

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 818**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09000525 .7**
96 Fecha de presentación: **08.11.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **2045337**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.04.2009**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE SÍNTESIS DE ÁCIDO NUCLEICO.**

30 Prioridad:
09.11.1998 JP 31747698

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.12.2011

73 Titular/es:
EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA
4-19-9, TAITO, TAITO-KU
TOKYO 110-8408, JP

72 Inventor/es:
Notomi, Tsugunori y
Hase, Tetsu

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 369 818 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

Procedimiento de síntesis de ácido nucleico

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de síntesis de ácido nucleico compuesto por una secuencia nucleotídica específica, que es útil como procedimiento de amplificación de ácido nucleico.

Técnica anterior

10 Un procedimiento de análisis basado en la complementariedad de una secuencia nucleotídica de ácido nucleico puede analizar los rasgos genéticos directamente. En consecuencia, este análisis es un medio muy potente para la identificación de enfermedades genéticas, canceración, microorganismos etc. Además, un gen en sí mismo es el objeto de detección y, por tanto, en algunos casos se pueden omitir procedimientos engorrosos y que consumen tiempo tal como los cultivos.

15 No obstante, la detección de un gen diana presente en una cantidad muy pequeña en una muestra en general no es fácil, por lo que es necesaria la amplificación de un gen diana en sí mismo o su señal de detección. Como procedimiento para amplificar un gen diana, se conoce la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (Science 230, 1350-1354, 1985). En la actualidad, el procedimiento de la PCR es el procedimiento más popular como técnica de amplificación de ácido nucleico in vitro. Este procedimiento se ha establecido firmemente como un excelente procedimiento de detección en virtud de su elevada sensibilidad basada en el efecto de la amplificación exponencial. Además, ya que el producto de amplificación se puede recuperar como ADN, este procedimiento se aplica extensamente como importante herramienta de soporte de las técnicas de ingeniería genética tales como clonación de genes y determinación estructural. No obstante, en el procedimiento de la PCR se han observado los siguientes problemas: es necesario un controlador especial de temperatura para la práctica; el proceso exponencial de la reacción de amplificación causa un problema en la cuantificación; y las soluciones de muestras y de reacción se contaminan con facilidad desde el exterior lo que permite la mezcla de ácidos nucleicos por error para actuar como molde.

25 A medida que la información genómica se acumula, el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) atrae la atención. La detección de SNP por medio de PCR es factible a través del diseño de un cebador de modo que su secuencia nucleotídica contenga SNP. Es decir, se puede deducir si una secuencia nucleotídica complementaria al cebador está presente o no mediante la determinación de si está presente un producto de reacción o no. No obstante, una vez que se sintetiza una cadena complementaria por error en la PCR por casualidad, este producto funciona como molde en la reacción siguiente, lo que da lugar a un resultado erróneo. En la práctica, se dice que es difícil establecer un control estricto de la PCR con la diferencia de una única base dada en el extremo del cebador. En consecuencia, es necesario mejorar la especificidad con el fin de aplicar la PCR a la detección de SNP.

35 Por un lado, en la práctica también se usa un procedimiento de síntesis de ácido nucleico mediante una ligasa. El procedimiento LCR (reacción en cadena de la ligasa, Laffler TG; Garrino JJ; Marshall RL; Ann. Biol. Clin. (París), 51:9, 821-6, 1993) se casa en la reacción en la que dos sondas adyacentes hibridan con una secuencia diana y se ligan entre sí mediante una ligasa. Las dos sondas no se podían unir en ausencia de la secuencia nucleotídica diana y, por tanto, la presencia del producto ligado es indicativa de la secuencia nucleotídica diana. Dado que el procedimiento de LCR también requiere el control de la temperatura para la separación de una cadena complementaria de un molde, surge el mismo problema que en el procedimiento de PCR. Para la LCR, también existe un informe de un procedimiento para mejorar la especificidad mediante la adición de la etapa de proporcionar un espacio entre las sondas adyacentes y rellenar el espacio con una ADN polimerasa. No obstante, lo que se puede esperar de este procedimiento modificado es únicamente especificidad y sigue existiendo un problema en cuanto a que se requiere controlar la temperatura. Es más, el uso de la enzima adicional conlleva un incremento de los costes.

45 Un procedimiento denominado el procedimiento SDA (amplificación por desplazamiento de hebras) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 392-396, 1992] [Nucleic Acid. Res., 20, 1691-1696, 1992] también se conoce como procedimiento para amplificar ADN que posea una secuencia complementaria a una secuencia diana como molde. En el procedimiento SDA, se usa una ADN polimerasa especial para sintetizar una cadena complementaria comenzando desde un cebador complementario al extremo 3' de una cierta secuencia nucleotídica mientras que desplaza una cadena de doble hebra, si existe, en el extremo 5' de la secuencia. En la presente descripción, la sencilla expresión "extremo 5'" o "extremo 3'" se refiere al de una cadena que sirva como molde. Dado que una cadena de la doble hebra en el extremo 5' es desplazada por una cadena complementaria recién sintetizada, esta técnica se denomina el procedimiento SDA. En el procedimiento de SDA se puede eliminar la etapa de variación de temperatura esencial en el procedimiento de la PCR mediante la inserción previa de una secuencia de reconocimiento por enzimas de restricción en una secuencia hibridada como un cebador. Es decir, una muesca generada por una enzima de restricción produce un grupo 3'-OH que actúa como origen de la síntesis de la cadena complementaria y la cadena complementaria sintetizada previamente se libera en forma de cadena monohebra por síntesis de desplazamiento de cadena y, después, se utiliza de nuevo como molde para la posterior síntesis de la

cadena complementaria. De este modo, en el procedimiento de SDA no se requiere el complicado control de la temperatura esencial en la PCR.

No obstante, en el procedimiento de SDA además de la ADN polimerasa para desplazamiento de la hebra se utilizará la enzima de restricción generadora de una muesca. Este requisito de la enzima adicional es una causa fundamental del coste más elevado. Además, dado que la enzima de restricción no se va a utilizar para la escisión de las cadenas de doble hebra sino para la introducción de una muesca (es decir, la escisión de sólo una de las cadenas), como sustrato para la síntesis se usará un derivado de dNTP tal como α -³²P-dNTP para hacer que la otra cadena sea resistente a la digestión con la enzima. En consecuencia, el producto de amplificación mediante SDA posee una estructura diferente de la del ácido nucleico natural y existe un límite a la escisión con enzimas de restricción o la aplicación del producto de amplificación en la clonación de genes. A este respecto también es una causa fundamental del coste más elevado. Además, cuando el procedimiento de SDA se aplica a una secuencia desconocida, existe la posibilidad de que la misma secuencia nucleotídica que la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción usada para introducir una muesca puede estar presente en una región a sintetizar. En este caso, es posible que no se sintetice una cadena complementaria completa.

El NASBA (amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico, también denominado procedimiento de amplificación mediada por transcripción/TMA) se conoce como procedimiento de amplificar ácido nucleico en el que no es necesario el control complicado de la temperatura. El NASBA es un sistema de reacción en el que el ADN se sintetiza mediante la ADN polimerasa en presencia de un ARN diana como molde con una sonda que posea un promotor T7 añadido y el producto se forma con una segunda sonda en una cadena de doble hebra, seguido por la transcripción mediante la ARN polimerasa T7 con la cadena de doble hebra formada como molde para amplificar una gran cantidad de ARN (Nature, 350, 91-92, 1991). El NASBA requiera algunas etapas de desnaturalización térmica hasta que el ADN de doble hebra se completa, pero la posterior reacción de transcripción mediante ARN polimerasa T7 procede en condiciones isotérmicas. No obstante, es esencial una combinación de enzimas plurales tales como transcriptasa inversa, ARNasa H, ADN polimerasa y ARN polimerasa T7, y esto es desfavorable para un coste similar al SDA. Además, dado que es complicado establecer condiciones para una pluralidad de reacciones enzimáticas, este procedimiento apenas está extendido como procedimiento analítico general. En las reacciones conocidas de amplificación de ácido nucleico siguen existiendo problemas, tales como el control complicado de la temperatura y la necesidad de varias enzimas tal y como ya se ha descrito anteriormente.

Para estas reacciones conocidas de sintetizar ácido nucleico, existen algunos informes sobre un intento de mejorar más la eficacia de la síntesis de ácido nucleico sin sacrificar la especificidad o el coste. Por ejemplo, en un procedimiento denominado RCA (amplificación de círculo rodante) se ha mostrado que se puede sintetizar ADN monohebra que posea una serie de secuencias nucleotídicas complementarias a una sonda candado de forma continua en presencia de una secuencia nucleotídica diana (Paul M. Lizardi y col., Nature Genetics, 19, 225-232, Julio, 1998). En la RCA, se utiliza una sonda candado que posee una estructura especial en la que cada uno de los extremos 5' y 3' de un único oligonucleótido constituye una sonda adyacente en la LCR. A continuación, la reacción continua de síntesis de la cadena complementaria con la sonda candado como molde ligada y ciclada en presencia de una secuencia nucleotídica diana se desencadena por combinación con una polimerasa que cataliza la reacción de tipo desplazamiento de hebra de síntesis de cadena complementaria. Por tanto, se forma un ácido nucleico de una hebra que posee la estructura de una serie de regiones cada una ellas compuestas por la misma secuencia nucleotídica. Además, a este ácido nucleico de una hebra se hibrida un cebador para sintetizar su cadena complementaria y, por tanto, se obtiene un alto grado de amplificación. No obstante, sigue existiendo el problema de la necesidad de una pluralidad de enzimas. Por otro lado, el desencadenamiento de la síntesis de cadenas complementarias depende de la reacción de ligación de dos regiones adyacentes y su especificidad es básicamente la misma que en la LCR.

