



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 877**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98934535 .0**  
96 Fecha de presentación : **15.07.1998**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1001963**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.05.2000**

54 Título: **Escalas de ácido nucleico.**

30 Prioridad: **15.07.1997 US 892884**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.05.2011**

73 Titular/es: **LIFE TECHNOLOGIES, Inc.**  
**9800 Medical Center Drive**  
**Rockville, Maryland 20850, US**

72 Inventor/es: **Jordan, Heather, J.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 357 877 T3

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

## DESCRIPCIÓN

- Un procedimiento común de analizar fragmentos de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) es por la separación en una matriz de gel de agarosa o poliacrilamida. Tales matrices proporcionan un medio en que se pueden analizar tales fragmentos de diferentes tamaños y formas. En presencia de una corriente eléctrica, los fragmentos de ácido nucleico migrarán a través de dicha matriz de gel en la dirección del electrodo positivo. Debido a que pequeñas moléculas lineales migran más fácil y rápidamente a través de los poros de una matriz que las moléculas más grandes, la matriz actúa como un tamiz molecular, lo que separa los fragmentos de diferentes tamaños. Los fragmentos de ácido nucleico más grandes normalmente se someten a electroforesis en geles de agarosa de baja concentración, mientras que los fragmentos más pequeños se separan en geles de agarosa de mayor concentración o en geles de poliacrilamida, debido a que la poliacrilamida tiene una mayor capacidad de resolución que la agarosa.
- La detección de moléculas de ácido nucleico sometidas a electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida se puede lograr por una variedad de técnicas, que incluyen el uso de colorantes fluorescentes tales como bromuro de etidio y SYBR Green. Estos colorantes se unen a las moléculas de ácido nucleico y fluorescen cuando se exponen a la luz ultravioleta (UV). En forma alternativa, las moléculas de ácido nucleico se pueden detectar por el acoplamiento químico de estas con marcas radioactivas, fluorescentes o quimioluminiscentes.
- Los estándares de peso molecular de ácido nucleico son útiles para estimar la calidad, tamaño y/o cantidad de la muestra de ácido nucleico. Un estándar normalmente se fracciona en forma simultáneamente con la muestra (por ejemplo, en paralelo con la muestra), y después de la detección, se hace una comparación entre las bandas de la muestra y las bandas del estándar. El conocimiento del tamaño (en pares de bases) del estándar permite estimar el tamaño del fragmento desconocido.
- Los estándares comunes usados para estimar el tamaño de los fragmentos de ácido nucleico incluyen digestos de restricción de moléculas de ácido nucleico tales como ADN genómico natural de los bacteriófagos (por ejemplo, bacteriófago lambda) que dan origen a una población de fragmentos de ácido nucleico de tamaño conocido. Estos tipos de estándares se llaman comúnmente "marcadores de ácido nucleico" (por ejemplo, "marcadores de ADN").
- Otro tipo de estándar de ácido nucleico es producido por la manipulación genética de los plásmidos para contener sitios de restricción/escisión para una o más endonucleasas de restricción específicas en intervalos particulares del plásmido. Después de la digestión del plásmido con las endonucleasas específicas, se generan fragmentos de ácido nucleico de tamaños conocidos específicos. Para la precisión de la determinación de tamaño y la facilidad de uso, es beneficioso tener numerosas bandas que aumentan de tamaño en intervalos uniformes y regulares. Estos tipos de estándares se llaman comúnmente "escalas de ácido nucleicos" (por ejemplo, "escalas de ADN"). Preferiblemente, cada fragmento generado de la digestión forma una banda diferenciada y más preferiblemente las bandas del digesto son equivalentes o sustancialmente equivalentes en intensidad cuando se colorea para facilitar la detección de cada banda.
- Ninguna de las escalas de ADN disponibles en el comercio proporciona un intervalo de tamaños de fragmento estándar en el que bandas electroforéticas de alto peso molecular de 1 kilobase (kb) o mayores y bandas de peso molecular bajo de 1 kb o menores, especialmente bandas en el intervalo de 100-500 pb, se resuelven claramente y son iguales o sustancialmente iguales en intensidad de modo que son capaces de dar fragmentos de ácido nucleico de tamaño que abarca un amplio intervalo de peso molecular mediante el uso de un estándar de ácido nucleico.
- Una escala de ADN de 1 Kb está actualmente disponible en Life Technologies, Inc. (Rockville, Maryland). Esta escala contiene doce bandas en aumentos de 1018 pb, una banda de 1636 pb, una banda de 517 pb, y varias bandas de tamaño menor que varían en tamaño de 506 pb a 75 pb. Sin embargo, los fragmentos menores que 1 Kb parecen menos intensos y menos diferenciados que las bandas de incremento de 1018 pb. Asimismo, la banda de 1.636 pb y la banda doblete de 517/506 pb se colorean más intensamente que las otras bandas en la escala. Otro producto disponible en el comercio es la "Escala de ADN de Kb", disponible en Stratagene (La Jolla, CA). Este producto contiene doce bandas de incrementos exactos de 1 Kb y tres bandas menores que 1 Kb. La intensidad de las bandas menores que 2 Kb es aproximadamente la mitad de las bandas de 2 Kb y más grandes. Además, las bandas de la escala mayores que 6 Kb se colorean con menos de intensidad que las bandas de 2 Kb - 6 Kb.
- La Promega Corporation (Madison, WI) vende una escala de ADN de 1 Kb con ocho bandas de incremento de 1 Kb que varían de 1 Kb a 10 Kb (no hay bandas de 7 o 9 Kb en esta escala) y tres bandas inferiores de 1 Kb. Las bandas de 1 Kb y 3 Kb en la Escala de ADN de 1 Kb disponible en Promega tienen aumento de intensidad (>2 veces) para servir como puntos de referencia dentro de la escala. Además de esto, las bandas de 8 Kb y 10 Kb son significativamente más intensas que otras bandas en la escala y las bandas de 0,25, 0,5, y 0,75 Kb son de varias intensidades.
- La escala de ADN de 1 Kb comercializada por Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) es prácticamente idéntica al producto Promega, excepto que solo contiene una banda inferior a 1 Kb (la banda de 0,5 Kb). Varias de las bandas en la escala de ADN de 1 Kb comercializada por Sigma varían en sus intensidades y esta escala contiene solo una banda menor que 1 Kb.

Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ) comercializa un producto llamado "Marcador de ADN de Kilobase" que es probablemente el mismo producto descrito antes y comercializado por Sigma.

