



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 746**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07718636 .9**

96 Fecha de presentación : **28.03.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2004852**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.12.2008**

54 Título: **Amplificación de fragmentos de ADN.**

30 Prioridad: **28.03.2006 AU 2006901582**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.04.2011

73 Titular/es: **COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND
INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION
Limestone Avenue
Campbell, ACT 2612, AU**

72 Inventor/es: **Molloy, Peter Laurence y
Rand, Keith**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a moléculas de ácido nucleico de diferenciación que tienen una secuencia específica adyacente a un extremo 3' de moléculas de ácido nucleico en las que la misma secuencia está incluida dentro de la molécula o está ausente. La invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico de diferenciación que difieren en la secuencia adyacente a un extremo 3'. En particular, la invención se refiere a un procedimiento para la amplificación selectiva de ADN escindido en presencia de ADN no escindido que comparte la misma secuencia diana.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se basa en ciclos repetidos de desnaturalización de ADN bicatenario, seguido de hibridación del cebador oligonucleotídico con el molde de ADN, y extensión de cebador por una ADN polimerasa (por ejemplo, véase, Mullis y col. patentes de Estados Unidos Nº 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159). Los cebadores oligonucleotídicos usados en PCR están diseñados para hibridar con cadenas opuestas del ADN, y se colocan de tal modo que el producto de la extensión catalizada por la ADN polimerasa de un cebador pueda servir como cadena molde para el otro cebador. El procedimiento de amplificación por PCR produce el aumento exponencial de ADN discreto cuya longitud está definida por los extremos 5' de los cebadores oligonucleotídicos.

En su aplicación convencional, se eligen cebadores que aparean con secuencias dentro del genoma diana y flanquean la región de ADN que tiene que amplificarse. Además, se han descrito varias variaciones de PCR en las que se ligan engarces en los extremos de fragmentos de ADN y después las secuencias de los engarces se usan para cebar la amplificación del ADN. La PCR mediada por ligamiento se aplicó por primera vez para la producción de huella genética de ADN y reacciones de secuenciación donde los extremos de ADN se generaron por digestión con DNasa I o escisión química (Mueller y Wold, 1989 y Pfeifer y col. 1989) y se extendieron hasta los extremos formados por digestión de restricción (Steigerwald y col. 1990). La especificidad se consigue combinando cebadores para una región diana específica con cebadores dirigidos al engarce añadido. Las variaciones de la técnica han encontrado una variedad de usos en la secuenciación de genomas y análisis de metilación del ADN, paseo cromosómico, identificación de sitios de integración o recombinación en el cromosoma, estudio de puntos de ruptura de mutaciones y extremos del ARNm. La PCR mediada por ligamiento también puede usarse para la amplificación del genoma completo, donde se amplifica la población entera de moléculas con extremos ligados (Schumaker y col., 2006).

A pesar de la utilidad de gran alcance de la PCR mediada por ligamiento, existe una necesidad en curso de metodologías basadas en PCR mejoradas que permitan la amplificación selectiva de ADN que tengan extremos 3' y que proporcionen ventajas de simplicidad, especificidad y conveniencia.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona procedimientos para diferenciar una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia específica adyacente a un extremo 3' de moléculas de ácido nucleico en las que está presente la misma secuencia diana pero incluida dentro de la molécula, o está ausente. Los extremos 3' pueden ser el resultado de, por ejemplo, escisión con enzimas de restricción u otra escisión enzimática o química específica, o los extremos pueden ser los extremos libres de amplicones generados por PCR, los extremos libres de un ADN de origen natural tal como de un cromosoma, virus o fago, o los extremos pueden producirse por transcripción inversa a partir de un molde de ARN, o producirse por cualquier otro medio que genere ácidos nucleicos que tienen un extremo 3'.

De acuerdo con una realización de la invención, también mencionada en este documento como 'PCR específica de extremo' o ES-PCR, se utilizan las secuencias de nucleótidos localizadas adyacentes a un extremo 3' de una molécula de ácido nucleico para cebar las reacciones de amplificación que proceden solamente cuando estas secuencias se encuentran adyacentes a un extremo 3', en lugar de cuando estas secuencias están incluidas dentro de las moléculas de ácido nucleico.

Para conseguir esta diferenciación, se utiliza un oligonucleótido (a partir de ahora en este documento "oligonucleótido molde") que tiene una parte 3' complementaria a la secuencia diana y una parte 5' que forma una cola 5' cuando el oligonucleótido hibrida con el ácido nucleico. Cuando el oligonucleótido molde hibrida con la secuencia diana localizada adyacente a un extremo 3', puede tener lugar el copiado de la cola 5' en presencia de una polimerasa adecuada por extensión del extremo 3' libre. Cuando el oligonucleótido molde hibrida con la secuencia diana que está incluida dentro de una molécula de ácido nucleico, no puede suceder el copiado de la cola 5', debido a la ausencia de un extremo 3' libre. El oligonucleótido actualmente descrito se menciona en este documento como oligonucleótido molde debido a su cola 5' que sirve como molde para la extensión 3' de la secuencia diana localizada adyacente a un extremo 3'.

El copiado de la cola 5' cuando la secuencia diana aparece adyacente a un extremo 3' provoca la adición de una nueva secuencia en el extremo 3' de la molécula de ácido nucleico marcada como diana, que puede utilizarse en una posterior amplificación selectiva de moléculas de ácido nucleico que tienen la secuencia diana adyacente al extremo 3'.

Por ejemplo, cuando un extremo 3' es un producto de escisión con enzimas de restricción, sucederá la amplificación selectiva del ADN escindido sobre el ADN no escindido.

En una realización, el oligonucleótido molde incorpora una modificación que retarda la extensión 3' del oligonucleótido, mientras el copiado de su cola 5' por extensión de la secuencia diana procede sin impedimentos. Por consiguiente, la secuencia de ácido nucleico de la región 3' del oligonucleótido molde puede elegirse de modo que la hibridación de la secuencia diana sea inestable en las condiciones usadas para que en ausencia de copiado de la cola 5', se inhiba la hibridación del oligonucleótido molde con la secuencia diana incluida dentro de una molécula de ácido nucleico. El copiado de la cola 5' potencia la hibridación del oligonucleótido molde con la secuencia diana adyacente a un extremo 3' en comparación con la hibridación del oligonucleótido molde con la secuencia diana incluida dentro de una molécula de ácido nucleico, en la que no sucede el copiado de la cola 5'.

La hibridación potenciada del oligonucleótido molde a su vez aumenta la eficacia con la que sucede la extensión 3' del oligonucleótido molde, posibilitando de este modo que proceda la amplificación de la secuencia diana, ya sea en combinación con otro oligonucleótido molde que ceba en la dirección inversa, o con un cebador inverso complementario a secuencias en otras partes dentro de la molécula de ácido nucleico marcada como diana, para permitir la detección o amplificación específica de la molécula deseada, es decir, la que tiene la secuencia diana adyacente a un extremo 3'.

La secuencia recién incorporada en el extremo 3' de una molécula de ácido nucleico marcada como diana (por copiado de la cola 5' del oligonucleótido) también puede utilizarse para amplificar la molécula de ácido nucleico marcada como diana.

Por lo tanto, en una realización de la invención, se incuba una muestra con un oligonucleótido molde cuya parte 3' contiene secuencias sustancialmente complementarias a la secuencia diana adyacente al extremo 3' de la molécula de ácido nucleico marcada como diana, y formando la parte 5' una cola 5'. El oligonucleótido molde incorpora una modificación que retarda la extensión desde su extremo 3'. En presencia de una polimerasa adecuada, la cola 5' del oligonucleótido molde se copia por extensión de la secuencia diana a partir de su extremo 3'. Como resultado de la extensión 3' de la secuencia diana, la hibridación del oligonucleótido molde se potencia en comparación con su hibridación a la secuencia diana incluida dentro de una molécula de ácido nucleico, promoviendo por lo tanto la extensión 3' del oligonucleótido molde cuando está hibridado con la secuencia diana adyacente a un extremo 3'. El propio oligonucleótido molde o la secuencia recién incorporada (mencionada en este documento como "tercer oligonucleótido") entonces puede usarse solo o en combinación con secuencias dentro de la molécula marcada como diana para permitir la detección o amplificación específica de las secuencias diana deseadas, es decir, aquellas adyacentes a un extremo 3'. Los procedimientos de la presente invención difieren de la PCR mediada por ligamiento en que no es necesaria una etapa de ligamiento y en que la especificidad de secuencia se incorpora directamente en los oligonucleótidos molde que están dirigidos a los extremos 3' del ácido nucleico.

La presente invención proporciona un procedimiento para la amplificación selectiva de una muestra de una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia diana adyacente a un extremo 3', comprendiendo el procedimiento

(i) poner en contacto la muestra con un oligonucleótido molde que tiene

(a) una región 3' sustancialmente complementaria a la secuencia diana adyacente al extremo 3' de una molécula de ácido nucleico;

(b) una cola 5' que comprende una secuencia de ácido nucleico tal que se forma una cola 5' libre cuando el oligonucleótido molde hibrida con la secuencia diana localizada adyacente a un extremo 3', proporcionando la cola 5' un molde para la extensión del extremo 3' de la secuencia diana que incorpora la secuencia complementaria a la cola 5' del oligonucleótido molde provocando la adición de la secuencia complementaria a la cola 5' a la secuencia diana; y

(c) una modificación en la región 3' que retarda la extensión 3' de dicho oligonucleótido molde;

(ii) poner en contacto la muestra con un segundo oligonucleótido para cebar en una dirección inversa el oligonucleótido molde, y opcionalmente un tercer oligonucleótido que comparte la secuencia de nucleótidos con la cola 5' del oligonucleótido molde;

(iii) realizar la amplificación de la muestra en la que

(a) la hibridación del oligonucleótido molde con la secuencia diana adyacente a un extremo 3' se estabiliza por el copiado de la cola 5' del oligonucleótido molde por extensión desde el extremo 3' de la secuencia diana en presencia de extensión 3' retardada de dicho oligonucleótido; y

(b) en la que la consiguiente hibridación del oligonucleótido molde estabilizada con la secuencia diana adyacente a un extremo 3' potencia la eficacia de la extensión 3' del oligonucleótido molde, y

(c) en la que la amplificación sucede usando el oligonucleótido molde y/o el tercer oligonucleótido en combinación con el segundo oligonucleótido, provocando la amplificación selectiva de la secuencia diana adyacente a

un extremo 3'.

Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento para la amplificación selectiva de una muestra de una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia diana adyacente a un extremo 3', en presencia de moléculas que comprenden la secuencia diana no adyacente a un extremo 3' sino incluida dentro de la molécula, comprendiendo el procedimiento

(i) poner en contacto la muestra con un oligonucleótido molde que tiene

(a) una región 3' sustancialmente complementaria a la secuencia diana adyacente al extremo 3' de una molécula de ácido nucleico;

(b) una cola 5' que comprende una secuencia de ácido nucleico tal que se forma una cola 5' libre cuando el oligonucleótido molde hibrida con la secuencia diana localizada adyacente a un extremo 3' o incluida dentro de una molécula de ácido nucleico, proporcionando la cola 5' un molde para la extensión del extremo 3' de la secuencia diana que incorpora la secuencia complementaria a la cola 5' del oligonucleótido molde provocando la adición de la secuencia complementaria a la cola 5' a la secuencia diana; y

(c) una modificación en la región 3' que retarda la extensión 3' de dicho oligonucleótido molde;

(ii) poner en contacto la muestra con un segundo oligonucleótido para cebar en una dirección inversa el oligonucleótido molde, y opcionalmente un tercer oligonucleótido que comparte la secuencia de nucleótidos con la cola 5' del oligonucleótido molde; y

(iii) realizar la amplificación de la muestra en la que

(a) la hibridación del oligonucleótido molde con la secuencia diana adyacente a un extremo 3' se estabiliza durante la hibridación de dicho oligonucleótido con la secuencia diana no adyacente a un extremo 3' por copiado de la cola 5' del oligonucleótido molde por extensión desde el extremo 3' de la secuencia diana en presencia de extensión 3' retardada de dicho oligonucleótido; y

(b) la consecuente hibridación del oligonucleótido molde estabilizada con la secuencia diana adyacente a un extremo 3' potencia la eficacia de la extensión 3' del oligonucleótido molde en comparación con la extensión del oligonucleótido molde hibridado con la secuencia diana no adyacente a un extremo 3', y

(c) la amplificación sucede usando el oligonucleótido molde y/o el tercer oligonucleótido en combinación con el segundo oligonucleótido, provocando la amplificación selectiva de la secuencia diana adyacente a un extremo 3' en presencia de moléculas de ácido nucleico que comprende la secuencia diana incluida dentro de la molécula.

Las moléculas de ácido nucleico pueden ser ADN (incluyendo ADNc) o ARN, o pueden ser moléculas que comprenden una combinación de desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o análogos de nucleótidos naturales.

De acuerdo con los procedimientos de la presente invención, la amplificación selectiva de moléculas de ácido nucleico escindidas en presencia de moléculas de ácido nucleico de ADN no escindidas que comparten la misma secuencia diana puede conseguirse, cuando como resultado de la escisión, la secuencia diana está adyacente a un extremo 3'.

Otra realización de la presente invención proporciona un procedimiento para la amplificación selectiva de una muestra, de una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia diana adyacente a un extremo 3' resultado de la escisión de la molécula, en presencia de moléculas no escindidas que comprenden la secuencia diana incluida dentro de la molécula, comprendiendo el procedimiento:

(i) poner en contacto la muestra con un oligonucleótido molde que tiene

(a) una región 3' sustancialmente complementaria a la secuencia diana adyacente al extremo 3' de una molécula de ácido nucleico;

(b) una cola 5' que comprende una secuencia de ácido nucleico tal que se forma una cola 5' libre cuando el oligonucleótido molde hibrida con las moléculas de ácido nucleico escindidas o no escindidas, proporcionando la cola 5' un molde para la extensión del extremo 3' de la secuencia diana que incorpora la secuencia complementaria a la cola 5' del oligonucleótido molde provocando la adición de la secuencia complementaria a la cola 5' a la secuencia diana; y

(c) una modificación en la región 3' que retarda la extensión 3' del oligonucleótido molde;

(ii) poner en contacto la muestra con un segundo oligonucleótido para cebar en una dirección inversa el oligonucleótido molde, y opcionalmente un tercer oligonucleótido que comparte la secuencia de nucleótidos con la cola 5' del oligonucleótido molde; y

(iii) realizar la amplificación de la muestra en la que

(a) la hibridación del oligonucleótido molde con la secuencia diana adyacente a un extremo 3' resultado de la escisión de una molécula de ácido nucleico, se estabiliza sobre la hibridación de dicho oligonucleótido con la secuencia diana no adyacente a un extremo 3' en una molécula de ácido nucleico no escindida por copiado de la cola 5' del oligonucleótido molde por extensión desde el extremo 3' de la secuencia diana en presencia de la extensión 3' retardada de dicho oligonucleótido; y

(b) la consecuente hibridación del oligonucleótido molde estabilizada con la molécula de ácido nucleico escindida potencia la eficacia de la extensión 3' del oligonucleótido molde en comparación con la extensión de dicho oligonucleótido hibridado con una molécula de ácido nucleico no escindida, y

(c) la amplificación sucede usando el oligonucleótido molde y/o el tercer oligonucleótido en combinación con el segundo oligonucleótido, provocando la amplificación selectiva de la secuencia diana adyacente a un extremo 3' sobre la secuencia diana incluida dentro de una molécula de ácido nucleico, provocando la amplificación selectiva de moléculas de ácido nucleico escindidas sobre moléculas de ácido nucleico no escindidas.

Las moléculas de ácido nucleico escindidas y no escindidas pueden ser moléculas de ADN.

Además de la diferenciación de moléculas de ácido nucleico que tienen la secuencia diana adyacente a un extremo 3' de moléculas de ácido nucleico que tienen la secuencia diana incluida dentro de la molécula, el oligonucleótido molde permite la diferenciación entre moléculas de ácido nucleico que difieren en la secuencia adyacente al extremo 3', es decir, la diferenciación entre extremos 3'. Esto se debe al oligonucleótido molde que comprende en la región 3' la secuencia de nucleótidos específica para una secuencia diana, como es el caso habitual para los cebadores oligonucleotídicos específicos de secuencia. Por tanto, se consigue la selección de la secuencia diana adyacente a un extremo 3' entre los diversos extremos 3' en una muestra. Notablemente, debido a la formación de una cola 5' cuando el oligonucleótido molde hibrida con una molécula de ácido nucleico, los desapareamientos entre el oligonucleótido molde y la secuencia de ácido nucleico adyacente a un extremo 3' impedirán el copiado de la cola 5', ya que estará impedida la extensión del extremo 3' de la secuencia de ADN diana. Esta disposición puede utilizarse para diseñar oligonucleótidos molde que no solamente distinguirán la secuencia diana adyacente a un extremo 3' de la secuencia diana incluida (mediante la cola 5'), sino que también distinguirán entre extremos 3' donde existen variaciones en la secuencia adyacente al extremo 3'.

Otra realización de la presente invención proporciona un procedimiento para la amplificación selectiva de una muestra, de una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia diana adyacente a un extremo 3', en presencia de una población mixta de extremos 3', comprendiendo el procedimiento

(i) poner en contacto la muestra con un oligonucleótido molde que tiene

(a) una región 3' sustancialmente complementaria a la secuencia diana adyacente al extremo 3';

(b) una cola 5' que comprende una secuencia de ácido nucleico tal que se forma una cola 5' libre cuando el oligonucleótido molde hibrida con la secuencia diana adyacente a un extremo 3', proporcionando la cola 5' un molde para la extensión del extremo 3' de la secuencia diana que incorpora la secuencia complementaria a la cola 5' del oligonucleótido molde provocando la adición de la secuencia complementaria a la cola 5' a la secuencia diana; y

(c) una modificación en la región 3' que retarda la extensión 3' de dicho oligonucleótido;

(ii) poner en contacto la muestra con un segundo oligonucleótido para cebar en una dirección inversa el oligonucleótido molde, y opcionalmente un tercer oligonucleótido que comparte la secuencia de nucleótidos con la cola 5' del oligonucleótido molde; y

(iii) realizar la amplificación de la muestra en la que

(a) la hibridación específica del oligonucleótido molde con la secuencia diana adyacente a un extremo 3' se estabiliza sobre la hibridación del oligonucleótido molde con la secuencia no complementaria adyacente a un extremo 3', por copiado de la cola 5' del oligonucleótido molde por extensión desde el extremo 3' de la secuencia diana en presencia de extensión 3' retardada del oligonucleótido molde; y

(b) la consecuente hibridación del oligonucleótido molde estabilizada con la secuencia diana adyacente a un extremo 3' potencia la eficacia de la extensión 3' del oligonucleótido molde en comparación con la extensión de dicho oligonucleótido hibridado con la secuencia no complementaria adyacente a un extremo 3', y

(c) la amplificación sucede usando el oligonucleótido molde y/o el tercer oligonucleótido en combinación con el segundo oligonucleótido, provocando la amplificación selectiva de la secuencia diana adyacente a un extremo 3' en presencia de una población mixta de extremos 3'.

Las moléculas de ácido nucleico pueden ser moléculas de ADN.

El oligonucleótido molde puede incluir bases modificadas dentro de su región 3' que cuando hibrida en el

extremo 3' de una molécula de ácido nucleico bloqueará la extensión 3' de esa molécula.

Preferiblemente, la modificación 3' que retarda la extensión 3' del oligonucleótido molde incluye la incorporación de un desapareamiento del nucleótido 3' terminal, una delección o una inserción en la región 3' del oligonucleótido molde cerca del extremo 3', una combinación de éstas, o cualquier otra modificación que provoque la extensión 3' retardada del oligonucleótido molde.

El copiado de la cola 5' por extensión del extremo 3' de la secuencia diana conduce a la amplificación selectiva de la molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia diana localizada adyacente a un extremo 3'. En ausencia del copiado de la cola 5', la extensión 3' del oligonucleótido molde hibridado o no sucede o sucede a una velocidad insignificante debido a la modificación en la región 3' del oligonucleótido molde que retarda o impide la extensión 3', desestabilizando la hibridación del oligonucleótido molde. Por lo tanto, el copiado de la cola 5' potenciará la hibridación y de este modo aumentará la eficacia de la extensión 3' del oligonucleótido molde.

La amplificación selectiva de la secuencia diana localizada adyacente a un extremo 3' también puede conseguirse bloqueando la extensión 3' del oligonucleótido molde. Cuando se bloquea la extensión 3' de un oligonucleótido molde, se utiliza un tercer oligonucleótido adicional que comparte la secuencia con la cola 5' del oligonucleótido molde en la reacción de amplificación para permitir que proceda la amplificación termocíclica. Por tanto, no puede suceder la extensión 3' del oligonucleótido molde que hibrida con la secuencia diana incluida dentro de una molécula de ácido nucleico porque la extensión está bloqueada pero, de forma más importante, porque no tiene lugar el copiado de la cola 5' y, por consiguiente, la amplificación del ácido nucleico usando el tercer oligonucleótido no amplificará la secuencia diana localizada dentro de una molécula de ácido nucleico.

