En tales modalidades, el uso de una marca no de HPA o marcas de HPA adicionales es opcional. Los HPAs adicionales a la marca de HPA también son opcionales. El HPA-marca es de preferencia una marca de intercalación, más de preferencia un tinte de cianina dimérico y aun más de
15 preferencia YOYO-1.

Las marcas de la invención (si funcionan solamente como marcadores, solamente como HPAs, o como HPAs y marcadores) de preferencia son fluoróforos de intercalación. Las marcas preferidas son miembros seleccionados del grupo
20 que consiste de 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, 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, homo-dímero-1 de etidio, ho-
25 dímero-2 de etidio, derivados de etidio, acridina, naranja de acridina, derivados de acridina, heterodímeros de etidio-acridina, monoazida de etidio, yoduro de propidio, tintes SYTO, Verde 1 SYBR, tintes SYBR, Pico Green, tintes SYTOX y 7-aminoactinomicina D. Mucho más de preferencia, las marcas
30 son tintes de cianina u homo- o heterodímeros de tintes de

cianina que proporcionan fluorescencia aumentada cuando se asocian con ácidos nucleicos, tales como aquellas descritas en las patentes norteamericanas Nos. 4,883,867 (Lee), 5,582,977 (Yue y colaboradores), 5,321,130 (Yue y colaboradores) y 5,410,030 (Yue y colaboradores), incluyendo las manchas de ácido nucleico comercialmente disponibles bajo las marcas TOTO, BOBO, POPO, YOYO, TO-PRO, BO-PRO, PO-PRO y YO-PRO de Molecular Probes, Inc., Eugene, OR. De estos, YOYO-1 (algunas veces referido en la presente como "YOYO") es el más preferido.

Las marcas no de intercalación también son adecuadas para el uso en la invención. Ejemplos preferidos de tales marcas incluyen biotina, rodamina, fluoresceína y otras marcas o pares de marcas que por fluorescencia o la ausencia de la señal de fluorescencia ya sea que son enlazadas en un complejo de sonda/objetivo cuando se irradian con energía excitante.

La invención además comprende el uso de marcas que emiten señales no fluorescentes. Tales marcas incluyen agentes luminiscentes, partículas detectables de luz dispersada (ver, por ejemplo, la patente norteamericana No. 6,214,560 de Yguerabide y colaboradores), marcas magnéticas (ver, por ejemplo Chemla y colaboradores "Ultrasensitive magnetic biosensor for homogeneous immunoassay". Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. vol. 97, 14268-14272 (2000)., etc. En ciertas modalidades, las marcas son aquellas divulgadas en la patente norteamericana No. 5,939,256 de Yamamoto y colaboradores, que causa un cambio detectable mediante la reacción o interacción con el complejo mismo, o que son mutuamente interactivas en la presencia de una estructura

helicoidal múltiples, para de esta manera causar un cambio detectable. En ciertas modalidades, las marcas son conjuntos de redox (por ejemplo, pares de redox) de sondas de dos partes, como es divulgado en la patente norteamericana No. 5 6,361,942 B1 de Coull y colaboradores. En ciertas modalidades, las marcas son puntos de quantum.

También está dentro del alcance de la invención utilizar marcas adaptadas para los métodos de anisotropía de fluorescencia de detección, tal como es divulgado por la 10 patente norteamericana No. 5,593,867 de Walker y colaboradores.

En ciertas modalidades, no se requieren marcas. Por ejemplo, la hibridación se puede detectar al extender el complejo de hibridación a través de un nanoporo, al aplicar 15 un campo eléctrico, y al monitorear el nanoporo para cambios de corriente, como es divulgado en la publicación de solicitud de patente norteamericana No. 2003/0099951 A1 de Akeson y colaboradores.

También es posible detectar diferencias entre los 20 perfiles de fusión de complejos similares para determinar si los complejos son idénticos. Ver, por ejemplo la publicación de solicitud de patente norteamericana No. 2003/0157507 A1 de Lipsky y colaboradores. En tales modalidades, enlazadores de hendidura menor también se pueden utilizar para nivelar las 25 temperaturas de fusión de las sondas, de modo que ellas exhiben afinidades de enlace comparables para los objetivos y perfiles de desnaturalización comparables para los ensayos de desnaturalización. Ver la patente norteamericana No. 6,683,173 B2 de Dempcy y colaboradores.

30 La marca, sonda, objetivo y HPA se combinan para

proporcionar la mezcla de hibridación, junto con cualquiera de los componentes adicionales, tales como agua, por lo menos una solución reguladora, etc. El orden de la adición de los componentes a la mezcla de divulgación no necesita ser crítico, pero información significativa acerca del objetivo se puede obtener si el orden de adición a la mezcla de reacción es variado y las emisiones de marca monitoreadas y comparadas. Por ejemplo, el HPA (y/o HPA-marca) se puede adicionar a una solución que ya contiene al múltiplex a ser estabilizado o se puede adicionar junto con una o más hebras. Además, los componentes de la mezcla de hibridación pueden estar en la forma de compuestos discretos o compuestos de los componentes individuales. Ejemplos de tales compuestos incluyen, por ejemplo, HPA, HPA-marca y/o marca covalentemente enlazada a o intercalada con la sonda y/o el objetivo. En ciertas modalidades, el compuesto puede ser un "conjugado de oligonucleótido-apagador-fluorescente-tinte" del tipo divulgado en la publicación de solicitud de patente norteamericana No. 2004/0081959 A9 de Reed y colaboradores. Tales modalidades además pueden comprender los enlazadores de hendidura menor (MGs) de Reed y colaboradores. Los MGBs de Redd y colaboradores también son adecuados para la adición como componentes discretos que la mezcla de hibridación, y se espera que faciliten la formación de múltiples sin incrementar el ruido al precedente de la fluorescencia no específica. Ver también la publicación de solicitud de patente norteamericana No. 2004/0058322 A1 de Hegpeth y colaboradores.

El orden de adición de los componentes de la mezcla de hibridación puede ser significativa en ciertas modalidades.

Sin embargo, los inventores no han encontrado que el orden de adición necesita ser tan significativo como para volver el método operable bajo cualquier orden específico de adición. Más bien, los inventores se han encontrado que la alteración
5 del orden de adición puede identificar un orden preferido de adición, que da por resultado resultados mejorados con relación a órdenes menos preferidos de adición. Por ejemplo, Los inventores han descubierto inesperadamente que la adición de la secuencia de ácido nucleico objetivo (por ejemplo,
10 contenida en la muestra genómica) de la mezcla de hibridación puede dar por resultado especificidad y sensibilidad aumentadas. Esto es particularmente sorprendente considerando que la adición de la marca a la mezcla de hibridación al último es más preferida para algunas otras modalidades.

15 El orden de adición también puede ser significativo cuando algunos o todos los componentes son eléctricamente pretratados de acuerdo con las enseñanzas de la publicación de solicitud de patente norteamericana No. 2003/0170659 previa de los inventores. Por ejemplo, una solución regulada
20 podría ser eléctricamente pretratada antes de la combinación de la sonda con otros componentes para formar la mezcla de hibridación. El pretratamiento eléctrico puede aumentar la sensibilidad y/o especificidad del ensayo.

La mezcla de hibridación puede ser incubada durante
25 un período de tiempo para permitir que ocurra la hibridación. La incubación se conduce durante un período de tiempo de menos de 60 minutos, de preferencia menos de 15 minutos, más de preferencia no más de 10 minutos, aun más de preferencia aproximadamente 5 minutos o menos, mucho más de preferencia 1
30 minuto o menos. La incubación de preferencia se conduce a una

temperatura de no desnaturalización, y más de preferencia se conduce a temperatura(s) dentro del intervalo de 20 a 40°C. Como se utiliza en la presente, el término "temperatura de no desnaturalización" se refiere a una temperatura insuficiente
5 para desnaturalizar la secuencia de ácido nucleico objetivo de doble hebra, y explícitamente comprende temperaturas por lo menos tan altas como 40°C. Las temperaturas suficientes para desnaturalizar el objetivo no son preferidas ya que ellas adicionan costo, retardan y dan complejidad innecesaria
10 al método.

La mezcla de hibridación se irradia con luz coherente de preferencia en o cerca de la longitud de onda de excitación máxima de la marca después de la incubación y luego se monitorea para la fluorescencia si la mezcla de
15 hibridación contiene un fluoróforo. Para YOYO (es decir, YOYO-1), una longitud de onda de excitación de 488 nm es preferida. Se ha descubierto que la densidad de potencia de la luz que irradia la muestra de prueba es importante, y de preferencia puede ser ajustada para suministrar
20 aproximadamente 84 W/cm²/seg de radiación cuando la marca es YOYO-1. Indebidamente densidades de potencia altas, si son suministradas de láseres o fuentes de luz brillante, no solamente puede anular el ensayo, sino también dañar los reactivos tal que la muestra de prueba no puede ser
25 subsecuentemente analizada utilizando la radiación apropiadamente accionada. Esto es así debido a que YOYO-1 puede actuar como un agente de fotosegmentación si se estimula adecuadamente. Los láseres son la fuente de radiación más preferidos. Los instrumentos accionados por
30 fuentes de "luz brillante", tales como bulbos de Xenon, que

general luz brillante pulsada o continua, aun si subsecuentemente se filtran, son menos adecuados para llevar a cabo el ensayo utilizando YOYO-1 y generalmente generan resultados no inteligibles. La "luz brillante" filtrada no es
5 equivalente a la estimulación de láser. Fotodiodos de potencia de watt muy bajas, tal como aquel presente en un instrumento Turner Design "TD" Picofluor, accionados por baterías de 4 AAA, se puede utilizar para llevar a cabo en ensayo para medir las emisiones fluorescentes de YOYO-1.

10 Una o más fuentes de luz diferentes se pueden emplear para irradiar las marcas. La irradiación de las marcas con una pluralidad de haces de luz de diferentes longitudes de onda es particularmente útil donde se emplean marcas que tienen diferentes características de excitación.
15 Por ejemplo, la luz láser de 488 nm se puede aplicar para excitar las marcas de YOYO-1 dirigidas a la detección de secuencia objetivo mientras que la luz de láser de otra longitud de onda es aplicada para excitar otras marcas presentes.

20 En una modalidad alternativa, la especificidad del ensayo se puede mejorar al digerir cualquier dúplex en el medio de hibridación que de otra manera podría generar una señal no específica. El objetivo dúplex en el tríplex se protege de la digestión, como es enseñado por la patente
25 norteamericana No. 6,458,540 B1 de Ramberg. Tolun y colaboradores, "A real time DNase assay (ReDA) based on PicoGreen fluorescence" Nucleic Acids Res. 2003 Sep 15; 31(18):e111 muestra que los intercaladores en el dúplex no necesitan detener la digestión, mientras que la intercalación
30 y la estabilización del DNA de tríplex puede hacerlo.

En ciertas modalidades de la invención, una etapa de separación se conduce antes de la detección de la señal emitida del medio de hibridación. Esta etapa separa las sondas no enlazadas de los complejos de sonda-objetivo. De preferencia, la etapa de separación comprende el uso de un soporte sólido policatiónico como es enseñado en la patente norteamericana No. 5,599,667.

La mezcla de hibridación puede ser monitoreada una o más veces para la emisión de marca después de que es irradiada una o más veces. La señal medida es de preferencia la intensidad fluorescente emitida de la mezcla de hibridación. En tales modalidades, la actividad del enlace entre la sonda objetivo se puede correlacionar directamente o inversamente con la intensidad, dependiendo de si la hibridación de las señales de marca a través del apagamiento de la señal o la emisión de señal. Así, la intensidad fluorescente generada al intercalar agentes está directamente correlacionada con la afinidad de enlace de sonda-objetivo, mientras que la intensidad fluorescente de las modalidades que emplean fluoróforos no de intercalación covalentemente enlazado a la sonda puede ser inversamente correlacionada con la afinidad de enlace de sonda-objetivo. En ciertas modalidades, la intensidad fluorescente se incrementa (o disminuye para los no intercaladores junto con el grado de igualaciones entre la sonda y el objetivo, de preferencia sobre un intervalo inclusivo de 0-2 desigualaciones y/o supresiones, más de preferencia sobre un intervalo inclusivo de 0-2 desigualaciones y/o supresiones.

Las modalidades de la invención comprenden calibrar la señal medida contra las señales de referencia para

determinar si la sonda es una igualación perfecta para la secuencia de ácido nucleico objetivo. Una curva de calibración puede ser generada, en donde la magnitud de la señal medida (por ejemplo, intensidad fluorescente) es una
5 función de la afinidad de enlace entre la secuencia de ácido nucleico objetivo y la sonda. Como la afinidad de enlace entre la secuencia de ácido nucleico objetivo y la sonda varía con el número de bases desigualadas, la naturaleza de la desigualación (es) (A-G contra A-C contra T-G contra T-C,
10 etc.), la localización de la (s) desigualación (es) dentro del complejo de hibridación, etc., el método de la invención se puede utilizar para detectar si la sonda y la secuencia de ácido nucleico objetiva son una igualación perfecta o una desigualación y finalmente para secuenciar la secuencia de
15 ácido nucleico objetivo.

La señal emitida puede ser recolectada serialmente y evaluada como una función del tiempo así como instantáneamente. Por ejemplo, un cambio en la señal fluorescente con respecto al tiempo puede ser monitoreado
20 para mejor determinar si la sonda perfectamente igual a la secuencia de ácido nucleico objetiva en una mezcla de hibridación que contiene una marca de intercalación, en donde un incremento en la señal fluorescente con respecto al tiempo ("incremento") indica una igualación perfecta y una
25 disminución en la señal fluorescente con respecto al tiempo ("mengüamiento") indica una falta de una igualación perfecta. De manera similar, las señales de incremento y de mengüamiento generado por una mezcla de hibridación que contiene una marca de no intercalación puede indicar una
30 igualación imperfecta a una igualación perfecta,

respectivamente. Aunque bajo algunas circunstancias la intensidad de señal de una mezcla carece de una igualación perfecta no disminuye a través del tiempo, todavía es posible distinguir entre las igualaciones perfectas y las
5 desigualaciones donde la señal emitida por la mezcla de desigualación cambia en una proporción menor que aquella de la mezcla de igualación, o la señal emitida por la mezcla de desigualación muestra evidencia de cambios discontinuos y regresiones.

10 La invención comprende el uso de uno o más de la medición de señal anteriores y los protocolos de análisis de datos. El uso de más de uno de los protocolos puede aumentar la confiabilidad del ensayo. Otros parámetros del ensayo (por ejemplo, el orden de adición de la mezcla de hibridación,
15 longitud de la sonda, etc.) también puede ser variado para verificar la consistencia a través de múltiples protocolos, para aumentar la confiabilidad del ensayo.

La detección de la señal fluorescente de preferencia es completada dentro de 60 minutos de la
20 provisión de la mezcla de hibridación, más de preferencia menos de 15 minutos, aun más de preferencia aproximadamente 10 minutos, todavía más de preferencia dentro de aproximadamente 5 minutos. El método completo de preferencia se conduce en menos de 60 minutos, más de preferencia menos
25 de 15 minutos, todavía más de preferencia menos de 10 minutos, aun más de preferencia de aproximadamente 5 minutos o menos, en una temperatura de no desnaturalización.

La confiabilidad de la invención es independiente del contenido de guanina y citosina en cualquiera de la sonda
30 o el objetivo. En la porción de W-C tradicional, puesto que

los pares de bases G:C forman tres enlaces de hidrógeno, mientras que los pares de bases A:T forman solamente dos enlaces de hidrógeno, las secuencias objetivo de sonda con un contenido de G o C más altos son más estables, presentando
5 temperaturas de fusión más altas. Consecuentemente, las desigualaciones de pares de bases que incrementan el contenido de GC de la sonda hibridada y la región objetivo arriba de aquella presente en los híbridos perfectamente igualados puede desalinearse la debilidad de enlace asociado
10 con una sonda desigualada.

El método de la invención es útil para detectar mutaciones genéticas, incluyendo SNPs con una combinación sin precedente de velocidad y confiabilidad. Las repeticiones de secuencia de ácido nucleico, inserciones y supresiones
15 también pueden ser detectadas. El método también es útil para detectar un estado morfológico de un organismo o célula de la cual se obtiene una muestra genómica. El estado morfológico de preferencia comprende información que considera: (a) una etapa de desarrollo; (b) estructura de orden más alto; (c)
20 eventos de enlace y/o (d) un estado de enfermedad.

El método se puede conducir dentro de una célula biológica.

La invención comprende además de los métodos anteriores un equipo para practicar esos métodos. El equipo
25 de preferencia comprende: medios de recolección de muestra para recolectar la muestra genómica; la sonda; el agente de promoción de hibridación y las marcas.

Los medios de recolección de muestra adecuados incluyen pero no están limitados a jeringas, vasos,
30 frasquitos, esponjas, torundas, adherentes, tubos capilares,

hojas absorbentes, membrana, película, microcavidad, columna, cuentas, chips, etc. De preferencia, los medios de recolección de muestra se adaptan para recolectar tejido, células bucales, sangre, fluido, esputo, orina y/o heces.

5 En ciertas modalidades, una etiqueta de identificación molecular se adiciona a la muestra para proporcionar un equipo y método para marcar una muestra biológica para propósitos de rastrear su historia y proporcionar un camino auditivo definitivo. La etiqueta es
10 por lo menos una molécula capaz de la detección. De preferencia, la etiqueta es una secuencia de ácido nucleico análogo de ácido nucleico que se ha funcionalizado con por lo menos una marca detectable (de preferencia marcas de giro o puntos de quantum) y opcionalmente con por lo menos un agente
15 de reticulación. Los medios de recolección de muestra utilizados en el método y el equipo de preferencia incluirán la etiqueta (por ejemplo, reticulado de una superficie de soporte) y tiene un código de barras u otros medios para identificar qué etiqueta es únicamente asociada con la
20 muestra. Ver, por ejemplo, la patente norteamericana No. 6,153,389, que describe las etiquetas de identificación para los ensayos basados en PCR.

 En ciertas modalidades, la sonda se proporciona sobre un soporte seleccionado del grupo que consiste de una
25 cuenta, una placa, una membrana, una película, una microcavidad, un electrodo, una columna o un tubo capilar.

 La sonda, las marcas y HPAs del equipo son esencialmente los mismos como para el método.

 La invención se ilustra en más detalle con
30 referencia a los siguientes Ejemplos, pero se debe entender

que la presente invención no se considera que sea limitada a los mismos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

5 En este Ejemplo, los inventores comparan las señales de ensayo triplex emitidas cuando sondas de oligonucleótido de una sola hebra de 15-mer o 25-mer se utilizan para analizar objetivos de amplicón dúplex. El dsDNA genómico se extrajo de una muestra de sangre humana
10 utilizando un equipo de purificación de sangre QIAamp DNA (QIAGEN, Mississauga, Canadá) según las instrucciones del fabricante. Un fragmento de dsDNA de 491 bp (SEQ ID NO:1), correspondiente a una región clínicamente significativa del exón 10 del gen de fibrosis cística [Genomics 10, 214-228
15 (1991)], se amplificó por PCR. Un cebador superior de 20-mer y un cebador inferior de 20-mer se sintetizaron en un sintetizador de DNA (Expedite 8909, PerSeptive Biosystems), se purificaron en cartucho y se disolvieron en ddH₂O. La secuencia para el cebador superior de 20-mer: 5'-GCA GAG TAC
20 CTG AAA CAG GA-3' (SEQ ID NO:2). La secuencia para el cebador inferior de 20-mer: 5'-CAT TCA CAG TAG CTT ACC CA-3' (SEQ ID NO:3). 100 pmol de cada cebador se mezcló con 1 µg de dsDNA genómico en una mezcla de reacción de PCR de 100 µl utilizando un equipo Taq PCR Master Mix (QIAGEN, Mississauga,
25 Canadá). Los siguientes parámetros del ciclo de PCR se utilizaron: 1 ciclo de 94°C x 5 min, 25 ciclos de (93°C x 30 seg, 48°C x 30 seg; 72°C x 45 seg), 1 ciclo de 72°C x 7 min. El tamaño del fragmento de PCR se confirmó mediante la electroforesis en gel. No se realizó purificación de la
30 muestra para remover cantidades pequeñísimas de cebadores

residuales o DNA genómico. La concentración del objetivo de dsDNA de 491 bp amplificado por PCR, con los cebadores residuales y el DNA genómico, se determinó mediante la espectroscopia de UV y se preparó una solución de extracto de
5 1 pmol/ µl.

Las secuencias de sonda de ssDNA de 15-mer o 25-mer antisentido, derivadas del exón 10 del gen de fibrosis cística humana se sintetizaron en un sintetizador de DNA (Expedite 8909, PerSeptive Biosystem) se purificaron en el
10 cartucho y se disolvieron en ddH₂O a una concentración de 1 pmol/µl.

La sonda CF01-15 (SEQ ID NO:4) fue una sonda de ssDNA de 15-mer diseñada para ser completamente complementaria a un segmento de 15 nucleótidos de la hebra de
15 sentido del objetivo dsDNA de 491 bp amplificado por PCR de tipo silvestre (SEQ ID NO:1), sobreposición de posiciones de aminoácido 505 a 510 [Genomics 10, 214-228 (1991)].

La secuencia para la sonda CF01-15 (SEQ ID NO:4) fue: 5'-CAC CAA AGA TGA TAT-3'.

20 Las sondas CF10-15 y CF09-15 fueron sondas de ssDNA mutantes de 15-mer idénticas en secuencia a la sonda de tipo silvestre CF01-15, excepto para una mutación de una base (subrayada).

La secuencia para la sonda CF10-15 (SEQ ID NO:5)
25 fue: 5'-CAC CAA AGA CGA TAT-3'.