5 Una "Escala de ADN de 1 Kilobase" está comercializada por Bayou Biolabs (Harahan, LA) que tiene bandas con incrementos de 1 Kb hasta 10 Kb. Este producto no contiene ninguna banda menor que 1 Kb. El producto de Bayou Biolabs tiene una banda de intensidad triple de 5 Kb y no contiene ninguna banda menor que 1 Kb.

10 Dos versiones disponibles en el comercio diferentes de una Escala de ADN de 1 Kb, comercializadas por GenSura (DelMar, CA) e Invitrogen (San Diego, CA) se consideran idénticas. Estas escalas tienen bandas de incremento de 1 Kb desde 1 Kb a 15 Kb y, como en el producto de Bayou Biolabs, no tiene bandas menores que 1 Kb y una banda de intensidad triple de 5 Kb.

15 En consecuencia, en vista de lo anterior, existe una necesidad de una escala de ADN que abarque un intervalo de longitud amplio y que, cuando se separe en un gel y se tiña, genere bandas diferenciadas que sean claras y visibles y sean de intensidad igual relativa en comparación entre sí. Esto es específicamente significativo para las longitudes de banda menores que 1 Kb (en particular las de 500 pb y menores).

20 La presente invención proporciona una escala de ácido nucleico que comprende una pluralidad de fragmentos de ácido nucleico en que la masa relativa de cada fragmento de dicha pluralidad es no mayor que 3 veces la masa relativa de cualquier otro fragmento de dicha pluralidad, en la que: la masa relativa se define como la relación de la masa de cada fragmento en comparación con la masa total de todos los fragmentos; y la masa de un fragmento se define como el tamaño (número de pares de bases) de cada longitud del fragmento multiplicado por el número de copias del mismo fragmento. La escala de ácido nucleico de la invención es útil para estimar el tamaño de fragmentos de ácido nucleico desconocidos, específicamente para estimar el tamaño (en pares de bases) de los fragmentos de ácido nucleico que abarcan un intervalo amplio de tamaños de peso molecular. Las escalas de ácido nucleico de la invención incluyen ARN o ADN y pueden ser de cadena simple o doble, aunque se prefieren las escalas de ADN de cadena doble.

30 Preferiblemente, las escalas de ácido nucleico de la invención tiene dos o más bandas (preferiblemente cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más bandas) que varían de aproximadamente 25 Kb a aproximadamente 100 pb o menores, preferiblemente 20 Kb a 100 pb o menores, más preferiblemente 15 Kb a 100 pb o menor y de máxima preferencia 12 Kb a 100 pb, aunque menores intervalos están contemplados por la invención.

35 Las escalas de ácido nucleico de la invención preferiblemente contienen una mezcla de fragmentos de ácido nucleico de diferentes longitudes en las que el número de copias de cada tamaño de fragmento se ajusta de modo que la masa relativa de cada fragmento es sustancialmente igual, como se define a continuación. Al tener sustancialmente la misma masa relativa, las bandas de las escalas de la invención tienen intensidad sustancialmente igual cuando se tiñen después de la separación por electroforesis en gel. En otro aspecto, los fragmentos de las escalas se producen por la escisión de una o más moléculas de ácido nucleico en uno o más sitios de restricción de enzima. Estas moléculas pueden comprender cualquier vector que incluyen plásmidos, cósmidos, o fagémidos.

45 Más específicamente, una escala de la presente invención se produce de un plásmido, diseñado para contener 9 copias de una secuencia de 100 pb, 4 copias de una secuencia de 200 pb, 3 copias de una secuencia de 300 pb, 2 copias de una secuencia de 400 pb, 2 copias de una secuencia de 500 pb, una copia de una secuencia de 650 pb, una de 850 pb, y una de 1650 pb y 12 copias de una secuencia de 1000 pb. Numerosos fragmentos de tamaño diferente están presentes en copias múltiples del plásmido ya que cada fragmento fue generado por la digestión con la endonucleasa apropiada. En consecuencia, las escalas de la invención comprenden numerosas bandas diferentes (cada banda que representa un fragmento de tamaño diferente), en las que cada banda tiene sustancialmente la misma intensidad después de la electroforesis en gel y tinción. Los fragmentos en este aspecto preferido de la invención se preparan por la digestión del plásmido con endonucleasas de restricción, de este modo se producen fragmentos que varían de aproximadamente 12 Kb a aproximadamente 100 pb, que cuando se tiñen, aparecen como bandas distintas de intensidad sustancialmente igual después de electroforesis en gel.

55 La presente invención también proporciona escalas de ácido nucleicos de la invención que comprenden una mezcla de fragmentos de ácido nucleico de longitudes diferentes. Cada fragmento de tamaño diferente de las escalas de la invención puede diferir en tamaño en X pares de bases (pb), donde X es un número entero igual o mayor que 10. Preferiblemente, la masa relativa de cada fragmento de tamaño diferente es sustancialmente equivalente de modo que se produzcan bandas diferenciadas de intensidad sustancialmente igual cuando los fragmentos se resuelven en un gel y se colorean.

60 Las escalas de la invención se pueden preparar por procedimientos que comprenden proporcionar suficiente cantidad de copias de cada fragmento de un tamaño deseado de modo que la masa de cada fragmento sea sustancialmente equivalente. Generalmente, se necesitan más copias de fragmentos menores para equiparar la masa de los fragmentos más grandes. Los fragmentos múltiples para preparar las escalas de la invención se pueden

proporcionar de modo separado o en una forma premixta. En cualquier caso, los fragmentos provistos por separado se deben mezclar antes de la separación en el gel.

Los procedimientos también pueden comprender

- 5
- (a) mezclar una o más enzimas de restricción con una o más moléculas de ácido nucleico (preferiblemente plásmidos, cósmidos, o fagémidos); y
- 10 (b) incubar la mezcla en condiciones que favorecen la escisión de dichas moléculas de ácido nucleico en uno o más de los sitios de restricción, de este modo se proporcionan las escalas de la invención. La escisión puede ser una digestión parcial, una digestión completa, o una combinación de ambas, que dependen del diseño de la molécula de ácido nucleico. La digestión parcial genera una población de multímeros (por ejemplo, repetición de monómeros, repetición de dímeros, repetición de trímeros, repetición de tetrámeros, etc.), de este modo se forma una escala, mientras que la digestión completa genera bandas de tamaño distinto (de acuerdo con el lugar de los
- 15 sitios de restricción).