Una variación el procedimiento en la que puede suceder la extensión 3' del oligonucleótido molde, pero aún se consigue la amplificación selectiva de acuerdo con la invención, implica el uso de un oligonucleótido molde modificado dentro de la secuencia diana para evitar el retro-copiado al oligonucleótido después de la amplificación. Las modificaciones que evitan el copiado incluyen la inserción dentro de la región 3' del oligonucleótido molde de uno o más análogos de bases o uno o más sitios abásicos, o cualquier combinación de éstos, que impiden o bloquean el copiado del oligonucleótido por la polimerasa particular empleada en el ensayo. Como resultado, los productos de extensión del oligonucleótido molde no pueden copiarse en un posterior ciclo de PCR. Por ejemplo, si se usa la ADN polimerasa Taq en la amplificación de ADN, la sustitución de nucleótidos de ADN con nucleótidos de ARN tales como 2 - O-metil nucleótidos de ARN aún permitirá la hibridación del oligonucleótido molde con secuencia diana. Sin embargo, el retro-copiado al oligonucleótido molde se bloqueará o será ineficaz debido a la presencia de los nucleótidos modificados. Las copias incompletas no participarán en ciclos de amplificación adicionales. Para permitir que proceda el termociclado, se utiliza un tercer oligonucleótido que comparte la secuencia con la cola 5' del oligonucleótido molde, y por tanto solamente se amplificarán las moléculas de ácido nucleico que tienen la secuencia diana adyacente a un extremo 3', que se extiende 3' complementaria a la cola 5'.

La presente invención proporciona un procedimiento para la amplificación selectiva de una muestra de una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia diana adyacente a un extremo 3', comprendiendo el procedimiento

(i) poner en contacto la muestra con un oligonucleótido molde que tiene

(a) una región 3' sustancialmente complementaria a la secuencia diana adyacente al extremo 3' de una molécula de ácido nucleico; y

(b) una cola 5' que comprende una secuencia de ácido nucleico tal que se forma una cola 5' libre cuando el oligonucleótido molde hibrida con la secuencia diana localizada adyacente a un extremo 3', proporcionando la cola 5' un molde para la extensión del extremo 3' de la secuencia diana que incorpora la secuencia complementaria a la cola 5' del oligonucleótido molde provocando la adición de la secuencia complementaria a la cola 5' a la secuencia diana; y

(c) una modificación en la región 3' que bloquea la extensión 3' de dicho oligonucleótido molde, o una modificación en la región de hibridación del oligonucleótido molde que permite la extensión 3' pero impide o bloquea el copiado en la región 3' de dicho oligonucleótido;

(ii) poner en contacto la muestra con un segundo oligonucleótido para cebar en una dirección inversa el oligonucleótido molde;

(iii) poner en contacto la muestra con un tercer oligonucleótido que comparte la secuencia de nucleótidos con la cola 5' del oligonucleótido molde y a partir del cual la extensión 3' procede sin impedimentos;

(iv) realizar la amplificación de la muestra en la que

(a) la hibridación del oligonucleótido molde con las moléculas de ácido nucleico en la muestra está seguida del copiado de la cola 5' del oligonucleótido molde cuando el oligonucleótido molde hibrida con la secuencia diana adyacente a un extremo 3' pero no en presencia de extensión 3' bloqueada del oligonucleótido molde, o en presencia de extensión 3' no impedida de un oligonucleótido molde a partir de cual está impedido o bloqueado el copiado posterior; y

(b) en la que la amplificación procede con el segundo y tercer oligonucleótidos, que amplifican selectivamente la secuencia diana localizada adyacente a un extremo 3' debido a la cola 5' copiada.

Por consiguiente, una realización de la presente invención proporciona un procedimiento para la amplificación selectiva de una muestra de una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia diana adyacente a un extremo 3' en presencia de moléculas que comprenden la secuencia diana no adyacente a un extremo 3' sino incluida dentro de la molécula, comprendiendo el procedimiento

(i) poner en contacto la muestra con un oligonucleótido molde que tiene

(a) una región 3' sustancialmente complementaria a la secuencia diana adyacente al extremo 3' de una molécula de ácido nucleico;

(b) una cola 5' que comprende una secuencia de ácido nucleico tal que se forma una cola 5' libre cuando el oligonucleótido molde hibrida con la secuencia diana localizada adyacente a un extremo 3' o incluida dentro de una molécula de ácido nucleico, proporcionando la cola 5' un molde para la extensión del extremo 3' de la secuencia diana que incorpora la secuencia complementaria a la cola 5' del oligonucleótido molde provocando la adición de la secuencia complementaria a la cola 5' a la secuencia diana; y

(c) una modificación en la región 3' que bloquea la extensión 3' de dicho oligonucleótido molde, o una modificación en la región de hibridación del oligonucleótido molde que permite la extensión 3' pero que impide o bloquea el copiado de dicho oligonucleótido en la región 3' de dicho oligonucleótido;

(ii) poner en contacto la muestra con un segundo oligonucleótido para cebar en una dirección inversa el oligonucleótido molde;

(iii) poner en contacto la muestra de ADN con un tercer oligonucleótido que comparte la secuencia de nucleótidos con la cola 5' del oligonucleótido molde y a partir del cual la extensión 3' procede sin impedimentos; y

(iv) realizar la amplificación de la muestra, en la que

(a) la hibridación del oligonucleótido molde con las moléculas de ácido nucleico en la muestra está seguida del copiado de la cola 5' del oligonucleótido molde cuando el oligonucleótido molde hibrida con la secuencia diana adyacente a un extremo 3' pero no cuando el oligonucleótido molde hibrida con la secuencia diana incluida dentro de una molécula de ácido nucleico, en presencia de extensión 3' bloqueada del oligonucleótido molde, o en presencia de extensión 3' sin impedimentos de un oligonucleótido molde a partir del cual el copiado posterior está impedido o bloqueado; y

(b) la amplificación procede con el segundo y tercer oligonucleótidos, que amplifica selectivamente la secuencia diana localizada adyacente a un extremo 3' debido a la cola 5' copiada, no procediendo la amplificación de la secuencia diana incluida dentro de una molécula de ácido nucleico debido a la ausencia de copiado de la cola 5' y a la extensión 3' bloqueada del oligonucleótido molde, o el copiado bloqueado del oligonucleótido molde.

En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la amplificación selectiva de una muestra, de una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia diana adyacente a un extremo 3', siendo el extremo el resultado de la escisión de la molécula, en presencia de moléculas de ácido nucleico no escindidas que comprenden la secuencia diana incluida dentro de la molécula, comprendiendo el procedimiento:

(i) poner en contacto la muestra de ADN con un oligonucleótido molde que tiene

(a) una región 3' sustancialmente complementaria a la secuencia diana adyacente al extremo 3' de una molécula de ácido nucleico;

(b) una cola 5' que comprende una secuencia de ácido nucleico tal que se forma una cola 5' libre cuando el oligonucleótido molde hibrida con moléculas de ácido nucleico escindidas o no escindidas, proporcionando la cola 5' un molde para la extensión del extremo 3' de la secuencia diana que incorpora la secuencia complementaria a la cola 5' del oligonucleótido molde provocando la adición de la secuencia complementaria a la cola 5' a la secuencia diana; y

(c) una modificación 3' que bloquea la extensión 3' de dicho oligonucleótido molde; o una modificación en la región de hibridación del oligonucleótido molde que permite la extensión 3' pero impide o bloquea el copiado de dicho oligonucleótido en la región 3' de dicho oligonucleótido;

(ii) poner en contacto la muestra con un segundo oligonucleótido para cebar en una dirección inversa el oligonucleótido molde;

(iii) poner en contacto la muestra con un tercer oligonucleótido que comparte la secuencia de nucleótidos con la cola 5' del oligonucleótido molde y a partir del cual la extensión 3' procede sin impedimentos; y

(iv) realizar la amplificación de la muestra, en la que

(a) la hibridación del oligonucleótido molde con la secuencia diana adyacente a un extremo 3' resultado de la escisión de una molécula de ácido nucleico está seguida del copiado de la cola 5' del oligonucleótido molde pero no cuando el oligonucleótido molde hibrida con la secuencia diana incluida dentro de una molécula de ácido nucleico sin escindir, en presencia de extensión 3' bloqueada de dicho oligonucleótido, o en presencia de extensión 3' sin impedimentos de un oligonucleótido molde a partir del cual el copiado posterior está impedido o bloqueado; y

(b) la amplificación procede con el segundo y tercer oligonucleótidos, que amplifican selectivamente la secuencia diana adyacente a un extremo 3' debido a la cola 5' copiada, no procediendo la amplificación de la secuencia diana incluida dentro de una molécula no escindida debido a la ausencia de copiado de la cola 5' y a la extensión 3' bloqueada del oligonucleótido molde, o el copiado bloqueado del oligonucleótido molde, provocando la amplificación selectiva de moléculas de ácido nucleico escindidas sobre moléculas de ácido nucleico no escindidas.

En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la amplificación selectiva de una muestra de una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia diana adyacente a un extremo 3', en presencia de una población mixta de moléculas que tienen diferentes extremos 3', comprendiendo el procedimiento

(i) poner en contacto la muestra con un oligonucleótido molde que tiene

(a) una región 3' sustancialmente complementaria a la secuencia diana adyacente al extremo 3';

(b) una cola 5' que comprende una secuencia de ácido nucleico tal que se forma una cola 5' libre cuando el oligonucleótido molde hibrida con la secuencia diana adyacente a un extremo 3', proporcionando la cola 5' un molde para la extensión del extremo 3' de la secuencia diana que incorpora la secuencia complementaria a la cola 5' del oligonucleótido molde provocando la adición de la secuencia complementaria a la cola 5' a la secuencia diana; y

(c) una modificación en la región 3' que bloquea la extensión 3' del oligonucleótido molde, o una modificación en la región de hibridación del oligonucleótido molde que permite la extensión 3' pero impide o bloquea el copiado de dicho oligonucleótido en la región 3' de dicho oligonucleótido;

(ii) poner en contacto la muestra con un segundo oligonucleótido para cebar en una dirección inversa el oligonucleótido molde;

(iii) poner en contacto la muestra de ADN con un tercer oligonucleótido que comparte la secuencia de nucleótidos con la cola 5' del oligonucleótido molde y a partir del cual la extensión 3' procede sin impedimentos; y

(iv) realizar la amplificación de la muestra, en la que

(a) la hibridación del oligonucleótido molde específica con la secuencia diana está seguida del copiado de la cola 5' del oligonucleótido molde cuando el oligonucleótido molde hibrida con la secuencia diana adyacente a un extremo 3' pero no cuando el oligonucleótido molde hibrida con una secuencia no complementaria adyacente a un extremo 3', en presencia de extensión 3' bloqueada del oligonucleótido molde, o en presencia de extensión 3' sin impedimentos de un oligonucleótido molde a partir del cual el copiado posterior está impedido o bloqueado; y

(b) la amplificación procede con el segundo y tercer oligonucleótidos que amplifican selectivamente la secuencia diana localizada adyacente a un extremo 3' debido a la secuencia de la cola 5' copiada, no procediendo la amplificación de la secuencia no complementaria adyacente a un extremo 3' debido a la ausencia del copiado de la cola 5' y a la extensión 3' bloqueada del oligonucleótido molde, o el copiado bloqueado del oligonucleótido molde, provocando la amplificación selectiva de la secuencia diana adyacente a un extremo 3' en presencia de una población mixta de extremos 3'.

La molécula de ácido nucleico puede ser moléculas de ADN.

El oligonucleótido molde puede incluir bases modificadas dentro de su región 3' que cuando hibrida en el extremo 3' de una molécula de ácido nucleico bloqueará la extensión 3' de esa molécula.

Preferiblemente, la modificación 3' que bloquea la extensión 3' del oligonucleótido molde incluye la incorporación de uno o más restos o análogos de nucleótidos no extensibles en el extremo 3', por ejemplo, una única base o análogo de base no extensible 3' terminal, una combinación de una base no extensible 3' terminal y desapareamientos de nucleótido en la región 3' del oligonucleótido molde cerca del extremo 3', o la incorporación de sitios abásicos en la región 3' del oligonucleótido molde cerca del extremo 3'. Más preferiblemente, la base no extensible se selecciona entre un 2', 3' didesoxinucleótido, un espaciador C3, C18 3' u otro más largo, un nucleótido 3' fosforilado, una base de "ácido peptidenucleico", una base de "ácido nucleico bloqueado" (LNA), un derivado amina de nucleótidos, uracilo tratado con uracil ADN glucosilasa, ARN o un resto de 2' O-metil ARN, o una combinación de éstos.

Los especialistas en la técnica apreciarán que pueden ser adecuados otros procedimientos para bloquear la extensión dependiendo de la identidad de la polimerasa utilizada. Por ejemplo, podría usarse una base de fosfortioato en combinación con un desapareamiento de nucleótidos para bloquear la extensión en casos en los que se desea usar una polimerasa con revisión de prueba.

Preferiblemente, el segundo oligonucleótido es un oligonucleótido molde adicional, es decir, que tiene características del oligonucleótido molde, o es un oligonucleótido no de molde, por ejemplo, que consiste en una única región de secuencia de nucleótidos complementaria al producto de extensión del oligonucleótido molde en el caso en el que la extensión 3' del oligonucleótido molde está solamente retardada en lugar de bloqueada, o consta de una única región de secuencia de nucleótidos complementaria al producto de extensión del tercer oligonucleótido en el caso en el que la extensión 3' del oligonucleótido molde está bloqueada.

En una realización preferida, el extremo 3' de una molécula de ADN amplificada por ES-PCR es el resultado de escisión por endonucleasas de restricción específicas de secuencia. Más preferiblemente, las endonucleasas de restricción son enzimas de restricción sensibles a metilación específicas de secuencia, que permiten la amplificación selectiva, de acuerdo con los procedimientos de la invención, de ADN no metilado sobre ADN metilado, o viceversa, dependiendo del uso de las enzimas de restricción inhibidas por la metilación del ADN, tales como HpaII, HhaI, BstII, NotI, SmaI y SacII, o enzimas de restricción que cortan selectivamente ADN metilado, tales como GluI, y BspI. De este modo, los procedimientos de la invención permiten la detección de diferencias en el estado de metilación entre dos muestras de ADN, proporcionando un enfoque para la detección de tejido enfermo en el que un cambio en la metilación está asociado con una patología. Por ejemplo, cambios en el estado de metilación que implican tanto la desmetilación del ADN como la hipermetilación de otras secuencias de ADN específicas están asociados con la transformación de células en el estado canceroso. Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un kit para la amplificación selectiva de ADN escindido a partir de una muestra de ADN que comprende ADN escindido y no escindido, comprendiendo el kit (i) un oligonucleótido molde, (ii) un segundo oligonucleótido, y (iii) un tercer oligonucleótido; de acuerdo con la invención.

En una realización preferida adicional, el sitio de escisión de ADN se selecciona para distinguir la presencia o ausencia de un sitio de restricción, permitiendo de este modo la detección de diferencias de secuencia entre muestras de ADN, tal como la detección de polimorfismos o mutaciones de un único nucleótido. Por consiguiente, los procedimientos de la invención permiten el genotipado para propósitos de formación de huellas genéticas o el diagnóstico de enfermedades genéticas asociadas con alteraciones en la secuencia genómica o la detección de mutaciones específicas que pueden ser indicativas de células cancerosas.

La detección de inestabilidad en repeticiones simples de nucleótidos, incluyendo repeticiones de mononucleótidos, tal como la delección de una o más pares de bases, puede conseguirse de acuerdo con una realización adicional de la invención. La presencia de una secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción cerca de una repetición de mononucleótidos para una enzima de restricción que tiene un sitio de escisión a una distancia definida fuera de su secuencia de reconocimiento, en este documento mencionada como 'cortadora flanqueante', puede utilizarse para distinguir la presencia de variantes de delección. Si dicho sitio de restricción no está convenientemente localizado cerca de una repetición de mononucleótidos, puede introducirse, por una primera ronda de PCR, por ejemplo. Cuando ha sucedido una delección de pares de bases entre el sitio de escisión y la secuencia de reconocimiento, el producto de digestión del ADN de repetición no delecionado diferirá en la secuencia de nucleótidos adyacente al extremo 3' del producto de digestión de ADN de repetición delecionado. Esto es porque la delección de uno o más pares de bases provocará un desplazamiento en la dirección 3' del sitio de escisión, provocando necesariamente un cambio en la secuencia en el sitio de escisión. Por tanto, el diseño de oligonucleótidos molde que hibridan específicamente con variantes de delección puede usarse para detectar dichas variantes.

Por ejemplo, el oligonucleótido molde puede incorporar un tramo de repetición de mononucleótidos complementaria que aparea con el de un fragmento de ADN resultante de la digestión de una variante de delección en la que se ha delecionado al menos un par de bases de la secuencia de repetición. La secuencia de repetición del oligonucleótido molde permitirá la hibridación con una secuencia de repetición complementaria adyacente al extremo 3' de un fragmento de digestión, pero solamente permitirá la extensión 3' del fragmento de digestión de la variante de delección. Esto es porque el fragmento que surge del ADN de repetición no delecionado necesariamente tendrá una secuencia de nucleótidos distinta a la de la variante de delección, provocando uno o más desapareamientos entre el oligonucleótido molde y el extremo 3' del fragmento de digestión, y evitando de este modo la extensión 3' del fragmento de digestión del ADN de repetición no delecionado. Este diseño del oligonucleótido molde no alterará su capacidad de amplificar selectivamente un ADN diana localizado adyacente a un extremo 3' sobre la misma secuencia diana incluida dentro de una molécula de ADN, pero demuestra la capacidad añadida de distinguir entre ADN que tienen ciertos extremos 3'.

Esté el sitio de restricción localizado dentro de una secuencia de repetición o cadena abajo de la secuencia de repetición, un cambio en la longitud de una secuencia de repetición provocará un cambio en el sitio de escisión de enzimas de restricción, produciendo un fragmento que tienen una secuencia diferente a la del fragmento generado a partir del ADN de repetición que no experimentó una delección.

La detección de inestabilidad en repeticiones de mononucleótidos tal como la delección de una o más repeticiones proporciona un enfoque para medir la inestabilidad de microsatélites, como se ha indicado que sucede en los microsatélites de células tumorales. Quedaría claro para los especialistas en la técnica que esta realización particular de la invención se aplica igualmente a la detección de inestabilidad en dinucleótidos u otras repeticiones tales como repeticiones de trinucleótidos y tetranucleótidos donde un sitio de reconocimiento de enzimas de restricción está

apropiadamente localizado (o introducido) como se ha descrito.

Las realizaciones de la invención que utilizan cortadoras flanqueantes también pueden aplicarse a la detección de una inserción de pares de bases en una molécula de ácido nucleico.

5 Cuando se produce un ácido nucleico variante a partir de la inserción de pares de bases, sucederá un desplazamiento en el sitio de escisión en dirección 5', produciendo de este modo una secuencia diferente adyacente al extremo 3' resultante de la escisión que si no existiera inserción. Sería evidente para los especialistas en la técnica que el uso de cortadoras flanqueantes podría aplicarse a la detección de una delección o inserción en cualquier molécula de ácido nucleico, y que la aplicación de cortadoras flanqueantes no está limitada a la detección de delecciones en secuencia de repeticiones de mononucleótidos sino que se aplica igualmente a cualquier molécula de ácido nucleico variante resultante de una delección o inserción de una o más pares de bases.

10 Por consiguiente, un aspecto adicional de la invención proporciona un procedimiento para detectar la presencia o ausencia de una delección o inserción en una molécula de ácido nucleico en una muestra en la que existe delección o inserción entre un sitio de reconocimiento de enzimas de restricción y su sitio de escisión localizado fuera del sitio de reconocimiento a una distancia definida, como se expone en la reivindicación 20.

15 Los procedimientos de la invención pueden utilizarse para la detección y cuantificación de variantes de transcritos de ARN. El ARNm copiado a ADNc comprenderá una población de ADNc que tienen una variedad de extremos 3' de acuerdo con su correspondiente secuencia de ARNm 5'. Cuando se conocen las secuencias exónicas, pueden prepararse oligonucleótidos molde que distinguirán entre ARNm con corte y empalme alternativo, de acuerdo con la identidad de secuencia del primer exón.

20 La cola 5' del oligonucleótido molde de acuerdo con la presente invención proporciona un molde para la extensión del extremo 3' de la secuencia diana solamente cuando el oligonucleótido molde hibrida con moléculas de ácido nucleico que tienen la secuencia diana adyacente a un extremo 3'. La extensión del extremo 3' de la secuencia diana complementaria a la cola 5' del oligonucleótido molde provoca la adición de la secuencia complementaria a la cola 5' a la secuencia diana. Por tanto, siguiendo las condiciones de reacción que permiten la hibridación del oligonucleótido molde con la secuencia diana y la extensión 3' de la secuencia diana complementaria a la cola 5' del oligonucleótido molde, las moléculas de ácido nucleico de la muestra que originalmente tienen la secuencia diana adyacente a un extremo 3' ahora también incluyen la secuencia 5' adicional de la secuencia diana que es complementaria a la cola 5' del oligonucleótido molde. Esta secuencia complementaria a la cola 5' puede utilizarse para detectar aquellas moléculas que se originaron en la muestra teniendo la secuencia diana adyacente a un extremo 3'.