La secuencia para la sonda CF09-15 (SEQ ID NO:6) fue: 5'-CAC CAC AGA TGA TAT-3'.

La sonda CF01-25 (SEQ ID NO:7) fue una sonda de ssDNA de 25-mer diseñada para ser completamente
30 complementaria a un segmento de 25 nucleótidos desde la hebra

de sentido del objetivo de dsDNA de 491 bp amplificado por PCR de tipo silvestre (SEQ ID NO:1), sobreposición de posiciones de aminoácidos de 504 a 512 [Genomics 10, 214-228 (1991)].

5 La secuencia para la sonda CF01-25 (SEQ ID NO:7) fue: 5'-TAG GAA ACA CCA AAG ATG ATA TTT T-3'.

 Las sondas CF10-25 y CF09-25 fueron sondas ssDNA mutantes de 25-mer idénticas en la secuencia a la sonda de tipo silvestre CF01-25, excepto para una mutación de una base
10 (subrayada).

 La secuencia para la sonda CF10-25 (SEQ ID NO:8) fue: 5'-TAG GAA ACA CCA AAG ACG ATA TTT T-3'.

 La secuencia para la sonda CF09-25 (SEQ ID NO:9) fue: 5'-TAG GAA ACA CCA CAG ATG ATA TTT T-3'.

15 Los ensayos de triplex, señalizados por intercaladores fluorescentes tal como YOYO-1, se han realizado con radiación de estimulación de varios láseres, incluyendo un láser de ion de argón Melles Griot 50 mW, Modelo 532-AP, un Láser de ion argón 25 mW Ion Laser
20 Technology, Modelo 5490 ACM-00, un láser de estado sólido Coherente de 20 mW, Modelo Sapphire 488-20 OEM, un Analizador Genexus que contiene un láser de ion argón Melles Griot 15 mW, Modelo 35-IMA-415-120 y un Analizador Genexus que
25 contiene un láser de estado sólido Coherente 20 mW, Modelo Sapphire 488-20 OEM. Todos de estos láseres se configuraron para suministrar radiación entre 80-84 W/cm₂/seg en una longitud de onda de 488 nm.

 La mezcla de reacción (80 µl) contuvo lo siguiente:
0.05 pmoles de objetivo de dsDNA de 491 bp amplificado por
30 PCR, 1.25 pmoles de sonda de ssDNA de 15-mer o 25 mer, 0.5 x

TBE y 150 nM del intercalador de DNA YOYO-1 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA). Las mezclas de reacción referidas en éste y todos los otros ejemplos fueron volúmenes finales de 80 µl y se incubaron a temperatura ambiente (RT),
5 a menos que se indique de otra manera. Después de una incubación de 5 minutos a RT (24°C) las mezclas de reacción se colocaron en placas de 384 cavidades Corning No Bind Surface (fondo negro con claro) y se irradiaron con el láser de ion argón de 15 mW Genexus Analyser que tiene una longitud
10 de onda de 488 nm. 10 mW de la luz láser irradia las muestras desde el fondo de cada cavidad. La radiación ocurrió en un intervalo de muestreo de 60 micras en ajuste de 20 hertz, 32% PMT y sensibilidad 10 µA/V. Las emisiones fluorescentes se monitorearon y nuevamente en la irradiación después de 10
15 minutos adicionales de incubación. Este Genexus Analyser se utilizó en todos los ejemplos acompañantes, a menos que se indique de otra manera.

Las sondas de ssDNA, cuando se incubaron con YOYO-1 como un control, produjeron un nivel relativamente alto de
20 fluorescencia como es comparado a aquel del control objetivo de dsDNA incubado con YOYO-1. En cada control la misma cantidad de YOYO-1 estuvo presente como en la mezcla de reacción relacionada. Alto nivel de fluorescencia del control de sonda de ssDNA fue un resultado de la formación de los
25 complejos estabilizados y señalizados por YOYO-1. El control de sonda de 25-mer produjo un nivel mucho más alto de fluorescencia que el del control de sonda de 15-mer (Tabla 1).

Triplexos de DNA perfectamente igualados que
30 consisten de dsDNA de 491 bp (SEQ ID NO:1) y la sonda CF01-15

de 15-mer, se formaron en la presencia de 150 nM YOYO-1 (muestra 4), produjeron emisiones fluorescentes muy intensas después de tanto 5 minutos como 15 minutos de incubación (Tabla 1). La emisión de un triplex de 15-mer de dsDNA: ssDNA es igualado a A-C bp (491 bp dsDNA + sonda CF10-15) (muestra 5 6) fue 96.2% y 95.4% menor que después de una incubación de 5 min y 15 min respectivamente, que del triplex de 15-mer perfectamente igualado (muestra 4), cuando se normalizó para variaciones en las emisiones de control de sonda de ssDNA. La 10 emisión de un triplex de 15-mer dsDNA:ssDNA desigualado de T-C de un bp (dsDNA de 491 bp + sondas CF09-15) (muestra 8) fue 98.2% y 98.8% menor después de una incubación de 5 min y 15 min respectivamente, que del triplex de 15-mer perfectamente igualado (muestra 4) cuando se normalizó para 15 variaciones en emisiones de control de sonda ssDNA.

Los triplexos de 25-mer de DNA perfectamente igualados consisten de dsDNA de 490 bp (SEQ ID NO:1) y la sonda CF01-25, formados en la presencia de 150 nM YOYO-1 (muestra 10), produjeron emisiones fluorescentes intensas 20 después de 5 min y después de 15 min de incubación (Tabla 1). La formación en complejo del objetivo dsDNA con las sondas de ssDNA de 25-mer igualadas dio por resultado una emisión grandemente montada como es comparada a aquella que surge del enlace del objetivo dsDNA a las sondas ssDNA de 15-mer 25 igualadas. Por consiguiente, el uso de las sondas de 25 mer dio por resultado un ensayo de triplex más sensitivo del objetivo de dúplex que el uso de la sondas es de 15-mer. La sonda incompletamente complementaria y los complejos objetivos, que contienen una desigualación de A-C de 1 bp 30 (dsDNA 491 bp + sonda CF10-25) (muestra 12) o una

desigualación de T-C de 1 bp (dsDNA de 491bp + sonda CF09-25) (muestra 14) produjo intensidades de emisión que fue de 98.0% o 100% menores, respectivamente después de 5 min de incubación y 98.5% o 100% menor, respectivamente después de 5 15 min de incubación, que aquellas observadas con los triplexos de 25-mer perfectamente igualadas (muestra 10), cuando se normalizó para variaciones en emisiones de control de sondas de ssDNA (Tabla 1). Estos datos soportan la conclusión sorprendente que las sondas de 25-mer pueden ser 10 más específicas que las sondas de 15-mer y la detección de SNPs en objetivos dúplex. Es notable, inesperado y altamente útil que una desigualación de 1 bp en un tríplex de 25 bases puede ser más desestabilizante que una desigualación de 1 bp en un tríplex de 15 bases. Para delinear adicionalmente este 15 hecho intuitivo contrario, los inventores compararon triplexos perfectamente igualado formados con el objetivo dúplex y sondas de oligo de 15, 20, 25, 27, 30 o 35 mer bajo condiciones descritas en lo anterior. Los inventores empíricamente determinaron sondas de 25-mer que son las más 20 específicas bajo las condiciones de la reacción. Las sondas de formación de tríplex más largas pueden por consiguiente ser más específicas que las sondas de formación de tríplex más cortas.

Puede ocurrir que un tríplex desigualado, formado 25 cuando una sonda de 25-mer se hace complejo con un objetivo dúplex en la presencia de YOYO-1, produce emisión que es menor que la emisión de control de sonda (comparar las muestras 13 y 14) (Tabla 1). Este resultado puede ocurrir debido a que, mientras que YOYO-1 puede facilitar la 30 autoasociación de las sondas que dan origen a una emisión en

la radiación, tal autoasociación del complejo con YOYO-1 se presenta que se dispersa en la introducción del objetivo dúplex sin una ganancia de desajuste bastante grande en la fluorescencia de la intercalación de YOYO-1 en la hendidura menor del objetivo dúplex y en nuevas hendiduras creadas por cualquier triplex desigualado formado. Las emisiones de ensayo de los triplexos desigualados, que son menores que las emisiones de la emisión de control de sonda relevante proporciona una característica muy deseable de un ensayo SNP homogéneo en solución. En este caso, el método da por resultado una señal de ensayo binaria para SNP presentes en objetivos de dsDNA genómicos.

Ejemplo 2

Este Ejemplo compara las señales de ensayo cuádruplex emitidas cuando sondas de dsDNA ya sea de 15-mer o 25-mer se han preincubado con YOYO-1 en varias temperaturas antes de la adición a la mezcla de reacción.

Las sondas dúplex se crearon fuera de las secuencias de 15-mer o 25-mer de sentido y antisentido complementarias, derivadas del exón 10 del gen de fibrosis cística humana, que se sintetizaron en un sintetizador DNA, se purificaron en cartucho y luego se disolvieron en ddH₂O a una concentración de 1 pmol/μl. Cantidades equimolares de oligonucleótido complementarios se calentaron a 95°C durante 10 min y se dejaron recocer gradualmente en la presencia de Tris 10 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM y NaCl 100 mM, conforme la temperatura se enfrió a 21°C durante 1.5 horas. Los oligos de DsDNA se diluyeron en ddH₂O a una concentración de 1 pmol/μl.

La sonda Ds CF01-15 (SEQ ID NO:10) comprendió una sonda de dsDNA de 15-mer diseñada para ser homóloga a un

segmento de 15 nucleótidos del objetivo de dsDNA de 491 bp amplificado por PCR de tipo silvestre (SEQ ID NO:1), sobreposición de las posiciones de aminoácidos 505 a 510 [Genomics 10, 214-228 (1991)].

5 La secuencia paralela de sentido de la sonda ds CF01-15 (SEQ ID NO:10) fue; 5'-ATA TCA TCT TTG GTG-3'.

La sonda ds CF10-15 y sonda ds CF09-15 comprendió sondas de DNA mutante de 15-mer idénticas en secuencia a la sonda ds CF01-15 de tipo silvestre, excepto para una mutación
10 de una bp (subrayado).

La secuencia para la hebra de sentido de la sonda ds CF10-15 (SEQ ID NO:11) fue: 5'ATA TCG TCT TTG GTG-3'.

La secuencia para la hebra de sentido de la sonda ds CF09-15 (SEQ ID NO:12) fue: 5'-ATA TCA TCT GTG GTG-3'.

15 La sonda ds CF01-25 (SEQ ID NO:13) fue una sonda de dsDNA de 25-mer diseñada para ser homóloga a un segmento de 25 nucleótidos del objetivo en dsDNA de 491 bp amplificado por el PCR de tipo silvestre (SEQ ID NO:1), sobreposición de las posiciones de aminoácido 504 a 512 [Genomics 10, 214-228
20 (1991)].

La secuencia para la hebra de sentido de la sonda ds CF01-25 (SEQ ID NO:13) fue: 5'-AAA ATA TCA TCT TTG GTG TTT CCT A-3'.

La sonda ds CF10-25 y sonda ds CF09-25 fueron
25 sondas de dsDNA mutantes de 25-mer idénticas en la secuencia a la sonda ds CF01-25 de tipo silvestre, excepto por una mutación de una bp (subrayado).

La secuencia para la hebra de sentido de la sonda ds CF09-25 (SEQ ID NO:15) fue: 5'-AAA ATA TCG TCT TTG GTG TTT
30 CCT A-3'.

La secuencia para la hebra de sentido de la sonda ds CF09-25 (SEQ ID NO:15) fue: 5'-AAA ATA TCA TCT GTG GTG TTT CCT A-3'.

Los inventores han divulgado previamente en, por ejemplo la patente norteamericana No. 5,656,692 y la publicación de solicitud de patente norteamericana No. 2003/0113716, que la sonda dúplex, que son homólogas a objetivos dúplex, se enlazaran específicamente y detectablemente a tales objetivos dúplex. Las sondas dúplex y los objetivos dúplex también pueden enlazar específicamente y detectablemente si existe correspondencia de Watson-Crick entre las bases próximas en complejo. Tal enlace "complementario empalmado" puede evitar que ocurra menos ávidamente que el enlace de cuádruplex homólogo sin embargo.

1.25 pmoles de la sonda de dsDNA de tipo silvestre o mutante se preincubaron en 0.5 x TBE con solución reguladora con 30 nM de YOYO-1 ya sea en RT (24°C) o en 30°C (sobre una placa caliente) durante 1 hora hasta que la adición de 0.05 pmoles del objetivo en dsDNA 491 bp amplificado por PCR (SEQ ID NO:1) y 70 nM de YOYO-1. Las mezclas de reacción de 80 µl luego se incubaron ya sea en RT o en 30°C durante 5 minutos, se colocaron en una probeta de cuarzo, se irradiaron con un láser en estado sólido coherente que tiene longitud de onda 488 nm y se monitorearon inmediatamente para la emisión fluorescente. El período de irradiación de láser fue de 70 mseg y suministraron radiación de 80 W/cm². La luz emitida fue recolectada por Ocean Optics CCD y documentada por Ocean Optics software.

La pre incubación de los controles de sonda de ds DNA con 30 nM YOYO-1 para 1 hora a 30°C, grandemente redujo

la intensidad de emisión de cada control de sonda de dsDNA. Cuando la sonda preincubada como es descrito se adicionó a las mezclas de reacción, las intensidades de emisión más altas se produjeron mediante los cuádruplexos de dsDNA:dsDNA que consisten de duplexos homólogos paralelos perfectamente igualados (dsDNA de 491 bp + sonda ds CF01-15 y dsDNA de 491 bp + sonda ds CF01-25). Adicionalmente, la incubación de la mezcla de reacción a 30°C da por resultado emisiones aumentadas de las muestras que contienen cuádruplexos homólogos de 15-mer o 25 mer igualados, que el de los mismos complejos incubados en RT. Las ganancias de emisión del cuádruplex homólogo perfectamente igualado fueron más evidentes cuando las sondas de dsDNA de 25-mer se utilizaron en las reacciones incubadas a 30°C (datos no mostrados). La sensibilidad y especificidad de un ensayo SNP promovido y señalado con YOYO-1 puede por consiguiente ser aumentada mediante la pre-incubación de la sonda antes de la adición a la mezcla de reacción y también mediante la incubación de la mezcla de reacción en temperaturas de no desnaturalización más altas que RT.

Las combinaciones de sonda y objetivo incompletamente homólogos que generan un complejo desigualado de A-C 1 bp (dsDNA de 491 bp + sonda ds CF10-15) o un complejo desigualado de T-C 1 bp (dsDNA de 491 bp + sonda ds CF09-15) dio por resultado intensidades de emisión fluorescentes asociadas con el cuádruplex que fueron 61.3% o 67.8% menores, respectivamente, después de 5 min de incubación en RT, que aquellas emitidas de los cuádruplexos homólogos paralelos perfectamente igualados en RT. Los cuádruplexos desigualados A-C uno bp (dsDNA de 491 bp +sonda

ds CF10-25) o cuádruplexos desigualados de T-C de uno bp
(dsDNA de 491 bp + sonda ds F09-25) produjeron intensidades
de emisión fluorescentes asociadas con el cuádruplex que
fueron tanto 100% menos que 5 min de incubación de RT, que
5 aquellas emitidas de los cuádruplexos perfectamente igualadas
a RT. La especificidad más grande se observó cuando el
objetivo dsDNA se hizo complejo con las sondas de dsDNA de
25-mer homólogas, que cuando se hizo complejo con las sondas
dsDNA de 15-mer homólogas al objetivo de dsDNA. Por
10 consiguiente sondas dúplex más largas pueden ser más
específicas que las sondas dúplex más cortas. Para el
análisis de SNP se prefieren sondas dúplex de 25-mer.

Las intensidades fluorescentes asociadas con
cuádruplex emitidas de un cuádruplex de dsDNA:dsDNA
15 desigualado de A-C de un bp formado con una sonda de 15-mer
(dsDNA de 492 bp + sonda ds CF10-15) o formado con una sonda
de 25-mer (dsDNA de 491 bp + sonda ds CF10-25) fue de 41.5% y
85.2% inferiores, respectivamente, después de una incubación
de 5 min a 30°C, que aquellas emitidas de los cuádruplexos
20 perfectamente igualados a 30°C. Las intensidades
fluorescentes asociadas con el cuádruplex emitidas de un
cuádruplex de dsDNA:dsDNA desigualado de T-C de uno bp con
una sonda de 15 mer (dsDNA de 491 bp + sonda ds CF09-15) o
formada con una sonda de 25-mer (dsDNA de 491 bp + sonda ds
25 de CF09-25) donde ambos 100% inferiores después de una
incubación de 5 min a 30°C, que aquellas emitidas de los
cuádruplexos perfectamente igualados a 30°C.

La pre-incubación de la sonda de dsDNA de 25-mer
con 30 nM YOYO-1 durante 1 hora a 30°C antes de la formación
30 de cuádruplex a 30°C dio por resultado sensibilidad más

grande y especificidad que aquella lograda después de la pre incubación de la sonda de dúplex de 25-mer con 50 nM YOYO-1 durante 1 hora as RT o diferente a aquella lograda después de la pre-incubación de una sonda de dsDNA de 15-mer con 30 nM YOYO-1 a 30°C durante 1 hora. Las ganancias de intensidad significantes de la emisión YOYO-1 se observaron para los cuádruplexos perfectamente igualados formados con ya sea sondas de dsDNA 15-mer o con sondas de dsDNA de 25-mer cuando las mezclas de reacción se incubaron a 30°C en lugar de RT. Las ganancias fueron más pronunciadas cuando se utilizaron sondas homólogas paralelas de dsDNA de 25-mer. Por consiguiente, las sondas de 25-mer ds pueden ser más sensible y específicas que las sondas de ds 15-mer comparables.

Ejemplo 3

Este Ejemplo describe la formación tríplex de los objetivos de dsDNA genómicos humanos purificados reaccionados con sondas ssDNA de 15-mer, 20-mer, 25-mer o 30-mer de RT en la presencia de YOYO-1.

El dsDNA genómico humano se extrajo de una muestra de sangre utilizando un equipo de purificación de sangre QIAamp DNA (QIAGEN, Mississauga, Canadá) según instrucciones del fabricante. La concentración de dsDNA genómico se determinó mediante espectroscopia de UV.

Las sondas de ssDNA de 15-mer, 20-mer o 25-mer antisentido, con secuencias derivadas del exón 10 del gen de fibrosis cística humana (CFTR), se sintetizaron sobre un sintetizador de DNA, se purificaron en cartucho y se disolvieron en ddH₂O a una concentración de 1 pmol/ µl.

La sonda Delta F508-WT15C (SEQ ID NO:4) fue una sonda ssDNA de tipo silvestre de 15-mer idéntica en la

secuencia de sonda CF01-15.

La sonda Delta F508-MUT15C (SEQ ID NO:16) fue una sonda de ssDNA mutante de 15-mer diseñada para ser complementaria a un segmento de 15 nucleótidos de la hebra de sentido del exón 10 del gen de fibrosis cística humana, excepto para una supresión de tres bases consecutivas en las posiciones de aminoácido 507 y 508 donde la secuencia de antisentido de tipo silvestre AAG es suprimida.

La secuencia para la sonda Delta F508-MUT15C (SEQ ID NO:16) fue: 5'-AAC ACC AAT GAT ATT-3'.

La sonda Delta F508-WT20C (SEQ ID NO:17) fue una sonda de ssDNA de tipo silvestre de 20-mer diseñada para ser complementaria de un segmento de 20 nucleótidos de la hebra de sentido del exón 10 del gen de fibrosis cística humana, de posiciones de aminoácido 506 a 512.

La secuencia para la sonda Delta F508-WT20C (SEQ ID NO:17) fue: 5'TAG GAA ACA CCA AAG ATG AT-3'.

La sonda Delta F508-MUT20C (SEQ ID NO:18) fue una sonda ssDNA mutante de 20-mer diseñada para ser complementaria a un segmento de 20 nucleótidos de la hebra de sentido del exón 10 del gen de fibrosis cística humana, excepto para una supresión de tres bases consecutivas en las posiciones de aminoácido 507 y 508 donde la secuencia de antisentido de tipo silvestre AAG es suprimida.

La secuencia para la sonda Delta F508-MUT20C (SEQ ID NO:18) fue: 5'-ATA GGA AAC ACC AAT GAT AT-3'.

La sonda Delta F508-WT25C (SEQ ID NO: 7) fue una sonda de ssDNA de tipo silvestre de 25-mer idéntica en la secuencia a la sonda CF01-25.

La sonda Delta F508-MUT25C (SEQ ID NO: 19) fue una

sonda de ssDNA mutante de 25-mer diseñada para ser complementaria a un segmento de 25 nucleótidos de la hebra de sentido del exón 10 del gen de fibrosis cística humana, excepto para una supresión de tres bases consecutiva en las 5 posiciones de aminoácidos 507 y 508 donde la secuencia de antisentido de tipo silvestre AAG es suprimida.

La secuencia para la sonda Delta F508-MUT25C (SEQ ID NO: 19) fue: 5'-ATA GGA AAC ACC AAT GAT ATT TTC T-3'.

La mezcla de reacción (80 µl) contuvo lo siguiente:
10 500 pg de objetivo de dsDNA genómico humano (aproximadamente 75 copias), 3.2 pmoles de la sonda de ssDNA de ya sea 15-mer, 20-mer o 25-mer, 0.5 x TBE y YOYO-1 600 nM. Las emisiones fluorescentes de las mezclas de reacción se detectaron utilizando el Genexus Analyzer que comprende un láser de ion
15 argón de 15 mW y ajustes de PMT de 34% después de 5, 15, 30, 45 y 60 minutos de incubación.