La escala de ácido nucleico de la invención se puede usar para determinar el tamaño de una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, en un procedimiento que comprende:

- 20 (a) separar de acuerdo con el tamaño la escala de ácido nucleico de la invención, y la molécula de ácido nucleico que se va ajustar por tamaño; y
- (b) determinar el tamaño de la molécula de ácido nucleico por comparación con los fragmentos o las bandas de la escala de ácido nucleico.
- 25

La escala de ácido nucleico de la invención se puede proporcionar como kits que comprenden un medio portador, tal como una caja, cartón o similares, que se compartimentaliza para recibir en aislamiento hermético uno o más medios de recipiente, tales como tubos, viales, ampollas, frascos, o similares, en el que un primer medio de recipiente comprende la escala de ácido nucleico de la presente invención. El kit puede comprender la escala en un recipiente individual (pre-mezclada) o puede comprender fragmentos de la escala en recipientes separados que se pueden mezclar en un tiempo posterior.

30

Las moléculas de ácido nucleico (ADN o ARN, preferiblemente, ADN de cadena doble) para preparar las escalas (o fragmentos de estas) de la invención incluyen plásmidos, cósmidos, o fagémidos. Un plásmido preferido es pKB1847. Se pueden proporcionar células huésped que contienen tales moléculas.

35

#### **Breve descripción de las figuras**

Estos y otros rasgos, aspectos, y ventajas de la presente invención se entenderán mejor con referencia a la siguiente descripción y las reivindicaciones anexas, y los dibujos acompañantes en los que

40

La Figura 1 muestra un mapa de restricción del plásmido pKB 1847;

La Figura 2 es una fotografía de un gel comparativo que ilustra las características distintivas de la presente invención en comparación con los estándares de ADN existentes.

45

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que se pueden usar como estándares para estimar el tamaño (en pares de bases) y/o la masa de moléculas de ácido nucleico lineales de cadena doble o simple separados por tamaño, preferiblemente por electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden ser moléculas de ADN, moléculas de ARN o moléculas del híbrido ADN/ARN, y pueden ser de cadena doble o cadena simple.

Las moléculas de ácido nucleico (o fragmentos de las escalas o composiciones de la invención) se pueden producir a partir de uno o más vectores (por ejemplo, plásmidos, cósmidos y fagémidos) diseñados para contener copias de fragmentos de diferentes longitudes. Sin embargo, cualquier molécula de ácido nucleico o combinación de moléculas se pueden usar para producir las escalas de la invención. Posteriormente se proporcionan los fragmentos de tamaño diferentes (como una premezcla o en forma separada para la mezcla posterior) de modo que la masa relativa de cada longitud del fragmento sea sustancialmente equivalente. La masa relativa se define como la relación de cada masa del fragmento en comparación con la masa de todos los fragmentos. La masa de un fragmento se define como el tamaño (número de pares de bases (pb) de cada longitud del fragmento multiplicado por el número de copias del mismo fragmento; por ejemplo, si una escala o composición tiene tres (3) fragmentos de tamaño diferente (fragmento 1, 100 pb con 50 copias; fragmento 2, 500 pb con 10 copias; y fragmento 3, 1000 pb con 5 copias) la masa de cada fragmento debe ser 5000 (por ejemplo, 5 copias de un fragmento de 1.000 pb debe tener la masa de  $5 \times 1.000 = 5.000$ ). La masa total en consecuencia debe ser 15.000 ( $5.000 + 5.000 + 5.000 = 15.000$ ). La masa relativa (en por ciento) se puede calcular por la división de la masa de un fragmento particular respecto de la masa total de todos los fragmentos multiplicado por 100. En consecuencia, la masa relativa de cada fragmento debe ser 33%. La masa relativa es sustancialmente igual cuando la masa relativa de cada fragmento es no mayor que 3 veces la masa relativa de otro fragmento, preferiblemente, no más de 2,5 veces la masa relativa de otro fragmento, más preferiblemente 2 veces la masa relativa de otro fragmento, aun más preferiblemente 1,5 veces la masa relativa de otro fragmento, y de máxima preferencia cada fragmento tiene aproximadamente la misma masa relativa.

Por ejemplo, la masa relativa del fragmento de 100 pb se puede calcular por la división de la masa del fragmento de 100 pb, 9 copias  $\times$  100 pb = 900, respecto de la masa total de los fragmentos de la escala, 19.550 pb (ver Tabla 1), multiplicado por 100 produce una masa relativa de 4,6%. En un segundo ejemplo, el fragmento de 1.650 pb ( $1.650 \times 1$  copia = 1.650) dividido por la masa total de todos los fragmentos de la escala, 19.550, multiplicado por 100 da una masa relativa de 8,4%. En consecuencia, debido a que la masa relativa del fragmento de 1.650 pb es menor que tres veces la masa relativa del fragmento de 100 pb, la masa relativa de los fragmentos se considera sustancialmente igual que como se define en la presente.

Una molécula de ácido nucleico particularmente preferida genera una escala de 1 kb (incrementos de aproximadamente 1 Kb) y contiene aproximadamente 9 copias de una secuencia de 100 pb, 4 copias de una secuencia de 200 pb, 3 copias de una secuencia de 300 pb, 2 copias de una secuencia de 400 pb, 2 copias de una secuencia de 500 pb, una copia de la secuencia de 650 pb, una de 850 pb y una de 1650 pb. La escala de 1 Kb se genera por la digestión parcial del vector que contiene 12 copias de una secuencia de aproximadamente 1 kb (1000 pb), mientras que las copias múltiples de fragmentos menores que 1 kb se generan por digestión completa. El aumento de la cantidad de fragmentos de tamaño menor proporciona la equiparación de la masa relativa de todos los fragmentos, de este modo permite la intensidad de banda sustancialmente igual.

Como se indicó, una o más moléculas de ácido nucleico se pueden usar para preparar la escala de la invención. Es decir, uno o numerosos fragmentos se pueden obtener de una o más moléculas, y los fragmentos se pueden aislar y mantener por separado o premezclar.

Como será entendido por los expertos en la técnica, las moléculas de ácido nucleico usadas para formar la escala de ajuste de tamaño de ácido nucleico de la invención son preferiblemente moléculas de ADN lineal o circular que se escinden con una enzima de restricción. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico pueden derivar de un cromosoma, un vector, un cósmido, un plásmido o un genoma viral. Preferiblemente, las moléculas de ácido nucleico son moléculas de vector o virales y sus derivados. Los ácidos nucleicos presentes en la molécula del vector o viral pueden incluir ácidos nucleicos exógenos que han sido unidos para producir la molécula del vector o viral. En una realización preferida, el ácido nucleico es ADN.