30 Por consiguiente, en este documento se describe un procedimiento para detectar en una muestra una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia diana adyacente a un extremo 3', comprendiendo el procedimiento:

(i) poner en contacto la muestra con un oligonucleótido molde que tiene

(a) una región 3' sustancialmente complementaria a la secuencia diana adyacente al extremo 3' de una molécula de ácido nucleico,

35 (b) una cola 5' que comprende una secuencia de ácido nucleico tal que se forma una cola 5' libre cuando el oligonucleótido molde hibrida con la secuencia diana localizada adyacente a un extremo 3', proporcionando la cola 5' un molde para la extensión del extremo 3' de la secuencia diana que incorpora la secuencia complementaria a la cola 5' del oligonucleótido molde provocando la adición de la secuencia complementaria a la cola 5' a la secuencia diana, y

(c) una modificación en la región 3' que retarda la extensión 3' de dicho oligonucleótido molde;

40 (ii) proporcionar condiciones de reacción para permitir la hibridación del oligonucleótido molde con la muestra, donde la hibridación del oligonucleótido molde con la secuencia diana adyacente a un extremo 3' permite la posterior extensión 3' de la secuencia diana complementaria a la cola 5';

(iii) proporcionar condiciones de reacción para permitir la extensión 3' de la secuencia diana complementaria a la cola 5', en presencia de extensión 3' retardada o bloqueada de dicho oligonucleótido; y

45 (iv) detectar las moléculas de ácido nucleico que tienen la secuencia diana adyacente a un extremo 3' por

(1) detección de la secuencia de ácido nucleico complementaria a la cola 5' del oligonucleótido molde resultante de la extensión 3' de la secuencia diana adyacente a un extremo 3'; o

50 (2) uso de la secuencia de ácido nucleico complementaria a la cola 5' del oligonucleótido molde resultante de la extensión 3' de la secuencia diana adyacente a un extremo 3', para copiar la molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia diana adyacente a un extremo 3'.

La detección de la secuencia de ácido nucleico complementaria la cola 5' del oligonucleótido molde puede conseguirse a través de cualquier medio conocido para detectar una molécula de ácido nucleico de secuencia conocida,

por ejemplo, por marcaje directo de la reacción de extensión 3' de la secuencia diana complementaria a la cola 5' con un nucleósido trifosfato radiomarcado o marcado de forma fluorescente tal como $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP o Cy5-dCTP o un nucleósido trifosfato biotinilado, o por captura de la secuencia complementaria incorporada con una sonda específica de secuencia a través de hibridación, o a través de captura directa de la secuencia de ácido nucleico complementaria a la cola 5' del oligonucleótido molde.

La secuencia de ácido nucleico complementaria a la cola 5' del oligonucleótido molde puede utilizarse para copiar moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia diana adyacente a un extremo 3' por una diversidad de medios. Por ejemplo puede usarse un cebador complementario a la secuencia incorporada para cebar la síntesis que se extenderá de nuevo a través de la secuencia diana. Como alternativa, la cola 5' del oligonucleótido molde puede proporcionar un promotor y sitio de inicio para una polimerasa tal como la ARN polimerasa T7 de modo que la adición de la secuencia complementaria a la cola 5' proporcione un molde para el copiado a través de la secuencia diana por la polimerasa. Las moléculas de ácido nucleico copiadas que tienen la secuencia diana adyacente a un extremo 3' pueden detectarse por cualquier medio conocido para detectar una molécula de ácido nucleico de secuencia conocida, tal como los enfoques citados anteriormente incluyendo hibridación y PCR.

Quedaría bastante claro para los especialistas en la técnica que un ADNc copiado a partir de ARN es un ácido nucleico adecuado para los propósitos de la presente invención.

En toda esta memoria descriptiva, salvo que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que las palabras "comprende", "comprenden" y "comprendiendo" implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elemento indicado pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos.

Los artículos "un" y "una" se usan en este documento para hacer referencia a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática del principio de la PCR específica de extremo para amplificar de forma selectiva un ADN escindido sobre un ADN no escindido.

Figura 2: Sitios del cebador para 21qTFMLHC/T y 21qTRC sobre ADN escindido con BstIU y ADN no escindido (secuencia repetida en tándem sobre el cromosoma humano 21 en la banda 21q22.3), cebador oligonucleotídico específico de extremo correspondiente que tiene un desapareamiento del nucleótido 3' terminal, y un segundo cebador oligonucleotídico para el cebado en dirección inversa, de acuerdo con una realización de la presente invención.

Figura 3: Curvas de amplificación y Tablas que muestran los valores de Ct para (i) ADN completamente metilado (CpGenome™, Chemicon International, Inc.) y ADN hipometilado K562; (ii) ADN de las muestras normales apareadas y de tejido de tumor colorrectal 29/99 y 30/99, respectivamente; (iii) muestras normales apareadas y de tejido de cáncer colorrectal 34/03 y 35/03, respectivamente.

Figura 4A: Sitios del cebador para el cebador directo 21qTFMLHC/T y el cebador inverso 21qTRM13, ambos oligonucleótidos molde específicos de extremo, en una secuencia repetida en tándem sobre el cromosoma humano 21 en la banda 21q22.3.

Figura 4B: Tabla que muestra los valores de Ct y las curvas de amplificación con SYBR Green que muestran la detección de ADN K562 hipometilado mucho antes que ADN completamente metilado. Se detecta claramente un nivel del 0,1% de muestra de ADN K562, un único equivalente de genoma, 7 ciclos antes de la muestra que contiene solamente ADN completamente metilado.

Figura 5A: Sitios del cebador para MycRM1, un oligonucleótido molde específico de extremo que tiene un desapareamiento del nucleótido 3' terminal y el cebador inverso MycFC1, dentro del gen Myc marcado como diana en un sitio HpaII que se ha descubierto que se hipometila en cáncer colorrectal (Sharrard y col. 1992).

Figura 5B: Tabla de los valores de Ct y curvas de amplificación que muestran la detección de ADN myc hipometilado en ADN K562 en comparación con el ADN completamente metilado de CpGenome™; y la detección de la metilación reducida en el sitio HpaII en tejido de tumor colorrectal 35/03 en comparación con su muestra normal apareada 34/03.

Figura 6A: Sitios del cebador para marcar como diana la región 5' (promotor) del elemento retrotransponible LINE, oligonucleótidos molde de inserción correspondientes que actúan como cebadores de amplificación directo e inverso, y la secuencia de nucleótidos de la sonda LPA-Hex marcada con HEX.

Figura 6B: Curvas de amplificación y Tablas que muestran los valores de Ct para la amplificación a partir de ADN K562 sustancialmente hipometilado o a partir de ADN completamente metilado, detectado con SYBR Green o la sonda marcada con HEX.

Figura 7A: Sitios del cebador para marcar como diana el primer sitio BstUI en la secuencia consenso de elementos Alu con un oligonucleótido molde con extensión 3' bloqueada por un grupo fosfato, y el segundo cebador oligonucleotídico correspondiente para el cebado en dirección inversa, y el cebador JOELUX para el cebador en dirección directa, de acuerdo con una realización de la presente invención.

Figura 7B: Curvas de amplificación y Tabla que muestra los valores de Ct para la amplificación a partir de ADN K562 sustancialmente hipometilado o a partir de ADN CpGenome metilado.

Figura 8A: Sitios del cebador para marcar como diana ADN metilado a través de un sitio Glal dentro de la isla CpG del gen hMLH1. El oligonucleótido molde incorpora 3 desapareamientos en su extremo 3', dos de los cuales se convierten en sitios abásicos cuando se digieren por uracil ADN glucosilasa, cebador inverso MLHRev3 correspondiente, y cebador LUX directo, de acuerdo con una realización de la presente invención.

Figura 8B: Curvas de amplificación y Tabla que muestra los valores de Ct para la amplificación de ADN CpGenome metilado o ADN no metilado.

Figura 9A: Detección de una mutación puntual en el gen BRAF. Se usó el cebador BRFMX de la primera ronda de PCR para introducir un sitio de restricción XbaI dependiente de la presencia de la transversión T a A en el sitio de mutación (subrayado dentro de la secuencia diana).

Figura 9B: Detección de una mutación puntual en el gen BRAF. Se usó el cebador BRFU de ES-PCR en combinación con un cebador JOELUX solapante externo y un cebador inverso BRF2.

Figura 9C: Curvas de amplificación que muestran la amplificación selectiva del gen BRAF mutado en la línea celular de cáncer colorrectal WiDr.

Figura 10A(i): Productos de la escisión con enzimas de restricción en una repetición de mononucleótidos adyacente a un sitio de restricción Bbr71.

Figura 10A(ii) y 10A(iii): Productos de la extensión de la cadena inferior de las moléculas cortadas usando transferasa terminal e hibridación del cebador a los productos extendidos.

Figura 10A(iv): Oligonucleótido molde para la hibridación de la ES-PCR a la cadena inferior cortada a partir de las moléculas corta y larga mostradas en la Fig.10A(i).

Figura 10B(i): Moléculas con repeticiones de nueve o diez A adyacentes a un sitio de restricción Mmel.

Figura 10B(ii): Productos de escisión de las moléculas de la Fig. 10B(i) con Mmel.

Figura 10A(iii): Ligamiento del engarce que muestra el ligamiento específico a los extremos cortados de la molécula de la Fig. 10B(ii) que se originan a partir de la molécula con nueve A (Fig.10B(i)).

Figura 10B(iv): Oligonucleótido molde para la hibridación de la ES-PCR a la cadena inferior cortada a partir de las moléculas "nueve" y "diez".

Figura 11A(i): La región del microsatélite NR22 que muestra la localización de un sitio MbolI y la secuencia del cebador inverso.

Figura 11A(ii) y 11A(iii): Secuencias de dos oligonucleótidos molde F1NR22-0 y J5NR22-4 para la amplificación de repeticiones de mononucleótidos de diferentes longitudes en el microsatélite NR22 después de la digestión con MbolI.

Figura 11B(i) y 11B(ii): Curvas de amplificación que muestran los resultados de la amplificación de ADN sanguíneo y ADN de células HCT116 que porta delecciones dentro del microsatélite NR-22.

Figura 12A: Esquema que muestra la digestión con una enzima de restricción que tiene un sitio de escisión a una distancia definida fuera de su secuencia de reconocimiento, y un desplazamiento en el sitio de escisión debido a una inserción de 4 pb entre la secuencia de reconocimiento y el sitio de escisión. La extensión 3' del ADN digerido solamente sucederá si existe una inserción entre la secuencia de reconocimiento y el sitio de escisión debida a la presencia de 2' O-metil nucleótidos (subrayados) en el oligonucleótido molde que bloquea la extensión 3' del ADN digerido cuando los 2' O-metil nucleótidos hibridan en el extremo 3' del ADN digerido. En el caso de ADN que tiene una inserción, el sitio de escisión se desplaza de tal modo que los 2' O-metil nucleótidos del oligonucleótido molde ya no hibridan en el extremo 3'.

Figura 12B: Oligonucleótidos utilizados en amplificación selectiva por ES-PCR de una mutación de inserción de 1 pb o 4 pb. El oligonucleótido molde emplea 2' O-metil nucleótidos para bloquear la extensión 3' desde el extremo 3' del ADN diana escindido.

Figura 12C: Curvas de amplificación que muestran la amplificación selectiva de ADN que incluye una inserción

de 1 pb o 4 pb sobre ADN que no tiene inserción, es decir, ADN "normal".

Figura 13A y 13B: Secuencia de ADN de ensayo representativos de ADN "no cortado" y "cortado", un oligonucleótido molde AluPhB de referencia con la extensión boqueada por un fosfato en su extremo 3' y el segundo y tercer oligonucleótidos, utilizados en una serie de experimentos de ES-PCR para evaluar el efecto sobre la ES-PCR de modificaciones en el oligonucleótido molde (Figura 13B).

Figura 13C: Curvas de amplificación que muestran los resultados de ES-PCR cuando se usan los diversos oligonucleótidos molde dados en la Figura 13B.

DEFINICIONES

Cuando se usa en el contexto de la presente invención, el término "muestra" se refiere a cualquier muestra biológica que comprende moléculas de ácido nucleico, comprendiendo típicamente ADN y/o ARN. Las muestras pueden ser tejidos, células o extractos de los mismos, o pueden ser muestras purificadas de moléculas de ácido nucleico. El uso del término "muestra" no implica la presencia de una secuencia diana ya sea adyacente a un extremo 3' de una molécula de ácido nucleico o incluida dentro de una molécula de ácido nucleico. La presencia en una muestra de una secuencia diana incluida dentro de una molécula de ácido nucleico no es necesaria para la amplificación selectiva de secuencia diana adyacente a un extremo 3'. Por tanto, el oligonucleótido molde servirá para amplificar una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia diana adyacente a un extremo 3' independientemente de si la secuencia diana está también presente o no en la muestra, localizada incluida dentro de una molécula de ácido nucleico.

Cuando se usa en el contexto de la presente invención, la expresión "secuencia diana" se refiere a una secuencia de ácido nucleico con la que el oligonucleótido molde hibrida con especificidad debido a que el oligonucleótido molde tiene una secuencia de nucleótidos en su región 3' sustancialmente complementaria a la secuencia diana. Cuando está localizada adyacente a un extremo 3', la secuencia diana es representativa de moléculas de ácido nucleico amplificadas selectivamente por ES-PCR.

Como se usa en el contexto de la presente invención, la expresión "adyacente a un extremo 3'" se refiere a la región de nucleótidos inmediatamente 5' del extremo 3' y que se extiende 5' del extremo 3' de una molécula de ácido nucleico, incluyendo típicamente el nucleótido terminal. La región "adyacente a un extremo 3'" empezando desde el nucleótido terminal de una molécula de ácido nucleico que tiene un extremo 3', corresponde en longitud a la región 3' del oligonucleótido molde complementaria a la secuencia diana.

Como se usa en el contexto de la presente invención, la expresión "incluido dentro de una molécula de ácido nucleico" se refiere a una localización no adyacente a un extremo 3' como se ha definido anteriormente, pero desplazado desde un extremo 3' por al menos un nucleótido 5' del extremo 3'. Por tanto, la secuencia diana incluida dentro de una molécula de ácido nucleico puede estar localizada dentro de una molécula de ácido nucleico a una distancia de uno o más nucleótidos desde el extremo 3'.

Cuando se usa en el contexto de la presente invención, la expresión "molécula marcada como diana" o "molécula de ácido nucleico marcada como diana" se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia diana localizada adyacente a un extremo 3' que provoca su amplificación selectiva por procedimientos de la invención.

Cuando se usa en el contexto de la presente invención, la expresión "molécula de ácido nucleico escindida" pretende hacer referencia a una molécula que se ha digerido por endonucleasas de restricción o cualquier otra enzima que genere ácidos nucleicos con extremos 3', y abarca ADN digerido por endonucleasas de restricción u otras enzimas que generan extremos 3'.

Cuando se usa en el contexto de la presente invención, la expresión "oligonucleótido molde" u "oligonucleótido de molde" se refiere a un ácido nucleico oligonucleotídico que comprende una región 5' que forma una cola 5' cuando su región 3' hibrida con ácido nucleico y que permite la extensión 3' de una secuencia diana con la que hibrida cuando está localizada adyacente a un extremo 3' de una molécula de ácido nucleico. En ciertas realizaciones de la invención, el oligonucleótido molde se incorpora en amplicones de PCR porque tiene lugar la extensión 3' del oligonucleótido. En dichos casos, el oligonucleótido molde sirve como cebador directo.

En otras realizaciones, el oligonucleótido molde no se incorpora en amplicones de PCR porque está bloqueada la extensión 3' del oligonucleótido, o porque está bloqueado el copiado de la región 3' del oligonucleótido. En estas situaciones, se usa un 'tercer' oligonucleótido adicional que comparte la secuencia con la cola 5' del oligonucleótido molde como cebador directo.

Los oligonucleótidos molde pueden comprender nucleótidos no de ADN, tales como nucleótidos de ARN, análogos de nucleótidos, u otras moléculas no de ácido nucleico que pueden incorporarse en el oligonucleótido para retardar o bloquear la extensión 3', o para bloquear el copiado a partir del oligonucleótido. Un especialista en la técnica apreciará que puede aplicarse cualquier medio para retardar la extensión 3' o para bloquear la extensión 3' o el copiado del oligonucleótido a un oligonucleótido molde de acuerdo con la presente invención, con la condición de que el medio elegido no impida la extensión 3' de la secuencia diana.

Cuando se usa en el contexto de la presente invención, la expresión "sustancialmente complementario" se refiere a complementariedad entre ácidos nucleicos, de modo que sucede una hibridación adecuada para conseguir la amplificación selectiva de una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia diana adyacente a un extremo 3' sobre una secuencia diana incluida dentro de una molécula de ácido nucleico, de acuerdo con la presente invención. Por tanto, no todas las bases en un oligonucleótido tienen que ser complementarias a la región de una molécula con que hibridará; el oligonucleótido solamente tiene que contener suficientes bases complementarias para posibilitar que el oligonucleótido reconozca e hibride con su molécula 'diana'. Por tanto, la expresión "sustancialmente complementario" abarca ácidos nucleicos que incorporan uno o más desapareamientos, deleciones, inserciones, combinaciones de deleciones e inserciones, o cualquier otra modificación de secuencia que no anule la hibridación de los ácidos nucleicos con especificidad.

Como se usa en el contexto de la presente invención, la expresión "extensión 3' retardada" se refiere a que la extensión 3' del oligonucleótido molde tiene impedimentos para proceder pero no está bloqueada, de modo que la extensión 3' del oligonucleótido sucede de forma menos eficaz que si la modificación para retardar la extensión 3' estuviera ausente. Por tanto, en esta situación, el oligonucleótido molde actuará como cebador directo en la reacción de amplificación.

Como se usa en el contexto de la presente invención, la expresión "extensión 3' bloqueada" se refiere a la ausencia en términos prácticos de extensión 3' del oligonucleótido molde, de modo que no procederá la reacción de amplificación, o procede a una velocidad inexplorable, salvo que se añada un 'tercer' oligonucleótido adicional a la reacción, compartiendo este oligonucleótido la secuencia con la cola 5' del oligonucleótido molde y a partir del cual sucederá la extensión 3'.

Como se usa en el contexto de la presente invención, el término "amplificación" se refiere a hacer una o más copias de la molécula marcada como diana, e incluye, aunque sin limitación, la amplificación de moléculas de ácido nucleico por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR puede hacer referencia a amplificación lineal, no exponencial de ADN además de a amplificación exponencial de ADN, donde un especialista en la técnica reconocería que cualquier forma de amplificación es apropiada para el propósito de la invención.

Como se usa en el contexto de la presente invención, la expresión "cortadora flanqueante" se refiere a una endonucleasa de restricción que escinde el ácido nucleico a una distancia definida desde su secuencia de reconocimiento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El principio de la PCR específica de extremo o ES-PCR contenida en la presente invención se muestra en la Figura 1. La ES-PCR depende del uso de al menos un oligonucleótido, en este documento mencionado como el oligonucleótido molde, que está de algún modo parcial o completamente bloqueado para la extensión. El oligonucleótido molde está diseñado para solapar con el extremo 3' de una molécula de ácido nucleico generada, por ejemplo, por digestión de restricción. La parte 3' del oligonucleótido molde aparea sustancialmente con la secuencia específica adyacente al extremo escindido de la molécula de ácido nucleico mientras que la parte 5' contiene la secuencia de ácido nucleico que forma una cola después de la hibridación del oligonucleótido molde con la molécula de ácido nucleico.

Después de la hibridación del oligonucleótido molde con una molécula de ácido nucleico escindida, se retarda o bloque la elongación del oligonucleótido molde, pero el extremo 3' de la molécula marcada como diana es capaz de extenderse para permitir el copiado de la cola 5' del oligonucleótido molde. La secuencia diana, que está incluida dentro de una molécula de ácido nucleico, porque, por ejemplo, no se ha escindido por una enzima de restricción en un sitio de restricción deseado, puede hibridar con el oligonucleótido molde, sin embargo, no puede suceder la extensión 3' de la secuencia diana para permitir el copiado de la cola 5' del oligonucleótido molde debido a la ausencia de un extremo 3' en el sitio de hibridación. De forma importante, la secuencia de nucleótidos añadida a la secuencia diana por extensión del extremo 3' libre complementario a la cola 5' del oligonucleótido molde se usa posteriormente en la amplificación de la molécula de ácido nucleico marcada como diana. La secuencia añadida también permite modificaciones de ES-PCR, por ejemplo, la incorporación de una marca tal como un nucleótido biotinilado que podría usarse para capturar selectivamente moléculas que contienen secuencias 3' extendidas. Se ha mostrado el uso de dos tipos diferentes de oligonucleótido molde, sin embargo, quedaría claro para los especialistas en la técnica que podría usarse cualquier característica de diseño incorporada en el extremo 3' del oligonucleótido molde que provoque una extensión retardada o bloqueada para conseguir los procedimientos de la invención.

Típicamente, las moléculas de ácido nucleico a analizar de acuerdo con la invención comprenden ADN. Sin embargo, los especialistas en la técnica apreciarán fácilmente que los procedimientos de la presente invención también son aplicables a otras moléculas de ácido nucleico, tales como ARN, condicionado a los reactivos apropiados, por ejemplo, ARN polimerasas o transcriptasas inversas, apropiadas para la amplificación o copiado de ARN. También se apreciará fácilmente que la cola incorporada formada por el copiado de la región 5' del oligonucleótido molde puede detectarse directamente o usarse para copiar la secuencia de ácido nucleico diana por otro medio diferente al termociclado.