Los controles de sonda de ssDNA produjeron altos niveles de emisión fluorescente en la presencia de YOYO-1 600 nM como es compara a aquella emitida del control de objetivo
20 de dsDNA genómico que también comprende YOYO-1 600 nM. Los controles de sonda de 25-mer exhibieron niveles más altos de fluorescencia, que los controles de sonda de 20-mer o 15-mer comparables (Tabla 2). Los valores de emisión de fluorescencia de las mezclas de reacción se normalizaron para
25 identificar la señal asociada con el tríplex al sustraer el valor de emisión del control de sonda apropiado de la emisión de la mezcla de reacción relevante, ambas de las cuales se monitorearon a través del tiempo.

Los triplexos de DNA perfectamente igualados,
30 heteropoliméricos, que consisten de dsDNA genómico y la sonda

Delta F508-WT25C de 25-mer (muestra 5), se formaron y se detectaron después tampoco como la incubación de 5 min en la presencia de YOYO-1 600 nM (Tabla 2). Es verdaderamente notable que las emisiones relacionadas con el tríplex de
5 igualación perfecta pueden ser significativamente más grandes que las emisiones combinadas del control de objetivo de dsDNA genómico y el control de sonda. También es notable que bajo ciertas condiciones los niveles de emisión de estos triplexos de DNA perfectamente igualados (muestra 5) fueron
10 esencialmente estables en varios puntos del tiempo hasta 55 min después de la incubación de 5 min inicial y la primera medición de láser (Tabla 2 y datos no mostrados). La observación de que los complejos de tríplex detectados formados en los primeros 5 minutos fueron establemente
15 detectados por todo el período de 60 minutos fuertemente sugiere que el equilibrio del objetivo genómico y los otros reactivos se ha logrado substancialmente después de solo cinco minutos de incubación a RT. Las observaciones anteriores constituyen evidencia contra el modelo de
20 "colisión aleatoria" del enlace de ácido nucleico. Las restricciones de tiempo impuestas por las etapas de manejo manual han evitado a los inventores del monitoreo de la formación de tríplex con objetivos genómicos durante las incubaciones más cortas que 5 minutos.

25 Las intensidades de emisión fluorescente asociadas con el tríplex producidas por un tríplex de gDNA: ssDNA que contiene una desigualación de 3 bp (dsDNA genómico + sonda Delta F508-MUT25C) (muestra 6) fueron 90.1%, 92.9%, 92.5% y 91.6% menor después de las incubaciones de 5, 15, 30 y 45
30 minutos, respectivamente, que aquellas emitidas por el

tríplex perfectamente igualado (muestra 5) (Tabla 2). Estos resultados claramente demuestran la capacidad para analizar el dsDNA genómico humano homogéneamente en solución, RT, después de tan poco como 5 minutos de incubación, utilizando 5 sondas de ssDNA oligo no marcadas y YOYO-1. Tales triplexos heteropoliméricos se pueden formar para detectar SNPs en muestras genómicas humanas, una secuencia en una muestra genómica humana, o la presencia o genotipo de otro organismo o patógeno en una muestra que también contiene dsDNA genómico 10 humano. El ensayo proporciona la detección directa de una señal relacionada con el complejo tríplex. Los inventores algunas veces se refieren al complejo como el INGENEUS TRIPLEX y la capacidad del ensayo divulgada en esta invención como el Ensayo Genómico.

15 Los triplexos de DNA perfectamente igualados, heteropoliméricos, que consisten de dsDNA genómico y la sonda Delta F508-WT20C de 20-mer (muestra 10), también se formaron y se detectaron después de una incubación de 5 minutos en la presencia de YOYO-1 600 nM (Tabla 2). La eficiencia de la 20 formación del tríplex de igualación perfecta después de una incubación de 5 minutos con YOYO-1 se presentó que significativamente menor, como es evidenciado por el nivel de emisión fluorescente, cuando se utilizaron sondas de ssDNA de 20-mer, antes que sondas de ssDNA de 25-mer.

25 Las intensidades fluorescentes asociadas con el tríplex para un tríplex de 20-mer que contiene una desigualación de 3 bp (dsDNA genómico + sonda Delta F508-MUT20C (muestra 11) fueron 43.0%, 77.6%, 85.9% y 95.5% menor después de las incubaciones de 5, 15, 30 y 45 minutos 30 respectivamente, que aquellas emitidas por el tríplex de 20-

mer perfectamente igualado comparables (muestra 10) (Tabla 2). Aunque el nivel de discriminación entre los triplexos de 20-mer perfectamente igualados y los triplexos desiguales de 3 bp comprendidos de sondas de dsDNA y ssDNA de 20-mer genómicas fue notablemente menor que el observado para los triplexos comprendidos de sondas de dsDNA y de ssDNA de 25-mer genómicas después de una incubación de 5 minutos, la incubación de hasta 45 minutos dio por resultado un incremento progresivo en los niveles de discriminación entre los triplexos de 20-mer igualados y desiguales (Tabla 2). Esto fue atribuido a un incremento permanente de formación de tríplex de 20-mer de igualación perfecta a través del tiempo coincidente con una declinación progresiva de la formación de tríplex de 20-mer desigualado. Este patrón continuó y se monitoreó durante el período de 45 y 60 minutos de incubación (datos no mostrados). Después de 45 minutos de incubación los niveles de discriminación entre los triplexos igualados y desiguales compuestos de sondas de dsDNA y ssDNA de 20-mer genómicas fueron equivalentes a los niveles de discriminación entre los triplexos igualados y desiguales compuestos de sondas de dsDNA y de ssDNA de 25-mer genómicas (Tabla 2), aunque con señales de emisión fluorescentes asociadas con el tríplex menores.

Niveles significativamente menores de emisiones de fluorescencia del tríplex de igualación perfecta de 15-mer, se observaron cuando el dsDNA genómico y la sonda Delta F508-WT15C (muestra 15) se incubaron durante 5 minutos en la presencia de YOYO-1 600 nM (Tabla 2). Las emisiones de fluorescencia observadas de triplexos de 15-mer desiguales de 3 bp comprendidos de dsDNA genómico y la sonda Delta F508-

MUT15C (muestra 16) fueron más altas después de la incubación corta que aquella de los triplexos de 15-mer perfectamente igualados (muestra 15). Sin embargo, después de 45 minutos de incubación en la presencia de YOYO-1 600 nM, la fluorescencia asociada con el tríplex de 15-mer desigualado ha declinado lo suficiente que la emisión fluorescente asociada con el tríplex del tríplex de 15-mer desigualado de 3 bp (muestra 16) fue 83.1% menor que aquella del tríplex de 15-mer perfectamente igualado (muestra 15) (Tabla 2). Esta discriminación se mantuvo después de 60 minutos de incubación (datos no mostrados).

Los resultados anteriores claramente demuestran la eficiencia sorprendente del ensayo de tríplex heteropolimérico para detectar desigualaciones de SNP en objetivos de dsDNA genómicos humanos, no amplificados, no desnaturalizados, de preferencia cuando se utilizan YOYO-1 y sondas de ssDNA de 25-mer. La sensibilidad del ensayo de tríplex heteropolimérico de los objetivos de dsDNA genómicos se considera sorprendente de que 500 pg de dsDNA genómico, aproximadamente 75 copias, se analizó homogéneamente en un volumen final de mezcla de reacción de 80 µl. Los SNPs en los objetivos genómicos humanos que pesan de 2 ng a 100 pg, aproximadamente 302 copias a 15 copias, han sido analizados de manera similar en solución utilizando concentraciones variadas de YOYO-1.

Las sondas de ssDNA de 20-mer, 25-mer o 30-mer antisentido, con las secuencias derivadas del exón 4 del gen metilentetrahidrofolato reductasa humano (MTHFR), se sintetizaron en un sintetizador de DNA, se purificaron en cartuchos y se disolvieron en ddH₂O en una concentración de 1

pmol/ μ l.

La sonda C677T-WT20C (SEQ ID NO: 20) fue una sonda ssDNA de tipo silvestre de 20-mer diseñada para ser complementaria a un segmento de 20 nucleótidos de la hebra de sentido del exón 4 del gen MTHFR humano [Nature Genetics 7, 195-200 (1994)].

La secuencia para sonda C677T-WT20C (SEQ ID NO: 20) fue: 5'-TGA TGA TGA AAT CGG CTC CC-3'.

La sonda C677T-MUT20C (SEQ ID NO: 21) fue una sonda de ssDNA mutante de 20-mer idéntica en secuencia a la sonda de tipo silvestre C677T-WT20C, excepto para una mutación de una base (subrayada). El polimorfismo de MTHFR 677 es una sustitución de citosina a timina en la hebra de sentido del gen MTHFR, dando por resultado una sustitución de alanina a valina en la enzima MTHFR.

La secuencia para la sonda C677T-MUT20C (SEQ ID NO: 21) fue: 5'-TGA TGA TGA AAT CGA CTC CC-3'.

La sonda C677T-WT25C (SEQ ID NO: 22) fue una sonda de ssDNA de tipo silvestre de 25-mer diseñada para ser complementaria a un segmento de 25 nucleótidos de la hebra de sentido del exón 4 del gen MTHFR humano.

La secuencia para la sonda C677T-WT25C (SEQ ID NO: 22) fue: 5'-TGA TGA TGA AAT CGG CTC CCG CAG A-3'.

La sonda C677T-MUT25C (SEQ ID NO:23) fue una sonda de ssDNA mutante de 25-mer idéntica en la secuencia a la sonda de tipo silvestre C677T-WT25C, excepto para una mutación de una base (subrayada).

La secuencia para la sonda C677T-MUT25C (SEQ ID NO: 23) fue: 5'-TGA TGA TGA AAT CGA CTC CCG CAG A-3'.

La sonda C677T-WT30C (SEQ ID NO: 24) fue una sonda

de ssDNA de tipo silvestre de 30-mer diseñada para ser complementaria a un segmento de 30 nucleótidos de la hebra de sentido del exón 4 del gen MTHFR humano.

La secuencia para la sonda C677T-WT30C (SEQ ID NO: 24) fue: 5'-GCG TGA TGA TGA AAT CGG CTC CCG CAG ACA-3'.

La sonda C677T-MUT30G (SEQ ID NO: 25) fue una sonda de ssDNA mutante de 30-mer idéntica en la secuencia a la sonda de tipo silvestre C677T-WT30C, excepto para una mutación una base (subrayada).

La secuencia para la sonda C677T-MUT30C (SEQ ID NO: 25) fue: 5'-GCG TGA TGA TGA AAT CGA CTC CCG CAG ACA-3'.

Las mezclas de reacción (80 µl) contuvieron lo siguiente: 1 ng o 2 ng de objetivo de dsDNA genómico humano (aproximadamente 151 copias o 302 copias, respectivamente), 3.2 pmoles de sonda de ssDNA de ya sea de 20-mer, 25-mer o 30-mer, 0.5 x TBE y YOYO-1 500 nM. Las emisiones fluorescentes de las mezclas de reacción se monitorearon con el láser de ion de argón de 15 mW en Genexus Analyzer en un ajuste de 30% de PMT después de 5, 15, 30, 45 y 60 minutos de incubación, como es descrito en el Ejemplo 1.

Niveles de emisión de fluorescencia muy diferentes se observaron para los controles de sonda de ssDNA de tipo silvestre y mutante, debido a diferencias en los niveles de la característica de auto hibridación de cada secuencia de sonda en la presencia de YOYO-1 bajo estas condiciones (Tabla 3). Las sondas de 30-mer exhibieron niveles más altos de fluorescencia que las sondas de 25-mer o 20-mer. Las emisiones de fluorescencia de las mezclas de reacción se normalizaron para identificar la señal asociada con el tríplex al substraer el valor de emisión de control de sonda

apropiado de la emisión de la mezcla de reacción relacionada, ambos de los cuales se monitorean a través del tiempo.

Los triplexos de 30-mer y 25-mer perfectamente igualados, heteropoliméricos que consisten de dsDNA genómico y ya sea la sonda C677T-WT30C o la sonda C677T-WT25C (muestras 5 y 10 en la tabla 3, respectivamente), se formaron durante una incubación de 5 minutos en la presencia de YOYO-1 500 nM. Los niveles de señal asociado con el tríplex de 30-mer y 25-mer de igualación perfecta fueron ambos significativamente más grandes que las señales de fluorescencia combinadas del control de dsDNA genómico objetivo más los controles de sonda relacionados después de solo 5 minutos de incubación. Que los complejos de tríplex de 30-mer y 25-mer se formaron y se detectaron directamente después de 5 minutos de incubación y que las señales de detección fueron estables por todo el período de 55 minutos implícitos (Tabla 3) sugiere que el equilibrio ha sido sustancialmente logrado después de solo cinco minutos de incubación. Utilizando la mitad de la cantidad del objetivo de dsDNA genómico, es decir 1 ng en lugar de 2 ng en el ensayo tríplex genómico, asombrosamente no dio por resultado una declinación proporcionada en la señal asociada con tríplex emitida de los complejos de tríplex de 30-mer o 25-mer perfectamente igualados formados (datos no mostrados). Los triplexos de 25-mer perfectamente igualados se formaron con eficacia similar, como es demostrado por los niveles comparables de las emisiones fluorescentes de la mezcla de reacción (datos no mostrados). Basado en el nivel de emisión fluorescente asociado con el tríplex, los triplexos de 25-mer perfectamente igualados se formaron más eficientemente que

los triplexos de 30-mer perfectamente igualados, bajo las condiciones de reacción probadas (comparar las muestras 10 y 5 en la Tabla 3).

La emisión fluorescente asociada con el triplex de un triplex de 30-mer desigualado de C-A de 1 bp en una mezcla de reacción comprendida de 2 ng de dsDNA genómico y la sonda C677T-MUT30C (muestra 6) fue 90.4%, 92.6%, 92.4% y 93.3% menor después de las incubaciones de 5, 15, 30 y 45 minutos, respectivamente de aquella emitida de la mezcla de reacción que contiene el triplex de 30-mer perfectamente igualado, (muestra 5), cada uno evaluado después de la incubación comparable (Tabla 3). De manera similar, cuando 1 ng de dsDNA genómico se hizo reaccionar con la sonda C677T-MUT30C para formar un triplex de 30-mer desigualado de C-A de 1 bp, la emisión fluorescente asociada con el triplex de este triplex desigualado fue de 80.2%, 84.9%, 86% y 87.3% menor después de las incubaciones de 5, 15, 30 y 45 minutos, respectivamente, que aquella emitida de la mezcla de reacción que contiene el triplex de 30-mer perfectamente igualado, cada uno evaluado después de la incubación comparable (datos no mostrados). Estos resultados claramente demuestran la eficiencia de la señal emitida por INGENEUS TRIPLEX utilizando las sondas de ssDNA de 30-mer para detectar desigualaciones de SNP en los objetivos de dsDNA genómicos humanos. Es notable que una desigualación de 1 bp en un INGENEUS TRIPLEX de 30-mer puede ser así desestabilizante para permitir altos niveles de discriminación entre los triplexos de 30-mer perfectamente igualados y los triplexos de 30-mer desigualados en la presencia de YOYO-1 y una muestra de DNA genómica humana.

Cuando 2 ng de dsDNA genómico se hizo reaccionar

con la sonda C677T-MUT25C para formar un tríplex de 25-mer desigualado de C-A de 1 bp (muestra 11, Tabla 3), la emisión fluorescente asociada con el tríplex de la mezcla de reacción que contiene este tríplex desigualado fue 98.1%, 99.0%, 99.3% y 99.4% menor después de las incubaciones de 5, 15, 30 y 45 minutos, respectivamente, que aquella emitida por la mezcla de reacción que contiene el tríplex de 25-mer perfectamente igualado (muestra 10). La emisión fluorescente de una mezcla de reacción que contiene un tríplex de 25-mer desigualado de C-A comprendido de 1 ng de dsDNA genómico y la sonda d C677T-MUT25C fue 91.4%, 93.7%, 94.4% y 95.2% menor después de las incubaciones de 5, 15, 30 y 45 minutos, respectivamente, que aquella emitida por una mezcla de reacción que contiene el tríplex de 25-mer perfectamente igualado (datos no mostrados). Estos resultados colectivamente demuestran el alto nivel de especificidad del ensayo de tríplex heteropolimérico cuando se practica con sondas de ssDNA de ya sea 30-mer o 25-mer y YOYO-1 para detectar desigualaciones de SNP en objetivos de dsDNA genómicos humanos.

La eficiencia de formación de los triplexos de 20-mer perfectamente igualados heteropoliméricos en mezclas de reacción que contienen ya sea 2 ng o 1 ng de dsDNA genómico y la sonda C677T-WT20C (muestra 15 en la Tabla 3 y datos no mostrados, respectivamente) fue significativamente menor que aquellos formados con las sondas de 25-mer o 30-mer comparables. Aunque el nivel de discriminación entre los triplexos de 20-mer perfectamente igualados (muestra 15) y los triplexos desigualados de 1 bp (muestra 16) comprendidos de dsDNA genómico y sondas de ssDNA de 20-mer fue notablemente menor que aquel observado para los triplexos

comprendidos de dsDNA genómico y las sondas de ssDNA de 25-mer o 30-mer después de una incubación de 5 minutos, la incubación de hasta 45 minutos dio por resultado un incremento progresivo en los niveles de discriminación entre los complejos de 20-mer igualados y desigualados (Tabla 3).

Los resultados anteriores demuestran que las sondas de ssDNA de 25-mer o 30-mer son claramente preferidas sobre las sondas de longitud más cortas de 15 o 20 bases para el ensayo de tríplex heteropolimérico de las muestras que contienen DNA genómico humano.

Ejemplo 4

El ejemplo 4 demuestra el efecto del pretratamiento eléctrico del medio de prueba sobre la formación de tríplex heteropolimérico subsecuente entre las sondas de ssDNA, YOYO-1 y los objetivos de dsDNA genómico humano. Previamente los inventores han divulgado la ventaja del pretratamiento eléctrico del medio antes de la adición a una mezcla de reacción que contiene objetivos de menos complejidad que el dsDNA genómico humano. Ver la Publicación de Solicitud de Patente Norteamericana No. 2003/0170659.

El medio de prueba que comprende 0.7 X TBE en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml fue ya sea no tratado o eléctricamente pretratado antes de uso. El medio de prueba fue eléctricamente pretratado por medio de dos electrodos de platino/iridio 2 mm separados inmersos en el medio de prueba. Cuarenta pulsos de 500 mseg de nueve voltios de corriente de DC, separados por intervalos de 10 segundos, se aplicaron a 56 μ m del medio de prueba que consiste de 0.7 X TBE. Inmediatamente después del pulso final de la corriente de DC, 3.2 pmoles de la sonda de ssDNA de 25-mer heteropolimérica

(SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 19), 500 pg de objetivo de dsDNA genómico humano (aproximadamente 75 copias) y YOYO-1 se adicionaron a los medios de prueba no tratados y eléctricamente pretratados para producir mezclas de reacción
5 con un volumen final de 80 µl. La concentración de solución reguladora final fue 0.5 X TBE, y la concentración de YOYO-1 final fue de 600 nM. Las emisiones fluorescentes se monitorearon con el ajuste de PMT al 30% después de 5, 15, 30, 45 y 60 minutos de incubación.

10 Mientras que las mezclas de reacción que contienen triplexos de DNA perfectamente igualados (dsDNA genómico + sonda Delta F508-WT25C) emitieron la intensidad fluorescente más alta, las mezclas de reacción que contienen los triplexos incompletamente complementarios con una desigualación de 3 bp
15 (dsDNA genómico + sonda Delta F508-MUT25C) produjeron emisiones fluorescentes asociadas con el triplex que fueron 54.7%, 79.9%, 84.7%, 98.6% y 90.5% menor después de 5, 15, 30, 45 y 60 minutos de incubación, respectivamente, que aquellas emitidas por los triplexos perfectamente igualados
20 en el medio no tratado después de la incubación comparable (datos no mostrados).

La aplicación de cuarenta pulsos de 9V al medio de prueba antes de la adición de los componentes de prueba dio por resultado una disminución de aproximadamente 2 veces en
25 los niveles de emisión fluorescente del control de sonda de ssDNA, como es comparado a aquel observado con el mismo control en medio de prueba no tratado. Ninguna diferencia sin embargo en la emisión de fluorescencia del control de dsDNA genómico seguido del pretratamiento eléctrico del medio de
30 prueba. El pretratamiento eléctrico del medio de prueba como

es descrito notablemente aumentó la señal emitida de la mezcla de reacción que contiene la formación de tríplex de 25-mer heteropolimérico perfectamente igualado, en este caso al grado de un incremento de 92.50% como es comparado a aquel observado con el mismo tríplex perfectamente igualado formado en el medio de prueba no tratado (datos no mostrados). La señal emitida de la formación de tríplex desigualado de tres bp (dsDNA genómico + sonda Delta F508-MUT25C) también se incrementó significativamente mediante la aplicación de cuarenta pulsos de 9V al medio de prueba, tal que la emisión fluorescente asociada con el tríplex de las mezclas de reacción que contienen complejos desigualados de 3 bp en el medio de pretratado fue solo de 17.4% menor después de una incubación de 5 minutos, que aquel obtenido por los complejos perfectamente igualados (datos no mostrados). Los niveles altos extraordinarios de la emisión fluorescente de los triplexos de DNA de 25-mer heteropoliméricos tanto igualados como desigualados no solamente fueron sostenidos a través del tiempo, sino que se incrementaron ligeramente por todo el período de incubación de 60 minutos monitoreados.