A fin de preparar las copias múltiples de los fragmentos de la invención, se puede usar el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Los fragmentos múltiples de un tamaño deseado se pueden clonar en un sitio de restricción seleccionado de modo cabeza a cola para evitar la formación de una horquilla. El vector que contiene el número apropiado de copias múltiples deseadas de modo que tenga una masa relativa sustancialmente igual se puede seleccionar de acuerdo con el tamaño. Las copias múltiples están preferiblemente flanqueadas con uno o más sitios de endonucleasa de restricción de modo que estas se puedan remover de un vector e insertar en otro vector como un "casete". Esto permite la preparación de un vector individual que contiene los múltiples fragmentos para obtener la escala o composición de la invención. Este vector se puede usar posteriormente, por la digestión con las endonucleasas apropiadas bajo las condiciones apropiadas, para preparar las escalas de la invención. En forma alternativa, los fragmentos de tamaño diferentes (o copias múltiples de estos) se pueden insertar en vectores

separados, los fragmentos se pueden aislar y posteriormente premezclar o almacenar para la mezcla posterior para obtener las escalas o composiciones de la invención. Estos fragmentos se deben mezclar en cantidades apropiadas para proporcionar una escala o composición, en la que cada fragmento de la escala tiene sustancialmente la misma masa relativa. El procedimiento anterior se puede repetir para cualquiera de los múltiples tamaños de fragmento, y las copias múltiples se combinan, según sea deseado. Los sitios de restricción que permiten el ligamiento cabeza a cola de fragmentos son sitios de restricción asimétricos conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, *Aval* y *BanII*.

Cuando las copias múltiples de los fragmentos de la presente invención son para insertar en uno o más vectores, los fragmentos se pueden ligar para producir repeticiones que se pueden separar por sitios de restricción. Una o más de estas repeticiones se pueden separar posteriormente por la escisión con una o más enzimas de restricción tal como una endonucleasa de restricción de extremo romo y/o extremo adhesivo. Una endonucleasa de restricción es una enzima que tiene la capacidad de reconocer una secuencia de base específica (usualmente 4, 5, 6 pares de bases de longitud o mayor) en una molécula de ADN, y escindir la molécula de ADN donde aparece esta secuencia. En la práctica de la presente invención, se pueden elegir enzimas de restricción y sitios de restricción que dan los fragmentos de extremo romo o extremo adhesivos iguales o diferentes. Los ejemplos de enzimas de restricción de extremo romo adecuadas para el uso en la invención, y sus sitios de escisión, incluyen sin limitación:

*AluI, DraI, Eco47 III, EcoRV, FspI, HpaI, MscI, NruI, PvuII, RsaI, ScaI, SmaI, SspI, StuI, ThaI, DraI*

Los ejemplos de enzimas de restricción de extremo adhesivo para usar en la invención, y sus sitios de escisión, incluyen sin limitación:

*AvaI, BamHI, BanII, BglII, ClaI, EcoRI, HindIII, HpaII, KpnI, MseI, NcoI, NdeI, NotI, PstI, PvuI, SacI/SstI, XbaI, XhoI.*

Las enzimas de restricción mencionadas anteriormente y otras que se pueden usar de modo equivalente en la presente invención, están disponibles en el comercio, por ejemplo en Life Technologies, Inc. (Rockville, MD). Ver también Roberts, R.J., Nucl. Acids Res. 17 (Suppl.):r347-r387 (1989), para otros ejemplos de enzimas de restricción y sus sitios de escisión.

Preferiblemente, las moléculas de ácido nucleico usadas para obtener fragmentos de las escalas, contienen un origen de replicación (por ejemplo, *ori*) de modo que la molécula de ácido nucleico se puede replicar autónomamente dentro de una célula huésped. También se prefiere que la molécula de ácido nucleico contenga un marcador seleccionable o detectable. El origen de replicación y el marcador pueden estar presentes en el mismo fragmento. Las células huésped que contienen la molécula de ácido nucleico de la invención se pueden cultivar y seleccionar con un agente de selección que corresponde al marcador seleccionable. Las células huésped procarióticas (gramnegativo o grampositivo) o eucarióticas se pueden usar de acuerdo con la invención. Las células huésped procarióticas preferidas incluyen las bacterias del género *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* o *Klebsiella*. Preferiblemente, se usan las cepas de *E. coli* (por ejemplo *E. coli* STBL2<sup>TM</sup> que se pueden obtener de Life Technologies, Inc. Rockville, MD). El huésped eucariótico preferido incluye levaduras, células de planta, células de mamífero o células de insecto.

De acuerdo con la invención, las secuencias del fragmento se pueden ligar en un vector que se transforma posteriormente en una célula huésped, mediante el uso de técnicas bien conocidas. Estas copias múltiples se pueden ligar entre sí para formar multímeros, por ejemplo, dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros y similares. La célula huésped posteriormente se cultiva, lisa y se aísla el vector por protocolos estándares. Por favor, ver por ejemplo, Maniatis, Fitch and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982) o ADN Cloning, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed. 1985) para los procedimientos de clonación general. El vector posteriormente se puede digerir en el sitio de la endonucleasa de restricción, de este modo se separan las repeticiones para dar copias múltiples del fragmento repetido. En forma alternativa, la digestión parcial del vector proporciona multímeros de tamaños variados. Las condiciones de digestión parcial que producen los multímeros deseados se pueden determinar por procedimientos estándares tales como visualización de los productos de los digestos parciales incubados con duración variada. Tales multímeros de tamaño variado (por ejemplo, monómeros, dímeros, trímeros, etc.) se usan para seleccionar por tamaño escalas de acuerdo con la invención y formar "peldaños" de la escala. Tales escalas de tamaño adecuado pueden ser de cadena doble o cadena simple. Las escalas de cadena simple se pueden formar de moléculas de ácido nucleico o escalas de cadena doble de la invención por técnicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica.

De acuerdo con la invención, los nucleótidos o sus derivados adecuados para preparar los oligonucleótidos y moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen, pero sin limitación, dUTP, dATP, dTTP, dCTP, dITP, ATP, TTP, UTP, GTP, CTP, 7-deaza-dGTP, adATP, adTTP, adGTP, adCTP, ddATP, ddTTP, ddCTP, y ddGTP. Otros nucleótidos (desoxi y didesoxi) y sus derivados adecuados para usar en la formación de las moléculas de ácido nucleico de la invención serán familiares para los expertos en la técnica.

Como se describe con más detalle en el siguiente Ejemplo 2, se puede producir una escala de ácido nucleico

preferida a partir del plásmido pKB 1847 (Figura 1) por la digestión primera del plásmido hasta la terminación con la enzima de restricción *Bgl*II para generar copias múltiples de fragmentos de 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, y 500 pb así como fragmentos de 650 pb, 850 pb, y 1650 pb y un "casete" de repetición de 12 kb que contiene 12 repeticiones de 1 kb (ver Figura 1). El casete posteriormente se digiere parcialmente con BamHI para generar fragmentos que aumentan de tamaño por incrementos de 1 kb, el fragmento más grande es de 12 kb. Obviamente, las etapas de digestión completa y digestión parcial se pueden invertir la secuencia.