En una realización, el oligonucleótido molde es capaz de hibridar de forma débil con la secuencia diana, pero

está diseñado de tal modo que la extensión 3' a partir del oligonucleótido molde es pobre a causa de un desapareamiento deliberado con la secuencia diana en su extremo 3'. Si el oligonucleótido molde hibrida con la secuencia diana adyacente a un extremo 3', sin embargo, el ácido nucleico, por ejemplo, ADN genómico, puede extenderse 3' usando el oligonucleótido molde como molde. La longitud aumentada posterior de la región de hibridación entre el oligonucleótido molde y la molécula de ácido nucleico marcada como diana estabiliza la hibridación del oligonucleótido molde y potencia en gran medida la eficacia con la que ahora se ceba y extiende sobre la molécula de ácido nucleico diana. Una vez se ha incorporado el oligonucleótido molde desapareado en el amplicón, la PCR continúa de forma eficaz, ya que el oligonucleótido molde originalmente desapareado ahora apareará completamente con su secuencia diana. En un ejemplo, el cebado sobre ADN no escindido se limita a través de la combinación de una corta región 3' del oligonucleótido molde y un desapareamiento terminal en el oligonucleótido molde. Además de un desapareamiento terminal, pueden usarse otros medios para limitar el cebado a partir del oligonucleótido molde.

En una realización de la invención que utiliza un desapareamiento terminal, la extensión es ineficaz salvo que haya sucedido el copiado de la cola 5' del oligonucleótido molde. Podría usarse cualquier otra modificación que reduzca o retarde la extensión de un oligonucleótido para conseguir la ES-PCR, por ejemplo, la incorporación de un corta delección o inserción deliberada en el oligonucleótido molde.

En una realización adicional de la invención, el oligonucleótido molde puede terminar en su extremo 3' con una base extensible, o puede incluir modificaciones que evitarán la extensión 3'. En el caso de oligonucleótidos de ES-PCR de extremo completamente bloqueado, se necesita un tercer oligonucleótido adicional en la reacción para permitir la extensión probable de la molécula de ácido nucleico marcada como diana. El tercer oligonucleótido adicional puede constar de la secuencia de ácido nucleico de la cola 5' del oligonucleótido molde o puede solapar con la secuencia diana para incluir algo de la secuencia específica de diana. Si el tercer cebador oligonucleotídico usado para la amplificación consta solamente de la secuencia de la cola 5' del oligonucleótido molde, es posible multiplicar la amplificación de diferentes moléculas de ácido nucleico usando una serie de oligonucleótidos molde que son específicos de gen o fragmento pero que contienen una extensión común. En esta realización puede usarse cualquier medio para bloquear la extensión incluyendo, aunque sin limitación, un espaciador C3, la terminación con un didesoxinucleótido, fosforilación, el uso de amina, sitios abásicos, restos de uracilo (combinado con incubación con uracil ADN glucosilasa) y/o 2' O- metil ARN. En el caso de usar análogos de ADN que no pueden copiarse por las ADN polimerasas, la ES-PCR puede conseguirse independientemente de la extensión 3' del oligonucleótido molde. Combinaciones de oligonucleótidos molde bloqueados o desapareados también son variaciones posibles que pueden usarse de acuerdo con la presente invención.

El oligonucleótido molde puede incluir bases modificadas dentro de su región 3' que cuando hibridan en el extremo 3' de una molécula de ácido nucleico bloqueará la extensión 3' de esa molécula. Esto permite la amplificación selectiva de ADN diana que tiene una secuencia diana adyacente a su extremo 3' que no hibrida en su extremo 3' con las bases modificadas del oligonucleótido molde, no bloqueándose de este modo durante la extensión 3'.

El oligonucleótido molde puede comprender una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia diana que abarca más de una posible localización en la que puede suceder la hibridación de un extremo 3' de la molécula de ácido nucleico. Por tanto, dependiendo de la localización de la hibridación de un extremo 3' en el oligonucleótido molde, la cola 5' resultante del oligonucleótido molde puede incluir o no la secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico marcada como diana. Pueden posicionarse bases modificadas que bloquean la extensión 3' desde el extremo 3' de una molécula de ácido nucleico hibridada en el oligonucleótido molde en una o más de las posibles localizaciones para la hibridación del extremo 3' representativas de la hibridación de extremos 3' de moléculas de ácido nucleico no marcadas como diana, de modo que la extensión 3' de una molécula de ácido nucleico suceda solamente a partir de la localización de hibridación característica para el extremo 3' de la molécula de ácido nucleico marcada como diana.

Como con otros procedimientos de amplificación, las condiciones tales como tiempos de hibridación, tiempos de extensión, y temperaturas dependen de las secuencias específicas y requieren una optimización individual. Se han descubierto dos o más fases útiles en la reacción de PCR para permitir mayor flexibilidad en el diseño de la ES-PCR. En general, se usan típicamente temperaturas de hibridación inferiores y tiempos de incubación más largos en la primera fase porque se espera que el cebado de la diana sobre la parte habitualmente corta (baja Tm) del oligonucleótido molde sea relativamente ineficaz. En el caso de oligonucleótidos molde desapareados y de inserción/delección, típicamente se usa un periodo de incubación prolongado en la primera fase para permitir la extensión probable después de que se haya estabilizado la unión por la extensión 3' de la secuencia diana. Después de los 5 ciclos iniciales, se espera que la PCR esté dirigida en gran medida por oligonucleótidos que aparean con su diana a lo largo de su longitud completa y de este modo puede emplearse una temperatura mayor (y habitualmente tiempos de incubación más cortos) en la segunda fase. Pueden emplearse tiempos de desnaturalización más cortos (y en algunos casos temperaturas inferiores - no mostrado en estos ejemplos) en la segunda fase porque el producto de PCR que ahora domina la reacción se desnaturaliza mucha más fácilmente que las diversas moléculas de ADN que se espera que sean importantes durante la primera fase. Son ventajosos tiempos de desnaturalización más cortos porque habrá menos inactivación de la ADN polimerasa Taq.

Sin embargo, el uso de dos fases no es un requisito para la ES-PCR. Por el uso de regiones complementarias

más largas en el(los) oligonucleótido(s) molde, particularmente para los cebadores de molde completamente bloqueados, puede desarrollarse una PCR de una fase.

La digestión con enzimas de restricción de la muestra puede realizarse en una reacción diferente antes de la ES-PCR, o puede realizarse en una única mezcla de reacción de digestión-amplificación inmediatamente antes de la PCR.

Como con otros procedimientos en los que se añade una secuencia común a los extremos de los ADN a amplificar (Elnifro, EM y col. 2000; Wittwer, CT y col. 2001), la ES-PCR puede adaptarse fácilmente para una PCR múltiple.

Los productos de ES-PCR pueden detectarse por procedimientos convencionales bien conocidos para los especialistas en la técnica incluyendo, aunque sin limitación, electroforesis en gel, control a tiempo real usando colorantes de unión a ADN no específicos tales como SYBRGreen, sondas fluorescentes específicas de secuencia o hibridación a series.

Para que la invención pueda entenderse fácilmente y llevarse a efectos prácticos, ahora se describirán realizaciones preferidas particulares mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: Uso de un único oligonucleótido molde desapareado para seleccionar ADN escindido

La región marcada como diana es una repetición en tándem (tamaño consenso de 74 pares de bases, GCGTGGCTGTCTCCACTGAGTCCCGGGCACGGGTCAGGCTAACCGCGG GAGGAATTTAATCTAGAGTTAACTT) presente en el cromosoma humano 21 en la banda 21q22.3. En el genoma humano (convención de mayo de 2004) el tamaño genómico de la región repetida es de 2218 pares de bases, [chr21:46536826-46539043](#). Se usó la enzima de restricción BstI para cortar el ADN genómico en el sitio GCGG subrayado. El corte por BstI está bloqueado por metilación de citosina de modo que se formarán extremos de restricción solamente a partir de ADN no metilado.

En este ejemplo, el oligonucleótido molde también actúa como cebador 'directo' y tiene un desapareamiento 3' terminal con la diana, el ADN genómico. La secuencia y los cebadores usados se muestran en la Figura 2. El cebador directo de desapareamiento y oligonucleótido molde es 21qTFMLHC/T, 5' CACTCCCACTCGGGAGGAATTTAATCTAGC 3' y el cebador completamente apareado inverso es 21qTRC, 5' ACCCGTGCCCCGGGACTCA 3'. Las bases subrayadas son las que no aparean con la secuencia diana inicial.

Se realizaron PCR en 25 microlitros de Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 2,7 mM, dCTP 0,2mM, dGTP 0,2 mM, dATP 0,2 mM, dUTP 0,4 mM, cebadores 200 nM, dilución 1/125.000 de SYBR® Green I (Molecular Probes N° Cat. S7563), colorantes de calibrado de fluoresceína 20 nM (BioRad), 1 unidad de BstI (New England Biolabs) y 0,5 unidades de polimerasa Platinum Taq (Invitrogen). Un Corbett RotorGene 3000 se ajustó para funcionar a 60C durante 5 minutos, 95C durante 2 minutos, después 5 ciclos de 95C 15 segundos - 65C 3 minutos, y después 40 ciclos de 95C 5 segundos - 65C 30 segundos. La digestión con BstI sucede durante la incubación de 5 min. inicial a 60C. El tiempo de extensión más largo en los primeros 5 ciclos es para permitir la extensión del ADN diana en condiciones en las la hibridación de la diana/cebador es inestable.

La fluoresceína está presente porque las reacciones a veces se procesan en un BioRad Icicler, y esta máquina requiere una traza de fluoresceína (o algún otro colorante) para propósitos de calibrado. No se espera que el bajo nivel tenga algún efecto significativo sobre los resultados.

Los ADN usados para la amplificación fueron ADN de CpGenome (Chemicon) que estaba metilado enzimáticamente en todos los sitios CpG y ADN de la línea celular de leucemia mielogénica crónica humana K562 así como ADN de dos pares de ADN de tumor colorrectal de colon normal adyacente apareado. El primer panel de la Figura 3 muestra las curvas de amplificación para ADN completamente metilado y para ADN de K562 que está sustancialmente hipometilado en muchas secuencias repetidas. La amplificación es altamente selectiva para ADN no metilado, amplificando K562 aproximadamente 13 ciclos antes que el ADN de CpGenome completamente metilado. Se muestran dos ejemplos en los paneles B y C de ADN de cáncer colorrectal y ADN aislado de tejido normal adyacente. En ambos casos, la amplificación más temprana del ADN canceroso (en 2,5 a 3 ciclos) es indicativa de hipometilación con relación al tejido normal.

Ejemplo 2: Los oligonucleótidos tanto directo como inverso son oligonucleótidos molde que tienen un desapareamiento 3' terminal.

Se amplificó la misma secuencia repetida del cromosoma 21q usando oligonucleótidos molde de desapareamiento tanto directo como inverso como cebadores. Las condiciones de PCR fueron las mismas que para el Ejemplo 1 excepto en que se incluyó la sonda 21qTRHEX 5' HEX-CCGTGCCCCGGGACTCAGTGG BH1 (de Sigma) a 100 nM y el cebador inverso fue 21qTRM13, 5' CCCTCACACTCGGTTAGCCTGACT-3'. Las bases subrayadas son las que no aparean con la secuencia diana inicial.

Se realizó una PCR a tiempo real usando un Corbett RotorGene 3000 con el programa: 60C durante 5 minutos, 95C durante 2 minutos después 3 ciclos de 95C 15 segundos - 65C 3 minutos, y después 60 ciclos de 95C 5 segundos -

65C 15 segundos. Se crearon 3 ng/ul de ADN genómico humano que contenía diferentes proporciones de ADN de K562 (que se sabe que tiene niveles reducidos de metilación en CpG) y ADN de CpGenome (ADN metilado de forma artificial) haciendo diluciones en TEX (Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA 0,1 mM, Triton X100 al 0,01%). Se añadió 1 ul de la mezcla de ADN a cada reacción de 25 ul.

Los resultados de SYBR Green se muestran en la Figura 4. En este experimento, la especificidad adicional producida por el uso de una sonda específica no proporcionó ventajas y los resultados fueron similares a los resultados de SYBR Green y por tanto no se muestran.

La amplificación a partir de ADN de K562 se detecta más de 20 ciclos antes del ADN completamente metilado y se detecta claramente un nivel del 0,1% de la muestra de ADN de K562 (3 pg, un único genoma equivalente) 7 ciclos antes que la muestra que contiene solamente ADN completamente metilado.

Ejemplo 3: Marcaje como diana de un sitio HpaII dentro gen de copia única c-myc

En este ejemplo se marca como diana un sitio HpaII (subrayado) dentro de la secuencia génica de c-myc GAGCGCCAGAGGAGGAACGAGCTAAAACGGAGCTTTTTGCCCTGCGTG ACCAGATCCCGAGTTGGAAAA, chr8:128.822.153-128.822.223 en el genoma humano construcción HG17. Se descubrió que el sitio HpaII estaba hipometilado en cáncer colorrectal por Sharrard et al 1992. La secuencia de la región y el oligonucleótido molde (los cebadores MycRM1 y MycFCI se muestran en la Figura 5A).

Las muestras de ADN se cortaron con HpaII en una reacción diferente. Las digestiones se realizaron durante 2 horas a 37C en tampón 1 de New England Biolabs (Bis Tris Propano-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM (pH 7,0 a 25°C)) + 100 ug/ml de BSA. Se cortaron 30 nanogramos de ADN con 5 unidades de HpaII en un volumen de 30 ul. Después de un tratamiento con calor de 20 minutos a 70C, se añadieron 24 ul de TEX (Tris 10mM pH 7,4, EDTA 0,1 mM, Triton X100 al 0,01%) y 6 ul de EDTA 50 mM dando concentraciones finales iguales del ión magnesio y EDTA, y una concentración de ADN final de 0,5 ng/ul. Se usaron 2 ul de estas muestras para cada PCR.

Las PCR se realizaron en 25 microlitros de Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 2,7 mM, glicerol al 0,2%, dCTP 0,2mM, dGTP 0,2 mM, dATP 0,2 mM, dUTP 0,4 mM, cebadores 200 nM, dilución 1/125.000 de SYBR® Green I (Molecular Probes Nº Cat. S7563), colorante de calibrado de fluoresceína 20 nM (BioRad) y 0,5 unidades de polimerasa Platinum Taq (Invitrogen). Un Corbett Rotor-Gene 3000 se ajustó para funcionar a 95C durante 2 minutos después 5 ciclos de 95C 15 segundos - 65C 3 minutos, y después 45 ciclos de 95C 5 segundos - 65C 30 segundos.

El cebador de desapareamiento MycRM1 permite la detección de ADN myc hipometilado en ADN de K562 en comparación con el ADN completamente metilado de CpGenome. También permite la detección de la metilación reducida en el sitio HpaII en la muestra de tumor canceroso colorrectal 35/03 en comparación con su muestra normal apareada 34/03. (Véase la Figura 5B).

Ejemplo 4: Oligonucleótido molde de inserción.

Este ejemplo muestra que la selección puede conseguirse sin usar un desapareamiento 3' terminal en el cebador, sino una inserción colocada varios nucleótidos desde el extremo 3'. Dichos oligonucleótidos molde de inserción pueden ser particularmente adecuados para casos en los que el sitio de restricción marcado como diana está presente en una secuencia repetitiva que podría variar en la secuencia en el punto de extensión.

En casos en los que una clase de secuencia repetida tiene gran heterogenicidad de secuencia, un cebador de desapareamiento diseñado para una secuencia consenso puede realmente aparear completamente con una cantidad significativa de secuencias mutantes. Esto causaría un enriquecimiento selectivo de los mutantes y reduciría la potencia selectiva de ES-PCR. Para dichos casos, se desarrolló una modificación del procedimiento que implicaba diseñar cebadores que tuvieran cortas inserciones o deleciones en comparación con la clase de repetición de secuencia consenso. Se razonó que muy pocas secuencias mutantes o ninguna tendrían la misma longitud de deleción o inserción con la misma secuencia y en la misma posición. Aunque algunas de las bases 3' aparean con la diana (6 en el caso mostrado), la deleción (o inserción en el caso mostrado aquí) evitará la colocación apropiada del extremo 3', retardando de este modo la extensión.

En este ejemplo, están marcados como diana dos sitios HpaII dentro de la región 5' (promotor) del elemento retrotransponible LINE. La selección de secuencias que se han cortado en ambos sitios HpaII se consigue usando dos oligonucleótidos molde/cebadores de inserción como se muestra en la Figura 6A.

Se ensayaron 5 ng de ADN tratado con Dral (sitio de reconocimiento TTAAAA, no sensible a metilación) y HpaII (CCGG, sensible a metilación). Las PCR se realizaron en 25 microlitros de Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 2,7 mM, Betaína 400 mM, dCTP 0,2 mM, dGTP 0,2 mM, dATP 0,2 mM, dUTP 0,4 mM, cebador selectivo MLHJ65 10 nM, cebadores de inserción 200 nM, sonda LPAHex marcada con HEX 50 nM, dilución 1/125.000 de SYBR® Green I (Molecular Probes Nº Cat. S7563), colorante de calibrado de fluoresceína 20 nM (BioRad), y 0,5 unidades de polimerasa Platinum Taq (Invitrogen). Un Corbett RotorGene 3000 se ajustó para funcionar a 95C durante 2 minutos después 5 ciclos de (95C 15 segundos, 60C 20 segundos, 65C 3 minutos), y después 50 ciclos de (95C 15 segundos, 65C 30

segundos).

Como se observa en la Figura 6B, la amplificación de ADN de K562 sustancialmente hipometilado se observaba aproximadamente 14 ciclos antes de la amplificación de ADN completamente metilado.

Ejemplo 5: Oligonucleótido molde 3' bloqueado.

El primer sitio BstUI en la secuencia consenso de elementos Alu se marcó como diana usando el oligonucleótido molde y los cebadores mostrados en la Figura 7A. El oligonucleótido molde BAFMLJ15 es incapaz de extenderse debido a que está bloqueado con un grupo fosfato en su extremo 3'. La parte del oligonucleótido que está recuadrada tiene la misma secuencia que el 'tercer' oligonucleótido JOELUX y permite la incorporación posible de JOELUX en el producto de PCR. JOELUX porta un resto fluorescente JOE unido cerca del extremo 3' cuya fluorescencia aumenta cuando está presente en ADN bicatenario.

Las PCR se realizaron en 25 microlitros de Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 2,7 mM, dCTP 0,2 mM, dGTP 0,2 mM, dATP 0,2 mM, dUTP 0,4 mM, AluRev21 40 nM, BAFMLJ15 10 nM, cebador JOELUX 60 nM, dilución 1/125.000 de SYBR® Green I (Molecular Probes N° Cat. S7563), colorante de calibrado de fluoresceína 20 nM (BioRad), 1 unidad de BstUI (New England Biolabs) y 1 unidad de polimerasa Platinum Taq (Invitrogen). Un Corbett RotorGene 3000 se ajustó para funcionar a 37C durante 5 minutos, 95C durante 2 minutos después 5 ciclos de 95C 1 minuto - 60C 40 segundos, y después 45 ciclos de 95C 15 segundos - 68C 20 segundos.

Usando un único cebador de molde bloqueado con fosfato, la amplificación de ADN de K562 sustancialmente hipometilado se retarda en más de seis ciclos de PCR con relación a la amplificación del ADN de CpGenome metilado.

Ejemplo 6: Uso de ES-PCR en la selección de ADN metilado

La región marcada como diana es un sitio Glal dentro de la isla CpG (chr3:37009233-37010360 en el inmovilizado hg17) del gen hMLH1 (Figura 8A). De acuerdo con una publicación de la compañía Sibenzyne (http://science.siben-zyne.com/article8_article_11_1.phtml) Glal corta la secuencia GCGC solamente cuando la C interna está metilada. La actividad completa de Glal solamente se observa cuando las cuatro C de su sitio de reconocimiento están metiladas. Por tanto, Glal solamente muestra actividad completa sobre ADN completamente metilado en el sitio CGCGCG. Este sitio se encuentra en la posición chr3:37.009.348-37.009.353 dentro de la isla CpG del gen hMLH1.

Se obtuvo el ADN completamente metilado de 'CpGenome' de Chemicon. Este ADN se había metilado enzimáticamente en todos los sitios CpG y se trató con Glal. Como control, se aisló ADN no metilado de sangre y se trató con la enzima de restricción HhaI. Esta enzima reconoce el mismo sitio pero solamente corta cuando el sitio está sin mutilar. (Obsérvese que hay dos sitios HhaI uno cerca del otro en esta localización.) El oligonucleótido molde usado para seleccionar los extremos cortados fue MLHJ65. Este oligonucleótido tiene una extensión 5' que permite la incorporación de un cebador LUX marcado con JOE, JOELUX. También tiene 3 desapareamientos en su extremo 3', dos de los cuales se convierten en sitios abásicos cuando se digieren por la uracil ADN glucosilasa. Un cebador no modificado MLHRev3 servía como cebador inverso (véase la Figura 8A).

Se trató 1 ug de ADN completamente metilado (de Chemicon) con 16 unidades de Glal durante 2 horas a 37C en 50 ul de tampón SE Y 1X (Tris-acetato 33 mM, acetato potásico 66 mM, acetato de magnesio 10 mM, ditiotritol 1 mM pH 7,9 a 25°C) + 100 ug/ml de albúmina sérica bovina. También se incluyeron 20 unidades de una segunda enzima de restricción, Dral, en la reacción. Esta enzima reconoce la secuencia TTAA y por tanto corta ADN independientemente del estado de metilación. Después de inactivación por calor (70C durante 15 minutos) se añadieron 140 ul de TEX (Tris HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, Triton X-100 al 0,01%) y 10 ul de EDTA 50 mM, dando una concentración de 5 ng/ul de ADN. El control no cortado se trató del mismo modo, excepto en que se añadió glicerol al 50% en lugar de la enzima de restricción. El ADN sanguíneo cortado por HhaI se preparó del mismo modo, excepto en que se usó el tampón 3 de New England Biolabs (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM (pH 7,9 a 25°C) y 20 unidades de HhaI.