Este incremento dramático en la señal asociada con el tríplex emitida demuestra una habilidad dramática para incrementar la sensibilidad del ensayo de tríplex utilizando la sonda de ssDNA de 25-mer y YOYO-1 al practicar el pretratamiento eléctrico del medio de prueba antes de la adición del analito y los reactivos. Tal sensibilidad incrementa permitirá la detección de tan menos que 75 copias de una secuencia de interés presente en la mezcla de reacción que tiene un volumen final de hasta 80 μ l aún en la presencia del antecedente genómico humano.

Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra la habilidad del INGENEUS TRIPLEX para formar específicamente en objetivos de dsDNA genómicos humanos, purificados de sangre o saliva, sobre un
5 intervalo de concentraciones objetivo reaccionadas con sondas de ssDNA de 25-mer en la presencia de YOYO-1.

dsDNA genómico humano se extrajo de una muestra de sangre humana utilizando un equipo de purificación de sangre de DNA QIAamp (QIAGEN, Mississauga, Canadá) o de la saliva
10 humana utilizando un equipo de recolección de DNA Oragene (DNA Genotek, Ottawa, Canadá) según las instrucciones del fabricante. La concentración de dsDNA genómico se determinó mediante la espectroscopia de UV.

Las sondas de ssDNA de 25-mer de antisentido, con
15 las secuencias derivadas del exón 10 del gen del factor V humano o secuencias derivadas del intrón 14b del gen de fibrosis cística humana (CFTR), se sintetizaron sobre un sintetizador de DNA, se purificaron en cartucho y se disolvieron en ddH₂O a una concentración de 1 pmol/μl.

20 La sonda FVL-WT25C (SEQ ID NO: 26) fue una sonda de ssDNA de tipo silvestre de 25-mer diseñada para ser complementaria a un segmento de 25 nucleótidos de la hebra de sentido del exón 10 del gen del factor V humano.

La secuencia para la sonda FVL-WT25C (SEQ ID NO:
25 26) fue: 5'-CCC TCT GTA TTC CTC GCC TGT CCA G-3'.

La sonda FVL-MUT25C (SEQ ID NO: 27) fue una sonda de ssDNA mutante de 25-mer idéntica en secuencia a la sonda de tipo silvestre FVL-WT25C, excepto por una mutación de una base (subrayada) correspondiente a la mutación Leiden de
30 Factor V G1691A [Nature 369, 64-67 (1994)]. Esta mutación da

por resultado la sustitución de glutamina por arginina en la posición 506 en la secuencia de aminoácidos en la proteína de factor V de coagulación.

La secuencia para la sonda FVL-MUT25C (SEQ ID NO: 27) fue: 5'CCC TCT GTA TTC CTT GCC TGT CCA G-3'.

La sonda 2789+5G->A-WT25C (SEQ ID NO: 28) fue una sonda de ssDNA de tipo silvestre de 25-mer diseñada para ser complementaria a un segmento de 25 nucleótidos de la hebra de sentido del exón 14b y el intrón 14b del gen CFTR humano.

La secuencia para la sonda 2789+5G->A-WT25C (SEQ ID NO: 28) fue: 5'-AAT AGG ACA TGG AAT ACT CAC TTT C-3'.

La sonda 2789+5G->A-WT25C (SEQ ID NO: 29) fue una sonda de ssDNA mutante de 25-mer idéntica en secuencia a la sonda de tipo silvestre 2789+5G->A-WT25C, excepto por una mutación de una base (subrayada) correspondiente a la mutación 2789+5G->A en el intrón 14b del gen CFTR humano.

La secuencia para sonda 2789+5G->A-MUT25C (SEQ ID NO: 29) fue: 5'-AAT AGG ACA TGG AAT ATT CAC TTT C-3'.

La mezcla de reacción (80 µl) contuvo lo siguiente: cantidades de 75 pg a 4 ng del objetivo de dsDNA genómico humano (aproximadamente 11 copias a 604 copias), 3.2 pmoles de la sonda de ssDNA de 25-mer, 0.5 x TBE y YOYO-1 500 nM. La emisión fluorescente de las mezclas de reacción se monitorearon con un ajuste de PMT de 30% después de 5, 15, 30, 45 y 60 minutos de incubación.

Los niveles de emisión de fluorescencia diferentes se observaron para los controles de sonda de ssDNA de tipo silvestre y mutante. Los valores de emisión de fluorescencia de mezclas de reacción se normalizaron para identificar la señal asociada con el tríplex al substraer el valor de

emisión de control de sonda apropiado, ambos de los cuales se monitorearon a través del tiempo.

Los tríplexos de 25-mer perfectamente igualados, heteropoliméricos, que consisten de ya sea 2 ng, 1 ng, 500 pg o 200 pg de dsDNA genómico (purificado de la sangre) y la sonda FVL-WT25C (muestras 5, 8, 11 y 14 en la Tabla 4, respectivamente), se formaron durante una incubación de 5 minutos en la presencia de YOYO-1 500 nM. Los niveles de señal del tríplex de 25-mer de igualación perfecta fueron todos significativamente más grandes que las señales de fluorescencia combinadas del control de dsDNA genómico objetivo y el control de sonda de tipo silvestre después de solo 5 minutos de incubación. Cuando 1 ng de dsDNA genómico estuvo presente en la mezcla de reacción hubo un incremento progresivo en la emisión de fluorescencia del tríplex de 25-mer perfectamente igualado (muestra 8, Tabla 4) por todo el período de incubación de 60 minutos. Mientras que las concentraciones disminuidas de los controles de dsDNA genómicos producidos progresivamente disminuyeron las emisiones fluorescentes, la disminución de las concentraciones de dsDNA genómico en la mezcla de reacción no dio por resultado una declinación proporcionada en las emisiones asociadas con tríplex del tríplex de 25-mer perfectamente igualado, formado (Tabla 4).

Las emisiones fluorescentes asociadas con el tríplex de las mezclas de reacción que contienen tríplex de 25-mer desigualado de G-T de 1 bp y los objetivos genómicos que pesan entre 2 ng y 200 pg y la sonda FVL-MUT25C (muestras 6, 9, 12 y 15 en la Tabla 4) fueron todos 100% menores después de las incubaciones de 5, 15, 30, 45 y 60 minutos que

aquellas emitidas por las mezclas de reacción que contienen triplexos de 25-mer perfectamente igualados y cantidades comparables de dsDNA genómico y la sonda FVL-WT25C (muestras 5, 8, 11 y 14, respectivamente, en la Tabla 4). Como se
5 discutió en el Ejemplo 1, YOYO-1 facilitó la autoasociación de las sondas que se presenta que es grandemente disminuida en la introducción del objetivo de dúplex genómico dando por resultado una declinación en la emisión de YOYO-1, sin una ganancia de desviación suficientemente grande en la
10 fluorescencia a partir de la intercalación en el objetivo de dúplex y cualquier formación de tríplex desigualado. Esto puede dar por resultado las emisiones fluorescentes de las mezclas de reacción que contienen triplexos de DNA genómicos desigualados es menor que las emisiones de los controles de
15 sonda comparables.

Los triplexos de 25-mer perfectamente igualados heteropoliméricos, en mezclas de reacción que contienen ya sea 4 ng, 2 ng, 1 ng, 500 pg, 200 pg, 100 pg o 75 pg de dsDNA genómico (purificado de la sangre) y 3.2 pmoles de la sonda
20 CFTR 2789+5G->A-WT25C se formaron con eficiencia similar a los triplexos de 25-mer perfectamente igualados compuestos de dsDNA genómico en la sonda FVL-WT25C (mostrada en la Tabla 4) después de una incubación de 5 minutos en la presencia de YOYO-1 500 nM (datos no mostrados). Las emisiones asociadas
25 con el tríplex de 25-mer de igualación perfecta CFTR fueron todas significativamente más grandes que la emisión de fluorescencia combinada del control de dsDNA genómico objetivo en la emisión de control de sonda relacionada. Como fue usual bajo las condiciones de ensayo empleadas, las
30 emisiones asociadas con el tríplex de las mezclas de reacción

fueron estables por todo el período de incubación de 60 minutos (datos no mostrados).

La emisión fluorescente asociada con el tríplex de una mezcla de reacción que contiene tríplex de 25-mer
 5 desiguado de T-G 1 bp comprendido entre 4 ng y 75 pg de dsDNA genómico y la sonda 2789+5G->A-MUTC25C fueron todos 100% menores después de de las incubaciones de 5, 15, 30, 45 y 60 minutos que aquellas emitidas por mezclas de reacción que contienen triplexos de 25-mer perfectamente igualados que
 10 comprenden cantidades comparables del DNA genómico objetivo genómico y después de ser normalizadas al valor de control de sonda relevante (datos no mostrados).

Los resultados anteriores claramente demuestran la eficiencia sorprendente y la sensibilidad del INGENEUS
 15 TRIPLEX para permitir al ensayo genómico directamente detectar desigualaciones en varios genes el objetivo de dsDNA genómico humanos no purificados, no desnaturalizados, sobre una amplia gama de concentraciones de dsDNA genómicas. La capacidad del ensayo anterior es todavía más sorprendente ya
 20 que permite que no más de 75 pg de dsDNA genómico, aproximadamente 11 copias, sean analizadas para SNPs en el equipo disponible para los investigadores que no se ha optimizado para la sensibilidad de detección, o para trabajar con volúmenes finales menores que 80 µl.

25 Numerosos SNPs se han analizados exitosamente utilizando el ensayo genómico utilizando esencialmente el mismo protocolo de ensayo descrito en este ejemplo. En la ocasión, variaciones en las concentraciones del reactivo o el protocolo se hicieron. Los SNPs analizados incluyeron el
 30 Factor V Leiden G1691A, MTHFR C677T, CFTR delta F508, CFTR

delta 1507, CFTR 2789+5G->A, CFTR 3849+10kbC->T, CFTR 3659delC, CFTR G551D, CFTR 621+1G->T, CFTRR1162X, CFTR 1717-1G->A, CFTR A455E, CFTR G542X, CFTR N1303K, CFTR R560T y CFTR W1282X. Setenta y cinco por ciento de las secuencias objetivo
5 en los objetivos de dúplex analizados en los Ensayos Genómicos mencionados en lo anterior contuvieron una o más regiones de 4 o 5 bases de purina y pirimidina alternantes, que bajo condiciones leves pueden formar regiones de ZDNA. Este potencial de ZDNA dio por resultado ninguna dificultad
10 en el ensayo y llevar a cabo los Ensayos Genómicos.

En todos estos casos las muestras de dsDNA genómicas humanas purificadas de la sangre se analizaron. Los ensayos de triplex Genómicos también se realizaron para la mutación CFTR 2789+5G->A utilizando dsDNA genómico purificado
15 de muestras de saliva, que se han almacenado a RT durante 1 semana después de la incubación a 50°C durante 30 minutos. La incubación de 50°C se recomienda por el fabricante del equipo Oragene para permitir el almacenamiento a largo plazo de muestras de saliva a RT.

20 La tabla 5 compara los resultados del ensayo obtenidos del dsDNA genómico humano purificado de saliva a aquellos del dsDNA genómico humano purificado de la sangre. Ya sea 4 ng o 2 ng de dsDNA genómico humano se analizaron utilizando 3.2 pmoles de la sonda 2789+5G->A-WT25C (muestras
25 5 y 8 en la Tabla 5). Las emisiones de las mezclas de reacción indicaron que los triplexos igualados se formaron con eficacia equivalente (muestras 5 y 8 en la Tabla 5 y datos no mostrados) después de una incubación de 5 minutos, en la presencia de YOYO-1 500 nM. Las emisiones asociadas con
30 el triplex fueron estables a través del período de 45 minutos

que se monitorearon.

Las emisiones fluorescentes asociadas con el tríplex de las mezclas de reacción que contienen un 1 tríplex de 25-mer es igualado de T-G de 1 bp comprendido de 4 ng de dsDNA genómico y la sonda 2789+5G->A-MUT25C (muestra 6, Tabla 5) fueron 94.9%, 93.1%, 94.1% y 93.8% menor después de las incubaciones de 5, 15, 30 y 45 minutos, respectivamente, que aquellas emitidas por las mezclas de reacción que contienen triplexos de 25-mer perfectamente igualados (muestra 5 en la Tabla 5). De manera similar cuando 2 ng de dsDNA genómico se hizo reaccionar con la misma sonda para formar el tríplex de 25-mer desigualado del T-G de 1 bp (muestra 9, Tabla 5), las emisiones fluorescentes asociadas con el tríplex fueron 100%, 97.7%, 100% y 100% menores después de incubaciones de 5, 15, 30 y 45 minutos, respectivamente, que aquellas emitidas por las mezclas de reacción que contienen triplexos de 25-mer perfectamente igualados (muestra 8, Tabla 5).

Los resultados anteriores demuestran que el Ensayo Genómico del DNA genómico humano purificado de la saliva puede ser tan eficiente y específico como uno en el cual el DNA genómico humano se purificó de la sangre. La purificación extensiva del DNA genómico, como ocurre cuando se utiliza en los equipos Qiagen, puede por lo tanto no ser un requerimiento para un ensayo de tríplex de muestras que contienen dsDNA genómico humano. La adquisición del DNA genómico humana para el ensayo de la saliva ofrece ventajas claras en el manejo, almacenamiento y envío sobre la adquisición de la sangre. En comparaciones de lado por lado, 1 ml de sangre periférica purificada por el equipo Qiagen produjo más que bastante DNA genómico humano para llevar a

cabo arriba de 9,000 ensayos de tríplex como es descritos en estos ejemplos, si 3 ng se analizaron por reacción. Una muestra de esputo típica, semi-purificada con un equipo Oragene, produjo bastante DNA genómico humano para arriba de 5 7,000 ensayos de tríplex a ser realizados.

Se observa que todos estos datos en estos ejemplos es consistente con la conclusión de que las moléculas YOYO-1 formadas en complejo con ácido nucleico tríplex emiten más luz que cuando se forman en un complejo con el ácido nucleico 10 dúplex.

Ejemplo 6

Este ejemplo describe un ensayo de SNP de los objetivos de dsDNA genómicos humanos reaccionados con sondas de ssDNA de 25-mer en las cuales el incremento y/o 15 menguamiento de las emisiones se monitorean a través del tiempo y se evalúan.

El dsDNA genómico humano se extrajo de una muestra de sangre humana y se cuantificó como es descrito en el Ejemplo 3. Las sondas de ssDNA de 25-mer de Antisentido, con 20 las secuencias derivadas del intrón 19 del gen CFTR humano, se sintetizaron en un sintetizador de DNA, se purificaron en cartuchos y se disolvieron en ddH₂O a una concentración de 1 pmol/ μ l.

La sonda 3849+10kbC->T-WT25C (SEQ ID NO: 30) fue 25 una sonda de ssDNA de tipo silvestre de 25-mer diseñada para ser complementaria a un segmento de 25 nucleótidos de la hebra de sentido del intrón 19 del gen CFTR humano.

La secuencia para sonda 3849+10kbC->T-MUT25C (SEQ ID NO: 30) fue: 5'-GTG TCT TAC TCG CCA TTT TAA TAC T-3'.

30 La sonda 3849+10kbC->T-NUT25C (SEQ ID NO: 31) fue

una sonda de ssDNA mutante de 25-mer idéntica en la secuencia a la sonda de tipo silvestre 3849+10kbC->T-WT25C, excepto para una mutación de una base (subrayada) correspondiente a la mutación 3849+10kbC->T en el intrón 19 del gen CFTR humano.

La secuencia para la sonda 3849+10kbC->T-MUT25C (SEQ ID NO: 31) fue: 5'-GTG TCT TAC TCA CCA TTT TAA TAC T-3'.

Las mezclas de reacción (80 µl) contuvieron lo siguiente: 2 ng de objetivos de dsDNA genómico humano (aproximadamente 302 copias), 3.2 pmoles de la sonda de ssDNA de 25-mer, 0.5 x TBE, YOYO-1 500 nM y ya sea 40 mM del catión kosmotrópico, cloruro de tetrametilamonio (TMA-Cl). En cada experimento las mezclas de reacción se formaron por duplicado, una tuvo YOYO-1 al adicionado por último a la mezcla de reacción. En la otra mezcla de reacción, todos los componentes de la mezcla de reacción se han mezclado antes de que se adicionara el DNA genómico. En todos los casos las mezclas de reacción se incubaron durante 5 minutos y se irradiaron. Las emisiones fluorescentes de las mezclas de reacción se monitorearon con el láser del ion de argón de 15 mW de Genexus Analyzer en un ajuste de 32% de PMT después de 5, 15, 30, 45 y 60 minutos de incubación, como es descrito en el Ejemplo 1.

En la presencia de 45 mM o 40 mM de TMA-Cl las emisiones fluorescentes de los controles de sonda de ssDNA de tipo silvestre y mutante para cada SNP fueron similares después de 5 minutos de incubación (Tablas 6, 7 y datos no mostrados) y permanecieron permanentes durante un curso de tiempo de 55 minutos adicionales. Solamente los valores de emisión asociados con el tríplex obtenidos después de 15 a 60

minutos de incubación de las mezclas de reacción se muestran en las Tablas 6 y 7.

Las emisiones asociadas con el tríplex de triplexos de 25-mer perfectamente igualados por duplicado en las mezclas de reacción que consisten de DNA genómico y la sonda 2789+5G->A-WT25C (muestras 5 y 9, Tabla 6), monitoreadas después de una incubación de 15 minutos en la presencia de 45 mM de TMA-Cl y YOYO-1 500 nM, fueron similares si el YOYO-1 o gDNA se adicionaron por último a las mezclas de reacción. Bajo ambos protocolos de ensayo de tríplex las emisiones asociadas con el tríplex perfectamente igualadas dramáticamente se incrementaron cuando se monitorearon durante un período de tiempo de 60 minutos (Tabla 6, Figs. 1 y 2).

Las emisiones asociadas con el tríplex de los triplexos de 25-mer desigualados por el duplicado en las mezclas de reacción que consisten de DNA genómico y la sonda 2789+5G->A-MUT25C (muestras 6 y 10, Tabla 6), monitoreadas después de una incubación de 15 min en la presencia de TMA-Cl de 45 mM y YOYO-1 500 nM, fueron similares si el YOYO-1 o gDNA se ha adicionado por último a las mezclas de reacción y produjeron emisiones que fueron con 55% o 54% menores que las mezclas de reacción que contienen triplexos perfectamente igualados (muestras 5 y 9, respectivamente, Tabla 6). Las emisiones asociadas con el tríplex de los triplexos desigualados formados en la mezcla de reacción a las cuales YOYO-1 se ha adicionado por último, permanecieron relativamente constantes cuando se monitorearon durante un período de tiempo de 60 min (muestra 6, Tabla y Fig. 1). Puesto que las emisiones asociadas con el tríplex

perfectamente igualados correspondientes se incrementaron significativamente a través del período de monitoreo, el nivel de discriminación entre las señales de tríplex perfectamente igualadas y las señales desiguales de 1 bp se incrementaron de 55% a 65% en las mezclas de reacción a las cuales se ha adicionado al último YOYO-1. Las emisiones asociadas con el tríplex de los triplexos desiguales formados en la mezcla de reacción a la cual gDNA se ha adicionado por último, se incrementó ligeramente a través del tiempo (muestra 10, Tabla 6 y Fig. 2). Sin embargo, la proporción de incremento de la emisión asociada con tríplex para los triplexos desiguales en estas mezclas de reacción fue mucho menor que aquellas de las mezclas de reacción que contienen triplexos perfectamente igualados comparables, tal que el nivel de discriminación entre las señales asociadas con el tríplex perfectamente igualadas y las señales asociadas con el tríplex desiguales de 1 bp se incrementaron de 54% a 60% cuando se monitorearon durante el período de tiempo.

Las emisiones asociadas con el tríplex de los triplexos de 25-mer perfectamente igualados en las mezclas de reacción que consisten de DNA genómico y la sonda 3849+10kbC->T-WT25C (muestras 5 y 9, Tabla 7), monitoreadas después de una incubación de 15 min en la presencia de TMA-Cl de 40 mM y YOYO-1 500 nM, fueron similares si YOYO-1 o gDNA se ha adicionado por último a las mezclas de reacción. Bajo ambos protocolos de ensayos de tríplex, las emisiones asociadas con el tríplex perfectamente igualados se incrementaron cuando se monitorearon hasta el punto de tiempo de 60 min (Tabla 7, Figs. 3 y 4).

En la mezcla de reacción que contiene TMA-Cl 40 mM, al cual YOYO-1 se ha adicionado al último, las emisiones asociadas con el tríplex de un tríplex de 25-mer desigualado que consiste de DNA genómico y la sonda 3849+10kbC->T-MUT25C (muestra 6, Tabla 7) fue 70%, 84%, 90%, 94%, 99%, 98%, 100%, 100%, 100% y 100% menor después de 5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 min de incubación, respectivamente, que aquella emitida de una mezcla de reacción similarmente monitoreada que contiene el tríplex de 25-mer perfectamente igualado (muestra 5, Tabla 7). En la mezcla de reacción que contiene TMA-Cl 40 mM, el cual gDNA se ha adicionado al último, las emisiones asociadas con el tríplex de un tríplex de 25-mer desigualado que consiste de DNA genómico y la sonda 3849+10kbC->T-MUT25C (muestra 10, Tabla 7) fue 49%, 55%, 62%, 66%, 69%, 72%, 73%, 76%, 85% y 88% menor después de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 min de incubación, respectivamente, que aquellas emitidas de una mezcla de reacción similarmente monitoreada que contiene el tríplex de 25-mer perfectamente igualado (muestra 9, Tabla 7).