De acuerdo con la invención, las escalas pueden contener una o más bandas o fragmentos destacados para los fines de orientación. Tales bandas o fragmentos destacados tendrán sustancialmente más masa relativa (mayor que 3 veces, preferiblemente mayor que 4 veces, y de máxima preferencia mayor que 5 veces) que los otros fragmentos o bandas. En consecuencia, los fragmentos destacados tienen intensidad mejorada después de la tinción de modo de distinguir las bandas o fragmentos destacados de las otras bandas o fragmentos dentro de la escala de la invención,

La escala de selección de tamaño o composición de la presente invención se puede usar para estimar el tamaño (en pb) de los fragmentos de ácido nucleico de cadena de doble (por ejemplo ADN o ARN), preferiblemente por electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. Esta escala también se puede usar para seleccionar por tamaño fragmentos de ácido nucleico de cadena simple cuando las cadenas se separan por desnaturalización térmica o química. En particular, la escala de la presente invención es útil como un estándar para seleccionar por tamaño fragmentos de ácido nucleico lineales de cadena doble y cadena simple en el intervalo de 25 Kb a 10 pb. La escala de la presente invención también se puede marcar en forma detectable, por ejemplo con una radiomarca, marca fluorescente, o marca quimioluminiscente como se describe más adelante y se usa como un estándar de los ensayos de ácido nucleico tales como hibridación Southern, o amplificación por PCR en el que el tamaño de las bandas esperadas está dentro del intervalo de la escala de tamaño adecuada usada.

La escala del marcador de ácido nucleico de la presente invención puede ser de cadena simple o cadena doble. La escala de cadena doble se obtiene directamente del constructo de ácido nucleico de cadena doble de la invención. Las cadenas simples se pueden obtener por calentamiento del constructo de ácido nucleico de cadena doble de la invención, o por el tratamiento de este con un agente caotrópico o con una helicasa. En forma alternativa, las cadenas simples se obtendrán cuando la escala se separa en SDS-PAGE.

La escala de la invención se puede marcar en forma detectable por tinción con bromuro de etidio o SYBR green, o por marcación del extremo mediante el uso de procedimientos estándar conocidos en la técnica. Una ventaja particular de la escala de cadena doble (por ejemplo, ADN) de la presente invención es la presencia de un "extremo adhesivo" que comprende los cuatro nucleótidos como resultado del digesto de restricción, lo que permite el uso de cualquier nucleótido marcado, A, C, T, G, para el fin de marcar en forma detectable las bandas de la escala o composición. En consecuencia, otro aspecto de la invención se refiere a la escala de la presente invención que se marca en forma detectable con una tinción u otra marca detectable. Las marcas adecuadas para la marcación en forma detectable de la escala de la invención incluyen, pero sin limitación, radiomarcas (por ejemplo, <sup>32</sup>P, <sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H y similares), marcas fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, ficocianina y similares) y marcas quimioluminiscentes (por ejemplo, mediante el uso de los sistemas de quimioluminiscencia PHOTO-GENE™ o ACES™, disponibles en el comercio de Life Technologies, Inc. Rockville, MD).

En otra realización, la presente invención se refiere a un kit de marcador de ácido nucleico que comprende un portador significa tal como una caja o cartón que tiene en aislamiento hermético al menos un recipiente tal como viales, tubos, frascos, ampollas y similares. Tal kit puede comprender la escala de ácido nucleico de la presente invención, opcionalmente en forma marcada. Los fragmentos de la escala se pueden proporcionar en recipientes separados o en forma premezclada. Las escalas o fragmentos de estas se pueden proporcionar en un tampón de conservación tal como aproximadamente 10 mM de TRIS-HCl (pH 8,0), aproximadamente 1 mM de EDTA y, opcionalmente, aproximadamente 50 mM de NaCl. La escala de ácido nucleico puede estar presente en una concentración de aproximadamente 1 μM, y se almacena preferiblemente a aproximadamente -20°C hasta el uso. Un recipiente adicional puede contener un reactivo capaz de marcar en forma detectable la escala de la presente invención, tal como bromuro de etidio, SYBR Green, o T4 polinucleótido quinasa. Opcionalmente, la escala puede estar en un tampón de conservación que contiene glicerol, o sacarosa, o un colorante tal como azul de bromofenol o cianol Xileno,

Habiendo descrito en general la invención, la misma se comprenderá más fácilmente mediante la referencia a los siguientes Ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración, y no se consideran una limitación de la presente invención, a menos que sea especificado,

Los siguiente MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS se usaron en los siguientes ejemplos.

### Ejemplo 1

Producción del plásmido "pKB1847"

## Etapa 1:

Una escala o composición de ADN de acuerdo con la presente invención se produce a partir de un plásmido construido especialmente ("pKB1847") diseñado para contener 9 copias de una secuencia de 100 pb, 4 copias de una secuencia de 200 pb, 3 copias de una secuencia de 300 pb, 2 copias de una secuencia de 400 pb, 2 copias de una secuencia de 500 pb, una copia de una secuencia de 650 pb, una de 850 pb, y una de 1650 pb y 12 copias de una secuencia de 1000 pb. Los fragmentos de tamaño variado están presentes en las copias múltiples en el plásmido para obtener la masa relativa de cada fragmento proporcional. El mapa del plásmido se fija y se construyó por las siguientes etapas: Un plásmido se diseñó para contener el origen de replicación pUC19 y el gen de resistencia a ampicilina en un fragmento de un tamaño exacto de 1650 pb. Un fragmento que contiene el gen ampicilina (936 pb) y un fragmento que contiene el origen de replicación (694 pb) se prepararon por amplificación por PCR con cebadores específicos que contienen sitios de restricción, seguido por la digestión por restricción y el ligamiento de los productos de PCR, posteriormente la transformación de la mezcla de ligamiento en las células de *E. coli* DH5 $\alpha$ E competentes. El plásmido resultante se designó "pHB 106".

## Etapa 2:

Dos fragmentos de 1000 pb posteriormente se amplificaron por PCR a partir de ADN lambda para contener los sitios de la enzima de restricción de modo que cuando se digirieron con estas enzimas, se pudieron ligar entre sí y clonar en el vector "pHB 106" entre los sitios de restricción *EcoRI* y *HindIII*.