Se ensayaron 5 ng de ADN cortado o no cortado. Las PCR se realizaron en 25 microlitros de Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, Betaína 800 mM, dNTP 0,2 mM, cebador selectivo MLHJ65 10 nM, cebador inverso MLHRev3 200 nM, cebador LUX fluorescente JOELUX 40 nM, SYBR® Green I (Molecular Probes N° Cat. S7563) colorante de calibrado de fluoresceína 20 nM (BioRad), 0,02 unidades de uracil ADN glucosilasa (New England Biolabs) y 0,5 unidades de polimerasa Platinum Taq (Invitrogen). Un Corbett RotorGene 3000 se ajustó para funcionar a 95C durante 90 segundos después 5 ciclos de (95C 30 segundos, 60C 10 segundos, 72C 30 segundos), y después 55 ciclos de (95C 1 segundo - 60C 10 segundos, 72C 30 segundos). Los ensayos se hicieron por triplicado.

El ADN metilado que se había cortado con Glal se amplificó un promedio de 6 ciclos antes del ADN metilado no cortado. El ADN no metilado de control cortado con HhaI se amplificó un promedio de 8,4 ciclos antes del ADN no cortado. Los datos muestran que en ambos casos en los que el ADN se cortaba para producir extremos específicos, la amplificación estaba significativamente favorecida en comparación con ADN no cortado. La amplificación más temprana del ADN cortado con HhaI puede estar relacionada con las diferentes eficacias de corte de las enzimas HhaI y Glal.

Ejemplo 7: Detección de una mutación puntual en el gen BRAF

Las mutaciones en el gen BRAF son habituales en cáncer colorrectal y casi siempre implican la mutación V600E causada por una transversión de T a A (Chan y col. 2003). Se usó ES-PCR en un procedimiento de dos etapas para diferenciar secuencias mutantes y normales en ADN de sangre y la línea celular de cáncer colorrectal WiDr respectivamente. En la primera ronda de PCR se usó un cebador BRFMX que contenía dos desapareamientos (Figura 9A(i); desapareamientos subrayados) 5' CCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTGGTCTAGCTCTAG 3' para introducir un sitio de restricción XbaI que dependía de la presencia de la base A en el sitio de mutación (Figura 9A(ii); sitio de la mutación subrayado).

Se usó el cebador BRFMX en PCR con un cebador inverso BRFR1, para amplificar la región diana. Se muestra la secuencia del ADN amplificado resultante, con el sitio XbaI subrayado en la Figura 9A(iii).

En la segunda ronda, se usó el cebador de ES-PCR BRFU en combinación con un cebador JOE-LUX de solapamiento externo y un cebador inverso BRFR2 (Figura 9B). La cadena superior copiada no se muestra en la Figura 9B porque XbaI da un saliente de 4 bases que cuando se copia dará múltiples desapareamientos con el oligonucleótido selectivo BRFU y por tanto no debe implicarse en la reacción. La cadena inferior está escrita de 3' a 5' para BRAF-A después del corte con XbaI y la desnaturalización. La extensión del oligo BRFU está inhibida por los desapareamientos de 3 bases terminales (subrayadas); no se usó uracil ADN glucosilasa en este experimento de modo que la extensión de BRFU sólo está impedida por los 3 desapareamientos terminales (Figura 9B).

Se digirieron 2 µl de una dilución 1/100 de cada uno de los productos de la primera ronda con 5 unidades de XbaI en tampón NEB2 más BSA durante dos horas a 37°C. Se usó 1 µl de cada uno de los productos digeridos en la ES-PCR. Las PCR se realizaron en 25 microlitros de Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, dNTP 0,2 mM, oligonucleótido selectivo BRFU 10 nM, cebador inverso BRFR2 100 nM, cebador LUX fluorescente JOELUX 40 nM, SYBR® Green I (Molecular Probes N° Cat. S7563) colorante de calibrado de fluoresceína 20 nM (BioRad) y 0,5 unidades de polimerasa Platinum Taq (Invitrogen). Un Corbett RotorGene 3000 se ajustó para funcionar a 95°C durante 90 segundos después 5 ciclos de (95°C 30 segundos, 50°C 40 segundos, 65°C 10 segundos), y después 40 ciclos de (95°C 5 segundos, 65°C 15 segundos). Los ensayos se hicieron por duplicado.

La amplificación, medida por la fluorescencia de JOE, se muestra en la Figura 9C. La amplificación más temprana observada en el caso de la muestra obtenida de WiDr muestra que puede usarse ES-PCR para detectar una mutación.

Ejemplo 8: Uso de enzimas de restricción que escinden fuera de su secuencia de reconocimiento en la generación de moléculas de ácido nucleico que difieren en la secuencia adyacente a su extremo 3'.

Varias enzimas de restricción (Tipo IIs, Tipo III y Tipo IV) escinden ADN fuera de sus sitios de reconocimiento a distancias definidas, en este documento mencionadas como "cortadoras flanqueantes". Los extremos 3' generados por cortadoras flanqueantes por lo tanto difieren entre sitios y dependen de la secuencia que flanquea el sitio de reconocimiento enzimático. En un sitio de escisión dado, dicha enzima también producirá diferentes extremos si ha habido una inserción o delección de bases entre el sitio de reconocimiento y el sitio de escisión. Las diferentes secuencias producidas adyacentes al sitio de escisión proporcionan una base para la amplificación selectiva de formas de delección o inserción usando ES-PCR u otros enfoques de amplificación selectiva. Previamente, los procedimientos para la detección de una delección o inserción han dependido de cambios en la longitud del fragmento de ADN después de digestión con enzimas de restricción. El enfoque actualmente descrito utiliza la diferencia en la secuencia de ácido nucleico de los fragmentos de enzimas de restricción, resultantes de la presencia de una delección o una inserción entre una secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción y su sitio de escisión lo que causa un desplazamiento en el sitio de escisión para enzimas de restricción que escinden a una distancia definida desde su secuencia de reconocimiento.

8.1 Determinación de una delección o inserción en una realización de homopolímero corto.

8.1.1. Una delección o inserción en una realización de homopolímero corto de A adyacentes a un sitio de restricción Bbr71 (GAAGAC (7/11) (Figura 10A(i)) se detecta usando ES-PCR (Figura 10A(iv)) (véase la siguiente Sección 8.1.1.1) o usando un cebador específico después de la extensión del extremo 3' usando transferasa terminal (Figuras 10A(ii) y 10A(iii)). El cebador mostrado en la Figura 10A (iii) aparea con el producto de la molécula de ADN original más corta y la cebará de forma eficaz, mientras que forma un desapareamiento de 3 bases con el producto de la molécula más larga y no la cebará. El producto de la molécula más corta después puede amplificarse usando un cebador inverso adecuado desde dentro de la secuencia.

8.1.1.1 Amplificación por ES-PCR. La cadena inferior escindida de la molécula corta ('secuencia corta', Fig. 10A(ii)) cebará de forma eficaz sobre un oligonucleótido molde que tiene la secuencia de ácido nucleico complementaria en su región 3' y un extremo 3' bloqueado por amina. La secuencia terminal recién incorporada a partir de la extensión 3' de la molécula marcada como diana puede usarse en combinación con un segundo oligonucleótido interno para la amplificación durante la ES-PCR. En contraste, el extremo escindido de la molécula larga ('secuencia larga', Fig. 10A(i)) tiene un desapareamiento de 3 bases, y por lo tanto no cebará sobre el oligonucleótido molde y por tanto será

refractaria a la amplificación.

8.2. Se muestra un segundo ejemplo en la Figura 10B. La mayoría de las enzimas con sitios de corte fuera de su secuencia de reconocimiento escinden para dar extremos escalonados que pueden actuar como sustratos para el ligamiento de engarce y la posterior PCR. En el presente ejemplo, un sitio Mmel (TCCGAC (20/18)) está adyacente a una realización de mononucleótido corto (Figura 10B(i)). El sitio cortado está 20 bases del sitio de reconocimiento en la cadena superior y 18 en la cadena inferior. Se muestran variantes de la secuencia con 10 o 9 T. Los extremos generados cuando se corta con Mmel se muestran en la Figura 10B(ii). Para amplificar de forma selectiva la molécula "nueve", puede ligarse un engarce con una extensión 3' CA mostrada, como se muestra en la Figura 10B(iii). Esta molécula podría detectarse por PCR, donde el cebador directo tendría la secuencia mostrada en la Fig. 10B(iii) en combinación con un cebador inverso desde dentro de la región a amplificar. La molécula "diez" alternativa da un extremo con desapareamiento que ligará mal y su amplificación estará adicionalmente comprometida por el desapareamiento con el cebador.

8.2.1 Amplificación por ES-PCR. Como alternativa, los extremos 3' generados pueden discriminarse usando ES-PCR con el oligonucleótido molde mostrado en la Figura 10C. La molécula "nueve" aparee perfectamente con la región 3' del oligonucleótido molde y por lo tanto lo cebará, mientras que la molécula "diez" produce un desapareamiento en su extremo 3', evitando de este modo la extensión 3' complementaria a la cola 5' del oligonucleótido molde, y no logrando de este modo que se amplifique en la reacción.

En muchos casos, no estará localizado adecuadamente un sitio endógeno para una enzima de restricción que corta fuera de su secuencia de reconocimiento. En dichos casos, es posible introducir un sitio apropiado usando un cebador para introducir mutaciones para producir un sitio que flanquee la región de interés y analizar el producto de PCR resultante como un procedimiento de dos etapas. Como alternativa, si hay otro sitio de restricción localizado cerca, puede introducirse un nuevo sitio cortando con la primera enzima y ligando un adaptador que contenga el sitio enzimático deseado. En el ejemplo de la Figura 10B, la secuencia mostrada se obtiene de un sitio dentro del gen TGFRB2, donde una delección de una única base en la secuencia de un tramo de diez A es habitual en cáncer colorrectal. El sitio Mmel se introduce hipotéticamente cortando en un sitio EcoRII flanqueante y ligando un adaptador que contiene el sitio Mmel.

Las secuencias de microsatélites proporcionan un ejemplo de relevancia clínica donde se desea detectar inestabilidad de repeticiones simples cortas, normalmente detectando la presencia de formas delecionadas más cortas (Ejemplo 8.3).

La presencia de una inserción también puede detectar como se muestra en el Ejemplo 8.4.

8.3: Detección de delección en el microsatélite NR22.

El microsatélite NR-22 se describió por Suraweera y col. (2002). Un sitio de restricción MbolI está localizado al lado de la repetición de mononucleótido del microsatélite (Figura 11A(i)). MbolI corta a una distancia de su sitio de reconocimiento, GAAGA, 8 nucleótidos desde el extremo de su secuencia de reconocimiento en la cadena superior y a 7 nucleótidos en la cadena inferior. La secuencia adyacente al nuevo extremo resultante dependerá de la longitud de la repetición de mononucleótido. En las Figuras 11A(ii) y 11 A(iii) solamente se muestra la cadena inferior por simplicidad. En la práctica, la cadena superior también se toma en cuenta porque durante la PCR se copia, dando un nuevo extremo 3' extensible. Se muestran ejemplos para la longitud de 22 (normal) 20, 18 y 16 pares de bases. (La clonación y secuenciación de esta región a partir de la línea celular de cáncer colorrectal HCT116 dio longitudes de 16 pb y 18 pb para la repetición de mononucleótido NR-22.)

Se muestran dos oligonucleótidos de molde en las Figuras 11A(ii) y 11A(iii), respectivamente, alineados con el ADN cortado con MbolI (cadena inferior) obtenido de repeticiones de mononucleótidos de diferente longitud de 16 a 22 bases. La extensión de los oligonucleótidos molde sobre el ADN genómico se evita o reduce por la presencia de desapareamientos en el extremo 3', así como sitios abásicos después de la escisión por uracil ADN glucosilasa de los oligonucleótidos que contienen U. La Figura 11A(ii) muestra el oligonucleótido molde de control 04FNR22-0. Los productos del corte de repeticiones de diferente longitud están todos disponibles para cebar F1NR22-0 y el producto extendido se amplificará posteriormente por el cebador LUX, FAMLUX1. La amplificación a partir de las repeticiones más cortas puede ser menos eficaz debido a la longitud más corta de la región de hibridación. El segundo oligonucleótido molde J5NR22-4 está diseñado para permitir de forma selectiva la amplificación solamente a partir de secuencias de repetición más cortas. Las bases subrayadas en el extremo 3' del ADN cortado con MbolI de repeticiones de 20 ó 22 bases forman desapareamientos con el oligonucleótido molde y evitarán su extensión. En contraste, los extremos obtenidos de repeticiones más cortas de 16 ó 18 bases cebarán de forma eficaz conduciendo a la posterior amplificación por el cebador JOELUX5 y detección por fluorescencia de JOE.

En resumen, se espera que la longitud normal del microsatélite NR-22 solamente dé fluorescencia de FAM en la PCR mientras que delecciones de NR-22 tales como de 4 pb o 6 pb darán fluorescencia tanto de FAM como de JOE.

Las PCR se realizaron en 25 microlitros de Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, dNTP 0,2 mM, F1NR22-0 2 nM, J5NR22-4 10 nM, NR22R1 80 nM, cebador LUX fluorescente JOELUX5 80 nM, cebador LUX

fluorescente FAMLUX1 20 nM, 0,04 unidades de uracil ADN glucosilasa (New England Biolabs), 0,5 unidades de endonucleasa de restricción MbolI (New England Biolabs), 0,5 unidades de polimerasa Platinum Taq (Invitrogen). Un Corbett RotorGene 3000 se ajustó para funcionar a 37°C durante 5 minutos, 95°C durante 90 segundos, después 5 ciclos de (95°C 10 segundos, 60°C 40 segundos, 70°C 10 segundos), y después 60 ciclos de (95°C 5 segundos, 70°C 15 segundos). Se controló la fluorescencia de JOE y FAM. Los ensayos se hicieron por duplicado. Se añadieron 5 nanogramos de ADN aislado de la línea celular HCT116 o de sangre de un sujeto normal a las reacciones.

Como se observa en la Figura 11B, en el caso de fluorescencia de FAM (Figura 11B(ii)), el ADN sanguíneo se amplifica antes del ADN de células HCT116 que porta delecciones dentro del microsatélite NR-22. Además, la fluorescencia de FAM, en el caso del ADN sanguíneo, es mayor al final de la reacción. Esto sugiere que este ensayo podría desarrollarse en un ensayo de punto final, uno que no requiera acceso a una máquina de PCR a tiempo real. En el caso de HCT116, sucederán tanto reacciones de FAM como de JOE porque las delecciones en esta línea celular permitirán el copiado de ambos oligonucleótidos molde en la reacción. Sin embargo, el oligonucleótido molde que es específico para el ADN que porta la delección se usa a una concentración mayor que la desvía de este modo hacia la reacción de JOE. Como el cebador inverso NR22R1 se usa a solamente 80 nM, se espera que las dos reacciones compitan entre sí, lo que explica la diferencia en la señal FAM final entre los dos ADN introducidos. En el caso de la señal JOE (Figura 11B(ii)), solamente el ADN delecionado de HCT116 da cadenas cortadas con MbolI capaces de cebar sobre el oligonucleótido molde J5NR22-4 que porta la cola que permite la incorporación de JOELUX5.

8.4: Detección de inserciones.

En la Figura 12A, solamente se muestra la cadena inferior de un fragmento de ADN por simplicidad (aunque debe recordarse que las enzimas de restricción en general cortan ADN bicatenario). Se muestra la localización de un sitio de reconocimiento de enzimas de restricción (no a escala). Un ejemplo de una enzima de restricción que corta fuera de su sitio de reconocimiento es AclI, que corta a una distancia de 14 desde el extremo de su sitio de reconocimiento cuando se considera la cadena 'inferior'.

Se diseña un oligonucleótido molde tal que después de la hibridación con el extremo cortado, se reduzca o bloquee la extensión sobre el oligonucleótido molde por la presencia de uno o más 2' O-metil nucleótidos. Los especialistas conocen bien otros medios para bloquear la extensión, tales como el uso de sitios abásicos en el oligonucleótido molde o el uso de desapareamientos (como se describe en este documento). La extensión se evita en este caso porque el extremo 3' del ADN cortado no está hibridado con un nucleótido de ADN sino a un 2' O-metil nucleótido.

Se muestra un ejemplo de una mutación de inserción en la parte inferior de la Figura 12A. La inserción de 4 pares de bases entre el sitio de reconocimiento para una cortadora externa tal como AclI y su sitio de corte desplazará la posición de corte 4 pares de bases a la izquierda. Cuando el ADN cortado resultante hibrida con el oligonucleótido molde que contiene 2' O-metilo, el complejo resultante tiene un tramo de 4 nucleótidos ADN-ADN apareados que permite de este modo la extensión del extremo 3' cortado.

Los datos para mostrar la eficacia de este enfoque se obtuvieron empleando oligonucleótidos sintéticos que imitan las diferentes cadenas inferiores cortadas que se generarían a partir de corte de ADN 'normal' o ADN que contiene una inserción 1 pb o 4 pb (Figura 12B).

La PCR finalmente está dirigida por los dos cebadores externos, JOELUX y CommR5, JOELUX es un cebador LUX marcado con JOE. Aparea 15 nucleótidos del oligonucleótido molde y de este modo se incorpora después de que se copie el oligonucleótido molde. CommR5 tiene 11 nucleótidos en común con los oligonucleótidos de ensayo y puede llegar a incorporarse después de que JOELUX copie un oligonucleótido de ensayo.

Las PCR se realizaron en 25 microlitros de Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, dNTP 0,2 mM, oligonucleótido molde 10 nM, cebador LUX fluorescente JOELUX 40 nM, CommR5 200 nM, 10⁸ oligonucleótidos de ensayo, 0,04 unidades de uracil ADN glucosilasa (New England Biolabs), 0,5 unidades de polimerasa Platinum Taq (Invitrogen). Un Corbett RotorGene 3000 se ajustó para funcionar a 37°C durante 5 minutos, 95°C durante 90 segundos, después 5 ciclos de (95°C 30 segundos, 55°C 40 segundos, 65°C 15 segundos), y después 55 ciclos de (95°C 5 segundos, 65°C 15 segundos). Se detectó la fluorescencia de JOE. Los ensayos se hicieron por triplicado. La incubación de 5 minutos a 37°C fue para dar tiempo a la digestión con uracil ADN glucosilasa.

Puede observarse en la Figura 12C que la amplificación de 10⁸ oligonucleótidos de ensayo (líneas continuas) que corresponde a la cadena inferior de ADN 'normal' después del corte con la cortadora externa es solamente evidente después del ciclo 30. Los oligonucleótidos de ensayo correspondientes a inserciones de 1 par de bases (líneas de puntos) o 4 pares de bases (líneas discontinuas) se amplifican aproximadamente 10 ciclos antes, lo que muestra que este sistema experimental podría usarse para amplificar de forma selectiva ADN a partir de mutantes de inserción.

Ejemplo 9: Diseños de oligonucleótido molde.

Se usó un sistema modelo para evaluar modificaciones de un oligonucleótido molde para su utilidad en los procedimientos de la invención. Se prepararon dos ADN de ensayo y se usaron como dianas. El ADN diana llamado

'cortado' corresponde a la cadena inferior de un elemento Alu que se ha cortado por la enzima de restricción BstUI. El corte satisfactorio de elementos Alu en el sitio BstUI solamente sucede si este sitio está sin mutilar. En este experimento no se usan enzimas de restricción porque se emplean 'miméticos' de oligonucleótido diana. El segundo ADN diana se llama 'no cortado' y es un mimético de un fragmento cortado o roto en una posición diferente a donde BstUI corta, que tiene una extensión de 5 T. Ambos oligonucleótidos diana se muestran en la orientación 3' a 5' en la Figura 13A. AluRev es el cebador inverso. Aparea completamente con su secuencia diana y también se muestra en la orientación 3' a 5'.

Se usó AluPhB y una serie de oligonucleótidos relacionados como oligonucleótidos de molde (Figura 13A). Éstos se muestran en la orientación 5' a 3'. La extensión de AluPhB está impedida por la presencia de un fosfato en el extremo 3' en lugar del grupo OH normal. AluPhB tiene una cola 5' (subrayada, Figura 13A) que una vez copiada por extensión de una secuencia diana adyacente a un extremo 3', permite la incorporación del cebador externo marcado con JOE llamado JOELUX. La amplificación por PCR se controló por fluorescencia de JOE según el cebador llega a incorporarse en el producto de PCR.

Las PCR se realizaron en 25 microlitros de Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, dNTP 0,2 mM, oligonucleótido molde 10 nM (AluPhB u otro), AluRev 40 nM, cebador LUX fluorescente JOELUX 40 nM, 0,04 unidades de uracil ADN glucosilasa (New England Biolabs), 0,5 unidades de polimerasa Platinum Taq (Invitrogen). Un Corbett RotorGene 3000 se ajustó para funcionar a 37°C durante 5 minutos, 95°C durante 2 minutos, después 5 ciclos de (95°C 10 segundos, 60°C 40 segundos, 70°C 5 segundos), y después 40 ciclos de (95°C 1 segundo, 65°C 15 segundos). Se detectó la fluorescencia de JOE. Los ensayos se hicieron por duplicado. La incubación de 5 minutos a 37°C se incluyó solamente para que las condiciones de ciclado fueran idénticas a otros experimentos en los que se requería digestión con enzimas de restricción antes de la PCR. Esto hizo que la comparación de los resultados de los diferentes experimentos fuera más directa. La uracil ADN glucosilasa (UDG) se añadió a la reacción para digerir el oligonucleótido molde que contiene nucleótidos U. A cada reacción se añadieron 10⁷ ADN diana cortado o 10¹⁰ no cortado.