Con el objeto de suministrar 3'-OH, existe un procedimiento conocido en el que se proporciona una secuencia nucleotídica en el extremo 3' con una secuencia complementaria en el mismo y se forma un bucle en forma de horquilla en el extremo (Gene, 71, 29-40, 1988). La síntesis de la cadena complementaria con una secuencia diana en sí misma como molde comienza en el bucle en horquilla para formar un ácido nucleico de una hebra compuesto por la secuencia nucleotídica complementaria. Por ejemplo, una estructura en la que la hibridación ocurra en la misma cadena en el extremo en el que se ha unido la secuencia nucleotídica complementaria se realiza en el documento PCT/FR95/00891. No obstante, en este procedimiento es esencial la etapa en la que el extremo cancela el apareamiento de las bases con la cadena complementaria y se constituye de nuevo el apareamiento de bases en la misma cadena es esencial. Se ha estimado que esta etapa procede en función de un sutil estado de equilibrio en el extremo de las secuencias nucleotídicas mutuamente complementarias que implica el apareamiento de bases. Es decir, se utiliza un estado en equilibrio mantenido entre el apareamiento de bases con una cadena complementaria y el apareamiento de bases en la misma cadena y la única cadena que hibrida con la secuencia nucleotídica en la misma cadena sirve como origen de la síntesis de una cadena complementaria. En consecuencia, se considera que se deben establecer estrictas condiciones de reacción para conseguir una eficacia elevada de la reacción. Además, en esta técnica anterior, el propio cebador forma una estructura de bucle. En consecuencia, una vez que se forma un dímero cebador, la reacción de amplificación se inicia de forma automática con independencia de si existe una secuencia nucleotídica diana o no, y, por tanto, se forma un producto sintético inespecífico. Esto puede constituir un serio problema. Además, la formación del dímero cebador y el posterior consumo del cebador mediante reacción sintética inespecífica conducen a una reducción de la eficacia de amplificación de la reacción deseada.

Además existe un informe de que una región que no sirve como molde para la ADN polimerasa se utilizó para realizar la hibridación de la estructura en el extremo 3' con la misma cadena (documento EP713922). Este informe también tiene el mismo problema que en el documento PCT/FR95/008891 ant. en relación con la utilización del equilibrio dinámico en el extremo o la posibilidad de una reacción sintética inespecífica debido a la formación de un dímero cebador. Además, se deberá preparar como molde una región especial que no sirva como molde para la ADN polimerasa.

Además, en varias reacciones de amplificación de la señal a las que se aplica el principio del procedimiento NASBA descrito anteriormente, a menudo se utiliza un oligonucleótido que posea una estructura en horquilla en el extremo del mismo para suministrar una región promotora de doble hebra (documento JP-A 5-211873). No obstante, estas técnicas no son las que permiten suministros sucesivos de 3'-OH para la síntesis de una cadena complementaria. Además, en el documento JP-A 10-510161 (documento WO 96/17079) se usa una estructura en horquilla con un extremo 3' hibridado en la misma cadena usado con el fin de obtener un molde de ADN transcrito mediante la ARN polimerasa. En este procedimiento, el molde se amplifica usando la transcripción a ARN y, después, la transcripción inversa de ARN a ADN. No obstante, en este procedimiento, el sistema de reacción no se puede constituir sin una combinación de una pluralidad de enzimas.

Descripción de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de síntesis de ácido nucleico basado en un nuevo principio. Un objeto más específico es proporcionar un procedimiento capaz de realizar la síntesis de ácido nucleico dependiendo de la secuencia con eficacia y a costes bajos. Es decir, un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento capaz de alcanzar la síntesis y amplificación de ácido nucleico mediante una única enzima, incluso en condiciones de reacción isotérmicas. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de sintetizar ácido nucleico en el que sea difícil alcanzar una especificidad elevada en el principio de reacción conocido de la síntesis de ácido nucleico, así como un procedimiento de amplificar ácido nucleico aplicando dicho procedimiento de síntesis.

Los presentes inventores han centrado su atención en el hecho de que la utilización de una polimerasa que catalice la síntesis de tipo de desplazamiento de hebra de la cadena complementaria es útil para la síntesis de ácido nucleico que no depende de un control complicado de la temperatura. Tal ADN polimerasa es una enzima utilizada en los procedimientos SDA y RCA. No obstante, aunque se utilice tal enzima, siempre se requiere otra reacción enzimática para suministrar el 3'-OH como el origen de la síntesis en el medio conocido basado en cebadores, tal como el SDA.

En estas circunstancias, los presentes inventores suministran el 3'-OH desde un punto de vista completamente diferente desde un enfoque conocido. Como resultado, los presentes inventores encontraron que utilizando un oligonucleótido que posea una estructura especial se puede suministrar el 3'OH sin ninguna reacción enzimática adicional, de modo que completa la presente invención. Es decir, la presente invención se refiere a un procedimiento de sintetizar ácido nucleico como describe en la reivindicación 1 ó 7.

El ácido nucleico que posee secuencias nucleotídicas complementarias unidas alternativamente en una cadena de una hebra como objeto de la síntesis en la presente invención significa ácido nucleico que posee secuencias nucleotídicas mutuamente complementarias unidas lateralmente en una cadena de una hebra. Además, en la presente invención debe contener una secuencia nucleotídica para formar un bucle entre las cadenas complementarias. En la presente invención, esta secuencia se denomina secuencia formadora de bucles. El ácido nucleico sintetizado mediante la presente invención está compuesto sustancialmente por cadenas mutuamente complementarias unidas a través de la secuencia formadora de bucles. En general, una hebra no separada en 2 o más moléculas tras la disociación del apareamiento de bases se denomina cadena de una hebra con independencia de si implica parcialmente apareamiento de bases o no. La secuencia nucleotídica complementaria puede formar apareamiento de bases en la misma cadena. Un producto intramolecular con bases apareadas, que se puede obtener permitiendo que secuencias nucleotídicas complementarias del ácido nucleico se unan alternativamente en una cadena de una hebra de acuerdo con la presente invención para aparear las bases en la misma cadena, da una región que constituye una cadena aparentemente de doble hebra y un bucle que no implican apareamiento de bases.

Es decir, el ácido nucleico que posee secuencias nucleotídicas complementarias unidas alternativamente en una cadena de una hebra de acuerdo con la presente invención contiene secuencias nucleotídicas complementarias capaces de hibridar en la misma cadena y su producto hibridado se puede definir como ácido nucleico de una hebra que constituye un bucle que no implica apareamiento de bases en la porción en bisagra doblada. Un nucleótido que posee una secuencia nucleotídica complementaria puede hibridar con el bucle que no implica apareamiento de bases. La secuencia formadora de bucles puede ser una secuencia nucleotídica arbitraria. La secuencia formadora de bucles puede aparear bases, de modo que inicie la síntesis de una cadena complementaria por desplazamiento y se proporciona, preferentemente, con una secuencia que se pueda distinguir de una secuencia nucleotídica localizada en la otra región con el fin de alcanzar la hibridación específica. Por ejemplo, en la presente invención, la secuencia formadora de bucles contiene sustancialmente la misma secuencia nucleotídica que en la región F2c (o R2c) localizada en el extremo 3' de una región (es decir, F1c o R1c) derivada del ácido nucleico como molde e hibridada en la misma cadena.

En la presente invención, sustancialmente la misma secuencia nucleotídica se define del siguiente modo. Es decir, cuando una cadena complementaria sintetizada con una cierta secuencia como molde se hibrida con una secuencia nucleotídica diana para dar el origen de síntesis de una cadena complementaria, esta cierta secuencia es sustancialmente la misma que la secuencia nucleotídica diana. Por ejemplo, sustancialmente la misma secuencia que F2 incluye, no sólo absolutamente la misma secuencia nucleotídica que F2 sino también una secuencia nucleotídica capaz de funcionar como molde, dando una secuencia nucleotídica capaz de hibridar con F2 y actuar como el origen de la síntesis de la cadena complementaria. El término "hibridar" en la presente invención significa formación de una estructura de doble hebra de ácido nucleico a través de apareamiento de bases basado en la ley de Watson-Crick. En consecuencia, aunque si una cadena de ácido nucleico con apareamiento de bases sea una cadena de una hebra, se produce hibridación si las secuencias nucleotídicas complementarias intramoleculares presentan apareamiento de bases. En la presente invención hibridación e hibridar poseen el mismo significado en cuanto a que el ácido nucleico constituye una estructura de doble hebra por el apareamiento de bases.

El número de pares de secuencias nucleotídicas complementarias que constituyen el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es de al menos 1. De acuerdo con un modo deseado de la presente invención, puede ser de 2 o más. En este caso, en teoría no hay un límite superior al número de pares de secuencias nucleotídicas complementarias que constituyen el ácido nucleico. Cuando el ácido nucleico como producto sintético de la presente invención está constituido por varios conjuntos de secuencias nucleotídicas complementarias, este ácido nucleico está compuesto por secuencias nucleotídicas idénticas repetidas.

El ácido nucleico que posee las secuencias nucleotídicas complementarias unidas alternativamente en una cadena de una hebra sintetizada por la presente invención puede no tener la misma estructura que el ácido nucleico natural. Se sabe que si un derivado nucleotídico se usa como sustrato cuando el ácido nucleico se sintetiza por la acción de una ADN polimerasa, se puede sintetizar un derivado del ácido nucleico. El derivado nucleotídico usado incluye nucleótidos marcados con un radioisótopo o derivados nucleotídicos marcados con un ligando de unión, tal como biotina o digoxina. Estos derivados nucleotídicos se pueden usar para marcar los derivados del ácido nucleico como el producto. Como alternativa, si se usan nucleótidos fluorescentes como sustrato, del ácido nucleico como el producto puede ser un derivado fluorescente. Además, este producto puede ser ADN o ARN. Cuál se forma viene determinado por una combinación de la estructura de un cebador, el tipo de sustrato de la polimerización y los reactivos de polimerización para llevar a cabo la polimerización del ácido nucleico.

La síntesis del ácido nucleico que posee la estructura descrita anteriormente se puede iniciar mediante el uso de una ADN polimerasa que posea actividad de desplazamiento de hebra y ácido nucleico que se proporciona en el extremo 3' del mismo, con una región F1 capaz de hibridar con una parte de F1c en la misma cadena y que, tras la hibridación de la región F1 a F1c, es capaz de formar un bucle que contiene una región F2c capaz de aparear bases. Existen muchos informes sobre la reacción de sintetizar una cadena complementaria, en la que se forma un bucle en horquilla y se usa una secuencia de muestra en sí misma como molde, mientras en la presente invención la porción del bucle en horquilla se proporciona con una región capaz de aparear bases, y existe una característica nueva sobre la utilización de esta región en la síntesis de la cadena complementaria. Mediante el uso de esta región como origen de la síntesis, se desplaza una cadena complementaria previamente sintetizada con una secuencia muestra en sí misma como molde. A continuación, una región R1c (región arbitraria) localizada en el extremo 3' de la cadena desplazada se encuentra en un estado listo para el apareamiento de bases. Una región con una secuencia complementaria a esta R1c se hibrida con la misma, lo que da lugar a la formación del ácido nucleico (2 moléculas) que posee una secuencia nucleotídica que se extiende de F1 a R1c y su cadena complementaria unida alternativamente a través de la secuencia formadora de bucles. En la presente invención, La región arbitraria tal como la anterior R1c se puede seleccionar de forma arbitraria siempre que pueda hibridar con un polinucleótido que posea una secuencia nucleotídica complementaria a dicha región y que una cadena complementaria sintetizada con el polinucleótido como el origen de la síntesis posee las funciones necesarias para la presente invención.