## Etapa 3:

El plásmido resultante contenía un sitio *Aval* asimétrico (CTCGGG) entre los dos fragmentos de 1 Kb que posteriormente se usó para ligar en otros fragmentos de 1 Kb que estaban flanqueados por el mismo sitio *Aval* asimétrico. Esto aseguró que los fragmentos de 1 Kb se ligaran en el plásmido de un modo cabeza a cola. Se aisló un plásmido que contiene doce fragmentos de 1 Kb ("pKB 1603").

## Etapa 4:

Un fragmento de 100 pb se amplificó a partir de ADN lambda y las múltiples copias se clonaron en el sitio *EcoRI* de pHB106 como se describió en las Etapas 2 y 3. Se aisló un plásmido que contiene nueve fragmentos de 100 pb ("pKB1213").

## Etapa 5:

El procedimiento descrito en la Etapa 4 se repitió para clonar cuatro fragmentos de 200 pb ("pKB2110"), tres fragmentos de 300 pb ("pKB3106"), dos fragmentos de 400 pb ("pKB4103"), y dos fragmentos de 500 pb ("pKB5006") en vectores pHB106.

## Etapa 6:

El plásmido pKB3106, que contiene los multímeros del fragmento de 300 pb, y el plásmido pKB4103, que contiene los multímeros del fragmento de 400 pb, se digirieron en dos sitios de restricción y los fragmentos de cada plásmido se purificaron en gel y se ligaron entre sí. Se formó un nuevo plásmido que contiene los multímeros de 300 pb y los multímeros de 400 pb cabeza a cola.

## Etapa 7:

Los multímeros de 100 pb, 200 pb y 500 pb posteriormente se clonaron en el plásmido que contiene los multímeros de 300 y 400 pb mediante el uso de tres "ciclos" más del procedimiento descrito en la Etapa 6. El plásmido resultante contenía todos los multímeros de los fragmentos de 100, 200, 300, 400, y 500 pb.

## Etapa 8:

El "casete" que contiene los multímeros de los fragmentos de 100 pb a 500 pb se cortó del plásmido de la etapa 7 y se ligó en el plásmido, pKB 1603, descrito en la etapa 3 que contiene los doce fragmentos de 1000 pb.

## Etapa 9:

Un fragmentos de 650 pb y un fragmentos de 850 pb, generados por PCR a partir de ADN Lambda, se clonaron en los sitios de enzima de restricción única en el plásmido descrito en la Etapa 8. El plásmido resultante se designó, "pKB1847". Este plásmido contenido en las células de *E. coli* STBL2<sup>TM</sup>, se depositó el 20 de junio de 1997 con The Collection, Agricultural Research Culture Collection (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, IL 61604 USA como Depósito Núm NRRL B-21791.



**Ejemplo 2**

Producción de la Escala de ADN

- 5 La Escala de ADN se produce a partir del plásmido pKB 1847 por digestión primero del plásmido hasta la terminación con la enzima de restricción *Bgl*II. Esto libera las copias múltiples de los fragmentos de 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, y 500 pb así como los fragmentos de 650 pb, 850 pb y 1650 pb y el fragmento repetido de 12 Kb. Esta mezcla posteriormente se digiere parcialmente con la enzima de restricción *Bam*HI para generar fragmentos que aumentan en tamaño en 1 Kb, el fragmento más grande es de 12 Kb (ver Tabla 1). Las enzimas de restricción *Bam*HI y *Bgl*II generan "extremos adhesivos" idénticos en cada fragmento de la escala con la secuencia, GATC.

Tabla 1: Escala de ADN de la presente invención - Masa relativa de bandas de escala

Tamaño de banda de la escala (pb)	Número de fragmentos del plásmido	Masa ( pb ) (# de fragmentos x tamaño)	Masa relativa ((masa/(tamaño del plásmido total) x 100%)
12.000			*5,1%
11.000			*5,1%
10.000			*5,1%
9.000			*5,1%
8.000			*5,1%
7.000			*5,1%
6.000			*5,1%
5.000			*5,1%
4.000			*5,1%
3.000			*5,1%
2.000			*5,1%
1.650	1	1.650	8,4%
1.000	12*	12.000*	*5,1%
850	1	850	4,3%
650	1	650	3,3%
500	2	1.000	5,1%
400	2	800	4,1%
300	3	900	4,6%
200	4	800	4,1%
100	9	900	4,6%

Tamaño del plásmido total = 19,550 pb

\* = La masa de 12.000 pb comprende 12 bandas separadas.

- 15 **Ejemplo 3**
- Electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio
- 20 El material se obtuvo de ocho compañías con productos de escala de ácido nucleico comparables y se analizó simultáneamente con la escala de ADN o composición de la invención de la siguiente manera:
- Se aplicaron 250 ng de ADN en los pocillos de un gel de agarosa 1% que contenía 1 ug/ml de bromuro de etidio. El gel se sumergió en solución tampón de Tris-Acetato-EDTA, que también contiene 1 ug/ml de bromuro de etidio, en un aparato de electroforesis.
- 25 El gel se sometió a electroforesis a 100 V durante 40 minutos.
- 30 Las bandas se analizaron por la fotografía del gel bajo la exposición de luz UV.
- La Figura 2 es una fotografía del gel que ilustra la intensidad y número de bandas de ADN en diversas escalas. Lo siguiente describe las diferencias entre la invención y los productos relacionados disponibles en el comercio cuando se analizan por electroforesis en gel:
- 35 El producto de la invención se ilustra en la Figura 2, Calle 1. De modo significativo, todas las bandas de la escala, en especial las bandas menores que 1 kb de longitud, se tiñen con intensidad relativamente igual con bromuro de etidio ya que la masa de ADN en cada una de las bandas es relativamente proporcional.

- 40 Como se puede observar en la Figura 2, Calle 2, la Escala de ADN de 1 Kb disponible en el comercio en Life Technologies, Inc. (Rockville, MD) difiere de la invención en que los fragmentos menores que 1 Kb parecen ser menos intensos que las bandas de incremento de 1018 pb. Esto es porque la masa relativa de cada uno de estos fragmentos (y en consecuencia la intensidad de estas bandas cuando se tiñen) disminuye en proporción con su

tamaño. Asimismo, la banda de 1.636 pb y la banda de 500 pb se tiñen más intensamente que las otras bandas de la escala.

5 La Calle 3 ilustra la "Escala de ADN Kb" de Stratagene (La Jolla, CA). La intensidad de las bandas menores que 2 Kb es aproximadamente la mitad de las bandas de 2 Kb y más grandes. Esta característica se describe como un marcador para los fines de referencia. Además, las bandas de la escala mayores que 6 Kb se tiñen menos intensamente que las bandas de 2 Kb - 6 Kb.