El oligonucleótido molde de referencia AluPhB tiene una región de hibridación de 23 bases con la secuencia diana 'cortada' y tiene la extensión bloqueada por un fosfato en su extremo 3'. La Figura 13C(i) muestra la amplificación de 10⁷ moléculas "cortadas" y una cantidad 1000 veces mayor de la molécula "no cortada". Si no hubiera selectividad se esperaría un retardo de aproximadamente 10 ciclos en la amplificación de las moléculas "cortadas". La amplificación en un número de ciclo equivalente es indicativa de una selectividad de aproximadamente 1000 veces. El grado de selectividad puede estar limitado por la extensión del oligonucleótido molde (por ejemplo, si se retira el fosfato 3' o si se mella el oligonucleótido molde) o por el cebado inadecuado de las moléculas "no cortadas" sobre el oligonucleótido molde, en este caso por cebado inadecuado sobre AluPhB. Se han desarrollado oligonucleótidos molde alternativos que muestran selectividad mejorada a causa de ciertas características incorporadas.

La serie de oligonucleótidos molde alternativos difiere en las modificaciones 3' diseñadas para evitar la extensión del oligonucleótido molde. Las modificaciones mostradas incluyen incorporar una amina C7 o un espaciador C3 o un desapareamiento terminal de 3 bases (AluUUG, donde las dos U formarán sitios abásicos después del tratamiento con UDG) y/o modificaciones internas que proporciona un bloqueo a la extensión si hay cebado aberrante desde cadena arriba del sitio de cebado apropiado. Éstas incluyen bases modificadas con 2' O-metilo en AluMeAm y AluMeMult (letra minúscula negrita), la inclusión de un sitio abásico (X en AluAbSp) o de bases de uracilo que pueden convertirse en sitios abásicos por tratamiento con UDG (Figura 13B).

La incorporación de modificaciones de bloqueo de la extensión en el oligonucleótido molde inhibía sustancialmente la amplificación de las moléculas "no cortadas", lo que conduce a una selectividad de factor 1000 o mayor. La comparación de AluMeAm y AluMeMult muestra una selectividad con una cantidad mayor de bases modificadas, aunque su presencia probablemente también está reduciendo la eficacia del cebador correcto.

La secuencia de AluHL es tal que sus extremos 5' y 3' pueden formar una estructura de horquilla (teniendo el extremo 3' múltiples desapareamientos con la molécula "cortada" diana que evitará el cebado. La estructura de horquilla posiblemente evita tanto el cebado incorrecto por el oligonucleótido molde como el cebado incorrecto sobre el oligonucleótido molde por la molécula de ácido nucleico "no cortada".

Estos experimentos muestran que puede evitarse la extensión de los oligonucleótidos molde de diferentes modos, y que modificaciones que reducen o evitan el copiado de la parte de hibridación de los oligonucleótidos de molde pueden aumentar la especificidad de la ES-PCR.

REFERENCIAS

Chan, T. L.; Zhao, W.; Leung, S. Y., y Yuen, S. T. BRAF and KRAS mutations in colorectal hiperplastic polyps and serrated adenomas. Cancer Res. 15 de agosto de 2003; 63(16):4878-81.

Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. Clin Microbiol Rev. octubre de 2000; 13(4): 559-70.

Mueller PR y B Wold. In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. Science. 10 de noviembre de 1989; 246(4931):780-6. Erratum en: Science 18 de mayo de 1990; 248(4957):802.

- Pfeifer GP, Steigerwald SD, Mueller PR, Wold B, Riggs AD. Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR. Science. 10 de noviembre de 1989; 246(4931):810-3.
- Schumacher A, Kapranov P, Kaminsky Z, Flanagan J, Assadzadeh A, Yau P, Virtanen C, Winegarden N, Cheng J, Gingeras T, Petronis A. Microarray-based DNA methylation profiling: technology and applications. Nucleic Acids Res. 20 de enero de 2006; 34(2): 528-42.
- Sharrard RM, Royds JA, Rogers S, Shorthouse AJ. Patterns of methylation of the c-myc gene in human colorectal cancer progression. Br.J.Cancer 1992 65:667-672.
- Steigerwald SD, Pfeifer GP, Riggs AD. Ligation-mediated PCR improves the sensitivity of methylation analysis by restriction enzymes and detection of specific DNA strand breaks. Nucleic Acids Res. 25 de marzo de 1990; 18(6):1435-9.
- Suraweera, N., Duval, A., Reperant, M., Vaury, C., Furlan, D., Leroy, K., Seruca, R., Iacopetta, B. y Hamelin, R. Evaluation of Tumor Microsatellite Instability Using Five Quasimonomorphic Mononucleotide Repeats and Pentaplex PCR, Gastroenterology 2002 123(6):1804-1811.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KS. Real-time multiplex PCR assays. Methods. diciembre de 2001; 25(4):430-42.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la amplificación selectiva de una muestra de una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia diana adyacente a un extremo 3', comprendiendo el procedimiento

(i) poner en contacto la muestra con un oligonucleótido molde que tiene

(a) una región 3' sustancialmente complementaria a la secuencia diana adyacente al extremo 3' de una molécula de ácido nucleico;

(b) una cola 5' que comprende una secuencia de ácido nucleico tal que se forma una cola 5' libre cuando el oligonucleótido molde hibrida con la secuencia diana localizada adyacente a un extremo 3', proporcionando la cola 5' un molde para la extensión del extremo 3' de la secuencia diana que incorpora la secuencia complementaria a la cola 5' del oligonucleótido molde provocando la adición de la secuencia complementaria a la cola 5' a la secuencia diana; y

(c) una modificación en la región 3' que retarda la extensión 3' de dicho oligonucleótido molde;

(ii) poner en contacto la muestra con un segundo oligonucleótido para cebar en una dirección inversa el oligonucleótido molde, y opcionalmente un tercer oligonucleótido que comparte la secuencia de nucleótidos con la cola 5' del oligonucleótido molde;

(iii) realizar la amplificación de la muestra en la que

(a) la hibridación del oligonucleótido molde con la secuencia diana adyacente a un extremo 3' se estabiliza por copiado de la cola 5' del oligonucleótido molde por extensión desde el extremo 3' de la secuencia diana en presencia de extensión 3' retardada de dicho oligonucleótido; y

(b) en la que la consecuente hibridación del oligonucleótido molde estabilizada con la secuencia diana adyacente a un extremo 3' potencia la eficacia de la extensión 3' del oligonucleótido molde, y

(c) en la que la amplificación sucede usando el oligonucleótido molde y/o el tercer oligonucleótido en combinación con el segundo oligonucleótido, provocando la amplificación selectiva de la secuencia diana adyacente a un extremo 3'.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la amplificación selectiva es de una muestra de una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia diana adyacente a un extremo 3' en presencia de moléculas que comprenden la secuencia diana incluida dentro de la molécula, donde la hibridación del oligonucleótido molde con la secuencia diana adyacente a un extremo 3' está estabilizada en comparación con la hibridación de dicho oligonucleótido con la secuencia diana incluida dentro de la molécula de modo que la eficacia de la extensión 3' del oligonucleótido molde cuando hibrida con la secuencia diana adyacente a un extremo 3' está potenciada en comparación con la extensión del oligonucleótido molde hibridado con la secuencia diana incluida dentro de la molécula.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la amplificación selectiva es de una muestra de una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia diana adyacente a un extremo 3' en presencia de una población mixta de moléculas que tienen diferentes extremos 3', donde la hibridación del oligonucleótido molde con la secuencia diana adyacente a un extremo 3' está estabilizada en comparación con la hibridación de dicho oligonucleótido con una secuencia no complementaria adyacente a un extremo 3' de modo que la eficacia de la extensión 3' del molde oligonucleotídico cuando hibrida con la secuencia diana adyacente a un extremo 3' está potenciada en comparación con la extensión del oligonucleótido molde hibridado con la secuencia no complementaria adyacente a un extremo 3'.

4. El procedimiento de la reivindicación 2 ó 3, en el que la molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia diana adyacente a un extremo 3' es el resultado de la escisión de la molécula, donde la escisión se debe opcionalmente a una endonucleasa de restricción específica de secuencia.

5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que una modificación en la región 3' del oligonucleótido molde que retarda la extensión 3' del oligonucleótido se selecciona entre el grupo constituido por

(i) la incorporación de un desapareamiento de nucleótido 3' terminal,

(ii) la incorporación de uno o más desapareamientos de nucleótidos en la región 3' del oligonucleótido molde cerca del extremo 3',

(iii) la incorporación de una delección en la región 3' del oligonucleótido molde cerca del extremo 3',

(iv) la incorporación de una inserción en la región 3' del oligonucleótido molde cerca del extremo 3', y

(v) cualquier combinación de modificaciones (i)-(iv).

6. Un procedimiento para la amplificación selectiva de una muestra de una molécula de ácido nucleico que tiene

una secuencia diana adyacente a un extremo 3', comprendiendo el procedimiento

(i) poner en contacto la muestra con un oligonucleótido molde que tiene

(a) una región 3' sustancialmente complementaria a la secuencia diana adyacente al extremo 3' a una molécula de ácido nucleico; y

(b) una cola 5' que comprende una secuencia de ácido nucleico tal que se forma una cola 5' libre cuando el oligonucleótido molde hibrida con la secuencia diana localizada adyacente a un extremo 3', proporcionando la cola 5' un molde para la extensión del extremo 3' de la secuencia diana que incorpora la secuencia complementaria a la cola 5' del oligonucleótido molde provocando la adición de la secuencia complementaria a la cola 5' a la secuencia diana; y

(c) una modificación en la región 3' que bloquea la extensión 3' de dicho oligonucleótido molde, o una modificación en la región de hibridación del oligonucleótido molde que permite la extensión 3' pero impide o bloquea el copiado en la región 3' de dicho oligonucleótido;

(ii) poner en contacto la muestra con un segundo oligonucleótido para el cebado en una dirección inversa del oligonucleótido molde;

(iii) poner en contacto la muestra con un tercer oligonucleótido que comparte la secuencia de nucleótidos con la cola 5' del oligonucleótido molde y a partir del cual la extensión 3' procede sin impedimentos;

(iv) realizar la amplificación de la muestra en la que

(a) la hibridación del oligonucleótido molde con las moléculas de ácido nucleico en la muestra está seguida por el copiado de la cola 5' del oligonucleótido molde cuando el oligonucleótido molde hibrida con la secuencia diana adyacente a un extremo 3' pero no en presencia de extensión 3' bloqueada del oligonucleótido molde, o en presencia de extensión 3' no impedida de un oligonucleótido molde a partir del cual el posterior copiado está impedido o bloqueado; y

(b) en la que la amplificación procede con el segundo y tercer oligonucleótidos, amplificando de forma selectiva la secuencia diana localizada adyacente a un extremo 3' debido a la cola 5' copiada.

7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la amplificación selectiva es de una muestra de una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia diana adyacente a un extremo 3' en presencia de moléculas que comprenden la secuencia diana incluida dentro de la molécula, donde el copiado de la cola 5' del oligonucleótido molde no sucede cuando el oligonucleótido molde hibrida con la secuencia diana incluida dentro de la molécula de modo que no procede la amplificación de la secuencia diana incluida dentro de la molécula.

8. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la amplificación selectiva es de una muestra de una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia diana adyacente a un extremo 3' en presencia de una población mixta de extremos 3', donde el copiado de la cola 5' del oligonucleótido molde no sucede cuando el oligonucleótido molde hibrida con una secuencia no complementaria adyacente a un extremo 3', de modo que no procede la amplificación de la secuencia no complementaria adyacente a un extremo 3'.

9. El procedimiento de la reivindicación 7 u 8, en el que la molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia diana adyacente a un extremo 3' es el resultado de la escisión de la molécula, donde la escisión se debe opcionalmente a una endonucleasa de restricción específica de secuencia.

10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en el que la modificación en la región 3' del oligonucleótido molde que bloquea la extensión 3' del oligonucleótido molde se selecciona entre el grupo que consiste en

(i) la incorporación de uno o más restos o análogos de nucleótidos no extensibles en su extremo 3',

(ii) la incorporación de una combinación de un resto o análogo de nucleótido no extensible 3' terminal y uno o más desapareamientos de nucleótidos en la región 3' del oligonucleótido molde cerca de su extremo 3',

(iii) la incorporación de uno o más sitios abásicos en la región 3' del oligonucleótido molde cerca de su extremo 3', y

(iv) la incorporación de una combinación de uno o más sitios abásicos y uno o más desapareamientos de nucleótidos en la región 3' del oligonucleótido molde cerca de su extremo 3'.

11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el uno o más restos o análogos de nucleótidos no extensibles se seleccionan entre el grupo que consiste en

(i) un 2', 3' didesoxinucleótido,

(ii) un espaciados 3' C3, C18 o de otra longitud,

- (iii) un nucleótido 3' fosforilado,
- (iv) una base de ácido peptidonucleico,
- (v) un engarce amina,
- (vi) uno o más uracilos tratados con uracil ADN glucosilasa,
- (vii) ARN,
- (viii) uno o más restos de 2' O-metil ARN, y
- (ix) cualquier combinación de (i)-(viii).

12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en el que una modificación en la región 3' que permite la extensión 3' pero impide o bloquea el copiado en la región 3' de dicho oligonucleótido se selecciona entre el grupo que consiste en

- (i) la inserción dentro de la región 3' del oligonucleótido molde de uno o más análogos de bases,
- (ii) la inserción de uno o más nucleótidos de ARN,
- (iii) la inserción de uno o más sitios abásicos, y
- (iii) cualquier combinación de (i) - (iii).

13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que los extremos 3' de las moléculas de ácido nucleico en la muestra que incluye el extremo 3' de la molécula de ácido nucleico marcada como diana, son el resultado de la digestión de la muestra con una endonucleasa de restricción cortadora flanqueante, y opcionalmente donde la modificación en la región 3' que bloquea la extensión 3' de dicho oligonucleótido molde es la incorporación de uno o más análogos de bases, uno o más sitios abásicos o cualquier combinación de éstas en su extremo 3'.

14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el oligonucleótido molde incorpora adicionalmente una modificación en la región 3' que bloquea la extensión 3' de la secuencia diana.

15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la modificación es la incorporación en la región 3' del oligonucleótido molde de uno o más análogos de bases.

16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el oligonucleótido molde incorpora un desapareamiento de nucleótido 3' terminal, uno o más sitios abásicos y la incorporación de uno o más análogos de bases.

17. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que el segundo oligonucleótido es un oligonucleótido molde adicional.

18. Un kit para la amplificación selectiva de ADN escindido de una muestra de ADN que comprende ADN escindido y no escindido, comprendiendo el kit (i) un oligonucleótido molde, (ii) un segundo oligonucleótido, y (iii) un tercer oligonucleótido; definido de acuerdo con el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17.

19. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 ó 9, en el que la endonucleasa de restricción es una endonucleasa de restricción sensible a metilación específica de secuencia, seleccionada entre el grupo que consiste en HpaII, HhaI, Bstul, NotI, SmaI, SacII, GluI y BsiI.

20. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3 o reivindicación 8, para detectar la presencia o ausencia de una delección o inserción en un ácido nucleico en una muestra,

en el que la molécula de ácido nucleico en la muestra se digiere con una enzima de restricción que tiene un sitio de escisión fuera de su sitio de reconocimiento,

y en el que la delección o inserción sucede entre el sitio de reconocimiento y el sitio de escisión de la enzima de restricción.

21. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 ó 9, en el que la endonucleasa de restricción se elige para distinguir entre la presencia o ausencia de un sitio de restricción en las moléculas de ácido nucleico de la muestra.

22. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 usado para la detección de un polimorfismo o mutación de un único nucleótido, para la detección de inestabilidad en repeticiones de nucleótidos simples, o para la determinación del estado de metilación de una molécula de ácido nucleico.

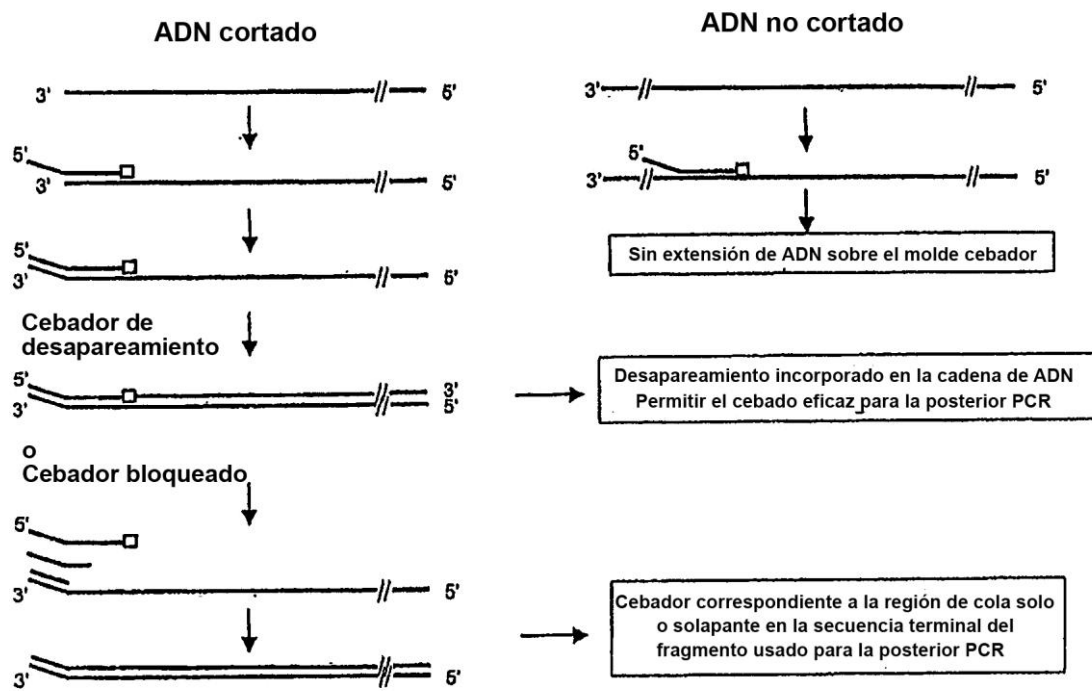


FIGURA 1

Sitios del cebador para 21qTFMLHC/T y 21qTRC sobre ADN cortado con BstUI

```

5' CGGGAGGAATTTAATCTAGAGTCTAACTTGGTGGCTGTCCCACTGAGTCCCGGGCACGGGTCAGGCTAACCG 3'
3' GCCCTCCTTAAATTAGATCTCAGATTGAACGCCGACAGGGGTGACTCAGGGCCCGTGGCCAGTCCGATTGGC 5'

21qTFMLHC/T CACTCCCACTCGGGAGGAATTTAATCTAGC >

```

Sitios del cebador para 21qTFMLHC/T y 21qTRC sobre ADN no cortado

```

5' AGGCTAACCGCGGGAGGAATTTAATCTAGAGTCTAACTTGGTGGCTGTCCCACTGAGTCCCGGGCACGGGTCAGGCTAACCG 3'
3' TCCGATTGGCGCCCTCCTTAAATTAGATCTCAGATTGAACGCCGACAGGGGTGACTCAGGGCCCGTGGCCAGTCCGATTGGC 5'

21qTFMLHC/T CACTCCCACTCGGGAGGAATTTAATCTAGC >

```

Las bases de los cebadores que aparean con secuencias diana se muestran subrayadas. Los desapareamientos se muestran en negrita