Por consiguiente la adición de concentraciones específicas de TMA-Cl o uno o más cationes kosmotrópicos adicionados por separado o combinación a una mezcla de reacción de ensayo puede dar por resultado un incremento progresivo en las emisiones de señal, si está ocurriendo en enlace de igualación perfecta, mientras que el enlace de desigualación puede dar por resultado una declinación progresiva en las emisiones de señal de una mezcla de reacción de ensayo (Tabla 7, Figs. 3 y 4, y datos no mostrados). Así las mezclas de reacción pueden ser seleccionadas en los cuales los incrementos en los niveles de

discriminación entre el enlace de igualación perfecta y el enlace de desigualación puede ser monitoreada a través del tiempo. El monitoreo puede también ser dirigido para observar los niveles altos, constantes o incrementados del enlace de la señal asociadas de las mezclas de reacción, bajo las cuales las señales de enlace de desigualación están bajas. Consecuentemente hay ventajas en llevar a cabo ensayos por duplicado en varios protocolos o reactivos para obtener la señal cuyas varias características confirman el registro de la muestra. Los inventores se refieren a estos métodos de detección de enlace igualada o desigualado colectivamente como los métodos de "incremento y menguamiento". Es muy útil generar Ensayos Genómicos de señal fluorescente, que no son dependientes meramente de las ganancias relativas en las intensidades de emisión, sino que también puede emplear proporciones y dirección de cambio de las emisiones a través del tiempo.

Cuando 2 ng de DNA genómico se hizo reaccionar con ya sea la sonda Delta F508-WT25C de 25-mer o la sonda Delta F508-MUT25C de 25-mer en mezclas de reacción que contienen TMA-Cl de mM y YOYO-1 500 nM, ya sea que YOYO-1 o gDNA se ha adicionado por último a las mezclas de reacción, el incremento y menguamiento de las emisiones asociadas con el tríplex de duración perfecta y las emisiones asociadas con el tríplex de desigualación se observaron durante el período de incubación de 60 min (datos no mostrados). En este caso las emisiones asociadas con el tríplex también se monitorearan después de 24 horas de incubación de las mezclas de reacción. El patrón de emisión de incremento y menguamiento fue evidente después de 24 horas de incubación (datos no

mostrados).

Cuando 2 ng de DNA genómico se hicieron reaccionar con ya sea la sonda FVL-WT25C de 25-mer o la sonda FVL-MUT25C de 25-mer en mezclas de reacción que contienen TMA-Cl 50 mM, NaCl 20 mM y YOYO-1 500 nM y ya sea que YOYO-1 o gDNA se ha
5 adicionó por último a las mezclas de reacción, el patrón de emisión de incremento y menguamiento se observó en el monitoreo de las mezclas de reacción durante 24 horas (datos no mostrados).

10 Numerosos cationes kosmotrópicos se han utilizado en conjunción con YOYO-1 500 nM para mejorar la especificidad del Ensayo Genómico y también aumentar el incremento y el menguamiento de las emisiones asociadas con el tríplex. Estos incluyen NaCl 50 a 80 mM, Na₂SO₄ 10 a 60 mM, Na₂HPO₄ 50 mM,
15 (NH₄)₂SO₄ 125 a 250 mM, TriMA-Cl 30 mM, TMA-Cl 30 a 52.5 mM, cada uno adicionado por separado o TMA-Cl 50 mM en combinación con NaCl 10 a 20 mM. Los beneficios del uso de uno o más cationes kosmotrópicos en la mezcla de reacción y las mejores concentraciones para el uso bajo cualquiera de
20 las condiciones de ensayo seleccionadas se pueden determinar experimentalmente.

Por consiguiente es claro que un Ensayo Genómico puede ser realizado al formar el INGENEUS TRIPLEX en dos o más mezclas de reacción ensambladas de acuerdo con dos o más
25 protocolos que son calculados para producir emisiones asociadas con tríplex monitoreadas a través del tiempo, que permiten que características de emisión múltiples sean observadas y evaluadas para permitir el análisis más preciso.

Ejemplo 7

30 Este Ejemplo demuestra la habilidad del INGENEUS

TRIPLEX para formar específicamente sobre los objetivos de dsDNA genómicos patogénicos reaccionados con sondas de ssDNA de 25-mer en la presencia de YOYO-1 y un exceso de dsDNA genómico humano.

5 Una suspensión de células de *Bacillus globigii* vegetativas (BG) fue suministrada por Dycor Technologies Ltd. (Edmonton, Alberta, Canadá). Un ml de BG se formó en pelotillas mediante la centrifugación durante 5 min a 5000 x g (7500 rpm), se resuspendió en 20 µl de Agente de Liberación
10 de Célula Bacteriana de (New Horizons, Columbus, MD), y se incubó a RT durante 5 min. Las bacterias lisadas luego se resuspendieron en 160 µl de solución reguladora AL (suministrada en el equipo de minipurificación de DNA QIAamp, QIAGEN, Mississauga, Canadá), y se incubaron a 56°C con 20 µl
15 de proteinasa K durante 30 min. El aislamiento del dsDNA genómico de BG se completó con el equipo de purificación de DNA de QIAamp, según las instrucciones del fabricante. La concentración del dsDNA genómico de BG se determinó mediante la espectroscopia de UV. El dsDNA genómico humano se extrajo
20 en una muestra de sangre humana y se cuantificó como es descrito en el Ejemplo 3.

Las sondas de ssDNA de 25-mer de antisentido, con las secuencias complementarias a un segmento de 25 nucleótidos de la hebra de sentido del gen de endonucleasa de
25 restricción Bgl I (bglIR) o el gen de proteína SASP específico de esporulación (csgA) de *B. globigii*, se sintetizaron en un sintetizador de DNA, se purificaron en cartuchos y se disolvió en ddH₂O a una concentración de 1 pmol/µl.

30 La secuencia para la sonda bglIR-WT25C (SEQ ID NO:

32) fue: 5'-TAT TTT GAT TAT AGG ACA TGA AGA T-3'.

La secuencia para la sonda csgA-WT25C (SEQ ID NO:

33) fue: 5'-GCA AAT AAC CGA GTG TAA CAT CCA T-3'.

Las mezclas de reacción (80 µl) contuvieron lo
5 siguiente: 0.46 pg de dsDNA genómico de BG (100 copias), 3.2
pmoles de sonda de ssDNA de 25-mer, 0.5 x TBE, TMA-Cl 40 mM,
YOYO-1 entre 500 y 300 nM y ya sea la presencia o ausencia de
2 ng del objetivo de dsDNA genómico humano (aproximadamente
302 copias). En todos los casos YOYO-1 se adicionó al último
10 a las mezclas de reacción, que se incubaron durante 5 minutos
y se irradiaron. Las emisiones fluorescentes de las mezclas
de reacción se monitorearon con el láser de ion de argón de
15 mW Genexus Analyzer en un ajuste de 32% de PMT después de
5, 15, 25, 35, 45, 55 y 65 minutos de incubación, como es
15 descrito en el Ejemplo 1.

En la presencia de TMA-Cl 40 mM, los niveles de
emisión de fluorescencia para ambos de los controles de sonda
bglIR-WT25C y csgA-WT25C de ssDNA, se incrementaron conforme
la concentración de YOYO-1 se incrementó en la mezcla de
20 reacción (Tabla 8 y datos no mostrados), indicativo del nivel
de auto-hibridación de la sonda en las diferentes
concentraciones de YOYO-1. El nivel de emisión de
fluorescencia de cada control de sonda permaneció constante
por todo el período de incubación de 65 minutos. Como es
25 esperado, los niveles de emisión de fluorescencia de los
controles de DNA genómico humano disminuyeron ligeramente con
la concentración de YOYO-1 disminuyente y permanecieron
relativamente constantes por todo el período de incubación de
65 minutos (Tabla 8). No se observó señal fluorescente para
30 los controles de DNA genómico de BG monitoreados en ajustes

de PMT de 32% (Tabla 8) o 34% (datos no mostrados), que reflejan el número de copias muy bajo del gDNA de BG analizado. En un ajuste de 36% de PMT, los controles de gDNA de BG dieron valores de emisión de fluorescencia ligeramente
5 arriba que los controles de YOYO-1, en cada concentración de YOYO-1 analizada (datos no mostrados). Los valores de emisión de fluorescencia de mezclas de reacción se normalizaron para identificar la señal asociada con el tríplex al substraer el valor de emisión de control de sonda apropiado, ambos de los
10 cuales se monitorearon a través del tiempo.

Los triplexos de 25-mer perfectamente igualados heteropoliméricos que consisten de 100 copias de dsDNA genómico de BG y la sonda bg1IR-WT25C, formados durante una incubación de 5 minutos en la presencia de YOYO-1 500, 400 o
15 300 nM (muestras 5, 10 y 15 en la Tabla 8, respectivamente). Los niveles de emisión de señal de la mezcla de reacción de igualación perfecta fueron todos significativamente más grandes que las señales de fluorescencia combinadas del control de dsDNA genómico de BG o el control de sonda. La
20 eficiencia de la formación de tríplex se mejoró conforme la concentración de YOYO-1 se disminuyó de 500 nM a 300 nM en las mezclas de reacción que contienen 100 copias de DNA genómico de BG. Cuando YOYO-1 300 nM estuvo presente en la mezcla de reacción hubo un incremento progresivo en la
25 emisión de fluorescencia de tríplex de 25-mer perfectamente igualada (muestra 15, Tabla 8) por todos los primeros 35 minutos de incubación, después de lo cual se observó una meseta en la emisión de fluorescencia. Cuando 200 copias de DNA genómico de BG se analizaron con la sonda bg1IR-WT2C, la
30 formación de tríplex eficiente también se observó en la

presencia de YOYO-1 500 - 300 nM después de 5 minutos de incubación, con 400 nM y 500 nM que es la concentración de YOYO-1 preferida en las mezclas de reacción de 80 µl (datos no mostrados). El DNA genómico de BG que varía en la
5 concentración de 1000 copias a 30 copias por 80 µl también se analizó exitosamente con la sonda csgA-WT25C (datos no mostrados). Tan poco como 10 copias del DNA genómico de BG en un volumen de reacción de 80 µl se analizó reproductiblemente con la sonda bglIR-WTC en la presencia de YOYO-1 300 nM,
10 demostrando claramente la sensibilidad extrema del ensayo INGENEUS TRIPLEX para detectar patógenos (datos no mostrados).

Aún más notable es la habilidad del INGENEUS TRIPLEX para analizar específicamente 100 copias del DNA
15 genómico bacteriano de un antecedente de DNA genómico humano. Los triplexos perfectamente igualados heteropoliméricos, formados entre las 100 copias del dsDNA genómico de BG y la sonda bglI-WT25C, se formaron durante un período de 5 minutos en la presencia de YOYO-1 300 nM, TMA-Cl 40 mM y 302 copias
20 del DNA genómico humano (muestra 17 en la Tabla 8). Además, hubo un incremento progresivo en la emisión de fluorescencia del tríplex de BG por todos los 65 minutos de incubación. La emisión de fluorescencia de las mezclas de reacción mostradas en la Tabla 8 también se monitoreó después de 24 horas de
25 incubación. Mientras que la fluorescencia asociada con el tríplex de BG observada en la ausencia del DNA genómico humano antecedente ligeramente disminuyeron después de 24 horas de incubación, la fluorescencia asociada con el tríplex de BG observado en la presencia del DNA genómico en exceso
30 continua incrementándose por todas las 24 horas de

incubación. La habilidad para analizar homogéneamente 0.33 copias de DNA genómico bacteriano para cada copia del DNA genómico humano presente demuestra la sensibilidad extrema del ensayo INGENEUS TRIPLEX para detectar el patógeno en no
5 más de 5 minutos.

Ejemplo 8

Este Ejemplo demuestra la habilidad para analizar el homocigoto de tipo silvestre, el heterocigoto mutante o las muestras de dsDNA genómico humano homocigotas mutantes
10 para la mutación de MTHFR C677T.

El dsDNA genómico humano que fue ya sea homocigoto de tipo silvestre, heterocigoto mutante o homocigoto mutante con respecto un MTHFR C677T, se extrajo de muestras de sangre de pacientes y se cuantificó como es descrito en el Ejemplo
15 3. Las sondas de ssDNA de 25-mer de antisentido, con las secuencias derivadas del exón 4 del gen MTHFR humano, se prepararon como es descrito en el Ejemplo 3.

Las mezclas de reacción (80 µl) contuvieron lo siguiente: 1 ng o 2 ng de objetivo de dsDNA genómico humano
20 (aproximadamente 151 copias o 302 copias, respectivamente), 3.2 pmoles de la sonda de ssDNA de 25-mer de ya sea tipo silvestre o mutante, 0.5 X TBE y YOYO-1 500 nM. Las emisiones fluorescentes de las mezclas de reacción se monitorearon utilizando el láser de ion argón de 15 mW Genexus Analyzer en
25 un ajuste de 30% de PMT después de 5, 15, 30, 45 y 60 minutos de incubación, como es descrito en el Ejemplo 1.

Diferentes niveles de emisión de fluorescencia se observaron para los controles de sonda de tipo silvestre C677T-WT25C (SEQ ID NO: 22) y la sonda mutante C677T-MUT25C
30 (SEQ ID NO: 23), debido a diferencias en los niveles de auto-

hibridación que son características para cada secuencia de sonda en la presencia de YOYO-1 (datos no mostrados). Los valores de emisión de fluorescencia de las mezclas de reacción se normalizaron para identificar la señal asociada con el tríplex al substrar el valor de emisión de control de sonda apropiado de la emisión de la mezcla de reacción relevante, ambos de los cuales se midieron después de la misma duración de incubación.

Los triplexos de DNA perfectamente igualados, heteropoliméricos en las mezclas de reacción comprendidos de ya sea dsDNA genómico humano homocigoto de tipo silvestre y la sonda de tipo silvestre C677T-WT25C o el dsDNA genómico humano homocigoto mutante y la sonda C677T-MUT25C mutante, se formaron eficientemente y se detectaron después de solo 5 minutos de incubación en la presencia del YOYO-1 500 nM (muestras 1 y 4, respectivamente, en la Fig. 5). La eficiencia de la formación de tríplex igualado, señalizado por la aparición de la fluorescencia asociada con el tríplex, fue ligeramente más grande en las mezclas de reacción comprendidas de 1 ng de dsDNA genómico homocigoto mutante y la sonda C677T-MUT25C (muestra 4, Fig. 5) y aquella de las mezclas de reacción comprendidas de 1 ng de dsDNA genómico homocigoto de tipo silvestre y la sonda de tipo silvestre C677T-WT25C (muestra 1, Fig. 5) después de 5 minutos de incubación. Las emisiones fluorescentes asociadas con el tríplex de los triplexos igualados (muestra 4, Fig. 5) disminuyeron ligeramente durante un período de incubación de 60 minutos monitoreado, mientras que las emisiones fluorescentes asociadas con el tríplex de los triplexos igualados (muestra 1, Fig. 5) permanecieron relativamente

constantes a través del tiempo. Las intensidades de emisión fluorescentes asociadas con el tríplex observadas de las mezclas de reacción que contienen cualquiera de los dos triplexos perfectamente igualados fueron más similares cuando
5 2 ng, en lugar de 1 ng, de dsDNA genómico estuvo presente en las mezclas de reacción (datos no mostrados).

Cuando 1 ng de dsDNA genómico mutante heterocigoto mutante se hizo reaccionar con la sonda mutante C677T-MUT25C (muestra 3, Fig. 5), las emisiones fluorescentes asociadas
10 con el tríplex fue 77%, 80%, 85%, 88% y 90% menores después de la incubación de 5, 15, 30, 45 y 60 min, respectivamente, que aquella emitida de la mezcla de reacción que contiene el tríplex perfectamente igualado comprendido de 1 ng de dsDNA genómico humano homocigoto de tipo silvestre y la sonda de
15 tipo silvestre C677T-WT25C (muestra 1, Fig. 5), cada uno evaluado después de períodos comparables de incubación.

Las emisiones fluorescentes asociadas con el tríplex de triplexos de desigualación de C-A de 1 bp en una mezcla de reacción comprendida de 1 ng de dsDNA genómico
20 humano homocigoto de tipo silvestre y la sonda mutante C677T-MUT25C (muestra 2, Fig. 5) fueron 92%, 95%, 98%, 98% y 98% menor después de 5, 15, 30, 45 y 60 minutos de incubación, respectivamente, que aquellas emitidas de la mezcla de reacción que contienen los triplexos perfectamente igualados
25 comprendidos de 1 ng de dsDNA genómico humano homocigoto de tipo silvestre y la sonda de tipo silvestre C677T-WT25C (muestra 1, Fig. 5), cada una evaluada después de períodos comparables de incubación. Las emisiones fluorescentes asociadas con el tríplex de los triplexos de desigualación de
30 C-A de 1 bp en una mezcla de reacción comprendida de 1 ng de

dsDNA genómico humano homocigoto mutante y la sonda de tipo silvestre C677T-WT25C (muestra 5, Fig. 5) fueron todos 100% menores después de 5, 15, 30, 45 y 60 minutos de incubación, respectivamente, que aquellas emitidas de la mezcla de reacción que contiene los triplexos perfectamente igualados comprendidos de 1 ng de dsDNA genómico humano homocigoto mutante y la sonda mutante C677T-MUT25C (muestra 4, Fig. 5) cada una evaluada después de períodos comparables de incubación.

Los resultados anteriores demuestran la alta eficiencia y especificidad del método de analizar muestras de dsDNA genómico humano homocigoto de tipo silvestre, heterocigoto mutante u homocigoto mutante. Estos resultados se obtuvieron utilizando sondas de tipo silvestre y mutantes de 25-mer para MTHFR C677T. Los resultados comparables se observaron cuando reacciones análogas se realizaron utilizando sondas de tipo silvestre mutantes de 25-mer de sentido para MTHFR C677T (datos no mostrados). La sensibilidad del ensayo además se demostró cuando los objetivos de dsDNA genómico humano, que varían en peso de 2 ng a 200 pg, se analizaron exitosamente con la sonda de tipo silvestre C677T-WT25C y la sonda mutante C677T-MUT25C en un volumen de reacción de 80 µl (datos no mostrados).

Mientras que la invención se ha descrito en detalle y con referencia a ejemplos específicos de la misma, será evidente para un experto en la técnica que varios cambios y modificaciones se pueden hacer en la misma sin apartarse del espíritu y alcance de la misma.

160

TABLA 1. Comparación de ensayos de triplex usando sondas de ssDNA de 15-mer y 25-mer

Objetivo - amplificación de dsDNA de 491 bp
sondas de 15-mer - CF01-15(normal), FC10-15(mutante), CF09-15(mutante)
sondas de 25-mer - CF01-25(normal), CF10-25(mutante), CF09-25(mutante)
YOYO-1 150 nM está presente en cada muestra

Muestra Sonda: objetivo = 25:1	Fluorescencia en el láser de argón 633nm PMT 22 después de 5 min	Monos ssDNA	% de cambio relativo a la igualación perfecta de la hilera 4	% de cambio relativo a la igualación perfecta de la hilera 10	Fluorescencia en el láser de argón 633nm PMT 22 después de 15 min	Monos ssDNA	% de cambio relativo a la igualación perfecta de la hilera 4	% de cambio relativo a la igualación perfecta de la hilera 10
1) YOYO-1 (150 nM)	0				0			
2) 491 bp (0.05 pmol)	0				10			
3) CF01-15 (1.25 pmol)	530				223			
4) CF01-15 + 491 bp (perfecta)	25128	24598			24764	24541		
5) CF10-15 (1.25 pmol)	293				240			
6) CF10-15 + 491 bp (1 bp A-C)	1339	946	-96.2		1375	1135	-95.4	
7) CF09-15 (1.25 pmol)	1848				1787			
8) CF09-15 + 491 bp (1 bp T-C)	2303	455	-98.2		2082	285	-98.8	
9) CF01-25 (1.25 pmol)	3086				2979			
10) CF01-25 + 491 bp (perfecta)	35647	32561			37148	34169		
11) CF10-25 (1.25 pmol)	663				459			
12) CF10-25 + 491 bp (1 bp A-C)	1307	644	-98.0		982	523	-98.5	
13) CF09-25 (1.25 pmol)	8538				8005			
14) CF09-25 + 491 bp (1 bp T-C)	6430	<0	-100		6039	<0	-100	

160

TABLA 2. Comparación de los ensayos de triplex de dsDNA genómico humano usando sondas de ssDNA de 15-mer, 20-mer o 25-mer

Objetivo = dsDNA genómico humano, WT para CPTA
sondas de 15-mer = delta F308-WT15C (tipo silvestre), delta F308-MUT15C (mutante)
sondas de 20-mer = delta F308-WT20C (tipo silvestre), delta F308-MUT20C (mutante)
sondas de 25-mer = delta F308-WT25C (tipo silvestre), delta F308-MUT25C (mutante)
YOYO-1 600 nM está presente en cada muestra

Muestra	Fluorescencia en el láser de argón 633nm @ 34 después de 5 min	Menos ssDNA	% de cambio relativo a la igualación perfecta	Fluorescencia en el láser de argón 633nm @ 34 después de 15 min	Menos ssDNA	% de cambio relativo a la igualación perfecta
1) YOYO-1 (600 nM)	207			211		
2) delta F308-WT25C (3.2 pmol) (antisentido)	1360			9381		
3) delta F308-MUT25C (3.2 pmol) (antisentido)	9168			8896		
4) wt gDNA (500 pg)	2723			2674		
5) wt gDNA (500 pg) + delta F308-WT25C (perfecta)	21217	7337		18698	9317	
6) wt gDNA (500 pg) + delta F308-MUT25C (3 bp AAG del)	3913	744	-90.1	9335	659	-92.9
7) delta F308-WT20C (3.2 pmol) (antisentido)	6293			3826		
8) delta F308-MUT20C (3.2 pmol) (antisentido)	767			809		
9) wt gDNA (500 pg)	2481			2381		
10) wt gDNA (500 pg) + delta F308-WT20C (perfecta)	7133	862		6826	994	
11) wt gDNA (500 pg) + delta F308-MUT20C (3 bp AAG del)	1258	491	-43.8	1052	223	-77.6
12) delta F308-WT15C (3.2 pmol) (antisentido)	3825			3639		
13) delta F308-MUT15C (3.2 pmol) (antisentido)	4397			4349		
14) wt gDNA (500 pg)	2505			2495		
15) wt gDNA (500 pg) + delta F308-WT15C (perfecta)	6416	591		4667	428	
16) wt gDNA (500 pg) + delta F308-MUT15C (3 bp AAG del)	5781	1144	+93.3	3509	980	+124