En la presente invención se usa el término "ácido nucleico". En la presente invención, el ácido nucleico generalmente incluye tanto ADN como ARN. No obstante, en el ácido nucleico de la presente invención también se incluye el ácido nucleico cuyos nucleótidos estén sustituidos por un derivado artificial o el ácido nucleico modificado de ADN o ARN natural, siempre que funcione como molde para la síntesis de una cadena complementaria. El ácido nucleico de la presente invención suele estar contenido en una muestra biológica. La muestra biológica incluye tejidos animales, vegetales o microbianos, células, cultivos y excreciones, o extractos de los mismos. La muestra biológica de la presente invención incluye ADN o ARN genómico parasítico intracelular, tal como virus o micoplasma. El ácido nucleico de la presente invención puede derivar del ácido nucleico contenido en dicha muestra biológica. Por ejemplo, un ADNc sintetizado a partir de ARNm, o ácido nucleico amplificado sobre la base de ácido nucleico derivado de la muestra biológica, es un ejemplo típico del ácido nucleico de la presente invención.

El ácido nucleico característico de la presente invención, que se proporciona en el extremo 3' del mismo, con una región F1 capaz de hibridar con una parte de F1c en la misma cadena y que, tras la hibridación de la región F1 con F1c, es capaz de formar un bucle que contenga una región F2c capaz de aparear bases, se puede obtener por varios procedimientos. En la presente invención, para dar la estructura se puede usar la reacción de síntesis de cadena complementaria que utiliza un oligonucleótido que posea la siguiente estructura.

Es decir, el oligonucleótido útil en la presente invención consta de al menos dos regiones X2, que se indica más

adelante, y X1c, en el que X1c está unida al extremo 5' de X2.

X2: una región con una secuencia nucleotídica complementaria a una región X2c en ácido nucleico que posee una secuencia nucleotídica específica.

5 X1c: una región que posee sustancialmente la misma secuencia nucleotídica que la región X1c localizada en el extremo 5' de la región X2c en el ácido nucleico que posee una secuencia nucleotídica específica.

Aquí, el ácido nucleico que posee una secuencia nucleotídica específica por la cual se determina la estructura del oligonucleótido de la invención se refiere al ácido nucleico que sirve como molde cuando el oligonucleótido de la presente invención se usa como cebador. En el caso de detección de ácido nucleico según el método sintético de la presente invención, el ácido nucleico que posee una secuencia nucleotídica específica es una diana de detección o el ácido nucleico derivado de la diana de detección. El ácido nucleico que posee una secuencia nucleotídica específica se refiere al ácido nucleico en el que al menos una parte de la secuencia nucleotídica se revela o se puede predecir. La parte de la secuencia nucleotídica revelada es la región X2c y la región X1c localizada en el extremo 5' de la misma. Se puede suponer que estas 2 regiones son contiguas o se localizan separadas una de la otra. Por la relación posicional relativa de las dos se determina el estado de un bucle formado tras la autohibridación del ácido nucleico como el producto. La distancia entre las dos es, preferentemente, no muy lejana una de otra con el fin de que el ácido nucleico como producto se someta a autohibridación, preferentemente, hibridación intermolecular. En consecuencia, la relación posicional de las dos es, preferentemente, que estén contiguas a través de una distancia de, por lo general 0 a 100 bases. No obstante, en la formación de un bucle mediante la autohibridación descrita antes, puede darse el caso en el que no sería ventajoso la formación de un bucle en un estado deseado en el que las dos están demasiado cercanas. En el bucle, existe una necesidad de una estructura para la hibridación de un nuevo oligonucleótido y para el inicio con facilidad de la reacción por desplazamiento de hebra para la síntesis de una cadena complementaria con dicho oligonucleótido como origen de la síntesis. Más preferentemente, la distancia entre la región X2c y la región X1c localizadas en el extremo 5' de X2c está diseñada para que sea de 0 a 100 bases, más deseablemente de 10 a 70 bases. Este valor numérico muestra una longitud que excluye a X1c y X2. El número de bases que constituyen la parte de un bucle es aquel de esta longitud más una región correspondiente a X2.

30 Ambos términos "mismo" y "complementaria" usados para la caracterización de la secuencia nucleotídica que constituye el oligonucleótido basado en la presente invención no implica que sean absolutamente el mismo o absolutamente complementarios. Es decir, la misma secuencia que una cierta secuencia incluye secuencias complementarias a secuencias nucleotídicas capaces de hibridar con una cierta secuencia. Por otro lado, la secuencia complementaria significa una secuencia capaz de hibridar en condiciones rigurosas para proporcionar un extremo 3' que sirva como el origen de la síntesis de la cadena complementaria.

35 Normalmente, las regiones X2 y X1c que constituyen el oligonucleótido de la presente invención para el ácido nucleico que posee una secuencia nucleotídica específica se localizan contiguas sin superponerse. Si hay una parte común en ambas secuencias nucleotídicas, las dos pueden superponerse parcialmente. Dado que X2 debe funcionar como cebador, siempre debe estar en el extremo 3'. Por otro lado, X1c deberá dar al extremo 3' la función de un cebador como se describe más adelante de una cadena complementaria sintetizada con el ácido nucleico como molde y, por tanto, se dispondrá en el extremo 5'. La cadena complementaria obtenida con este oligonucleótido como el origen de la síntesis sirve como molde para la síntesis de la cadena complementaria en dirección inversa en la siguiente etapa, y, finalmente, la parte del oligonucleótido de la presente invención se copia como molde en una cadena complementaria. El extremo 3' generado mediante la copia posee la secuencia nucleotídica X1, que hibrida con X1c en la misma cadena para formar un bucle.

45 En la presente invención, el oligonucleótido significa el que satisface los 2 requisitos, es decir, debe ser capaz de formar apareamiento de bases complementarias y de dar un grupo -OH que sirva como origen de la síntesis de la cadena complementaria en el extremo 3'. En consecuencia, su estructura no necesariamente se limita a la que se produce a través de enlaces fosfodiéster. Por ejemplo, puede estar compuesto por un derivado de fosfotioato que posee un S en lugar de un O como estructura básica o un ácido nucleico peptídico en enlaces peptídicos. Las bases pueden ser aquellas capaces de aparearse con sus bases complementarias. En la naturaleza hay 5 bases, es decir A, C, T, G y U, pero la base puede ser un análogo tal como bromodesoxiuridina. El oligonucleótido usado en la presente invención funciona preferentemente, no sólo como origen de la síntesis sino también como molde para la síntesis de la cadena complementaria. El término polinucleótido en la presente invención incluye oligonucleótidos. El término "polinucleótido" se usa en el caso en el que la longitud de la cadena no esté limitada, mientras que el término "oligonucleótido" se usa para hacer referencia a un polímero de nucleótidos que posean una longitud de cadena relativamente corta.

55 El oligonucleótido de acuerdo con la presente invención posee una longitud de cadena tal que permite el apareamiento de bases con una cadena complementaria y que mantenga la especificidad necesaria en el ambiente dado en las diversas reacciones de síntesis de ácido nucleico que se describen más adelante. Específicamente, está compuesto por de 5 a 200 pares de bases, más preferentemente de 10 a 50 pares de bases. La una longitud de cadena de un cebador que reconozca la polimerasa conocida catalizadora de la reacción de síntesis de ácido nucleico dependiente de secuencia es de al menos unas 5 bases, de modo que la longitud de cadena de la parte

que hibrida no debe ser superior a esto. Además, estadísticamente se desea una longitud de 10 bases o más con el fin de esperar la especificidad como la secuencia oligonucleotídica. Por otro lado, la preparación de una secuencia oligonucleotídica demasiado larga mediante síntesis química es difícil y, por tanto, la longitud de cadena que se ha descrito antes es un ejemplo del intervalo deseado. La longitud de cadena de ejemplo en el presente documento hace referencia a la longitud de cadena de una parte que hibrida con una cadena complementaria. Como se describe más adelante, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención puede hibridar finalmente con al menos 2 regiones de forma individual. En consecuencia, debe entenderse que la longitud de cadena de ejemplo en el presente documento es la longitud de cadena de cada región que constituye el oligonucleótido.

Además, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención puede marcarse con una sustancia de marcaje conocida. La sustancia de marcaje incluye ligandos de unión tales como digoxina y biotina, enzimas, sustancias fluorescentes y sustancias luminiscentes y radioisótopos. Las técnicas de sustitución de una base que constituye un oligonucleótido por un análogo fluorescente también son conocidas (documento WO95/05391, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 6644-6648, 1994).

Otros oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención también pueden haber estado unidos a una fase sólida. Como alternativa, se puede marcar una parte arbitraria del oligonucleótido se puede marcar con un ligando de unión tal como biotina, y puede inmovilizarse indirectamente a través de un compañero de unión tal como avidina inmovilizada. Cuando el oligonucleótido inmovilizado se usa como origen de la síntesis, la fase sólida captura el ácido nucleico como el producto de la reacción de síntesis, lo que facilita su separación. El producto separado se puede detectar mediante un indicador específico de ácido nucleico o mediante hibridación con una sonda de marcaje. Los fragmentos del ácido nucleico diana también se pueden recuperar mediante la digestión del producto con enzimas de restricción arbitrarias.

El término "molde" usado en la presente invención significa ácido nucleico que sirve como un molde para la síntesis de una cadena complementaria. Una cadena complementaria que posea una secuencia nucleotídica complementaria al molde posee el significado de una cadena correspondiente al molde, pero la relación entre ambos es meramente relativa. Es decir, una cadena sintetizada como la cadena complementaria puede funcionar de nuevo como molde. Es decir, la cadena complementaria puede convertirse en un molde.