10 Las bandas de 1 Kb y 3 Kb en la escala de ADN de 1 Kb disponible de Promega (Madison, WI) (Calle 4) tienen aumento de intensidad (>2 veces) para servir como puntos de referencia dentro de la escala. Además de estos, las bandas de 8 Kb y 10 Kb son significativamente más intensas que otras bandas de la escala y las bandas de 0,25, 0,5, y 0,75 Kb son de diversas intensidades.

15 Varias de las bandas de la escala de ADN de 1 Kb comercializada por Sigma (St. Louis, MO) (ver Calle 5) varían en sus intensidades y esta escala contiene solo una banda menor que 1 Kb.

La escala de ADN de 1 Kb comercializada por Pharmacia (Piscataway, NJ) (Calle 6) es idéntica a la escala Sigma y es probablemente el mismo producto.

20 El producto de Bayou Biolabs (Harahan, LA) de la Calle 7 tiene una banda de 5 Kb de intensidad triple y no contiene ninguna banda menor que 1 Kb.

25 Las dos escalas de ADN de 1 Kb de las Calles 8 y 9 (GenSura (DelMar, CA) e Invitrogen (San Diego, CA)) son productos idénticos que tienen bandas de 5 Kb de mayor intensidad y ninguna banda menor que 1 Kb.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una escala de ácido nucleico que comprende una pluralidad de fragmentos de ácido nucleico en la que la masa relativa de cada fragmento de dicha pluralidad es no mayor que 3 veces la masa relativa de cualquier otro fragmento de dicha pluralidad, en la que:
- la masa relativa se define como la relación de la masa de cada fragmento en comparación con la masa total de todos los fragmentos; y
- 10 la masa de un fragmento se define como el tamaño (número de pares de bases) de cada longitud del fragmento multiplicada por el número de copias del mismo fragmento.
- 15 2. La escala de ácido nucleico de la reivindicación 1 que comprende dos o más fragmentos que varían de 25 Kb a 100 pb.
3. La escala de ácido nucleico de la reivindicación 2 que comprende dos o más fragmentos que varían de 20 Kb a 100 pb.
- 20 4. La escala de ácido nucleico de la reivindicación 3 que comprende dos o más fragmentos que varían de 15 Kb a 100 pb.
5. La escala de ácido nucleico de la reivindicación 4 que comprende dos o más fragmentos que varían de 12 Kb a 100 pb.
- 25 6. Una escala de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que los fragmentes difieren en longitud por x pares de bases en donde x es un número entero igual o mayor que 10.
7. Una escala de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6 en la que el número entero es igual o mayor que 100.
- 30 8. La escala de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la que dicha escala está compuesta de fragmentos de ácido nucleico que tienen incrementos entre tamaños de fragmento de aproximadamente 1 kb y uno o más fragmentos de ácido nucleico menores que 1 Kb.
- 35 9. La escala de ácido nucleico de la reivindicación 8 en la que dichos fragmentos de ácido nucleico menores que 1 Kb están en incrementos de 10 pb, 20 pb, 30 pb, 40 pb, 50 pb, 60 pb, 70 pb, 80 pb, 90 pb o 100 pb.
- 40 10. La escala de ácido nucleico de la reivindicación 8 que comprende copias múltiples de uno o más fragmentos seleccionados del grupo que consiste en 100 pb, 500 pb, 50 pb, y 10 pb de longitud.
- 45 11. La escala de ácido nucleico de la reivindicación 1 que comprende 9 copias de una secuencia de 100 pb, 4 copias de una secuencia de 200 pb, 3 copias de una secuencia de 300 pb, 2 copias de una secuencia de 400 pb, 2 copias de una secuencia de 500 pb, y una copia de una secuencia de 650 pb, una de 850 pb, una de 1650 pb y un fragmento de 12 Kb que se digiere parcialmente para generar fragmentos que aumentan de tamaño en 1 Kb, el fragmento más grande es de 12 Kb.
- 50 12. La escala de ácido nucleico de cualquier reivindicación precedente en la que dicha escala comprende una marca detectable y en la que dicha marca detectable es bromuro de etidio.
- 55 13. La escala de ácido nucleico de cualquier reivindicación precedente en la que dicha marca detectable es SYBR green.
14. La escala de ácido nucleico de cualquier reivindicación precedente en la que la escala está en un tampón de conservación que comprende un colorante.
- 60 15. La escala de ácido nucleico de la reivindicación 14 en la que dicho colorante se selecciona del grupo que consiste en azul de bromofenol, verde de xileno.
16. La escala de ácido nucleico de cualquier reivindicación precedente, en la que la masa relativa de cada fragmento de dicha pluralidad es no mayor que 2,5 veces la masa relativa de cualquier otro fragmento de dicha pluralidad.
- 65 17. La escala de ácido nucleico de la reivindicación 15, en la que la masa relativa de cada fragmento de dicha pluralidad es no mayor que 2 veces la masa relativa de de cualquier otro fragmento de dicha pluralidad.
18. La escala de ácido nucleico de la reivindicación 17, en la que la masa relativa de cada fragmento de dicha pluralidad es no mayor que 1,5 veces la masa relativa de de cualquier otro fragmento de dicha pluralidad.

19. La escala de ácido nucleico de la reivindicación 18, en la que la masa relativa de cada fragmento de dicha pluralidad es aproximadamente la misma.
- 5 20. La escala de ácido nucleico de la reivindicación 19 en la que el número de copias de cada fragmento de dicha pluralidad es tal que la masa relativa de cada fragmento es no mayor que 2,5 veces la masa de cualquier otro fragmento de dicha pluralidad.
- 10 21. La escala de ácido nucleico de la reivindicación 20 en la que el número de copias de cada fragmento de dicha pluralidad es tal que la masa relativa de cada fragmento es no mayor que 2 veces la masa de cualquier otro fragmento de dicha pluralidad.
- 15 22. La escala de ácido nucleico de la reivindicación 21 en la que el número de copias de cada fragmento de dicha pluralidad es tal que la masa relativa de cada fragmento es no mayor que 1,5 veces la masa de cualquier otro fragmento de dicha pluralidad.