FIGURA 2

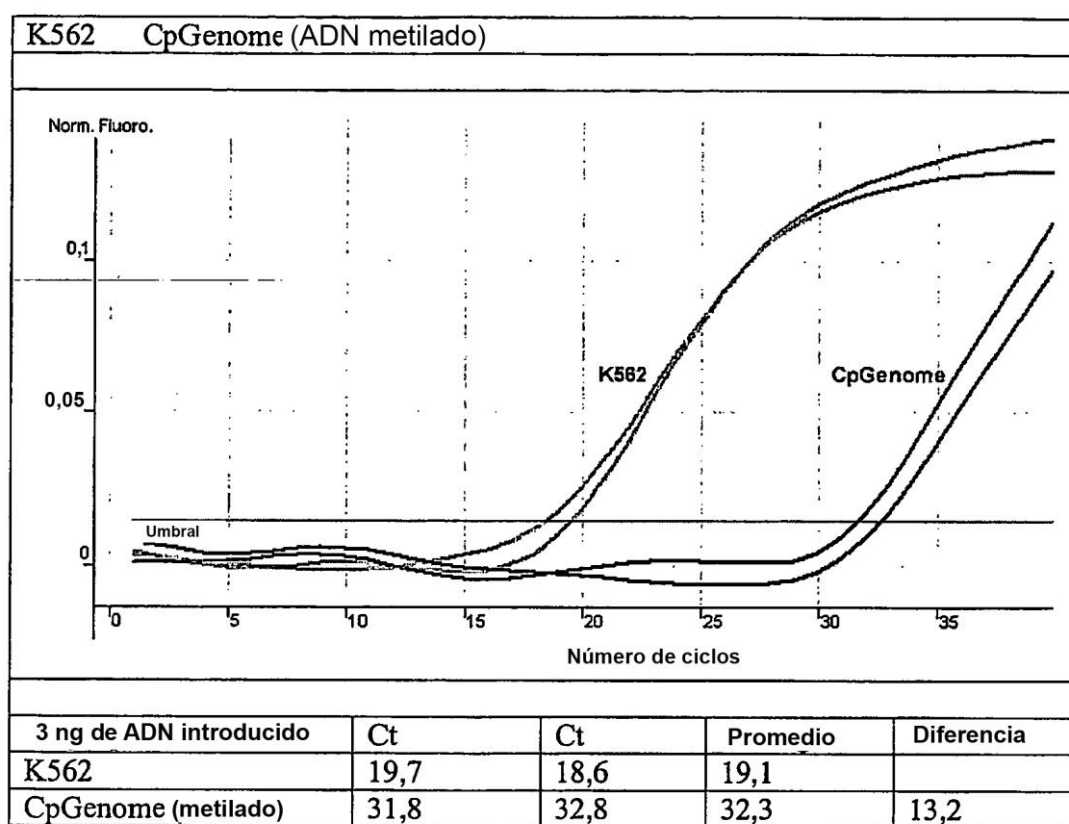


FIGURA 3A

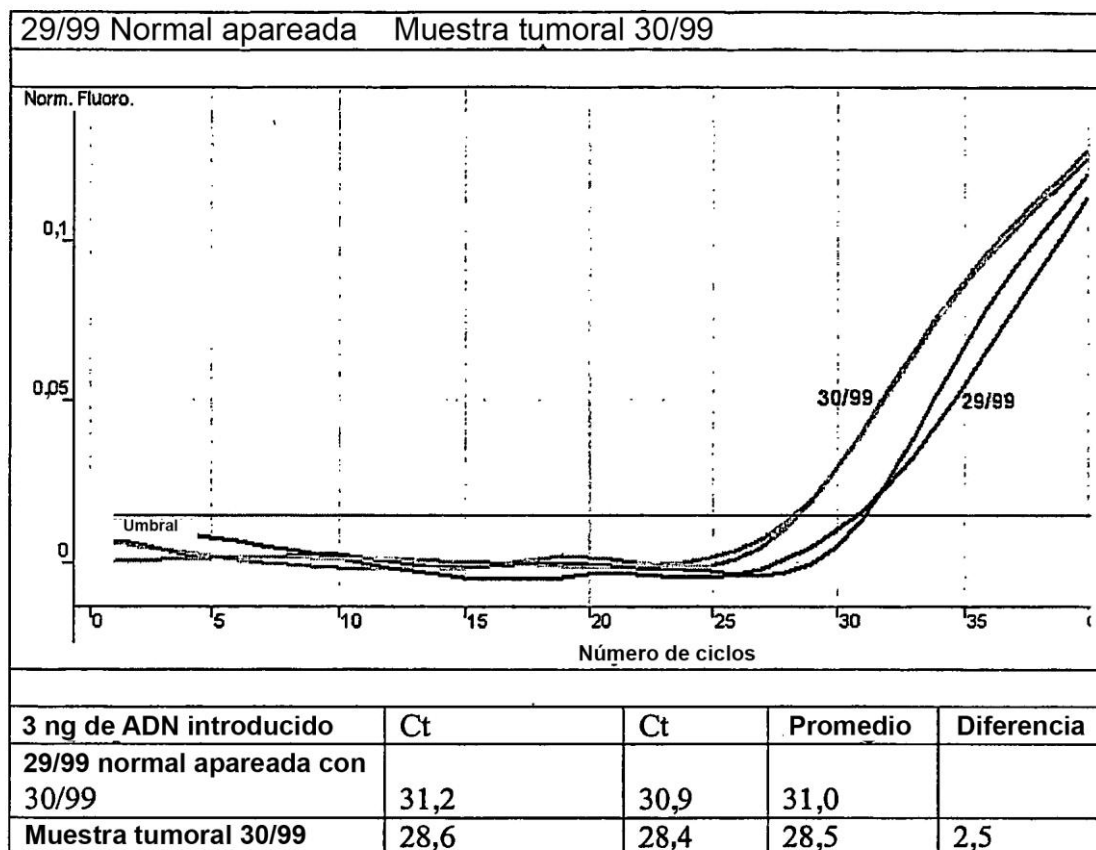


FIGURA 3B

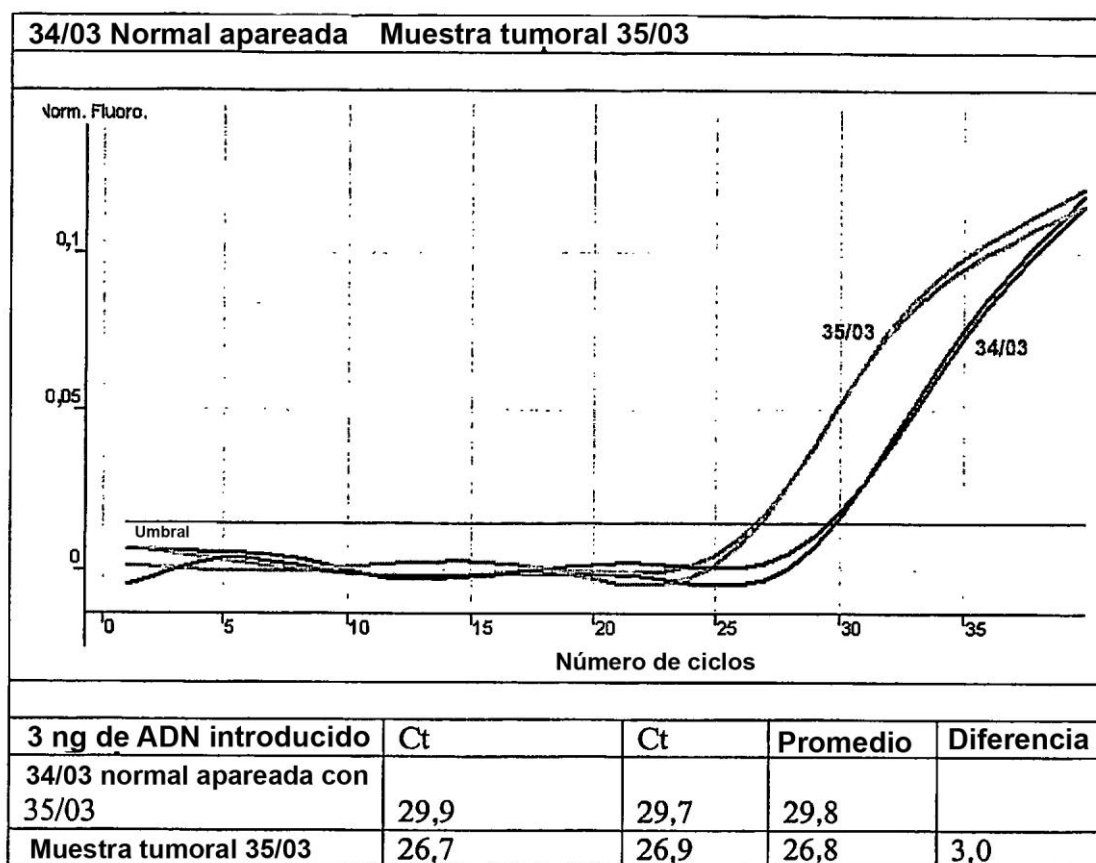


FIGURA 3C

Cebador molde específico de extremo directo 21qTFMLHC/T

Cebador molde específico de extremo inverso 21qTRM13

```
CACTCCCACTCGGGAGGAATTTAATCTAGC > 21qTFMLHC/T
5' CGGGAGGAATTTAATCTAGAGTCTAACTTGCGTGGCTGTCCCCACTGAGTCCCGGGCACGGGTCAGGCTAACCG 3'
21qTRM13 < TCAGTCCGATTGGCTCACACTCCC
```

FIGURA 4A

	% K562	% CpGenome (Metilado)	Ct de SYBR Green
	100	0	26,4
	10	90	30,0
	1	99	33,6
	0,1	99,9	40,2
	0	100	47,3
	Sin ADN añadido		56,0

Curvas de amplificación con SYBR Green:

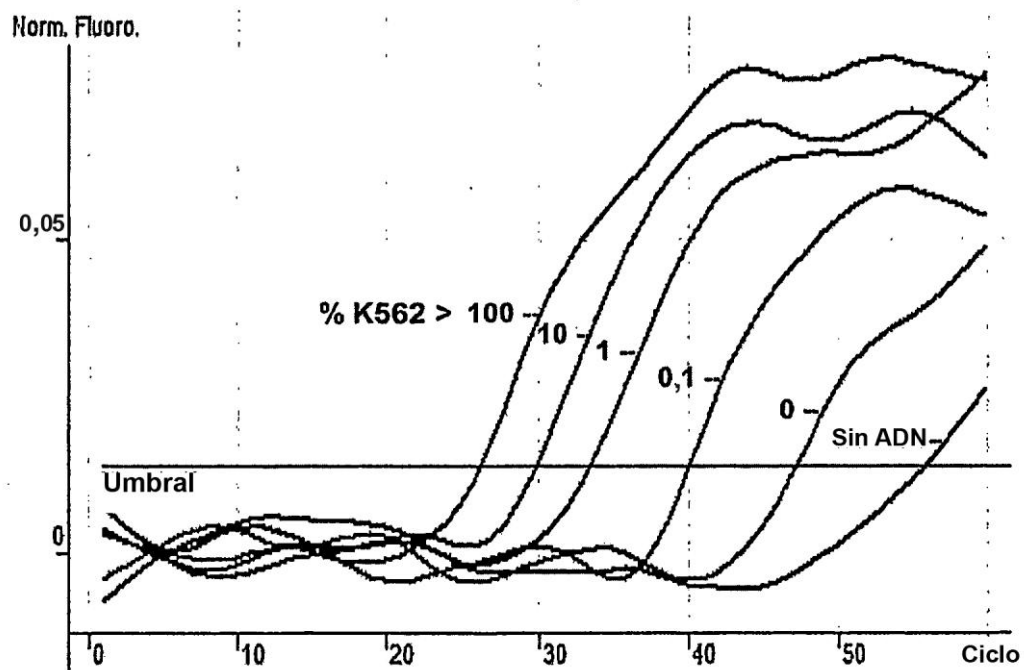


FIGURA 4B

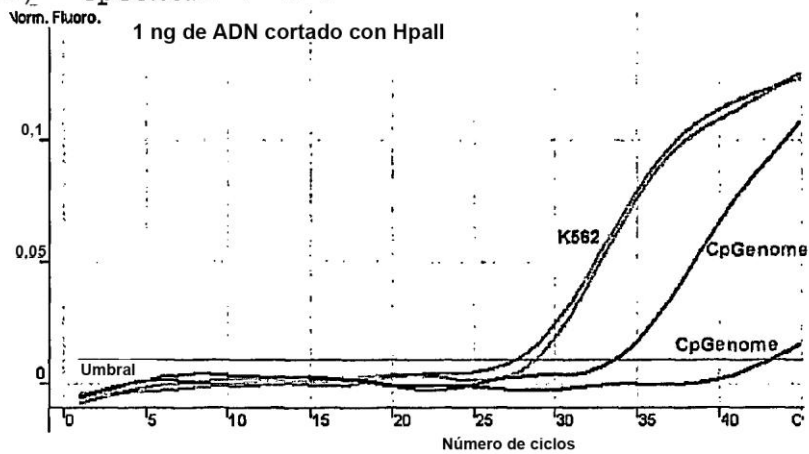
Sitio HpaII dentro del gen Myc marcado como diana por el cebador de desapareamiento

Myc no cortado 5' GAGCGCCAGAGGAGGAACGAGCTAAAACGGAGCTTTTTTGCCCTGCGTGACCAGATCCCGGAGTTGGAAAA
MycFC1 CGCCAGAGGAGGAACGAGCTAA 3' >>
Myc cortado con HpaII GAGCGCCAGAGGAGGAACGAGCTAAAACGGAGCTTTTTTGCCCTGCGTGACCAGATCC 3'
<< 3' CCGCACTGGTCTAGGTCCCTGCTCC
MycRM1

FIGURA 5A

1 ng de ADN cortado con HpaI	Ct de SYB	SYB Ct	Ct promedio de SYB	Diferencia de Ct promedio
K562 (hipometilado)	29,0	27,8	28,4	
CpGenome (Metilado)	33,9	43,3	38,6	10,2
34/03 (apareada normal)	27,8	27,5	27,6	
35/03 (muestra tumoral)	23,6	23,7	23,6	4,0

K562 (Gris) CpGenome (Negro)



34/03 (Normal, negro)

35/03 (Tumoral, gris)

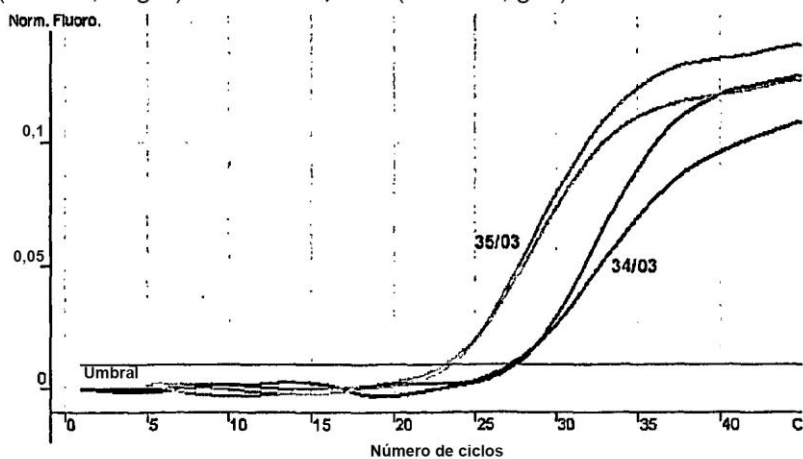


FIGURA 5B

ADN no cortado de LINE, sitios HpaII en negrita

```
5' NNNNCCGGTCTACAGCTC---CCAGCGTGAGCGACGCAGAAGACGGGTGATTTCTGCATTT---CCATCTGAGGTACCGNNNN 3'
3' NNNNGGCCAGATGTCGAG---GGTCGCACTCGCTGCGTCTTCTGCCACTAAAGACGTAAA---GGTAGACTCCATGGCCNNNN 5'
```

LINE cortado con HpaII (y copiado)

```
5' CGGTCTACAGCTC---CCAGCGTGAGCGACGCAGAAGACGGGTGATTTCTGCATTT---CCATCTGAGGTACCG
3' GCCAGATGTCGAG---GGTCGCACTCGCTGCGTCTTCTGCCACTAAAGACGTAAA---GGTAGACTCCATGGC
```

HEX- CGACGCAGAAGACGGGTGATTTCTG BH1 5' Sonda LPAHex

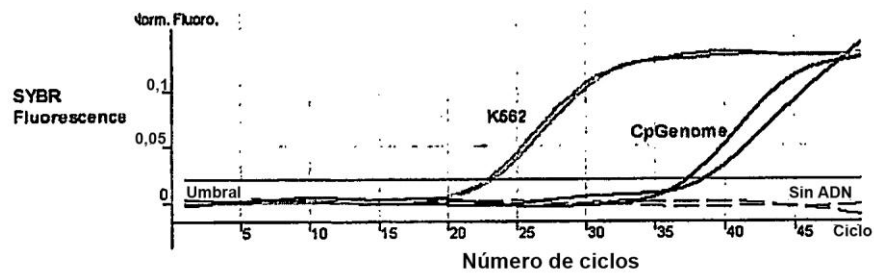
CACGCAGGGT**CGGTCTACAGCTC**gtg**CCAGCG** L1FES3-6 >>

<< L1RE13 CGTAAActgGGTAGACTCCATGGCTCCGACGTCC

FIGURA 6A

Resultados de SYBR Green

	5 ng de ADN	Ct de SYB	Ct de SYB	Prom.	Dif.
2	K562 HpaII	23,3	23,0	23,2	14,9
4	CpGen HpaII	38,6	37,5	38,1	
3	TEX	—	—	—	



Resultados de la sonda HEX

	5 ng de ADN	Ct de HEX	Ct de HEX	Prom.	Dif. n
2	K562 HpaII	26,5	26,2	26,4	14,5
4	CpGen HpaII	41,8	40,0	40,9	
3	TEX	—	—	—	

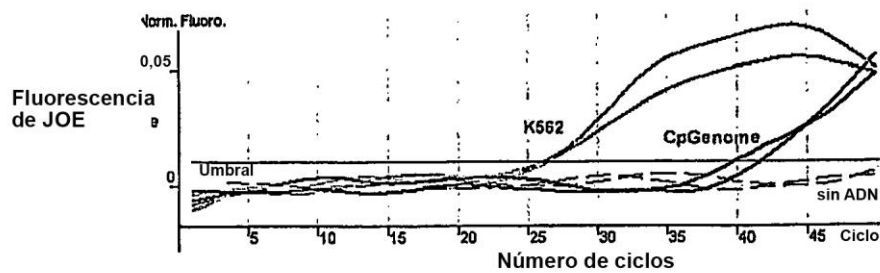


FIGURA 6B

JOELUX CACAGGTTCTCACCATTCCGCCCTGTG >>

BAFMLJ15 CCATTCCGCCCTGTGTCGGTGGCTCACGCCT Fosfato

Diana cortada con BstU1 5' CGGTGGCTCACGCCTGTAATCCAGCACATTGGGAGGCCGAGGCGG--- 3'
 3' GCCACCGAGTCCGGACATTAGGGTCGTGAAACCCTCCGGCTCCGCC--- 5'

<< AluRev21 TCGTGAAACCCTCCGGCTCCG 5'

FIGURA 7A

1 ng de ADN	Ct de JOE	Ct de JOE	Ct promedio de JOE	Diferencia
K562 (Hipometilado)	19,3	19,7	19,5	
CpGenome (Metilado)	25,7	26,1	25,9	6,4
Sin ADN de control	33,6	33,9	33,7	

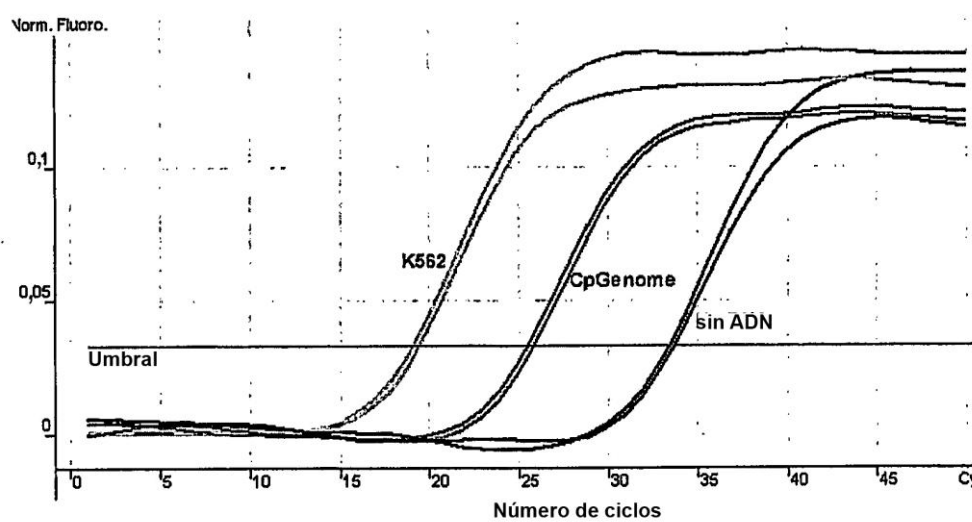


FIGURA 7B

Secuencia de hMLH1

ADN no cortado 5' --CCAGGGCCGCGGCTCGCCCGTCCGCCACATACCGCTCGTAGTATTGTTGCTCAGCCTCGTAGTGGCGCCTGACGT--3'
 3' --GGTCCCGGCGCGCGAGCGGCGTGTATGGCGAGCATCAATAGCACGAGTCGGAGCATCACCGCGGACTGCA--5'

CACAGGTTCTCACCATTCCGCCCTGTG 3' >> JOELUX
 MLHJ65 CCATTCCGCCCTGTGTGCTCGCTCGCCGTCCGCCCTUG 3'

ADN cortado con Glal 5' CGCTCGCCGTCCGCCACATACCGCTCGTAGTATTGTTGCTCAGCCTCGTAGTGGCGCCTGACGT--
 3' GCGAGCGGCAGGCGGTGTATGGCGAGCATCATAGCACGAGTCGGAGCATCACCGCGGACTGCA--
 << 3' ATAAGCACGAGTCGGAGCATCACCG MLHrev3 5'

Secuencia recuadrada: sitio Glal.

C: C mostrada en negrita, bases C que deben mutilarse para que Glal corte de forma eficaz.