TABLA 2. Continuación

Muestra	Fluorescencia en el láser de argón Genasys ③ PWR 34 después de 30 min	Menos ssDNA	% de cambio relativo a la igualdad perfecta	Fluorescencia en el láser de argón Genasys ③ PWR 34 después de 45 min	Menos ssDNA	% de cambio relativo a la igualdad perfecta
1) YOYO-1 (600 nM)	187			207		
2) delta F508-WT25C (3.2 pmol) (antisentido)	8116			7435		
3) delta F508-MUT25C (3.2 pmol) (antisentido)	8369			8120		
4) wt gDNA (500 pg)	2802			2798		
5) wt gDNA (500 pg) + delta F508-WT25C (perfecta)	17776	9668		17380	9923	
6) wt gDNA (500 pg) + delta F508-MUT25C (3 bp AAG del)	9082	729	-92.5	8953	833	-91.6
7) delta F508-WT20C (3.2 pmol) (antisentido)	5435			5193		
8) delta F508-MUT20C (3.2 pmol) (antisentido)	826			802		
9) wt gDNA (500 pg)	2324			2300		
10) wt gDNA (500 pg) + delta F508-WT20C (perfecta)	6632	1217		6549	1356	
11) wt gDNA (500 pg) + delta F508-MUT20C (3 bp AAG del)	997	171	-85.9	863	61	-93.5
12) delta F508-WT15C (3.2 pmol) (antisentido)	3528			3459		
13) delta F508-MUT15C (3.2 pmol) (antisentido)	4398			5098		
14) wt gDNA (500 pg)	2534			2490		
15) wt gDNA (500 pg) + delta F508-WT15C (perfecta)	4089	561		4199	680	
16) wt gDNA (500 pg) + delta F508-MUT15C (3 bp AAG del)	5384	986	+75.8	5213	115	-83.1

TABLA 3. Comparación de los ensayos de triplex de dsDNA genómico humano usando sondas de ssDNA de 20-mer, 25-mer o 30-mer

Objetivo -dsDNA genómico humano, WT para HTRFA
sondas de 20-mer -C677T-WT20C (tipo silvestre), C677T-MUT20C (mutante)
sondas de 25-mer -C677T-WT25C (tipo silvestre), C677T-MUT25C (mutante)
sondas de 30-mer -C677T-WT30C (tipo silvestre), C677T-MUT30C (mutante)
YOYO-1 500 nM está presente en cada muestra

Muestra	Fluorescencia en el láser de argón Genasys ® Por 30 segundos de 5 min	Menos ssDNA	% de cambio relativo a la igualdad perfecta	Fluorescencia en el láser de argón Genasys ® Por 30 segundos de 15 min	Menos ssDNA	% de cambio relativo a la igualdad perfecta
1) YOYO-1 (500 nM)	0			0		
2) C677T-WT30C (3.2 pmol) (antisentido)	24304			23982		
3) C677T-MUT30C (3.2 pmol) (antisentido)	1795			1537		
4) wt gDNA (2 ng)	2301			2234		
5) wt gDNA (2 ng) + C677T-WT30C (perfecta)	34355	14051		37063	14081	
6) wt gDNA (2 ng) + C677T-MUT30C (1 bp C-A)	3138	1343	-90.4	2575	1038	-92.6
7) C677T-WT25C (3.2 pmol) (antisentido)	7856			7397		
8) C677T-MUT25C (3.2 pmol) (antisentido)	1435			1241		
9) wt gDNA (2 ng)	2045			1596		
10) wt gDNA (2 ng) + C677T-WT25C (perfecta)	31234	23378		30865	23468	
11) wt gDNA (2 ng) + C677T-MUT25C (1 bp C-A)	1182	447	-98.1	1474	233	-99.0
12) C677T-WT20C (3.2 pmol) (antisentido)	221			69		
13) C677T-MUT20C (3.2 pmol) (antisentido)	3297			2639		
14) wt gDNA (2 ng)	2684			1883		
15) wt gDNA (2 ng) + C677T-WT20C (perfecta)	11389	1100		854	785	
16) wt gDNA (2 ng) + C677T-MUT20C (1 bp C-A)	4245	948	-13.8	3083	444	-43.4

TABLA 3. Continuación

Muestra	Fluorescencia en el láser de argón Genasys ② FRET 30 después de 30 min	Menos ssDNA	t de cambio relativo a la igualación perfecta	Fluorescencia en el láser de argón Genasys ② FRET 30 después de 45 min	Menos ssDNA	t de cambio relativo a la igualación perfecta
1) YOYO-1 (500 nM)	0			0		
2) C677T-WT30C (3.2 pmol) (antisentido)	2269			22302		
3) C677T-MUT30C (3.2 pmol) (antisentido)	1304			1141		
4) wt gDNA (2 ng)	2162			2101		
5) wt gDNA (2 ng) + C677T-WT30C (perfecta)	36679	14070		36279	13977	
6) wt gDNA (2 ng) + C677T-MUT30C (1 bp C-A)	2377	1073	-92.4	2078	937	-93.3
7) C677T-WT25C (3.2 pmol) (antisentido)	7060			6834		
8) C677T-MUT25C (3.2 pmol) (antisentido)	1141			979		
9) wt gDNA (2 ng)	1518			1518		
10) wt gDNA (2 ng) + C677T-WT25C (perfecta)	30392	23332		30697	23063	
11) wt gDNA (2 ng) + C677T-MUT25C (1 bp C-A)	1303	162	-99.3	1111	132	-99.4
12) C677T-WT20C (3.2 pmol) (antisentido)	24			4		
13) C677T-MUT20C (3.2 pmol) (antisentido)	2345			2163		
14) wt gDNA (2 ng)	1788			1651		
15) wt gDNA (2 ng) + C677T-WT20C (perfecta)	694	670		490	486	
16) wt gDNA (2 ng) + C677T-MUT20C (1 bp C-A)	2575	230	-65.7	2185	22	-95.5

171

Tabla 4. Comparación de los ensayos triplex de dsDNA genómico humano en cantidades variantes
Objetivo - dsDNA genómico humano, WT para FVL
sondas de 25-mer - FVL-WT25C (tipo silvestre), FVL-MUT25C (mutante)
YOYO-1 500 nM está presente en cada muestra

Muestra	Fluorescencia en el láser de Argón Genomus 6 FWT 30 después de 5 min	Menos dsDNA	% de cambio relativo a la igualdad perfecta	Fluorescencia en el láser de Argón Genomus 6 FWT 30 después de 15 min	Menos dsDNA	% de cambio relativo a la igualdad perfecta
1) YOYO-1 (500 nM)	0			0		
2) FVL-WT25C (3.2 pmol) (antisentido)	6206			6035		
3) FVL-MUT25C (3.2 pmol) (antisentido)	44438			44427		
4) wt gDNA (2 ng)	3409			3421		
5) wt gDNA (2 ng) + FVL-WT25C (perfecta)	26341	20135		26333	20820	
6) wt gDNA (2 ng) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	34222	<0	-100	33941	<0	-100
7) wt gDNA (1 ng)	1198			1348		
8) wt gDNA (1 ng) + FVL-WT25C (perfecta)	20408	14203		21450	15415	
9) wt gDNA (1 ng) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	25049	<0	-100	24984	<0	-100
10) wt gDNA (500 pg)	4			6		
11) wt gDNA (500 pg) + FVL-WT25C (perfecta)	23737	17551		23451	17416	
12) wt gDNA (500 pg) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	25994	<0	-100	23480	<0	-100
13) wt gDNA (200 pg)	7			0		
14) wt gDNA (200 pg) + FVL-WT25C (perfecta)	20925	14719		20874	14839	
15) wt gDNA (200 pg) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	22325	<0	-100	22378	<0	-100

89

171

172

TABLA 4. Continuación

Muestra	Fluorescencia en el láser de argón Genasys ③ PMT 30 después de 30 min	Menos ssDNA	% de cambio relativo a la igualación perfecta	Fluorescencia en el láser de argón Genasys ③ PMT 30 después de 45 min	Menos ssDNA	% de cambio relativo a la igualación perfecta
1) YOYO-1 (500 nM)	0			0		
2) FVL-WT25C (3.2 pmol) (antisentido)	3803			3518		
3) FVL-MUT25C (3.2 pmol) (antisentido)	44650			44101		
4) wt gDNA (2 ng)	3687			3642		
5) wt gDNA (2 ng) + FVL-WT25C (perfecta)	26378	20575		26041	20523	
6) wt gDNA (2 ng) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	34089	<0	-100	33639	<0	-100
7) wt gDNA (1 ng)	1474			1398		
8) wt gDNA (1 ng) + FVL-WT25C (perfecta)	22017	16214		21862	16344	
9) wt gDNA (1 ng) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	23098	<0	-100	24793	<0	-100
10) wt gDNA (500 pg)	8			14		
11) wt gDNA (500 pg) + FVL-WT25C (perfecta)	23417	17614		23159	17641	
12) wt gDNA (500 pg) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	25514	<0	-100	25347	<0	-100
13) wt gDNA (200 pg)	0			0		
14) wt gDNA (200 pg) + FVL-WT25C (perfecta)	20832	15049		20698	15180	
15) wt gDNA (200 pg) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	22441	<0	-100	22353	<0	-100

50

172

TABLA 4. Continuación

Muestra	Fluorescencia en el láser de argón Genasus 488 FMT 30 después de 60 min	Menos ssDNA	% de cambio relativo a la igualación perfecta
1) YOYO-1 (300 nM)	0		
2) FVL-WT25C (3.2 pmol) (antisentido)	3505		
3) FVL-MUT25C (3.2 pmol) (antisentido)	44534		
4) wt gDNA (2 ng)	3619		
5) wt gDNA (2 ng) + FVL-WT25C (perfecta)	26024	20519	
6) wt gDNA (2 ng) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	33801	<0	-100
7) wt gDNA (1 ng)	1643		
8) wt gDNA (1 ng) + FVL-WT25C (perfecta)	22005	16500	
9) wt gDNA (1 ng) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	24913	<0	-100
10) wt gDNA (500 pg)	16		
11) wt gDNA (500 pg) + FVL-WT25C (perfecta)	23240	17735	
12) wt gDNA (500 pg) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	25483	<0	-100
13) wt gDNA (200 pg)	0		
14) wt gDNA (200 pg) + FVL-WT25C (perfecta)	20720	15215	
15) wt gDNA (200 pg) + FVL-MUT25C (1 bp G-T)	22448	<0	-100

TABLA 5. Ensayos de triplex de dsDNA genómico humano obtenido de saliva
Objetivo = dsDNA genómico humano, WT para CPTA
sondas de 25-mer = 27898+5G->A-WT25C (tipo silvestre), 2789+5G->A-MUT25C (mutante)
YOYO-1 500 nM está presente en cada muestra

Muestra	Fluorescencia en el láser de argón Genomus ② PWR 30 después de 5 min	MONOS ssDNA	% de cambio relativo a la igualación perfecta	Fluorescencia en el láser de argón Genomus ② PWR 30 después de 15 min	MONOS ssDNA	% de cambio relativo a la igualación perfecta
1) YOYO-1 (500 nM)	0			0		
2) 2789+5G->A-WT25C (3.2 pmol) (antisentido)	23291			22608		
3) 2789+5G->A-MUT25C (3.2 pmol) (antisentido)	22804			22871		
4) wt gDNA (4 ng)	1530			1856		
5) wt gDNA (4 ng) + 2789+5G->A-WT25C (perfecta)	44631	21360		43624	21016	
6) wt gDNA (4 ng) + 2789+5G->A-MUT25C (1 bp T-G)	23893	1089	-94.9	23531	1460	-99.1
7) wt gDNA (2 ng)	21			19		
8) wt gDNA (2 ng) + 2789+5G->A-WT25 (perfecta)	36630	15339		38142	15534	
9) wt gDNA (2 ng) + 2789+5G->A-MUT25 (1 bp T-G)	22453	<8	-100	22430	359	-97.7

Muestra	Fluorescencia en el láser de argón Genomus ② PWR 30 después de 30 min	MONOS ssDNA	% de cambio relativo a la igualación perfecta	Fluorescencia en el láser de argón Genomus ② PWR 30 después de 45 min	MONOS ssDNA	% de cambio relativo a la igualación perfecta
1) YOYO-1 (500 nM)	0			0		
2) 2789+5G->A-WT25C (3.2 pmol) (antisentido)	22243			21877		
3) 2789+5G->A-MUT25C (3.2 pmol) (antisentido)	21847			21714		
4) wt gDNA (4 ng)	1939			2102		
5) wt gDNA (4 ng) + 2789+5G->A-WT25C (perfecta)	42830	20707		42412	20535	
6) wt gDNA (4 ng) + 2789+5G->A-MUT25C (1 bp T-G)	20777	1230	-94.1	22806	1092	-99.8
7) wt gDNA (2 ng)	18			18		

5) wt gDNA (2 ng) + 2789+5G->A-WT25 (Perfecta)	37707	13464		37351	15474	
9) wt gDNA (2 ng) + 2789+5G->A-MUT25 (1 bp T-G)	-21835	<0	-100	21541	<0	-100

TABLA 6. Ensayos de triplex de ddGTA genómico humano empleando protocolos de reacción alternativos
 Objetivo -ddGTA genómico humano, WT para CTR
 sondas de 25-mer = 2789+5G->A-WT25C (tipo silvestre), 2789+5G->A-MUT25C (mutante)
 YOYO-1 500 nM y TMA-Cl 45 mM están presentes en cada muestra

Muestra	Fluorescencia en el láser de argón 633 nm 32 segundos después de 5 min	Emisión asociada con el triplex en 3 min	% de cambio relativo a la igualación perfecta	Emisión asociada con el triplex en 15 min	% de cambio relativo a la igualación perfecta
1) YOYO-1 (500 nM)	0				
2) 2789+5G->A-WT25C (3.2 pmol /80 uL)	21363				
3) 2789+5G->A-MUT25C (3.2 pmol /80 uL)	20717				
4) wt gDNA (2 ng/80 uL)	4182				
5) wt gDNA (2 ng/80 uL) + 2789+5G->A-WT25C(perfecta) *	28146	6783		7210	
6) wt gDNA (2 ng/80 uL) + 2789+5G->A-MUT25C (1bp T-G) *	23757	3040	-35	3221	-55
7) 2789+5G->A-WT25C (3.2 pmol /77.9 uL)**	22575				
8) 2789+5G->A-MUT25C (3.2 pmol /77.9 uL)**	20896				
9) wt gDNA (2 ng/80 uL) + 2789+5G->A-WT25C(perfecta) *				7728	
10) wt gDNA (2 ng/80 uL) + 2789+5G->A-MUT25C (1bp T-G)**				3560	-54

*Sonda + gDNA es mezclado, luego YOYO-1 es adicionado. La mezcla de reacción se incuba durante 5 min y luego se irradia.

**Sonda + YOYO-1 al control es mezclado, incubado durante 5 min e irradiado. Luego gDNA se adiciona y la mezcla de reacción se incuba durante 5 min y se irradia.

7/5

TABLA 6. Continuación

Muestra	Emisión asociada con el triplex en 20 min	% de cambio	Emisión asociada con el triplex en 25 min	% de cambio	Emisión asociada con el triplex en 30 min	% de cambio
5) wt gDNA (2 ng/10 u) + 2789+5G>A-WT25C (perfecta)*	8033		8239		8608	
6) wt gDNA (2 ng/10 u) + 2789+5G>A-MUT25C (1bp T-G)*	3176	-60	3143	-62	3120	-64
9) wt gDNA (2 ng/10 u) + 2789+5G>A-WT25C (perfecta)**	9378		9867		10223	
10) wt gDNA (2 ng/10 u) + 2789+5G>A-MUT25C (1bp T-G)**	4334	-54	4918	-50	5027	-51

Muestra	Emisión asociada con el triplex en 35 min	% de cambio	Emisión asociada con el triplex en 40 min	% de cambio	Emisión asociada con el triplex en 45 min	% de cambio
5) wt gDNA (2 ng/10 u) + 2789+5G>A-WT25C (perfecta)*	9239		9848		9963	
6) wt gDNA (2 ng/10 u) + 2789+5G>A-MUT25C (1bp T-G)*	3141	-66	3219	-67	3183	-68
9) wt gDNA (2 ng/10 u) + 2789+5G>A-WT25C (perfecta)**	10485		10702		11028	
10) wt gDNA (2 ng/10 u) + 2789+5G>A-MUT25C (1bp T-G)**	4908	-53	5217	-51	4770	-57

Muestra	Emisión asociada con el triplex en 60 min	% de cambio	Emisión asociada con el triplex en 65 min	% de cambio	Emisión asociada con el triplex en 80 min	% de cambio
5) wt gDNA (2 ng/10 u) + 2789+5G>A-WT25C (perfecta)*	9419		10022		9433	
6) wt gDNA (2 ng/10 u) + 2789+5G>A-MUT25C (1bp T-G)*	3432	-64	3802	-62	3318	-63
9) wt gDNA (2 ng/10 u) + 2789+5G>A-WT25 (perfecta)**	11603		12147		12732	
10) wt gDNA (2 ng/10 u) + 2789+5G>A-MUT25C (1bp T-G)**	4925	-58	5925	-51	5121	-60

*Sonda + gDNA es mezclada, luego TOPO-1 es adicionado. La mezcla de reacción se incuba durante 5 min y luego se irradia.

**Sonda + TOPO-1 al control es mezclada, incubado durante 5 min e irradiaado. Luego gDNA se adiciona y la mezcla de reacción se incuba durante 5 min y se irradia.

TABLA 7. Ensayos de triplex de dsDNA genómico humano empleando protocolos de reacción alternativos

Objetivo = dsDNA genómico humano, WT para CFTR
sondas de 25-mer = 3849+10kbC->T-WT25C (tipo silvestre), 3849+10kbC->T-MUT25C (mutante)
YOYO-1 500 nM y TBA-Cl 40 mM están presentes en cada muestra

Muestra	Fluorescencia en el láser de argón 32 después de 5 min	% de cambio relativo a la igualación perfecta	Emitión asociada con el triplex en 15 min	% de cambio relativo a la igualación perfecta
1) YOYO-1 (500 nM)	0			
2) 3849+10kbC->T-WT25C (3.2 pmol /80 u)	20035			
3) 3849+10kbC->T-MUT25C (3.2 pmol /80 u)	20399			
4) wt gDNA (2 ng/80 u)	7091			
5) wt gDNA (2 ng/80 u) + 3849+10kbC->T-WT25C(perfecta) *	30228	10173	10115	
6) wt gDNA (2 ng/80 u) + 3849+10kbC->T-MUT25C (1bp A-C) **	23481	3082	1614	-84
7) 3849+10kbC->T-WT25C (3.2 pmol /77.9 u)**	22696			
8) 3849+10kbC->T-MUT25C (3.2 pmol /77.9 u)**	20833			
9) wt gDNA (2 ng/80 u) + 3849+10kbC->T-WT25C (perfecta) **			10264	
10) wt gDNA (2ng/80u) + 3849+10kbC->T-MUT25C (1bp A-C)**			3218	-49

*Sonda + gDNA es mezclado, luego YOYO-1 es adicionado. La mezcla de reacción se incuba durante 5 min y luego se irradia.
**Sonda + YOYO-1 de control es mezclado, incubado durante 5 min e irradiado. Luego gDNA se adiciona y la mezcla de reacción se incuba durante 5 min y se irradia.

TABLA 7. Continuación

Muestra	Emisión asociada con el triplex en 25 min	% de cambio	Emisión asociada con el triplex en 25 min	% de cambio	Emisión asociada con el triplex en 30 min	% de cambio
5) wt gDNA (2 ng/80 u) + 3849+10kbC>T-WT25C (perfecta)*	10279		10335		10503	
6) wt gDNA (2 ng/80 u) + 3849+10kbC>T-MUT25C (1bp A-C)*	977	-90	603	-94	113	-99
9) wt gDNA (2 ng/80 u) + 3849+10kbC>T-WT25C (perfecta)**	10458		10482		10476	
10) wt gDNA (2 ng/80 u) + 3849+10kbC>T-MUT25C (1bp A-C)**	4662	-55	3944	-62	3546	-66

Muestra	Emisión asociada con el triplex en 35 min	% de cambio	Emisión asociada con el triplex en 40 min	% de cambio	Emisión asociada con el triplex en 45 min	% de cambio
5) wt gDNA (2 ng/80 u) + 3849+10kbC>T-WT25C (perfecta)*	10425		10737		10947	
6) wt gDNA (2 ng/80 u) + 3849+10kbC>T-MUT25C (1bp A-C)*	227	-98	<0	-100	<0	-100
9) wt gDNA (2 ng/80 u) + 3849+10kbC>T-WT25C (perfecta)**	10233		10778		10531	
10) wt gDNA (2 ng/80 u) + 3849+10kbC>T-MUT25C (1bp A-C)**	3216	-69	3025	-72	2833	-73

Muestra	Emisión asociada con el triplex en 60 min	% de cambio	Emisión asociada con el triplex en 65 min	% de cambio	Emisión asociada con el triplex en 80 min	% de cambio
5) wt gDNA (2 ng/80 u) + 3849+10kbC>T-WT25C (perfecta)*	10845		10872		10685	
6) wt gDNA (2 ng/80 u) + 3849+10kbC>T-MUT25C (1bp A-C)*	<0	-100	<0	-100	<0	-100
9) wt gDNA (2 ng/80 u) + 3849+10kbC>T-WT25C (perfecta)**	10973		11699		12112	
10) wt gDNA (2 ng/80 u) + 3849+10kbC>T-MUT25C (1bp A-C)**	2592	-76	1788	-85	1499	-88

*Sonda + gDNA se mezclado, luego TOTO-1 es adicionado. La mezcla de reacción se incuba durante 5 min y luego se irradia.