El oligonucleótido útil en la presente invención no se limita a las 2 regiones descritas antes y puede contener una región adicional. Mientras que X2 y X1c están dispuestos en los extremos 3' y 5' respectivamente, una secuencia arbitraria se puede interponer entre ellas. Por ejemplo, puede ser un sitio de reconocimiento de enzimas de restricción, un promotor reconocido por la ARN polimerasa o ADN codificador de ribozima. Al utilizarlo como secuencia de reconocimiento para enzimas de restricción, el ácido nucleico que posee una secuencia complementaria unida alternativamente en una cadena de una hebra como producto de la síntesis de la presente invención se puede escindir en ácidos nucleicos de doble hebra de la misma longitud. Al disponer una secuencia promotor reconocida por la ARN polimerasa, el producto de la síntesis de la presente invención sirve como molde para permitir su posterior transcripción a ARN. Al organizar el ADN codificador para ribozima, se lleva a cabo un sistema en el que el producto de la transcripción se autoescinde. Estas secuencias nucleotídicas adicionales son aquellas que funcionan después de formarse en una cadena de doble hebra. En consecuencia, cuando el ácido nucleico de una hebra de acuerdo con la presente invención ha formado un bucle, estas secuencias no funcionan. No funcionan hasta que el ácido nucleico es elongado e hibrida en ausencia de un bucle con una cadena que posea una secuencia nucleotídica complementaria.

Cuando un promotor se combina con el oligonucleótido basado en la presente invención en una dirección tal que permite la transcripción de la región sintetizada, el producto de la reacción basado en la presente invención en el que se repite la misma secuencia nucleotídica da un sistema transcripcional altamente eficaz. Mediante la combinación de este sistema con un sistema de expresión adecuad, la traducción en una proteína es también factible. Es decir, el sistema se puede utilizar para la transcripción y la traducción a una proteína en células bacterianas o animales o in vitro.

El oligonucleótido de la presente invención que posee la estructura descrita anteriormente se puede sintetizar químicamente. Como alternativa, el ácido nucleico natural se puede escindir con, por ejemplo, enzimas de restricción y modificar de modo que se componga de, o se una a, la secuencia nucleotídica descrita antes.

El principio básico de la reacción para realizar la síntesis mediante el uso del útil oligonucleótido descrito anteriormente en combinación con ADN polimerasa que posee actividad de desplazamiento de hebra en la reacción de la síntesis de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se describe por referencia en las Fig. 5 a 6. El oligonucleótido descrito anteriormente (FA en la Fig. 5) se hibrida en X2 (correspondiente a F2) al ácido nucleico como molde, para proporcionar el origen de la síntesis de la cadena complementaria. En la Fig. 5, una cadena complementaria sintetizada a partir de FA como el origen de la síntesis es desplazada por la síntesis de la cadena complementaria (descrita más adelante) a partir de un cebador externo (F3), para formar una cadena de una hebra (Fig. 5-A). Cuando se lleva a cabo la síntesis de la cadena complementaria en la cadena complementaria resultante, el extremo 3' del ácido nucleico sintetizado como cadena complementaria en la Fig. 5-A posee una secuencia nucleotídica complementaria al primer oligonucleótido de la presente invención. Es decir, dado que el extremo 5' del primer oligonucleótido de la presente invención posee la misma secuencia que una región X1c (correspondiente a

F1c), el extremo 3' del ácido nucleico sintetizado de este modo posee una secuencia complementaria X1 (F1). La Fig. 5 muestra que la cadena complementaria sintetizada a partir como origen de la síntesis es desplazada mediante la síntesis de la cadena complementaria por el cebador R3 como origen de la síntesis. Una vez que este desplazamiento permite el apareamiento de bases en la porción del extremo 3', X1 (F1) en el extremo 3' se hibrida con X1c (F1c) en la misma cadena, y procede la reacción de elongación con él mismo como molde (Fig. 5-B). A continuación, X2c (F2c) localizado en el extremo 3' del mismo se deja en forma de bucle en el que no se produce apareamiento. X2 (F2) en el primer oligonucleótido de acuerdo con la presente invención hibrida con este bucle y se sintetiza una cadena complementaria con dicho primer oligonucleótido como origen de la síntesis (Fig. 5-B). Un producto de la reacción de síntesis de la cadena complementaria con el producto sintetizado previamente como molde es desplazado mediante la reacción por desplazamiento de hebra de modo que queda listo para el apareamiento de bases.

Mediante la constitución básica usando una clase de oligonucleótido y un cebador inverso arbitrario capaz de realizar la síntesis de ácido nucleico, en el que se usa como molde una cadena complementaria sintetizada con dicho oligonucleótido como cebador, se puede obtener una pluralidad de productos de la síntesis de ácido nucleico tal y como se muestra en la Fig. 6. Como se puede observar en la Fig. 6, (D) es el producto de ácido nucleico de la invención deseado que posee una secuencia nucleotídica complementaria alternativamente unida en una cadena de una hebra. Una vez que se ha convertido en una cadena de una hebra mediante tratamiento tal como desnaturalización por calor, el otro producto (E) sirve de nuevo como molde para formar (D). Si el producto (D) como ácido nucleico en forma de una cadena de doble hebra se convierte en una cadena de una hebra por desnaturalización por calor, se produce hibridación dentro de la misma cadena con una probabilidad elevada sin formar la cadena de doble hebra original. Esto se debe a que una cadena complementaria que posee la misma temperatura de fusión (T_f) sufre una reacción intramolecular, con preferencia sobre la reacción intermolecular. Cada cadena de una hebra derivada del producto (D) hibridado en la misma cadena hibrida en la misma cadena y retorna al estado de (B) y cada cadena además da una molécula de (D) y (E) respectivamente. Al repetir estas etapas, es posible sintetizar de forma sucesiva el ácido nucleico que posee secuencias nucleotídicas complementarias unidas alternativamente en una cadena de una hebra. El molde y el producto formado en 1 ciclo se incrementan de forma exponencial, lo que hace que la reacción sea muy eficiente.

Para realizar el estado de I Fig. 5(A), la cadena complementaria sintetizada inicialmente debe, en al menos la porción en la que hibrida el cebador inverso, debe estar lista para el apareamiento de bases. Esta etapa se puede conseguir mediante un procedimiento arbitrario. Es decir, se prepara por separado un primer cebador externo (F3), que hibrida con el primer molde en una región F3c en el extremo 3' de la región F2c a la que se hibrida el primer oligonucleótido de la presente invención. Si este primer cebador externo se usa como origen de la síntesis para sintetizar una cadena complementaria mediante una polimerasa catalizadora de la síntesis de tipo de desplazamiento de hebra de la cadena complementaria, se desplaza la cadena complementaria sintetizada a partir de F2c como origen de la síntesis en la invención y, como resultado, la región R1c a hibridar con R1 queda lista para el apareamiento de bases (Fig. 5). Mediante la utilización de la reacción de desplazamiento de hebra, la reacción hasta ahora puede proceder en condiciones isotérmicas.

Cuando se usa un cebador externo se iniciará la síntesis del cebador externo (F3) tras la síntesis a partir de F2c. En el procedimiento más sencillo, la concentración del cebador interno se hace más elevada que la concentración del cebador externo. Específicamente, los cebadores se usan a concentraciones por lo general de 2 a 50 veces, preferentemente de 4 a 10 veces diferentes, de modo que la reacción puede proceder según lo previsto. Además, se establece la temperatura de fusión (T_f) del cebador externo en un valor inferior a la T_f de X1 (correspondiente a F1 y R1) en el cebador interno, por lo que se puede controlar la cronología de la síntesis. Es decir, (cebador externo F3:F3c) \leq F2c/F2 \leq (F1c/F1) o (cebador externo/región en el extremo 3' en el molde) \leq (X2c:X2) \leq (X1c:X1). En este documento, la razón para (F2c/F2) \leq (F1c/F1) es para hibridar entre F1c/F1 antes de la hibridación de F2 con el bucle. LA hibridación entre F1c/F1 es una reacción intramolecular y, por tanto, puede proceder preferentemente a una probabilidad elevada. No obstante, es significativo considerar la T_f con el fin de proporcionar condiciones de la reacción más deseadas. Según el curso se deben considerar condiciones similares incluso en el diseño de un cebador inverso. Utilizando tal relación se pueden conseguir condiciones de reacción estadísticamente ideales. Si se fijan otras condiciones, la temperatura de fusión (T_f) se puede calcular teóricamente mediante una combinación de la longitud de una cadena complementaria de hibridación y las bases que constituyen el apareamiento de bases. En consecuencia, los expertos en la técnica pueden derivar condiciones preferibles sobre la base de la descripción de esta memoria descriptiva.

Además, el fenómeno denominado apilamiento contiguo también se puede aplicar para controlar el tiempo de hibridación del cebador externo. El apilamiento contiguo es un fenómeno en el que un oligonucleótido que no puede hibridar de forma independiente se convierte en capaz de hibridar tras situarse contiguo a la parte de una cadena de doble hebra (Chiara Borgheso-Nicoletti y col., *Bio Techniques*, **12** 474-477 (1992)). Es decir, el cebador externo está diseñado de modo que esté contiguo a F2c (X2c) y no puede hibridar de forma independiente. Al hacerlo así, la hibridación del cebador externo no se produce hasta que F2c (X2c) se hibrida y, por tanto, preferentemente se produce la hibridación de F2c (X2c). Sobre la base de este principio, los ejemplos muestran el contexto de la secuencia nucleotídica de un oligonucleótido necesario como cebador para una serie de reacciones. Esta etapa también se puede alcanzar mediante desnaturalización en calentamiento o con una ADN helicasa.

Si el ácido nucleico molde que posee F2c (X2c) es ARN, el estado de la Fig. 5 (A) también se puede ver con un procedimiento diferente. Por ejemplo, si esta cadena de ARN se descompone, R1 estará listo para el apareamiento de las bases. Es decir, F2 hibrida con F2c en ARN y se sintetiza una cadena complementaria en forma de ADN a través de la transcriptasa inversa. El ARN que sirve como molde se descompone mediante desnaturalización básica o mediante tratamiento enzimático con una ribonucleasa que actúa sobre el ARN en una cadena de doble hebra de ADN/ARN, por lo cual el ADN sintetizado de F2 se forma en una cadena de una hebra. Para la enzima que descompone selectivamente el ARN en una cadena de doble hebra de ADN/ARN, se puede utilizar la actividad ribonucleasa de RNasa H o de algunas transcriptasas inversas. De este modo, el cebador inverso puede hibridar con R1c capaz de aparear sus bases. En consecuencia, el cebador externo para habilitar a R1c para el apareamiento de bases se hace innecesario.