Secuencia subrayada: Sin apareamiento con la secuencia de hMLH1

--: La secuencia continúa pro no se muestra

FIGURA 8A

Tabla que muestra los valores de Ct

	ADN	Ct de JOE			Ct promedio	Diferencia debida a Glal
1	ADN completamente metilado CpGenome + Glal	39	40	37	38,6	6,0
2	ADN completamente metilado CpGenome, sin Glal	46	42	46	44,5	
3	Sin control de ADN	48	47		47,2	
4	ADN sanguíneo + HhaI	36	36	37	36,1	8,4

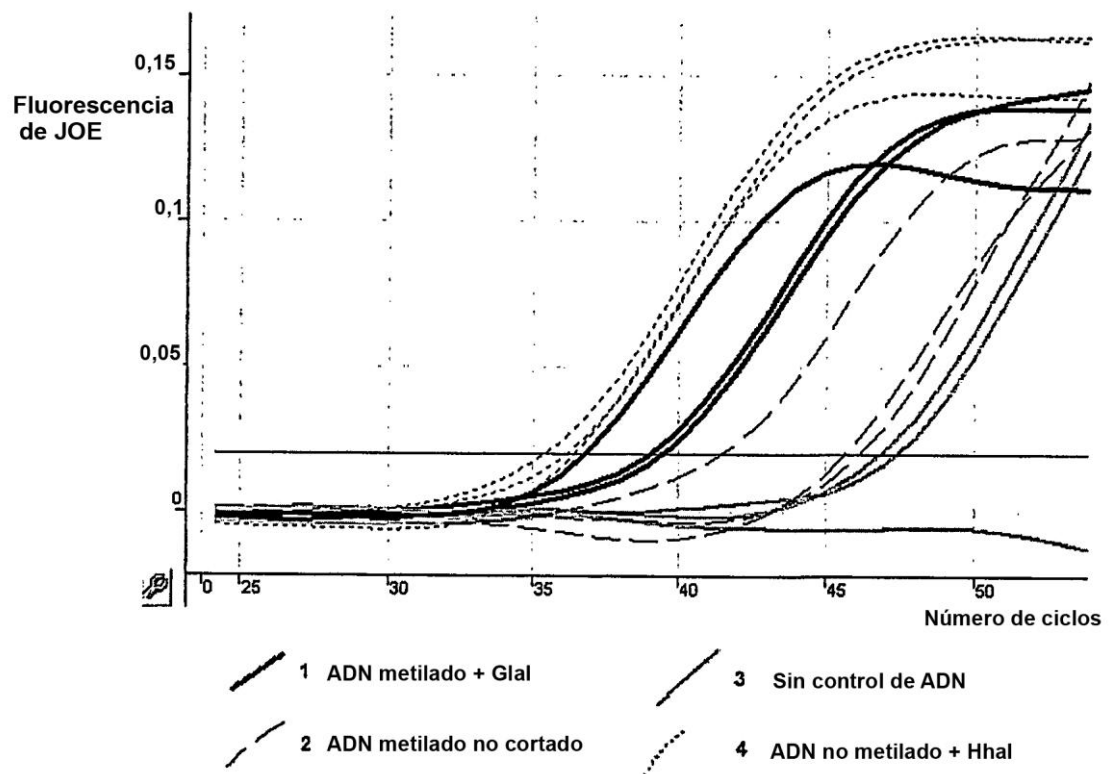


FIGURA 8B

Figura 9A(i)

BRFMX

5' CCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTCTAG>

CCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCA
CCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGAGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCA

Figura 9A(ii)

BRFR1

5' AATGGATCCAGACAACTGTTCAAAC 3'

Figura 9A(iii)

BRAF-T(WT)

CCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTCTAGTGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCA

BRAF-A (Mutante)

CCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTCTAGAGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCA

FIGURA 9A

BRF2 << ACCCAGGGTAGTCAAACCTTG
BRAF-A << TCTTTAGAGCTACCTCAGGGTAGTCAAACCTTG
BRFU 5' CCGCCCTGTGCAGAAATCTCGATGGUUG
JOELUX 5' CACAGTTCTCACCATTCCGCCCTGtG >>

FIGURA 9B

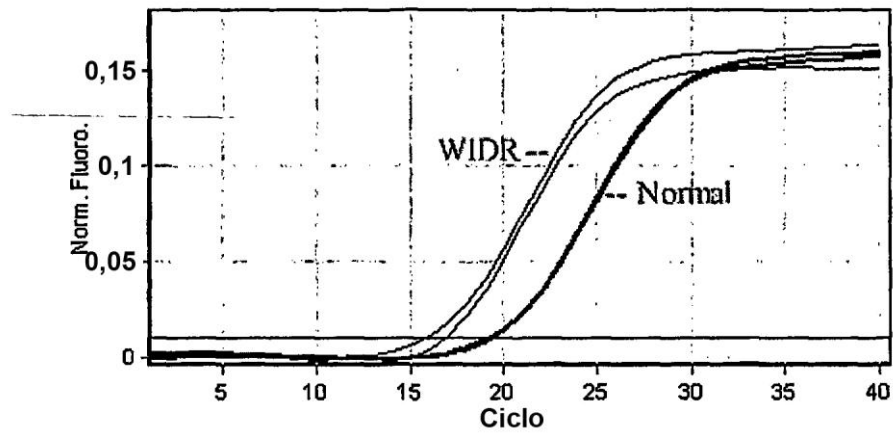


FIGURA 9C

Fig.10A(i) Escisión con enzimas de restricción

Secuencia corta .. GAAGACACTTTTT-3' TTTTTTTCAGCCTTCTG..
 .. CTTCTGTGAAAAAAAAA. 3'-AAAGTCGGAAGTC..

Secuencia larga .. GAAGACACTTTTT-3' TTTTTTTTTTTCAGCCTTCTG..
 .. CTTCTGTGAAAAAAAAA 3'-AAAAAGTCGGAAGTC..

**Fig. 10A(ii) Transferasa terminal (cadena inferior)**

Secuencia corta 3'-TTTTTTTTTTTAAAGTCGGAAGTC..

Secuencia larga 3'-TTTTTTTTTTTAAAAAGTCGGAAGTC..

**Fig. 10A(iii) Cebado selectivo**

Secuencia corta 3'-TTTTTTTTTTTAAAGTCGGAAGTC..
 5' AAAAAAAAAAATTTTCAG> cebado

Secuencia larga 3'-TTTTTTTTTTTAAAAAGTCGGAAGTC..
 5' AAAAAAAAAAATTTTCAG> sin cebado

Fig. 10A(iv) ES-PCR

Secuencia corta 3'- <AAAGTCGGAAGTC..
 Oligo molde 5' ACCATTCCGCCCTGTGCGGATTTTCAGCCTTCAG-NH2

Secuencia larga 3'- AAAAAAGTCGGAAGTC..
 Oligo molde 5' ACCATTCCGCCCTGTGCGGATTTTCAGCCTTCAG-NH2

FIGURA 10A

Fig. 10B(i)

Diez T:

CCGCGTTATCCGACCAGGCTTTTTTTTTCCTTCATAATGCACTTTGGAGAAGCAGCA...
 GGCGCAATAGGCTGGTCCGAAAAAAAAAAGGAAGTATTACGTGAAACCTCTTCGTCGT...

Nueve T:

CCGCGTTATCCGACCAGGCTTTTTTTTTCCTTCATAATGCACTTTGGAGAAGCAGCA...
 GGCGCAATAGGCTGGTCCGAAAAAAAAAAGGAAGTATTACGTGAAACCTCTTCGTCGT...

Fig. 10B(ii)

Extremos 3' generados cuando se corta con Mmel:

Diez	5'	ATAATGCACTTTGGAGAAGCAGCA...
	3'	AGTATTACGTGAAACCTCTTCGTCGT...
Nueve	5'	TAATGCACTTTGGAGAAGCAGCA...
	3'	GTATTACGTGAAACCTCTTCGTCGT...

Fig. 10B(iii)

Engarce	
CACCGACCGTCGAGCA	TAATGCACTTTGGAGAAGCAGCA...
GTGGCTGGCAGCTC	GTATTACGTGAAACCTCTTCGTCGT...

Cebador directo
 CACCGACCGTCGAGTCATAATG

Fig. 10B(iv)

	3'	AGTATTACGTGAAACCTCTTCGTCGT
5'	ACCATTCCGCCCTGTGCGGAACATAATGCACTTTG-NH2	
	3'	<GTATTACGTGAAACCTCTTCGTCGT...
5'	ACCATTCCGCCCTGTGCGGAACATAATGCACTTTG-NH2	

FIGURA 10B

Figura 11A(i): Región del microsatélite NR22

5' GAAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATATGCAGTTTGTAAACAACAACTGGATGGCATCAG
 3' CTTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTATACGTCAAACATTCTTGTGTTTGACCTACCGTAGTC
 MboII Sitio NR22R1 del cebador inverso

Figura 11A (ii): Hibridación con el oligo molde de control F1NR22-0:

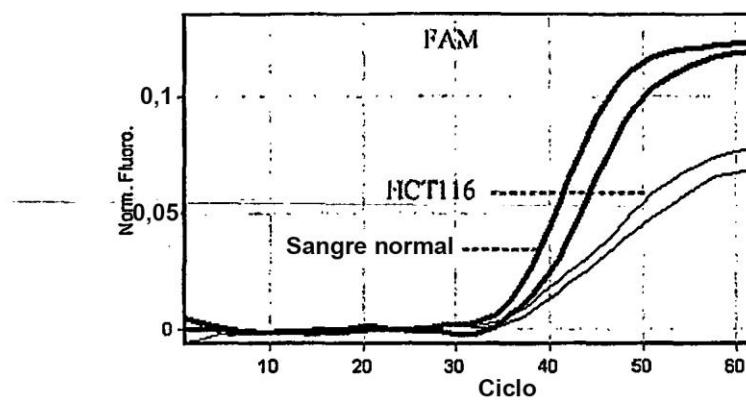
22 3' AAAAAAAAAAAATTATACGTCAAACATTCTTGTGTTTGACCTACCGTAGTC
 5' CAGATCCTCTCCTCCGTGAGTTTTTTTTTTTTTAATATGCAGTTTGGUUC 3'
 20 3' AAAAAAAAAAAATTATACGTCAAACATTCTTGTGTTTGACCTACCGTAGTC
 5' CAGATCCTCTCCTCCGTGAGTTTTTTTTTTTTTAATATGCAGTTTGGUUC 3'
 18 3' AAAAAAAAAATTATACGTCAAACATTCTTGTGTTTGACCTACCGTAGTC
 5' CAGATCCTCTCCTCCGTGAGTTTTTTTTTTTTTAATATGCAGTTTGGUUC 3'
 16 3' AAAAAAAATTATACGTCAAACATTCTTGTGTTTGACCTACCGTAGTC
 5' CAGATCCTCTCCTCCGTGAGTTTTTTTTTTTTTAATATGCAGTTTGGUUC 3'
 5' CACGGTCCAGATCCTCTCCTCCGTG >> FAMLUX1

Figura 11A(iii): Hibridación con el oligo molde de ensayo J5NR22-4:

22 3' AAAAAAAAAAAATTATACGTCAAACATTCTTGTGTTTGACCTACCGTAGTC
 5' GGCTGGACGCATCGTAGAGTTTTTTTTTTAATATGCAGTTTGGUUC 3'
 20 3' AAAAAAAAAAAATTATACGTCAAACATTCTTGTGTTTGACCTACCGTAGTC
 5' GGCTGGACGCATCGTAGAGTTTTTTTTTTAATATGCAGTTTGGUUC 3'
 18 3' AAAAAAAAAATTATACGTCAAACATTCTTGTGTTTGACCTACCGTAGTC
 5' GGCTGGACGCATCGTAGAGTTTTTTTTTTAATATGCAGTTTGGUUC 3'
 16 3' AAAAAAAATTATACGTCAAACATTCTTGTGTTTGACCTACCGTAGTC
 5' GGCTGGACGCATCGTAGAGTTTTTTTTTTAATATGCAGTTTGGUUC 3'
 5' CTACGAGTGGCTGGACGCATCGTAG >> JOELUX5

FIGURA 11A

11B(i)



11B(ii)

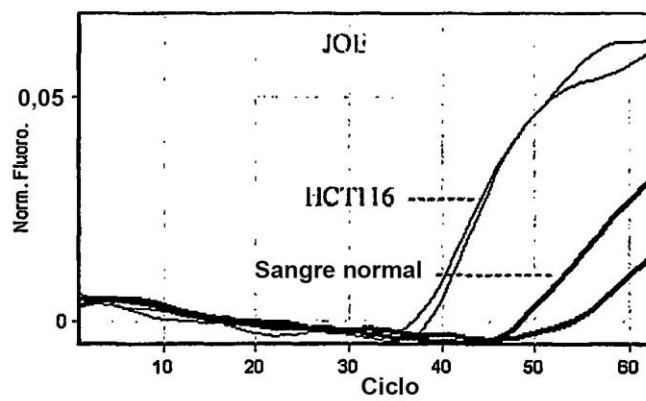


FIGURA 11B

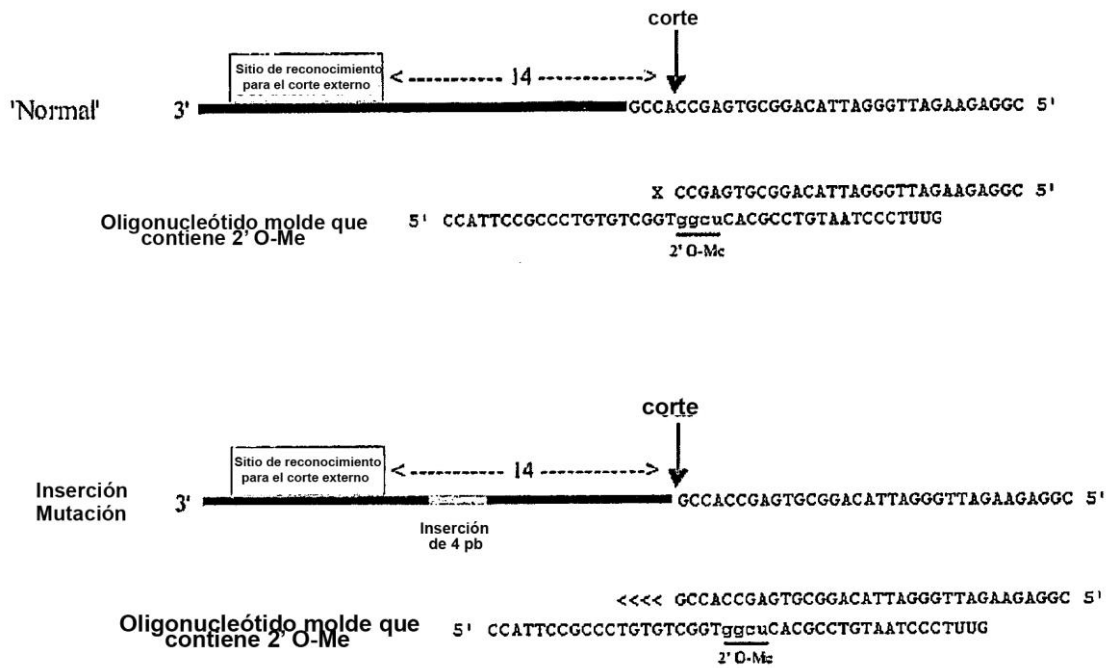


FIGURA 12A

Normal 3' CCGAGT GCGGACATTAGGTTAGAAGAGGC 5'
 Inserción de 1 pb 3' ACCGAGT GCGGACATTAGGTTAGAAGAGGC 5'
 Inserción de 4 pb 3' GCCACCGAGT GCGGACATTAGGTTAGAAGAGGC 5'
 Oligonucleótido molde CCATTCCGCCCTGTGTCCGTgguCACGCCTGTAATCCCTUUG 3'
 JOELUX 5' CACAGGTTCTCACCATTCCGCCCTGTG >> << TTAGAAGAGGCGGAGCGGAG 5' CommR5

Oligonucleótidos usados en el Ejemplo 8.2

Los nucleótidos 2' O - metilo en el oligonucleótido molde están subrayados así como los nucleótidos de ADN en el ADN cortado que hibridan con ellos.

FIGURA 12B

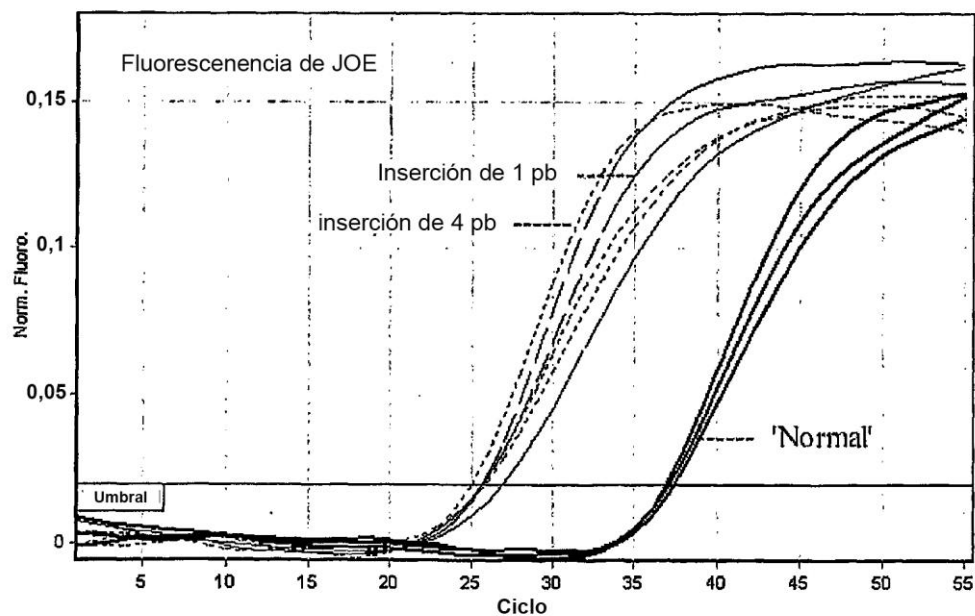


FIGURA 12C

AluRev <<TCGTGAAACCCTCCGGCTCCG 5'
 No cortado 3' TTTTGGCCACCGAGTGCGGACATTAGGGTCGTGAAACCCTCCGGCTCCGCC 5'
 Cortado 3' GCCACCGAGTGCGGACATTAGGGTCGTGAAACCCTCCGGCTCCGCC 5'
 AluPhB 5' CCATTCCGCCCTGTGTCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCP 3'
 5' cacaggTTCTCACCATTCCGCCCTGTG >> JOELUX

FIGURA 13A

AluPhB CCATTCCGCCCTGTGTCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCC 3' fosfato
 AluMeAm CCATTCCGCCCTGTGTCgGTGGCTCACGCCTGTAATCCC 3' C7-amina.
 AluAbSp CCATTCCGCCCTGTGTCGXTGGCTCACGCCTGTAATCCC 3' Espaciador C3
 AluHL CCATTCCGCCCTGTGTCGGTGGCTCACGCCTGGCGGAATGG 3'
 AluMeMult CCATTCCGCCCTGTGTCgguggCTCACGCCTGTAATCCC 3' C7-amina
 AluUUG CCATTCCGCCCTGTGTCGGUUGCTCACGCCTGTAATCCCTUUG 3'

FIGURA 13B

Fig. 13C(i)

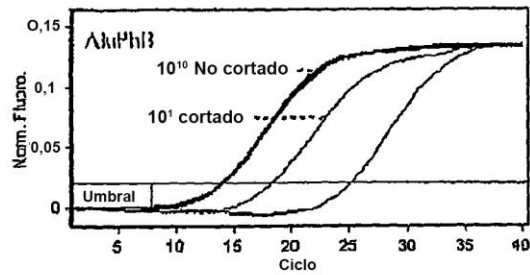


Fig. 13C(ii)

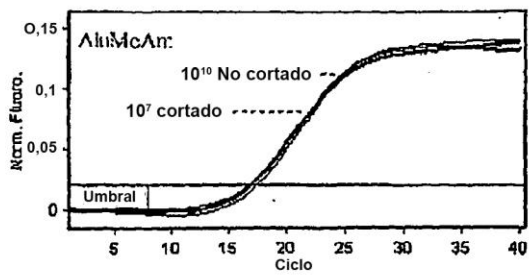


Fig. 13C(iii)

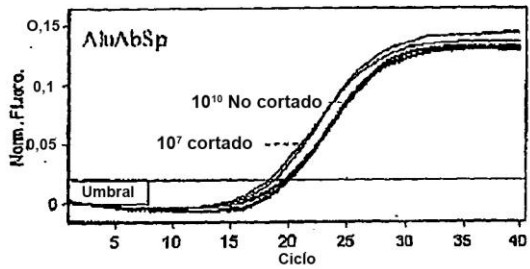


Fig. 13C(iv)

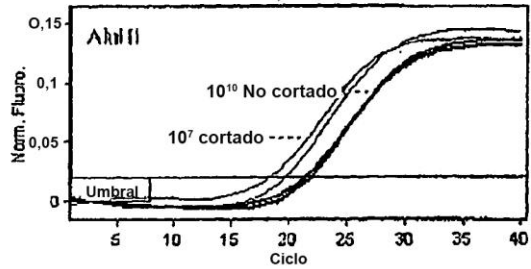


Fig. 13C(v)

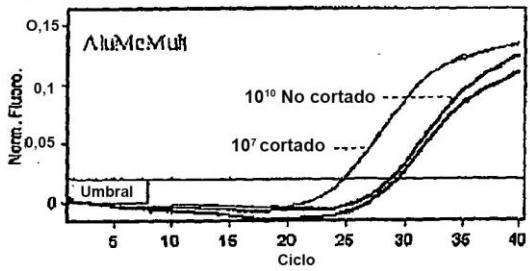


Fig. 13C(vi)

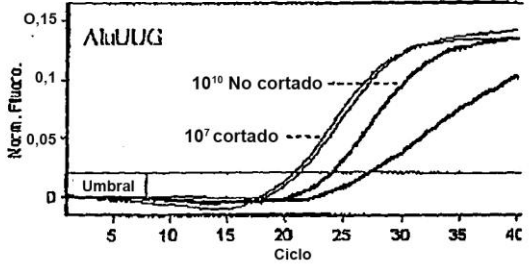


FIGURA 13C