**Sonda + TOTO-1 al control se mezclado, incubado durante 5 min e irradiado. Luego gDNA se adiciona y la mezcla de reacción se incuba durante 5 min y se irradia.

179

TABLA 8. Ensayos de triplex del dsDNA genómico de *Bacillus globigii*

Objetivo = dsDNA genómico de *Bacillus globigii*
sonda de 25-mer = bg11R-WT25C (tipo silvestre para *B. globigii*)
TMA-Cl 40 mM estuvo presente en cada muestra
YOYO-1 500 nM estuvo presente en las muestras 1-5, YOYO-1 400 nM estuvo presente en las muestras 6-10,
YOYO-1 300 nM estuvo presente en las muestras 11-17

Muestra	Fluorescencia en el láser de argón 633nm FMT 32 después de 5 min	Menor contr.	Fluorescencia en el láser de argón 633nm FMT 32 después de 15 min	Menor control
1) YOYO-1 (500 nM)	0		0	
2) gDNA de <i>B. globii</i> (100 copias/80 ul)	0		0	
3) gDNA humano (302 copias /80 ul)	6004		5837	
4) bg11R-WT25C (3.2 pmol /80 ul) (antisentido)	16704		16521	
5) gDNA de <i>B. globii</i> (100 copias/80 ul) + bg11R-WT25C *	19137	2433	18583	2082
6) YOYO-1 (400 nM)	0		0	
7) gDNA de <i>B. globii</i> (100 copias/80 ul)	0		0	
8) gDNA humano (302 copias /80 ul)	5872		5964	
9) bg11R-WT25C (3.2 pmol /80 ul) (antisentido)	22043		22429	
10) gDNA de <i>B. globii</i> (100 copias/80 ul) + bg11R-WT25C *	26141	4096	26073	3646
11) YOYO-1 (300 nM)	0		0	
12) gDNA de <i>B. globii</i> (100 copias/80 ul)	0		0	
13) gDNA humano (302 copias /80 ul)	5321		5330	
14) bg11R-WT25C (3.2 pmol /80 ul) (antisentido)	28663		28582	
15) gDNA de <i>B. globii</i> (100 copias/80 ul) + bg11R-WT25C *	35536	6873	36076	7494
16) gDNA humano (302 copias /80 ul) + bg11R-WT25C *	40732		40568	
17) BG gDNA (100 copias) + bgDNA (302 copias) + bg11R-WT25C *	43378	2646	43237	2689

*Sonda + gDNA fueron mezclados, luego YOYO-1 fue adicionado. Las mezclas de reacción se incubaron durante 5 min y luego se irradiaron.

179

TABLA 8. Continuación

Muestra	Fluorescencia en el láser de argón Genasys 2 FRET 32 después de 25 min	Menos control	Fluorescencia en el láser de argón Genasys 2 FRET 32 después de 35 min	Menos control
1) YOYO-1 (500 nM)	0		0	
2) gDNA de <i>S. globii</i> (100 copias/80 ul)	0		0	
3) gDNA humano (302 copias /80 ul)	5693		5764	
4) bglr-WT25C (3.2 pmol /80 ul) (antisentido)	15724		15443	
5) gDNA de <i>S. globii</i> (100 copias/80 ul) + bglr-WT25C *	17945	2221	17601	2158
6) YOYO-1 (400 nM)	0		0	
7) gDNA de <i>S. globii</i> (100 copias/80 ul)	0		0	
8) gDNA humano (302 copias /80 ul)	6107		3961	
9) bglr-WT25C (3.2 pmol /80 ul) (antisentido)	21801		21647	
10) gDNA de <i>S. globii</i> (100 copias/80 ul) + bglr-WT25C *	25297	3496	25175	3528
11) YOYO-1 (300 nM)	0		0	
12) gDNA de <i>S. globii</i> (100 copias/80 ul)	0		0	
13) gDNA humano (302 copias /80 ul)	5225		5326	
14) bglr-WT25C (3.2 pmol /80 ul) (antisentido)	28103		28113	
15) gDNA de <i>S. globii</i> (100 copias/80 ul) + bglr-WT25C *	35810	7707	35886	7773
16) gDNA humano (302 copias /80 ul) + bglr-WT25C *	40238		40436	
17) BG gDNA (100 copias) + bglr-WT25C (302 copias) + bglr-WT25C *	43219	2981	43390	2934

*Sonda + gDNA fueron mezclados, luego YOYO-1 fue adicionado. Las mezclas de reacción se incubaron durante 5 min y luego se irradiaron.

TABLA 8. Continuación

Muestra	Fluorescencia en el láser de argón 32 después de 45 min	Menos control	Fluorescencia en el láser de argón 32 después de 55 min	Menos control
1) YOYO-1 (300 nM)	0		0	
2) gDNA de <i>S. globii</i> (100 copias/80 ul)	0		0	
3) gDNA humano (302 copias /80 ul)	5617		5537	
4) hqIR-WT25C (3.2 pmol /80 ul) (antisentido)	14902		14669	
5) gDNA de <i>S. globii</i> (100 copias/80 ul) + hqIR-WT25C*	17027	2125	16669	2000
6) YOYO-1 (400 nM)	0		0	
7) gDNA de <i>S. globii</i> (100 copias/80 ul)	0		0	
8) gDNA humano (302 copias /80 ul)	5812		5939	
9) hqIR-WT25C (3.2 pmol /80 ul) (antisentido)	21363		21232	
10) gDNA de <i>S. globii</i> (100 copias/80 ul) + hqIR-WT25C *	24722	3357	24633	3401
11) YOYO-1 (300 nM)	0		0	
12) gDNA de <i>S. globii</i> (100 copias/80 ul)	0		0	
13) gDNA humano (302 copias /80 ul)	5209		5215	
14) hqIR-WT25C (3.2 pmol /80 ul) (antisentido)	27708		27606	
15) gDNA de <i>S. globii</i> (100 copias/80 ul) + hqIR-WT25C *	35339	7631	35190	7584
16) gDNA humano (302 copias /80 ul) + hqIR-WT25C *	39743		39816	
17) BG gDNA (100 copias) + hqDNA (302 copias) + hqIR-WT25C *	42781	3038	42705	2889

*Sonda + gDNA fueron mezclados, luego YOYO-1 fue adicionado. Las mezclas de reacción se incubaron durante 5 min y luego se irradiaron.

TABLA 8. Continuación

Muestra	Fluorescencia en el láser de argón 633nm (a) FMR 32 después de 65 min	Menos control	Fluorescencia en el láser de argón 633nm (a) FMR 32 después de 24 min	Menos control
1) YOYO-1 (300 nM)	0		0	
2) gDNA de <i>S. globii</i> (100 copias/80 ul)	0		0	
3) gDNA humano (302 copias /80 ul)	5521		3706	
4) hqIR-WT25C (3.2 pmol /80 ul) (antisentido)	14435		11223	
5) gDNA de <i>S. globii</i> (100 copias/80 ul) + hqIR-WT25C *	16383	1948	11571	346
6) YOYO-1 (400 nM)	0		0	
7) gDNA de <i>S. globii</i> (100 copias/80 ul)	0		0	
8) gDNA humano (302 copias /80 ul)	3709		3996	
9) hqIR-WT25C (3.2 pmol /80 ul) (antisentido)	21033		20366	
10) gDNA de <i>S. globii</i> (100 copias/80 ul) + hqIR-WT25C *	24968	3313	22730	2364
11) YOYO-1 (300 nM)	0		0	
12) gDNA de <i>S. globii</i> (100 copias/80 ul)	0		0	
13) gDNA humano (302 copias /80 ul)	5119		5011	
14) hqIR-WT25C (3.2 pmol /80 ul) (antisentido)	27517		29294	
15) gDNA de <i>S. globii</i> (100 copias/80 ul) + hqIR-WT25C *	35074	7557	35604	6310
16) gDNA humano (302 copias /80 ul) + hqIR-WT25C *	39480		41000	
17) BG gDNA (100 copias) + hqDNA (302 copias) + hqIR-WT25C *	42644	3164	43031	4031

*Sonda + gDNA fueron mezclados, luego YOYO-1 fue adicionado. Las mezclas de reacción se incubaron durante 5 min y luego se irradiaron.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una secuencia de ácido nucleico en una muestra genómica, el método caracterizado porque comprende:

proporcionar la muestra genómica que comprende una secuencia de ácido nucleico objetivo de un ácido nucleico dúplex;

proporcionar una sonda que comprende una secuencia de ácido nucleico de sonda;

proporcionar una mezcla de hibridación que comprende la muestra genómica, la sonda, un agente de promoción de hibridación y marcas;

incubar la mezcla de hibridación para proporcionar una mezcla incubada que comprende un complejo de la secuencia de ácido nucleico objetivo, la sonda y las marcas;

irradiar la mezcla incubada con radiación efectiva para estimular por lo menos algunas de las marcas para emitir energía;
y

detectar de una señal fluorescente si la sonda perfectamente iguala a la secuencia de ácido nucleico objetivo, para de esta manera detectar si la secuencia de ácido nucleico está presente en la muestra genómica,

en donde la detección se completa dentro de sesenta minutos de proporcionar la mezcla de hibridación, y el método se conduce sin desnaturalización del ácido nucleico dúplex y sin amplificación de PCR del ácido nucleico dúplex.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque se detecta un polimorfismo de nucleótido individual o múltiple.

3. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque más de una de la secuencia de ácido nucleico se detecta en la muestra genómica por más de una sonda.

184
184

4. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque se detecta un haplotipo.

5. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque se detecta un estado morfológico de un organismo o célula de la cual se obtuvo la muestra genómica, el estado morfológico que comprende por lo menos uno de información que considera una etapa del desarrollo e información que considera un estado de enfermedad.

6. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra genómica comprende menos de 700 copias de la secuencia de ácido nucleico objetivo.

7. El método de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque la muestra genómica comprende aproximadamente 150 a aproximadamente 300 copias de la secuencia de ácido nucleico objetivo.

8. El método de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque la muestra genómica consiste esencialmente de contenidos de una célula individual.

9. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la detección se conduce en una célula biológica.

10. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra genómica es de más de 5 kb en longitud.

11. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra genómica es no digerida por todo el método.

12. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia de ácido nucleico objetivo pertenece a un patógeno presente o previamente presente en un organismo o una célula de la cual se obtiene la muestra genómica.

185

13. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la sonda, si es unitaria, es un ácido nucleico de una sola hebra o análogo de ácido nucleico de 15 a 30 bases en longitud.

14. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de promoción de hibridación es una marca de intercalación.

15. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque la marca de intercalación comprende tintes de cianina diméricos.

16. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque la marca de intercalación consiste de YOYO-1.

17. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque las marcas son fluoróforos de intercalación que también constituyen el agente de promoción de hibridación.

18. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de promoción de hibridación es un cosmótopo.

19. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de promoción de hibridación es un catión de un compuesto seleccionado del grupo que consiste de $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$, $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{HCl}$, NaCl , Na_2SO_4 , Na_2HPO_4 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

20. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque las marcas son fluoróforos no de intercalación.

21. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el período de incubación es de uno a diez minutos, y el método se practica completamente en menos de quince minutos.

22. El método de conformidad con la reivindicación 1,

caracterizado porque la mezcla de hibridación se mantiene a una temperatura de 20 a 40°C por todo el período de incubación.

23. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la por lo menos una base de la sonda enlaza a una base o a un par de bases del objetivo mediante la interacción de base complementaria de Watson-Crick y/o mediante la interacción de base homóloga, tal que el complejo es un tríplex.

24. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque por lo menos una base de la sonda enlaza a una base o a un par de bases del objetivo mediante la interacción de base complementaria de Watson-Crick y/o mediante la interacción de base homóloga, tal que el complejo es un cuádruplex.

25. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la sonda y la secuencia de ácido nucleico objetivo no se enlazan de manera conjunta solamente como hebras antiparalelas que obedecen a las reglas de emparejamiento de base de Watson-Crick.

26. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la radiación es un haz de láser que tiene una densidad de potencia de aproximadamente 84 W/cm²/seg.

27. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la señal fluorescente se compara con una señal fluorescente de referencia para determinar si la sonda es una igualación perfecta para la secuencia de ácido nucleico objetivo.

28. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la detección comprende monitorear un cambio en la señal fluorescente a través del tiempo para determinar si la sonda perfectamente iguala la secuencia de ácido nucleico

objetivo, y en donde un incremento en la señal fluorescente a través del tiempo indica una igualación perfecta y una disminución en la señal fluorescente a través del tiempo indica una falta de igualación perfecta.

29. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la sonda se proporciona en la mezcla de hibridación en una cantidad de saturación objetivo, la cantidad de saturación objetivo es una concentración de sonda en exceso de una concentración objetivo, y las marcas se proporcionan en la mezcla de hibridación en una cantidad de saturación compleja, la cantidad de saturación compleja que es una concentración de marca arriba de la cual la discriminación de la señal de las señales antecedentes cambia en una primera proporción menor que una segunda proporción en la cual cambia la concentración de la marca.

30. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la sonda tiene una longitud efectiva para optimizar la transferencia o migración de energía.

31. El método de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado porque la discriminación de la señal fluorescente de las señales antecedentes se maximiza mediante la transferencia de energía o migración de energía entre las marcas intercaladas intra-objetivo y las marcas intercaladas de sonda-objetivo.

32. El método de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado porque la sonda es de 20-30 bases o pares de base en longitud.

33. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque una longitud de la sonda se selecciona para maximizar una intensidad de la señal fluorescente.

34. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la sonda se proporciona en la mezcla de

hibridación en una cantidad de saturación objetivo, las marcas se proporcionan en la mezcla de hibridación en una cantidad de saturación compleja, y la sonda tiene una longitud efectiva para optimizar la transferencia o migración de energía.

35. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque una mezcla preliminar que comprende una solución reguladora y agua se somete a una carga eléctrica aplicada efectiva para aumentar una sensibilidad del método, y por lo menos una porción de la mezcla preliminar es subsecuentemente incorporada en la mezcla de hibridación.

36. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra genómica se adiciona a la mezcla de hibridación después de la sonda, el agente de promoción de hibridación y las marcas.

37. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de promoción de hibridación o las marcas se adicionan a la mezcla de hibridación al último.

38. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra genómica se purifica, se semipurifica, no se purifica o se diluye.

39. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque los niveles de la expresión del producto de gen en una muestra genómica se detectan o los productos de expresión de gen de por lo menos dos muestras genómicas se comparan.

40. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la mezcla de hibridación además comprende una pluralidad de sondas que enlazan las secuencias de la muestra genómica adyacentes a la secuencia de ácido nucleico objetivo.

41. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la sonda comprende un apagador de emisión y

587
189

por lo menos una de las marcas.

42. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la sonda se modifica por al menos una porción enlazada.

43. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque las marcas comprenden FET, FRET, migración de energía o ajustes de redox.

44. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque las marcas comprenden puntos de quantum.

45. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque se detectan repeticiones de secuencia de ácido nucleico, inserciones o supresiones.

46. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la detección se repite bajo condiciones variadas de la mezcla de hibridación.

47. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque se detecta un estado canceroso o de enfermedad de un organismo o célula de la cual se obtuvo la muestra genómica, o se determina la preñez del organismo.

48. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra genómica se obtiene de una muestra de tejido humano, células bucales, sangre, fluido, esputo, orina o heces, y se marca con una etiqueta de identificación molecular adaptada para identificar una fuente de la muestra genómica.

49. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la sonda se proporciona sobre un soporte seleccionado del grupo que consiste de una cuenta, una placa, una membrana, una película, una micropantalla, un electrodo, una columna y un tubo capilar.

50. El método de conformidad con la reivindicación 1,

caracterizado porque la sonda se proporciona sobre una película de isla de plata.

51. Un equipo para practicar el método de la reivindicación 1, el equipo caracterizado porque comprende:

la sonda;

el agente de promoción de hibridación; y

las marcas.

52. El equipo de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque además comprende un contenedor en el cual se proporciona la mezcla de hibridación.

53. El equipo de conformidad con la reivindicación 52, caracterizado porque el contenedor se adapta para recolectar esputo o el equipo además comprende un dispositivo de recolección de esputo.

54. El equipo de conformidad con la reivindicación 52, caracterizado porque el contenedor comprende una etiqueta de identificación molecular adaptada para identificar una fuente de la muestra genómica.

55. El equipo de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque la sonda se proporciona sobre un soporte seleccionado del grupo que consiste de una cuenta, una placa, una membrana, una película, una micropantalla, un electrodo, una columna y un tubo capilar.

56. El equipo de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado porque el soporte es una película de isla de plata.

57. El equipo de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque la sonda es de una sola hebra que contiene una horquilla, o es de doble hebra.

58. El equipo de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque las marcas comprenden tintes de cianina diméricos.

59. El equipo de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque las marcas y el agente de promoción de hibridación consisten de YOYO-1.

60. El equipo de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque el agente de promoción de hibridación es por lo menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste de $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$, $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{HCl}$, NaCl , Na_2SO_4 , Na_2HPO_4 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

61. Un método para detectar una secuencia de ácido nucleico en una muestra genómica, el método caracterizado porque comprende:

proporcionar la muestra genómica que comprende una secuencia de ácido nucleico objetivo de un ácido nucleico de una sola hebra o de doble hebra;

proporcionar una sonda que comprende una secuencia de ácido nucleico de sonda;

proporcionar una mezcla de hibridación que comprende la muestra genómica, la sonda, un agente de promoción de hibridación y marcas;

incubar la mezcla de hibridación para proporcionar una mezcla incubada que comprende un complejo de la secuencia de ácido nucleico objetivo, la sonda y las marcas;

aplicar energía a la mezcla incubada efectiva para inducir una señal de la mezcla de hibridación; y

detectar de la señal si la sonda perfectamente iguala a la secuencia de ácido nucleico objetivo, para de esta manera detectar si la secuencia de ácido nucleico está presente en la muestra genómica, en donde la detección se completa dentro de sesenta minutos de la provisión de la mezcla de hibridación, y el método se conduce sin la desnaturalización del ácido nucleico dúplex y sin la amplificación de PCR del ácido nucleico dúplex.

62. El método de conformidad con la reivindicación 61,

caracterizado porque subsecuente a la etapa de incubación y antes de la etapa de aplicación de energía, la mezcla incubada además se incuba bajo condiciones tal que las sondas se disasocian de la secuencia de ácido nucleico objetivo, y en donde la etapa de detección comprende determinar de la señal si la sonda es disasociada de la secuencia de ácido nucleico objetivo y las condiciones de incubación, para determinar si la sonda perfectamente iguala la secuencia de ácido nucleico objetivo.

63. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque subsecuente a la etapa de incubación y antes de la etapa de aplicación de energía, la mezcla incubada además es incubada bajo condiciones tal que las sondas se disasocian en la secuencia de ácido nucleico objetivo, y en donde la etapa de detección comprende determinar de la señal si la sonda es disasociada de la secuencia de ácido nucleico objetivo y las condiciones de incubación, para determinar si la sonda perfectamente iguala a la secuencia de ácido nucleico objetivo.

64. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la sonda comprende una o más partes, y por lo menos una de las partes es 5 a 30 bases en longitud.

65. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque una etapa de separación se realiza antes de la etapa de irradiación.

66. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque además comprende una etapa de provisión de por lo menos una sonda de bloqueo para suprimir el enlace de la sonda a una secuencia no objetivo de la mezcla genómica.

67. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el complejo actúa como una estructura fotónica para recolectar la energía fotónica y transferir energía a una marca que emite señal.

68. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque las etapas del método se repiten más de una vez para proporcionar más de una mezcla de hibridación y más de una señal fluorescente, con la condición de que la mezcla de hibridación se forme al combinar la muestra genómica, la sonda, el agente de promoción de hibridación y las marcas en una secuencia diferente.

69. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la detección comprende monitorear un cambio en la anisotropía de fluorescencia de la señal fluorescente a través del tiempo para determinar si la sonda perfectamente iguala a la secuencia de ácido nucleico objetivo.

RESUMEN DE LA INVENCION

Un método para detectar una secuencia de ácido nucleico en una muestra genómica, incluye: proporcionar la muestra genómica que contiene una secuencia de ácido nucleico objetivo de un ácido nucleico dúplex; proporcionar, una sonda que contiene una secuencia de ácido nucleico de sonda; proporcionar una mezcla de hibridación que contiene la muestra genómica, la sonda, un agente de promoción de hibridación y marcas; incubar la mezcla de hibridación; irradiar la mezcla incubada con radiación efectiva para estimular por lo menos algunas de las marcas para emitir energía; y detectar de una señal fluorescente si la sonda perfectamente iguala la secuencia de ácido nucleico objetivo, en donde la detección se completa dentro de sesenta minutos de la provisión de la mezcla de hibridación, y el método se conduce sin desnaturalización y sin amplificación de PCR del ácido nucleico dúplex. Un equipo para practicar el método incluye la sonda, el agente de promoción de hibridación y marcas.