Como alternativa, para el desplazamiento de la hebra por el cebador externo tal y como se ha descrito antes se puede utilizar la actividad de desplazamiento de hebra de la transcriptasa inversa. En este caso se puede constituir un sistema de reacción sólo mediante una transcriptasa inversa. Es decir, usando ARN como molde, una transcriptasa inversa puede posibilitar la síntesis de una cadena complementaria a partir de la hibridación de F2 con F2c en el molde y la síntesis de una cadena complementaria a partir del cebador externo F3 como origen de la hibridación de síntesis a F3c localizado en el extremo 3' de F2c y desplazar simultáneamente la cadena complementaria sintetizada anteriormente. Cuando la transcriptasa inversa realiza la reacción de síntesis de una cadena complementaria con ADN como molde, todas las reacciones de síntesis de cadenas complementarias, incluida la síntesis de una cadena complementaria con R1 como origen de la síntesis que hibrida con R1c en la cadena complementaria desplazada como molde, la síntesis de una cadena complementaria con R3 como origen de la síntesis que hibrida con R3c localizado en el extremo 3' de R1c y la reacción de desplazamiento simultáneo, proceden mediante la transcriptasa inversa. Si no es posible esperar que la transcriptasa inversa exhiba actividad de desplazamiento de hebra de ADN/ARN en las condiciones de reacción dadas, se puede combinar con una ADN polimerasa que posee actividad de desplazamiento de hebra descrita anteriormente. El modo de obtener un primer ácido nucleico de una hebra con ARN como molde, tal y como se describe anteriormente constituye un modo preferente de la presente invención. Por otro lado si se usa una ADN polimerasa, tal como ADN polimerasa Bca que posee tanto actividad de desplazamiento de hebra como actividad de transcriptasa inversa, no sólo la síntesis de un primer ácido nucleico de una hebra a partir de ARN sino también la posterior reacción con ADN como molde puede proceder de igual modo con la misma enzima.

El sistema de reacción descrito antes conlleva diversas variaciones inherentes a la presente invención mediante el uso del cebador inverso que posee una estructura específica. La variación más eficaz se describe más adelante. Es decir, el oligonucleótido constituido como se describe en [5] se usa como el cebador inverso en el modo más ventajoso de la presente invención. El oligonucleótido en [5] es un oligonucleótido en el que las regiones arbitrarias R2c y R1c en una cadena complementaria sintetizada con F2 como cebador son X2c y X1c, respectivamente. Mediante el uso de tal cebador inverso, se producen numerosas reacciones para formar un bucle y para la síntesis y desplazamiento de una cadena complementaria a partir de este bucle en las cadenas tanto de sentido como antisentido (hacia delante y hacia atrás). Como resultado, la eficiencia de la reacción para la síntesis del ácido nucleico con secuencias nucleotídicas complementarias unidas alternativamente en una cadena de una hebra de acuerdo con la presente invención mejora considerablemente mientras que una serie de estas reacciones son factibles en condiciones isotérmicas. En lo sucesivo, este modo se describe con más detalle por referencia a las Fig. 1 a 3, donde se resume este modo.

En el modo siguiente se preparan 2 clases de oligonucleótidos basados en la presente invención. Para la explicación, estos son FA y RA diseñados. Las regiones que constituyen FA y RA son del siguiente modo:

	X2	X1c
45	FA	F2 F1c
	RA	R2 R1c

En este documento, F2 es una secuencia nucleotídica complementaria de una región de F2c con ácido nucleico como molde. R2 es una secuencia nucleotídica complementaria de una región arbitraria R2c contenida en una cadena complementaria sintetizada con F2 como cebador. F1c y R1c son secuencias nucleotídicas arbitrarias localizadas en dirección posterior de F2c y R2c, respectivamente. La distancia entre F2 y R2 puede ser arbitraria. Incluso cuando su longitud es e alrededor de 1 kpb, suficiente síntesis es factible en condiciones adecuadas, aunque depende de la capacidad de síntesis de la ADN polimerasa para sintetizar una cadena complementaria. Específicamente, cuando se usa la ADN polimerasa Bst, el producto indicado se sintetiza si la distancia entre F2 y R2c es 800 pb, preferentemente 500 pb o menos. En la PCR que implica ciclos de temperatura, se considera que la reacción de la actividad enzimática por la agresión que supone el cambio de temperatura reduce la eficiencia de la síntesis de una secuencia nucleotídica larga. En un modo preferente de la presente invención, no es necesario el ciclo de la temperatura en la etapa de amplificación del ácido nucleico y, por tanto, ciertamente se puede conseguir la síntesis y amplificación de una secuencia nucleotídica incluso larga.

En primer lugar, F2 en FA hibrida con el ácido nucleico como molde y se usa como origen de la síntesis de una

cadena complementaria. Las posteriores etapas de reacción hasta la Fig. 1 (4) son las mismas que en el modo básico descrito anteriormente (Fig. 5) en la presente invención. La secuencia hibridada como F3 en la Fig. 1 (2) es el primer cebador externo descrito antes. Se usa una ADN polimerasa para realizar la síntesis de tipo desplazamiento de hebra de una cadena complementaria, con este cebador como origen de la síntesis, de modo que la cadena complementaria sintetizada a partir de FA se desplaza y queda lista para el apareamiento de bases.

Cuando R2c queda lista para el apareamiento de bases en (4), el segundo oligonucleótido RA como cebador inverso hibrida de este modo en combinación con R2c/R2. La síntesis de una cadena complementaria con este punto como origen de la síntesis procede hasta que la cadena alcance F1c en el extremo 5' de FA. Tras esta reacción de síntesis de una cadena complementaria, el segundo cebador externo R3 para el desplazamiento se hibrida con el mismo para sintetizar una cadena complementaria, durante la cual el desplazamiento de la hebra también procede de modo que la cadena complementaria sintetizada de RA a medida que se desplaza el origen de la síntesis. En la cadena complementaria desplazada de este modo, RA se localiza en el extremo 5' de la misma y una secuencia complementaria de FA se localiza en el extremo 3'.

En el extremo 3' del ácido nucleico de una hebra así desplazada existe una secuencia F1 complementaria a F1c en la misma cadena. F1 se hibrida con rapidez con F1c en la misma molécula para iniciar la síntesis de una cadena complementaria. Cuando el extremo 3' (F1) hibrida con F1c en la misma cadena se forma un bucle que contiene F2c- Como también es evidente a partir de la Fig. 2-(7), la parte de este bucle sigue lista para el apareamiento de bases. El primer oligonucleótido FA de la invención que posee una secuencia nucleotídica complementaria a F2c hibrida con la parte de este bucle y actúa como origen de la síntesis de una cadena complementaria (7). La síntesis de una cadena complementaria del bucle procede mientras el producto de la reacción en la síntesis de la cadena complementaria previamente iniciada para F1. Como resultado, la cadena complementaria sintetizada con él mismo como molde queda lista para el apareamiento de bases de nuevo en el extremo 3'. Este extremo 3' se proporciona con una región R1 capaz de hibridar a R1c en la misma cadena, y los dos hibridan preferentemente debido a la rápida reacción intramolecular. Se ha observado la misma reacción que la descrita anteriormente comenzando desde el extremo 3' sintetizado con FA como molde también procede en esta región. Como resultado, el ácido nucleico que posee secuencias nucleotídicas complementarias unidas alternativamente en la misma cadena de una hebra de acuerdo con la presente invención continúa extendiéndose desde R1 como punto de partida en el extremo 3' mediante síntesis sucesiva de una cadena complementaria y su posterior desplazamiento. Dado que R2c siempre se encuentra contenido en el bucle formado por la hibridación intramolecular del R1 en el extremo 3', el segundo oligonucleótido (RA) proporcionado con R2 se hibrida con el bucle en el extremo 3' en la reacción siguiente.

Cuando se presta atención al ácido nucleico sintetizado como cadena complementaria a partir del oligonucleótido que hibrida con el bucle en el ácido nucleico de una hebra alargado con sí mismo como molde, también aquí procede la síntesis del ácido nucleico que posee secuencias nucleotídicas complementarias unidas alternativamente en la misma cadena de una hebra de acuerdo con la presente invención. Es decir, la síntesis de una cadena complementaria del bucle se completa cuando alcanzó RA en el ejemplo en la Fig. 2-(7). Después, cuando el ácido nucleico desplazado por esta síntesis de ácido nucleico inicia la síntesis de la cadena complementaria (Fig. 3- (8)), la reacción alcanza el bucle que una vez fue el origen de la síntesis, y el desplazamiento se inicia de nuevo. De este modo, el ácido nucleico iniciado para su síntesis a partir del bucle también se desplaza y, como resultado se obtiene el R1 del extremo 3' capaz de hibridar en la misma cadena (Fig. 3-(10)). Este R1 del extremo 3' hibrida con R1c en la misma cadena para iniciar la síntesis de la cadena complementaria. Esta reacción es la misma que la de la Fig. 2-(7), con la excepción de que se usa F en lugar de R. En consecuencia, la estructura que se muestra en Fig. 3-(10) puede funcionar como un ácido nucleico nuevo que continúa la autoelongación y la formación de ácido nucleico nuevo.

La reacción de síntesis de ácido nucleico, iniciada a partir del ácido nucleico mostrado en la Fig. 3-(10), causa la elongación a partir del F1 del extremo 3' como origen de la síntesis, en oposición a la reacción descrita anteriormente. Es decir, en la presente invención, a medida que se elonga un ácido nucleico, la reacción de continuación del suministro de un ácido nucleico nuevo que inicia la elongación por separado procede. Además a medida que se elonga la cadena, se crea una pluralidad de secuencias formadoras de bucle, no sólo en el extremo sino también en la misma cadena. Cuando estas secuencias formadoras de bucle queden listas para el apareamiento de bases mediante la reacción de síntesis por desplazamiento de hebra, un oligonucleótido hibrida para servir como base para la reacción de formar un nuevo ácido nucleico. Además se alcanza eficiencia en la amplificación mediante la reacción de síntesis que se inicia, no sólo en el extremo sino también en la cadena. El oligonucleótido RA basado en la presente invención se combina como cebador inverso tal y como se ha descrito antes, por el cual se produce la elongación y posterior formación de un nuevo ácido nucleico. Además, en la presente invención, este recién formado ácido nucleico se elonga y produce la posterior formación de un nuevo ácido nucleico. Una serie de estas reacciones continúan, en teoría, de forma permanente para alcanzar una amplificación muy eficiente del ácido nucleico. Además, la reacción en la presente invención puede llevarse a cabo en condiciones isotérmicas.