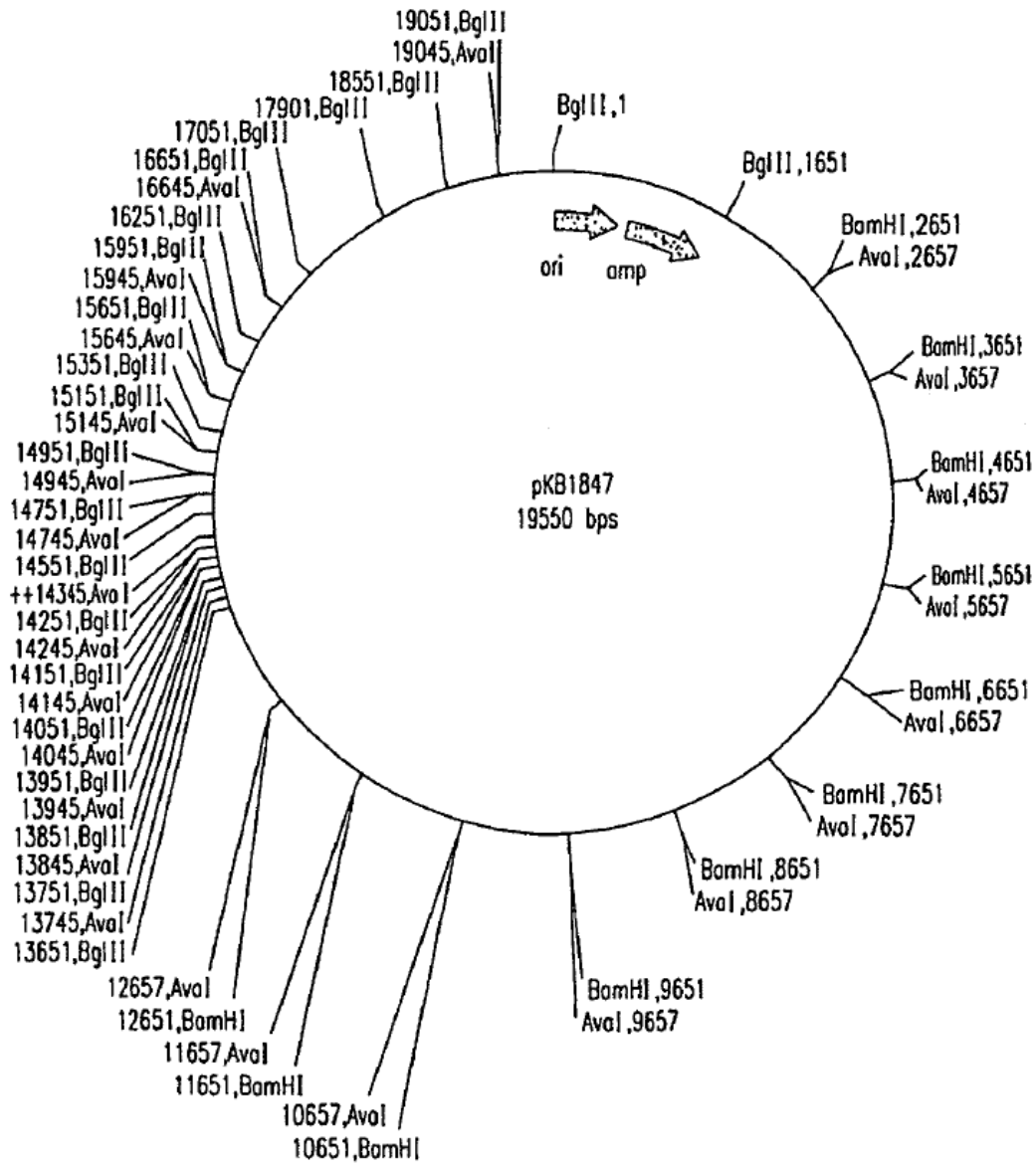


FIG. 1

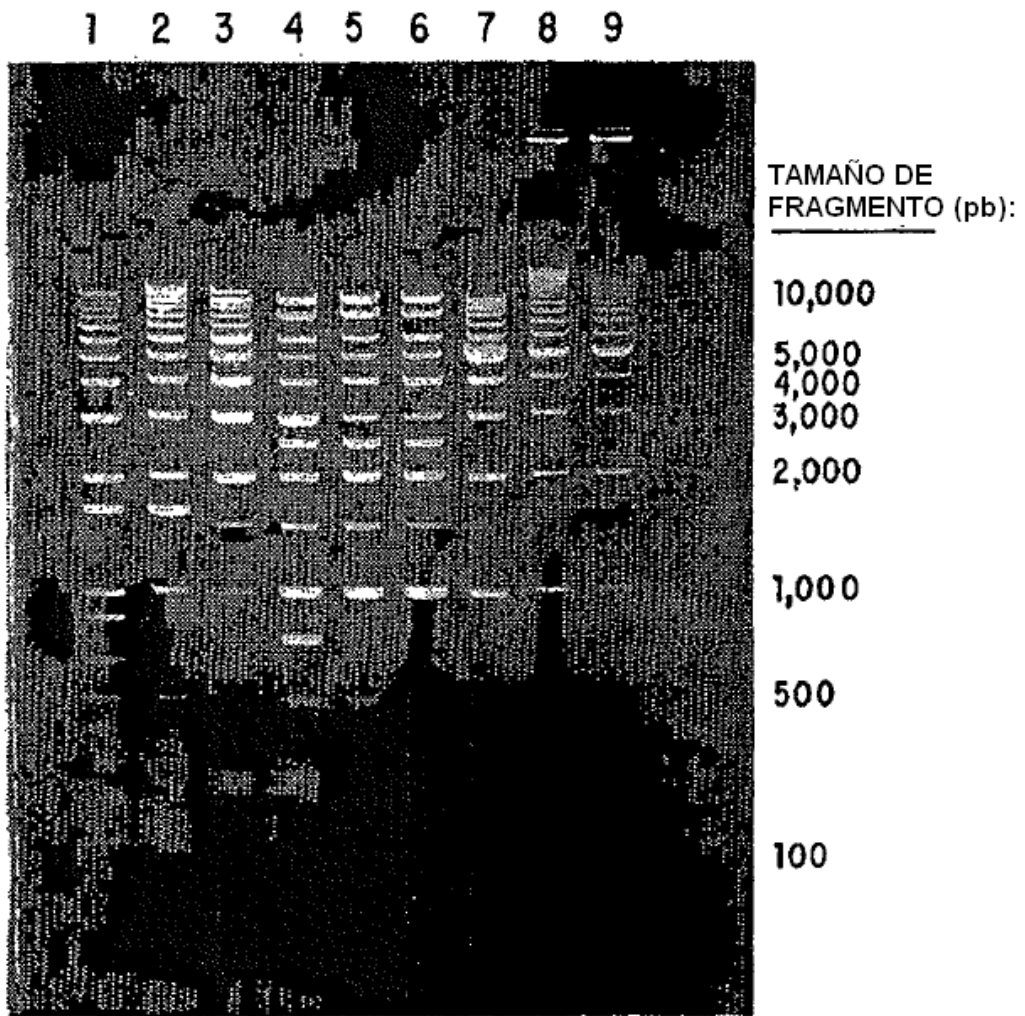


FIG.2