198
195

FIG. 1. Fluorescencia asociada con el triplex de muestras de ADN genómico humano analizadas en la presencia de 600nm YOYO-1 y 45mM TMA-Cl (en donde YOYO-1 se adiciona al último)

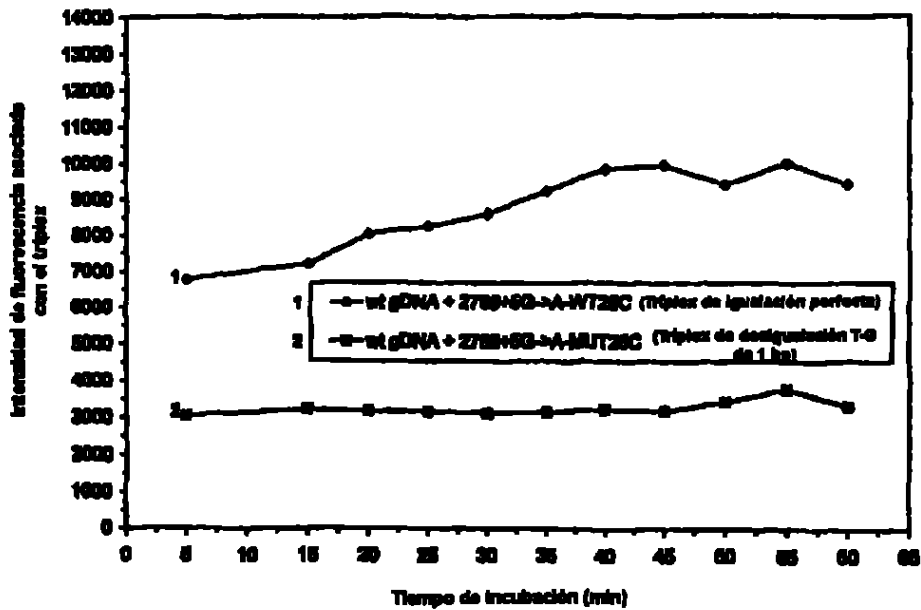


FIG. 2. Fluorescencia asociada con el triplex de muestras de ADN genómico humano analizadas en la presencia de 600nm YOYO-1 y 45mM TMA-Cl (en donde el ADN Genómico se adiciona al último)

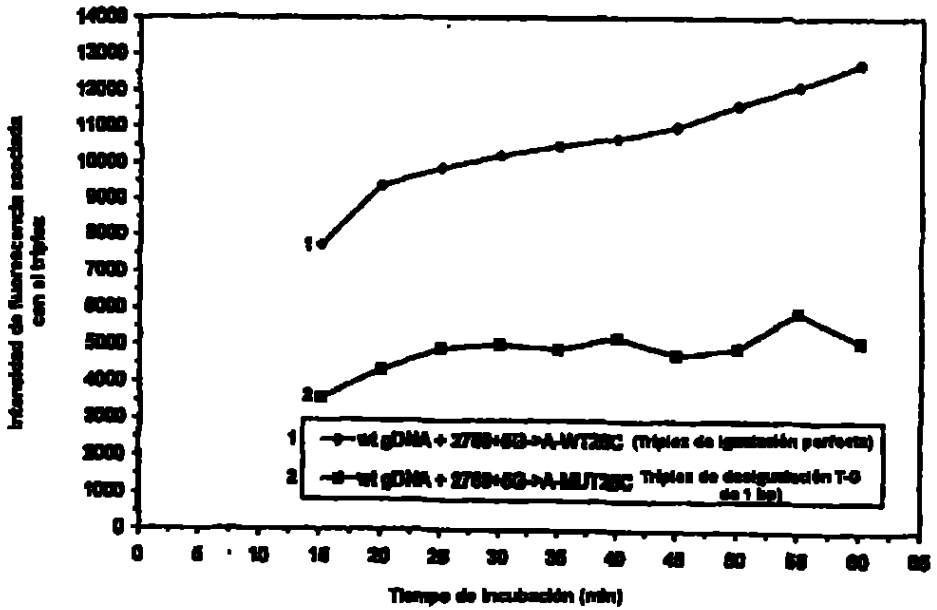


FIG. 3. Fluorescencia asociada con el triplex de muestras de ADN genómicas humanas analizadas en la presencia de 600nm YOYO-1 y 45mM TMA-Cl (en donde YOYO-1 se adiciona al último)

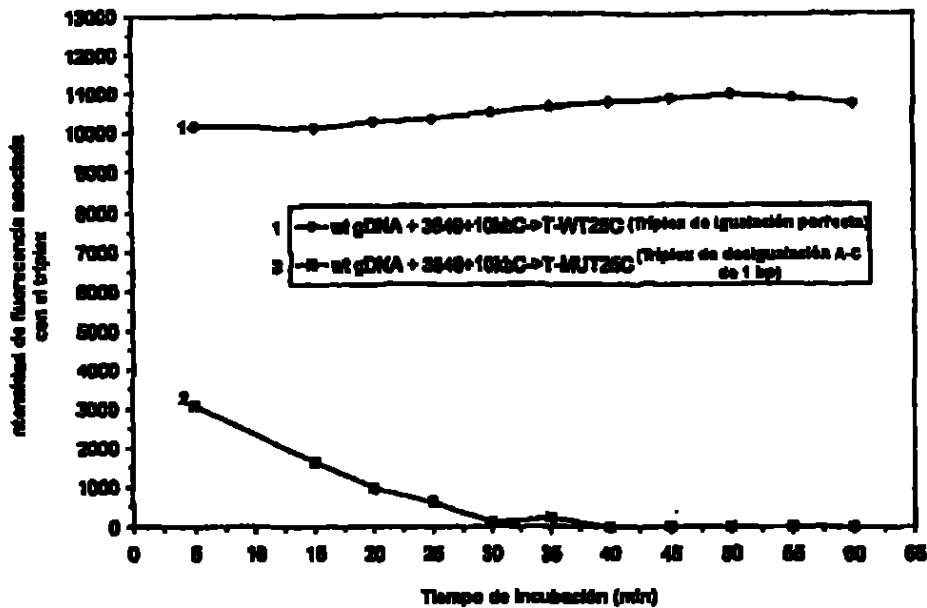


FIG. 4. Fluorescencia asociada con el triplex de muestras de ADN genómicas humanas analizadas en la presencia de 600nm YOYO-1 y 40mM TMA-Cl (en donde el ADN Genómico se adiciona al último)

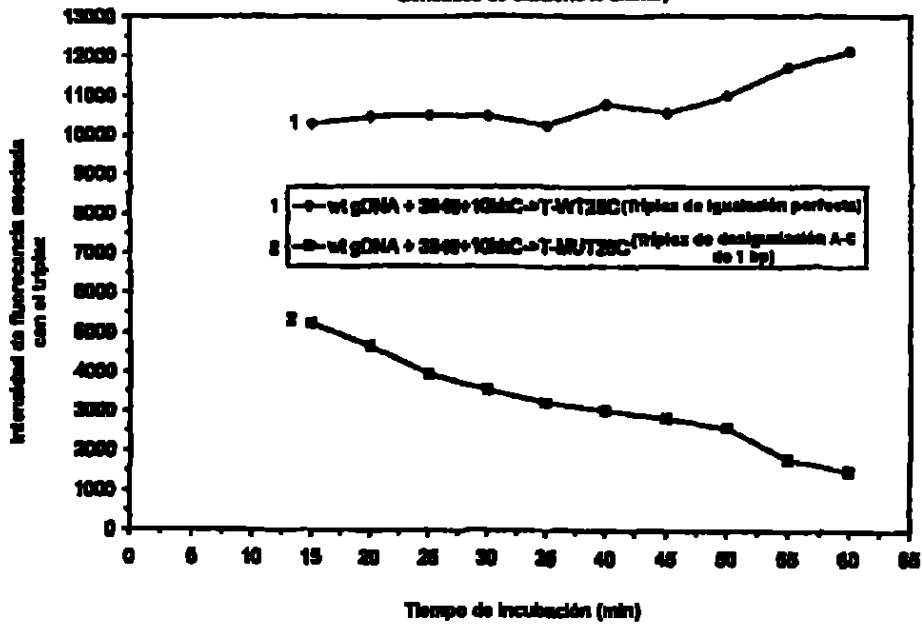
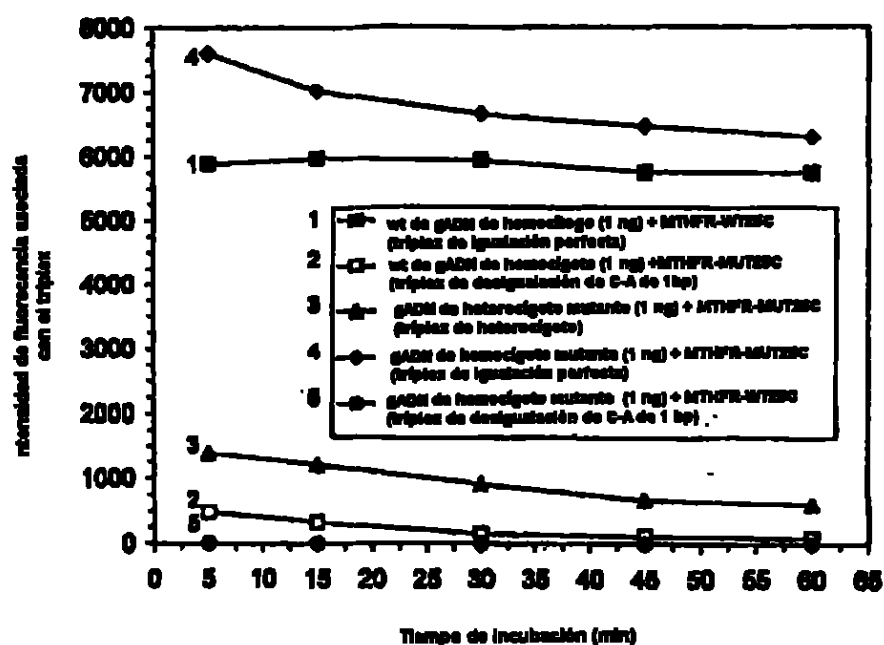


FIG. 8. Ensayo de triplex del daADN genómico humano para MTHFR C677T



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Eriksen, Oler
 Inhaler. Inhaler

<130> E1047/20251

<150> US 60/612,670

<151> 2004-09-24

<160> 33

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 491

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

gcagaggtacc tgaacacagga agtatatttaa atatttttga tcaatgtagt taatagaatc	60
tttacaaata agaatatata cttctgctta ggtatgaat tggaggcaag tgaatcctga	120
gogtgatttg acaatgacct aataatgatg ggtttttatt ccagaattca cttctaatga	180
tgatttatgg agaatggag cottoagagg gtataattaa gcacagtggg agaatttcat	240
tctgtttctc gtttttctgg atttatgctg gcacatttaa agaaatata atctttggtg	300
tttcttatga tgaatataga tacagaagcg tctcaaaagc atgccaacta gaagaggtaa	360
gaactatgt gaacttttt tgattatgca tatgaacccg tcaactacc caaattatat	420
atttggctcc atattcaatc ggttagctca catatattta tgtttctctc atgggtaagc	480
tactgtgaat g	491

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Sintetico

<400> 2

gcagaggtacc tgaacacagga	20
-------------------------	----

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Sintetico

<400> 3

cattcacagt agotttaacca	20
------------------------	----

<210> 4

<211> 15

<212> ADN

<213> Sintetico

<400> 4 caacaaagat gatat	15
<210> 5	
<213> Sirtelico	
<400> 5 caacaaagac gatat	15
<210> 6 <211> 15 <212> ADN <213> Sirtelico	
<400> 6 caacaaagat gatat	15
<210> 7 <211> 25 <212> ADN <213> Sirtelico	
<400> 7 taggaanac caagatgat atttt	25
<210> 8 <211> 25 <212> ADN <213> Sirtelico	
<400> 8 taggaanac caagatgat atttt	25
<210> 9 <211> 25 <212> ADN <213> Sirtelico	
<400> 9 taggaanac caagatgat atttt	25
<210> 10 <211> 15 <212> ADN <213> Sirtelico	
<400> 10 atatcatett tgytg	15
<210> 11 <211> 15 <212> ADN <213> Sirtelico	

<400> 11 atatogtctt tggtg	15
<210> 12	
<213> Sintetico	
<400> 12 atatcatotg tggtg	15
<210> 13 <211> 25 <212> ADN <213> Sintetico	
<400> 13 aaatcatcat ctttggtggt tccta	25
<210> 14 <211> 25 <212> ADN <213> Sintetico	
<400> 14 aaatcatogt ctttggtggt tccta	25
<210> 15 <211> 25 <212> ADN <213> Sintetico	
<400> 15 aaatcatcat ctgtggtggt tccta	25
<210> 16 <211> 15 <212> ADN <213> Sintetico	
<400> 16 aacacatg atatt	15
<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> Sintetico	
<400> 17 taggaacac caagatgat	20
<210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> Sintetico	

<400> 18 ataggaaca ccaatgatat	20
<211> 20 <212> ADN <213> Sintetico	
<400> 19 ataggaaca coaatgatat tttot	25
<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> Sintetico	
<400> 20 tgatgatgaa atcggctccc	20
<210> 21 <211> 20 <212> ADN <213> Sintetico	
<400> 21 tgatgatgaa atcgactccc	20
<210> 22 <211> 25 <212> ADN <213> Sintetico	
<400> 22 tgatgatgaa atcggtccc gcaga	25
<210> 23 <211> 25 <212> ADN <213> Sintetico	
<400> 23 tgatgatgaa atcgactccc gcaga	25
<210> 24 <211> 30 <212> ADN <213> Sintetico	
<400> 24 gcgtgatgat gaatatggct ccgcagaca	30
<210> 25 <211> 30 <212> ADN <213> Sintetico	

<400> 25 gogtqatgat qaaatogast cccgcagaca	20
<211> 25 <212> ADN <213> Sintetico	
<400> 26 oactatqtat taaatogactg toaag	25
<210> 27 <211> 25 <212> ADN <213> Sintetico	
<400> 27 oactatqtat taaatogactg toaag	25
<210> 28 <211> 25 <212> ADN <213> Sintetico	
<400> 28 aaatagacat gaaatactca ctta	25
<210> 29 <211> 25 <212> ADN <213> Sintetico	
<400> 29 aaatagacat gaaatattca ctta	25
<210> 30 <211> 25 <212> ADN <213> Sintetico	
<400> 30 gtgtcttact agaatcttta atact	25
<210> 31 <211> 25 <212> ADN <213> Sintetico	
<400> 31 gtgtcttact caaatcttta atact	25
<210> 32 <211> 25 <212> ADN <213> Sintetico	

<400> 32 tatttttgatt ataggacatg aagat	25
<210> 33	
<212> ADN	
<213> Sintetico	
<400> 33 gcaaatatccc gagtgtaaca tccat	25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2004/053162

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/010326 A (INGENEUS CORPORATION; ERIKSON, GLEN, H; DAKSIS, JASMINE, I; KANDIC, IV) 6 February 2003 (2003-02-06) see whole doc. esp. claims and examples	1-69
X	WO 02/04655 A (INGENEUS CORPORATION; DAKSIS, JASMINE, I; PICARD, PIERRE; ERIKSON, GLE) 17 January 2002 (2002-01-17) see whole doc. esp. claims and p.16, 1.19 ff.	1-69
X	WO 01/46467 A (INGENEUS CORPORATION; DAKSIS, JASMINE, I; PICARD, PIERRE; ERIKSON, GLE) 28 June 2001 (2001-06-28) see whole doc. esp. claims and examples	1-69
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 March 2006

Date of mailing of the international search report

10/04/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mueller, F

205

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2004/053162

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/142329 A1 (ERIKSON GLEN H ET AL) 22 July 2004 (2004-07-22) see whole doc. esp. claims and p.18, par. 239.	1-69
A	XU Z. ET AL.,: "modulation of nucleic structure by ligand binding: induction of a DNA-RNA-DNA hybrid triplex by dapi intercalation" BIOORGANICS & MEDICAL CHEMISTRY, vol. 5, no. 6, 1997, pages 1137-1147, XP002372777 see whole doc. esp. p.1141, 1.col. last par. ff.	

206

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Informa 1 patent family members

International application No

PCT/IB2004/053162

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03010326	A	06-02-2003	BR 0211264 A	29-03-2005
			CA 2454300 A1	06-02-2003
			CN 1650026 A	03-08-2005
			EP 1463831 A2	06-10-2004
			JP 2005527181 T	15-09-2005
			MX PA04000626 A	08-07-2004
			ZA 200401362 A	27-05-2005
WO 0204655	A	17-01-2002	AU 8000701 A	21-01-2002
			BR 0112400 A	20-07-2004
			CA 2415493 A1	17-01-2002
			CN 1441850 A	10-09-2003
			EP 1307591 A2	07-05-2003
			JP 2004511218 T	15-04-2004
			MX PA03000340 A	05-04-2004
WO 0146467	A	28-06-2001	AU 778892 B2	23-12-2004
			AU 1726301 A	03-07-2001
			BR 0016614 A	07-01-2003
			CA 2394752 A1	28-06-2001
			CN 1413264 A	23-04-2003
			EP 1242620 A2	25-09-2002
			JP 2003517841 T	03-06-2003
			MX PA02006262 A	06-09-2004
			US 6403313 B1	11-06-2002
			US 6420115 B1	16-07-2002
US 2004142329	A1	22-07-2004	AU 2004205799 A1	05-08-2004
			CA 2513125 A1	05-08-2004
			WO 2004065631 A1	05-08-2004

(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C12Q 1/68
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) INGENEUS INC.
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 60/612,670	(32) Fecha 24/09/2004
		(33) País US
		(72) Inventor(es) GLEN H. ERIKSON
		(74) Apoderado: EMILIO FERRERO
(85)	Fecha límite inicio fase nacional: 24/04/2007	(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	Fecha: 30/03/2006
	Fecha de presentación de la solicitud: 23/09/2005	N° publicación: WO 2006/033088 A3
	No. de solicitud PCT/IB2005/053162	
(54) Título: ENSAYO GENOMICO		

REINDICACIONES

1. Un método para detectar una secuencia de ácido nucleico en una muestra genómica, el método caracterizado porque comprende:

proporcionar la muestra genómica que comprende una secuencia de ácido nucleico objetivo de un ácido nucleico dúplex;

proporcionar una sonda que comprende una secuencia de ácido nucleico de sonda;

proporcionar una mezcla de hibridación que comprende la muestra genómica, la sonda, un agente de promoción de hibridación y marcas;

incubar la mezcla de hibridación para proporcionar una mezcla incubada que comprende un complejo de la secuencia de ácido nucleico objetivo, la sonda y las marcas;

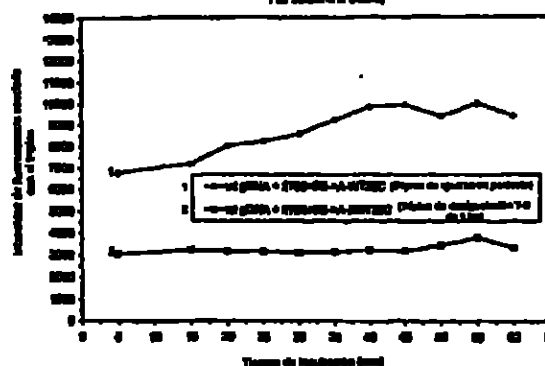
irradiar la mezcla incubada con radiación efectiva para estimular por lo menos algunas de las marcas para emitir energía; y

detectar de una señal fluorescente si la sonda perfectamente iguala a la secuencia de ácido nucleico objetivo, para de esta manera detectar si la secuencia de ácido nucleico está presente en la muestra genómica.

en donde la detección se completa dentro de sesenta minutos de proporcionar la mezcla de hibridación, y el método se conduce sin desnaturalización del ácido nucleico dúplex y sin amplificación de PCR del ácido nucleico dúplex.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque se detecta un polimorfismo de nucleótido individual o múltiple.

FIG. 1. Fluorescencia emitida por el tejido de epitelio de AEN gasterales humanos sometidos a la presión de 4000-1 y 4000 TGA-2 (en orden TGA-2 en superior y 4000-1 en inferior) (100x).





208

Expediente No		07040955	No de Folio
Item		No de unidades	
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA		
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA	1	
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS:		
Observaciones: <i>Artema Final.</i>			

209

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 30,136
FECHA : ABRIL 16 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-040955-00000-0000

Fecha: 2007-04-24 16:21:20 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYI Eva: 378 FASENACIONAL
Ad. 411 PRESENTACION Folios: 208

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55800350	16/04/2007	23,650,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
	TOTAL :	\$ 482,000.00

SUM: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO 15908 841 001 8



No. 07-040955- -00000-0000

Fecha: 2007-04-24 16:21:20 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTE IYII Evt: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 208



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION

[9]

MODELO DE UTILIDAD

[]

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [4]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [4]
- ◆ Descripción de la invención [4]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [4]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [4]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha 24 ABR. 2007

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Conmutador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: info@sic.gov.co

www.sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia

211

REPÚBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO

REFERENCIA	Radicación No.	7 40955
	Solicitud internacional	pct/ib2005/053162
	Fecha inicio fase nacional	24/04/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	8893

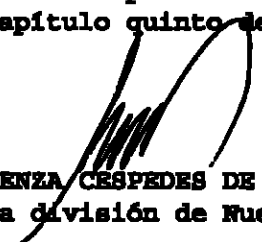
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, deben legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPÉDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 27 JUL 2021
adpa11