Los productos de la reacción acumulados de este modo poseen una estructura que posee una secuencia nucleotídica entre F1 y R1 y su secuencia complementaria está unida de forma alternativa en su interior. No obstante, ambos extremos de la unidad que se repite poseen una región consistente en las secuencias nucleotídicas sucesivas F2-F1 (F2v-F1c) y R2-R1 (R2c-R1c). Por ejemplo, en la Fig.-3-(9), las secuencias (R2-F2c)-(F1-R2c)-(R1-

F1C)- (F2-R2C) están unidos en este orden y a partir del extremo 5'. Esto es porque la reacción de la amplificación basada en la presente invención progresa sobre el principio de que la reacción se incide de F2 (o R2) con un oligonucleótido como origen de la síntesis y, seguidamente, se elonga una cadena complementaria por medio de la reacción sintética de F1 (o R1), con el extremo 3' como origen de la síntesis.

- 5 En el presente documento, en el modo más preferible, los oligonucleótidos FA y RA de acuerdo con la presente invención se usaron como oligonucleótidos que hibridan con la parte de un bucle. No obstante, aunque no se usen estos oligonucleótidos que poseen una estructura limitada, la reacción de amplificación de acuerdo con la presente invención se puede llevar a cabo mediante el uso de un oligonucleótido capaz de iniciar la síntesis de una cadena complementaria a partir del bucle. Es decir, el extremo 3' en elongación, una vez desplazado por una cadena complementaria sintetizada a partir del bucle, da la parte de un bucle de nuevo. Dado que el ácido nucleico con secuencias nucleotídicas complementarias ligadas alternativamente en una cadena de una hebra siempre se usa como molde para la síntesis de la cadena complementaria comenzando en el bucle, es evidente que se puede sintetizar el ácido nucleico deseado en la presente invención. No obstante, el ácido nucleico sintetizado de este modo lleva a cabo la síntesis de una cadena complementaria formando un bucle después del desplazamiento, pero no posee un extremo 3' disponible para la posterior formación de un bucle y, por tanto, no puede funcionar como molde nuevo. En consecuencia, no se espera que el producto en este caso, al contrario que el ácido nucleico iniciado para su síntesis por FA o RA, se amplifique de forma exponencial. Por esta razón, un oligonucleótido que posea la estructura FA o RA es útil para la *síntesis altamente eficiente* de ácido nucleico basada en la presente invención.
- 20 Una serie de estas reacciones procede mediante la adición de los componentes siguientes a un ácido nucleico de una hebra como molde y, después, la incubación de la mezcla a una temperatura tal que la secuencia nucleotídica que constituye FA y RA pueda formar un apareamiento de bases estable con su secuencia nucleotídica complementaria mientras que se puede mantener la actividad enzimática.

• 4 tipos de oligonucleótidos:

25 FA,

RA,

Primer cebador externo F3, y

Segundo cebador externo R3,

• ADN polimerasa para realizar la síntesis de tipo desplazamiento de hebra de la cadena complementaria,

- 30 • Un oligonucleótido que sirva como sustrato para la ADN polimerasa.

En consecuencia, no es necesario un ciclo de temperatura como en de la PCR. El apareamiento de bases estable al que se hace referencia en la presente memoria descriptiva significa un estado en el que al menos una parte de un oligonucleótido presente en el sistema de reacción puede dar el origen de la síntesis de la cadena complementaria. Por ejemplo, la condición deseada para realizar un apareamiento de bases estable es establecer una temperatura inferior a la de fusión (Tf). En general, la temperatura de fusión (Tf) se considera la temperatura a la que las bases del 50% de los ácidos nucleicos con secuencias nucleotídicas mutuamente complementarias están apareadas. El *establecimiento en la temperatura de fusión* (Tf) o a una temperatura menor no es una condición esencial en la presente invención, pero es una de las condiciones de reacción que se deben considerar para alcanzar una eficiencia elevada en la síntesis. Si el ácido nucleico que se va a usar como molde es una cadena de una hebra, el ácido nucleico debe, en al menos una región con la cual hibride el oligonucleótido, quedar listo para el apareamiento de bases. Para esto normalmente se lleva a cabo la desnaturalización con calor, que sólo se puede realizar una vez como pretratamiento antes de iniciar la reacción.

Esta reacción se lleva a cabo en presencia de un tampón que proporcione un pH adecuado a la reacción enzimática, sales necesarias para la hibridación o para mantener la actividad catalítica de la enzima, un agente protector para la enzima y, según sea necesario, un regulador de la temperatura de fusión (Tf). Como tampón, se utiliza, por ejemplo, Tris-HCl con una acción tampón dentro del intervalo desde neutro a débilmente alcalino. El pH se ajusta dependiendo de la ADN polimerasa que se use. Como sales, KCl, NaCl, (NH₄)₂SO₄ etc., se añaden de forma adecuada para mantener la actividad de la enzima y regular la temperatura de fusión (Tf) del ácido nucleico. El agente protector de la enzima fabrica seroalbúmina bovina o azúcares. Además, como regulador de la temperatura de fusión (Tf) generalmente se usa dimetil sulfóxido (DMSO) o formamida. Mediante el uso del regulador de la temperatura de fusión (Tf) se puede regular la hibridación del oligonucleótido en condiciones de temperatura limitada. Además, betaína (N,N,N-trimetilglicina) o una sal de tetraalquilamonio también son eficaces para mejorar la eficiencia del desplazamiento de hebra en virtud de su isostabilización. Al añadir a la solución de la reacción de betaína en una cantidad de 0,2 a 3,0 M, preferentemente de 0,5 a 1,5 M, cabe esperar una acción estimuladora sobre la amplificación del ácido nucleico de la presente invención. Dado que estos reguladores de la temperatura de fusión actúan disminuyendo la temperatura de fusión, las condiciones que proporcionen rigurosidad y reactividad adecuadas se determinan empíricamente según la concentración de sales, la temperatura de la reacción etc.

Una característica importante en la presente invención es que una serie de reacciones no proceden a menos que se mantenga la relación posicional de una pluralidad de regiones. Por esta característica se puede prevenir de un modo eficaz la reacción de síntesis inespecífica acompañada de síntesis inespecífica de la cadena complementaria. Es decir, aunque se produzca cierta reacción inespecífica, la posibilidad de que el producto sirva de material de partida en la posterior etapa de amplificación es mínima. Además, la regulación del progreso de las reacciones por muchas regiones conlleva la posibilidad de que se pueda constituir arbitrariamente un sistema de detección capaz de la identificación estricta del producto deseado en las secuencias nucleotídicas análogas.

Esta característica se puede utilizar para la detección de mutaciones en un gen. En el modo de la invención en el que se usa el cebador externo se usan 4 cebadores, es decir 2 cebadores externos y 2 cebadores consistentes en los oligonucleótidos de la presente invención. Es decir, a menos que las 6 regiones contenidas en los 4 oligonucleótidos funcionen como se ha diseñado, la reacción de síntesis de la presente invención no procede. En particular, son importantes las secuencias del extremo 3' de cada oligonucleótido como origen de la síntesis de la cadena complementaria y del extremo 5' de la región X1c donde la cadena complementaria sirve como origen de la síntesis. Por tanto, estas importantes secuencias están diseñadas de modo que correspondan a una mutación que se debe detectar y el producto de la reacción de síntesis de la presente invención se observa por la presencia o ausencia de una mutación tal como una delección o inserción de bases o se puede analizar de forma exhaustiva un polimorfismo genético tal como los SNP. Específicamente, las bases que se cree que poseen una mutación o polimorfismo están diseñadas de modo que correspondan a las proximidades del extremo 3' de un oligonucleótido como origen de la síntesis de la cadena complementaria o del extremo 5' del mismo cuando el origen de la síntesis es una cadena complementaria. Si en el extremo 3' existe una falta de correspondencia como origen de la síntesis de la cadena complementaria o en sus proximidades, la reacción de la síntesis de una cadena complementaria al ácido nucleico se inhibe de forma significativa. En la presente invención, no se consigue un alto grado de la reacción de amplificación a menos que la estructura de los extremos de un producto en la reacción inicial conlleve repetidas reacciones. En consecuencia, aunque se produzca una síntesis errónea, la síntesis de la cadena complementaria que constituye la reacción de amplificación siempre se interrumpe en algunas de las etapas y, por tanto, no se produce un alto grado de reacción de amplificación en presencia de una falta de correspondencia. Como resultado, la falta de correspondencia inhibe de un modo eficaz la reacción de amplificación y finalmente se produce un resultado preciso. Es decir, se puede decir que la reacción de amplificación del ácido nucleico basada en la presente invención presenta un mecanismo altamente completo de comprobación de la secuencia nucleotídica. Estas características constituyen una ventaja apenas prevista en, por ejemplo, el procedimiento de PCR en el que la reacción de amplificación se realiza en sólo 2 regiones.

La región X1c que caracteriza al oligonucleótido usado en la presente invención puede servir como origen de la síntesis tras sintetizar una secuencia complementaria y esta secuencia complementaria hibrida con la secuencia X1 en la misma cadena recién sintetizada por la cual procede la reacción de síntesis con ella misma como molde. Por tanto, aunque se forme el denominado cebador dímero, a menudo problemático en la técnica anterior, este oligonucleótido no forma un bucle. En consecuencia, en teoría no se puede producir la amplificación atribuible al cebador dímero y, por tanto, el presente nucleótido contribuye a una mejora en la especificidad de la reacción.

Además, de acuerdo con la presente invención, se combinan los cebadores externos mostrados como F3 (Fig. 1-(2)) o R3 (Fig. 2-(5)) a través de lo cual se puede llevar a cabo una serie de las reacciones descritas antes en condiciones isotérmicas. Es decir, la presente invención proporciona un procedimiento para amplificar ácido nucleico que posea secuencias complementarias unidas alternativamente en una cadena de una hebra, que comprende las etapas que se muestran en el elemento 9 anteriormente indicado. En este procedimiento, se seleccionan las condiciones de temperatura a las que se produce una hibridación estable entre F2c/F2, entre R2c/R2, entre F1c/F1 y entre R1c/R1 y, preferentemente se establece la hibridación de F3c/F3 y R3c/R3 mediante el fenómeno del apilamiento contiguo facilitado por la hibridación de F2c/F2 y R2c/R2, respectivamente.

En la presente invención, se usan los términos "síntesis" y "amplificación" de ácido nucleico. La síntesis de ácido nucleico en la presente invención significa la elongación de ácido nucleico a partir de un oligonucleótido que sirva como origen de la síntesis. Si no solo esta síntesis, sino también la formación de otro ácido nucleico y la reacción de elongación de este ácido nucleico formado se producen continuamente, una serie de estas reacciones se denomina amplificación.

El ácido nucleico de una hebra que se proporciona en el extremo 3' del mismo con una región F1 capaz de hibridar con una parte de F1c en la misma cadena y que tras la hibridación de la región F1 a F1c en la misma cadena es capaz de formar un bucle que contenga una región F2c capaz de aparear bases, es un elemento importante de la presente invención. Un ácido nucleico de una hebra tal también se puede suministrar según el principio siguiente. Es decir, la síntesis de una cadena complementaria se deja proceder sobre la base de un cebador que posea la siguiente estructura. 5'-[región X1 que hibrida con la región X1c localizada en el cebador]-[secuencia formadora de bucles lista para el apareamiento de bases]-[región X1c]-[región que posee una secuencia complementaria a un molde]-3'.

Como región que posee una secuencia complementaria a un molde, se preparan dos secuencias nucleotídicas, es decir, una secuencia nucleotídica (cebador FA) complementaria a F1 y una secuencia nucleotídica (cebador RA) complementaria a R1c. La secuencia nucleotídica que constituye el ácido nucleico que se va a sintetizar contiene

una secuencia nucleotídica que se extiende desde la región F1 a la región R1c y una secuencia nucleotídica que se extiende desde la región R1 que posee una secuencia nucleotídica complementaria a esta secuencia nucleotídica hasta la región F1c. X1c y X1 capaces de hibridar dentro del cebador pueden ser secuencias arbitrarias. No obstante, en una región entre los cebadores FA y RF, la secuencia de la región X1c/X1 se hace, preferentemente, diferente.

En primer lugar, se lleva a cabo la síntesis de una cadena complementaria mediante el cebador FA desde la región F1 en el ácido nucleico molde. Después, la región R1c en la cadena complementaria sintetizada queda lista para el apareamiento de bases, a la que el otro cebador hibrida para formar el origen de la síntesis de la cadena complementaria. El extremo 3' de la cadena complementaria sintetizada en esta etapa posee una secuencia nucleotídica complementaria al cebador FA que constituye el extremo 5' de la cadena sintetizada inicialmente, por lo que se ha proporcionado en el extremo 3' de la misma con la región X1 que hibrida con la región X1C en la misma cadena para formar un bucle. Por tanto, se proporciona la característica estructura del extremo 3' de acuerdo con la presente invención y la posterior reacción constituye el sistema de reacción mostrado previamente como el modo más preferible. El oligonucleótido que hibrida con la porción del bucle se proporciona en el extremo 3' del mismo con la región X2 complementaria a la región X2c localizada en el bucle y en el 5' del mismo con la región X1. En el sistema de reacción previo, se usaron los cebadores FA y RA para sintetizar una cadena complementaria al ácido nucleico molde, lo que proporciona al extremo 3' del ácido nucleico una estructura de bucle. En este procedimiento, los cebadores cortos proporcionan la estructura terminal característica de la presente invención. Por otro lado, en este modo, toda la secuencia nucleotídica que constituye un bucle se proporciona como cebador y es necesaria la síntesis de este cebador más largo.

Si como cebador inverso se usa una secuencia nucleotídica que contenga las regiones de reconocimiento de enzimas de restricción, se puede constituir un modo diferente de acuerdo con la presente invención. La reacción con cebador inverso que contenga una secuencia de reconocimiento para una enzima de restricción se describe específicamente por referencia a la Fig. 6. Cuando la Fig. 6-(D) se completa, una enzima de restricción genera una muestra en un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción en el cebador inverso. La reacción de tipo desplazamiento de hebra de síntesis de la cadena complementaria se inicia a partir de esta muestra como origen de la síntesis. Dado que los cebadores inversos se localizan en ambos extremos de un ácido nucleico de doble hebra constituyente (D), la reacción de síntesis de la cadena complementaria también se inicia a partir de ambos extremos. Aunque básicamente se basa en el procedimiento de SDA descrito en la técnica anterior, la secuencia nucleotídica que sirve como molde posee una estructura que posee secuencias nucleotídicas complementarias unidas alternativamente de acuerdo con la presente invención de modo que se constituye el sistema de síntesis de ácido nucleico único para la presente invención. Se diseñará una parte que sirva como cadena complementaria del cebador inverso en el que se realizará la muestra, para incorporar un derivado de dNTP de forma que se produce resistencia a la nucleasa para evitar la escisión de la cadena de doble hebra por la enzima de restricción.

También es posible insertar un promotor para la ARN polimerasa en el cebador inverso. La transcripción a partir de ambos extremos en la Fi. 6 (D) se lleva a cabo por la acción de una ARN polimerasa que reconoce este promotor, en este caso demasiado similar al modo anterior donde se aplicó el procedimiento SDA.

El ácido nucleico sintetizado en la presente invención es una cadena de una hebra, pero está compuesto por secuencias complementarias parciales y, por tanto, la mayoría de estas secuencias tienen sus bases apareadas. Mediante el uso de esta característica se puede detectar el producto sintetizado. Al llevar a cabo el procedimiento de sintetizar ácido nucleico de acuerdo con la presente invención en presencia de un pigmento fluorescente como sustancia intercalada específica de la cadena de doble hebra tal como bromuro de etidio, SYBR, Verde I o Verde Pico, a medida que la cantidad de producto aumenta, aumenta la densidad de la fluorescencia. Mediante su monitorización, es posible rastrear la reacción de síntesis a tiempo real en un sistema cerrado. También se considera la aplicación de este tipo de sistema de detección al procedimiento de la PCR, pero se estima que hay muchos problemas a causa de que la señal del producto no se puede distinguir de las señales procedentes de los cebadores dímeros etc. No obstante, cuando este sistema se aplica a esta invención, la posibilidad de incrementar el apareamiento inespecífico de bases es muy baja y, por tanto, cabe esperar de forma simultánea una sensibilidad elevada y bajo nivel de ruidos. Similar al uso de la sustancia de intercalación específica de cadena de doble hebra, la transferencia de energía fluorescente se puede utilizar para un procedimiento de realizar un sistema de detección en un sistema uniforme.

El procedimiento de sintetizar ácido nucleico de acuerdo con la presente invención está avalado por la ADN polimerasa catalizadora de la reacción de tipo desplazamiento de hebra para la síntesis de la cadena complementaria. Durante la reacción descrita anteriormente, también se contiene una etapa de reacción que no requiere necesariamente la polimerasa de tipo desplazamiento de hebra. No obstante, para la simplificación de un reactivo constitutivo y desde un punto de vista económico, supone una ventaja usar una clase de ADN polimerasa. Como este tipo de ADN polimerasa se conocen las siguientes enzimas. Además, en la presente invención se pueden utilizar varios mutantes de estas enzimas en la medida en la que ambos poseen actividad *dependiente de la secuencia* para la síntesis de la cadena complementaria y la actividad de desplazamiento de hebra. Los mutantes a los que se hace referencia en la presente memoria descriptiva incluyen aquéllos que sólo poseen una estructura que conlleve la actividad catalítica requerida de la enzima o aquéllos con modificaciones de la actividad catalítica, estabilidad o termoestabilidad mediante, por ejemplo, mutaciones en aminoácidos.

ADN polimerasa Bst

(exo-)ADN polimerasa Bca

Fragmento Klenow de ADN polimerasa I

ADN polimerasa Vent

5 (exo-)ADN polimerasa Vent (ADN polimerasa Vent sin actividad exonucleasa)

ADN polimerasa Deep Vent

(exo-)ADN polimerasa Deep Vent (ADN polimerasa Deep Vent sin actividad exonucleasa)

ADN polimerasa del fago ϕ 29

ADN polimerasa del fago MS2

10 ADN polimerasa z-Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.)

ADN polimerasa KOD (Toyobo Co., Ltd.)

15 Entre estas enzimas, la ADN polimerasa Bst y la exo-)ADN polimerasa son enzimas particularmente deseadas porque poseen un cierto grado de termoestabilidad y una elevada actividad catalítica. La reacción de esta invención se puede llevar a cabo isotérmicamente en una forma de realización preferida, pero a causa del ajuste de la temperatura de fusión (Tf) etc., no siempre es posible utilizar las condiciones de temperatura deseadas para la estabilidad de la enzima. En consecuencia, es una de las condiciones deseadas que la enzima es termoestable. Aunque la reacción isotérmica es factible, se puede realizar la desnaturalización por calor para proporcionar el ácido nucleico como primer molde, y a este respecto también, la utilización de una enzima termoestable amplía la selección del protocolo del ensayo.

20 La (exo-) ADN polimerasa Vent es una enzima que posee actividad de desplazamiento de hebra y un grado elevado de termoestabilidad. Se sabe que la reacción de síntesis de la cadena complementaria que implica el desplazamiento de la hebra por parte de la ADN polimerasa se estimula mediante la adición de una proteína de unión a la hebra única (Paul M. Lizardi y col., Nature Genetics, 19, 225-232, julio 1998). Esta acción se aplica a la presente invención y, mediante la adición de la proteína de unión a la hebra única, cabe esperar el efecto de estimulación de la síntesis de la cadena complementaria. Por ejemplo, el gen 32 de T4 es eficaz como proteína de unión a la hebra única para la (exo-)ADN polimerasa Vent.

30 Para la ADN polimerasa sin actividad 3'-5'-exonucleasa, existe un fenómeno conocido en el que la síntesis de la cadena complementaria no se detiene en el extremo 5' de un molde, lo que tiene como resultado la generación de una protrusión de una base. En la presente invención, este fenómeno no es preferible porque cuando la síntesis de la cadena complementaria alcance el extremo, la secuencia del extremo 3' conduce al inicio de la siguiente síntesis de la cadena complementaria. No obstante, dado que la ADN polimerasa añade una base "A" con una elevada probabilidad al extremo 3', se puede seleccionar la secuencia de modo que la síntesis desde el extremo 3' comienza en "A", de forma que no existe ningún problema su el dATP añade una base adicional de forma errónea. Además, aunque durante la síntesis de la cadena complementaria se protruya el extremo 3', se puede utilizar la actividad exonucleasa 3' → 5' para digerir la protrusión y producir un extremo romo. Por ejemplo, dado que la ADN polimerasa Vent posee esta actividad, esta enzima se puede usar en forma de mezcla con la (exo-) ADN polimerasa Vent con el fin de resolver este problema.

40 Varios reactivos necesarios para el procedimiento de sintetizar o amplificar ácido nucleico de acuerdo con la presente invención pueden envasarse previamente y proporcionarse en forma de kit. Específicamente, Para la presente invención se proporciona un kit, que comprende varias clases de oligonucleótidos necesarios como cebadores para la síntesis de la cadena complementaria y como cebadores externos para desplazamiento, dNTP como sustancia para la síntesis de la cadena complementaria, una ADN polimerasa para llevar a cabo la reacción de tipo desplazamiento de hebra de la cadena complementaria, un tampón que proporcione las condiciones adecuadas para la reacción enzimática y tantos reactivos como sea necesario para la detección de los productos de la reacción de síntesis. En particular, en un modo preferido de la presente invención, la adición de reactivos es necesaria durante la reacción y, por tanto, los reactivos necesarios para una reacción se suministran después de pipetear en un vaso de reacción, a través de lo cual la reacción puede iniciarse mediante la adición de únicamente una muestra. Constituyendo un sistema en el que el producto de la reacción se pueda detectar in situ en un vaso de reacción mediante la utilización de una señal luminiscente o de una señal fluorescente, no es necesario abrir y cerrar el vaso tras la reacción. Esto es muy deseable para la prevención de la contaminación.

50 El ácido nucleico que posee secuencias nucleotídicas complementarias unidas alternativamente en una cadena de una hebra sintetizado de acuerdo con la presente invención posee, por ejemplo, la siguiente utilidad. La primera característica es el uso de una ventaja resultante de la estructura especial que posee secuencias complementarias en una molécula. Cabe esperar que esta característica facilite la detección. Es decir, existe un sistema conocido

para detectar ácido nucleico en el que su señal varía en función del apareamiento de las bases con una secuencia nucleotídica complementaria. Por ejemplo, mediante la combinación con el procedimiento de utilizar una sustancia de intercalación específica de cadena de doble hebra como detector tal y como se ha descrito antes, se puede realizar un sistema de detección que haga uso completo de las características del producto de la síntesis de la presente invención. Si el producto de la reacción de síntesis de la presente invención se desnaturaliza con calor una vez en dicho sistema de detección y se retorna a la temperatura original, se produce preferentemente hibridación intramolecular, lo que permite el rápido apareamiento de bases en secuencias complementarias. Si hay productos de reacción inespecíficos, no poseen secuencias complementarias en la molécula, de modo que tras la separación por desnaturalización con calor en 2 o más moléculas, no pueden retornar de inmediato a la cadena de doble hebra original. Proporcionando la etapa de desnaturalización con calor antes de la detección se pueden reducir los ruidos que acompañan a la reacción inespecífica. Si se usa la ADN polimerasa no resistente al calor, la etapa de desnaturalización con calor posee el significado de terminación de la reacción y, por tanto, posee ventajas para el control de la temperatura de la reacción.

La segunda característica es que siempre forma un bucle capaz de aparear bases. La estructura de un bucle capaz de aparear bases se muestra en la Fig. 4. Como se puede observar en la Fig. 4, el bucle está compuesto por la secuencia nucleotídica F2c (X2c) que se puede hibridar mediante el cebador y una secuencia nucleotídica intermedia entre F2c-F1c (X1c). La secuencia entre F2c-F1c (o entre X2c-X1c en una forma más universal) es una secuencia derivada de nucleótidos a partir del molde. En consecuencia, si una sonda que posee una secuencia nucleotídica complementaria hibrida con esta región, la detección específica del molde es factible. Además, esta región siempre está lista para el apareamiento de las bases y, por tanto, la desnaturalización con calor antes de la hibridación no es necesaria. La secuencia nucleotídica que constituye un bucle en el producto de la reacción de amplificación en la presente invención puede tener una longitud arbitraria. En consecuencia, si se desea hibridación con una sonda, una región a hibridar mediante el cebador y una región a hibridar mediante la sonda se organizan por separado para evitar su competencia, a través de lo cual se pueden constituir condiciones de reacción ideales.

De acuerdo con un modo preferible de la presente invención, un gran número de bucles capaces de aparear las bases se proporcionan en una hebra única de ácido nucleico. Esto significa que un gran número de sondas pueden hibridar con una molécula de ácido nucleico para permitir una detección altamente sensible. Por tanto, es posible realizar no sólo la mejora de la sensibilidad sino también un procedimiento para detectar el ácido nucleico basado en un principio de reacción especial tal como la agregación. Por ejemplo, al producto de la reacción de la presente invención se añade una sonda inmovilizada en partículas finas tales como látex de poliestireno, la agregación de las partículas de látex se observa a medida que procede la hibridación del producto con la sonda. La observación altamente sensible y cuantitativa es factible mediante la medición óptica de la fuerza de la agregación. Dado que la agregación también se puede observar a simple vista, también se puede constituir un sistema de reacción que no use un dispositivo de medición óptica.

Además, el producto de la reacción de la presente invención que permite la unión de muchos marcadores al mismo por molécula de ácido nucleico permite la detección cromatográfica. En el campo del inmunoensayo, en la práctica se usa un procedimiento analítico (inmunocromatografía) que usa un medio cromatográfico que utiliza un marcador detectable visualmente. Este procedimiento se basa en el principio de que se produce un sándwich con un analito, que queda entre un anticuerpo inmovilizado en un medio cromatográfico y un anticuerpo marcado, y el componente marcado que no reacciona es eliminado. El producto de la reacción de la presente invención convierte a este principio en aplicable para el análisis del ácido nucleico. Es decir, se prepara una sonda marcada hacia la parte de un bucle y se inmoviliza sobre un medio cromatográfico para preparar una sonda de captura para atrapar en el mismo y permitir el análisis en el medio cromatográfico. Como la sonda de captura se puede utilizar una secuencia complementaria a la parte del bucle. Dado que el producto de reacción de la presente invención posee un gran número de bucles, el producto se une a un gran número de sondas marcadas para dar una señal visualmente reconocible.

El producto de reacción de acuerdo con la presente invención que siempre da una región como un bucle capaz del apareamiento de bases permite una amplia variedad de otros sistemas de detección. Por ejemplo, es factible un sistema de detección que utiliza la resonancia plasmón superficial usando una sonda inmovilizada para esta porción de bucle. Además, si una sonda para la porción bucle está marcada con una sustancia de intercalación específica de cadena de doble hebra se pueden realizar análisis de fluorescencia más sensibles. Como alternativa, también es posible utilizar de forma positiva la capacidad del ácido nucleico sintetizado mediante la presente invención para formar un bucle capaz del apareamiento de bases en ambos extremos, el 3' y el 5'. Por ejemplo, se diseña un bucle para que posea una secuencia nucleotídica común entre un tipo normal y un tipo anormal, mientras que el otro bucle está diseñado para generar una diferencia entre ellos. Es posible constituir un sistema analítico característico en el que la presencia de un gen se confirma mediante la sonda para la porción común, mientras que la presencia de una anomalía se confirma en otra región. Dado que la reacción de sintetizar ácido nucleico de acuerdo con la presente invención también puede proceder isotérmicamente, es una ventaja muy importante que el análisis a tiempo real se pueda realizar mediante un fotómetro fluorescente general. Hasta este momento se conoce la estructura del ácido nucleico que se va a hibridar. No obstante, el ácido nucleico que posee secuencias nucleotídicas complementarias unidas alternativamente en una cadena de una hebra obtenida mediante la presente invención es nuevo en cuanto a que contiene un gran número de bucles capaces de aparear sus bases con otros oligonucleótidos.

Por otro lado, un gran número de los propios bucles dados por el producto de la reacción de acuerdo con la presente invención se pueden usar como sondas. Por ejemplo, en un chip de ADN, las sondas deben acumularse a una densidad elevada en un área limitada. Sin embargo, en la presente tecnología, el número de oligonucleótidos que pueden inmovilizarse en un área concreta es limitado. Por tanto, mediante el uso del producto de la reacción de la presente invención, un gran número de sondas capaces de hibridar se pueden inmovilizar a una densidad elevada. Es decir, el producto de la reacción de acuerdo con la presente invención puede inmovilizarse como sondas en un chip de ADN. Tras la amplificación, el producto de la reacción puede inmovilizarse mediante cualquier técnica conocida en la técnica o el oligonucleótido inmovilizado se utiliza como el oligonucleótido en la reacción de amplificación de la presente invención, lo que tiene como resultado la generación del producto de la reacción inmovilizado. Mediante el uso de la sonda inmovilizada de este modo, un gran número de ADN de muestra se puede hibridar en un área limitada y, como resultado, se puede esperar observar señales elevadas.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es una ilustración de una parte (1) a (4) del principio de la reacción en un modo preferible de la presente invención.

La Fig. 2 es una ilustración de una parte (5) a (7) del principio de la reacción en un modo preferible de la presente invención.

La Fig. 3 es una ilustración de una parte (8) a (10) del principio de la reacción en un modo preferible de la presente invención.

La Fig. 4 es una ilustración de la estructura de un bucle formado por el ácido nucleico de una hebra de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 5 es una ilustración de una parte (A) a (B) en un modo básico de la presente invención.

La Fig. 6 es una ilustración de una parte (C) a (D) en un modo básico de la presente invención.

La Fig. 7 es una figura que muestra la relación posicional de cada secuencia nucleotídica que constituye un oligonucleótido en la secuencia nucleotídica diana de M13mp18.

La Fig. 8 es una fotografía que muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de un producto obtenido mediante el procedimiento de síntesis de ácido nucleico de una hebra con M13mp18 como molde de acuerdo con la presente invención.

Calle 1: marcador de tamaño XIV

Calle 2: 1 fmol de ADNds de M13mp18

Calle 3: No hay diana

La Fig. 9 es una fotografía que muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de un producto digerido con una enzima de restricción obtenido en el Ejemplo 1 mediante la reacción de síntesis del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

Calle 1: marcador de tamaño XIV

Calle 2: digesto de BamHI del producto purificado

Calle 3: digesto de PvuII del producto purificado

Calle 4: digesto de HindIII del producto purificado

La Fig. 10 es una fotografía que muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de un producto obtenido mediante el procedimiento de síntesis de ácido nucleico de una hebra de acuerdo con la presente invención usando M13mp18 como molde en presencia de betaína. 0, 0,5, 1 y 2 indican la concentración (M) de betaína añadida a la solución de la reacción. N indica el control negativo y -21 indica la concentración 10^{-21} mol del ADN molde.

La Fig. 11 es una figura que muestra la relación posicional de cada secuencia nucleotídica que constituye un oligonucleótido en una secuencia nucleotídica diana derivada del HVB.

La Fig. 12 es una fotografía que muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de un producto obtenido mediante el procedimiento de síntesis de ácido nucleico de una hebra de acuerdo con la presente invención, en el que como molde se usó HBV-M13mp18 integrado en M13mp18.

Calle 1: marcador de tamaño XIV

Calle 2: 1 fmol de ADNds de HBV-M13mp18

Calle 3: No hay diana

La Fig. 13 es una fotografía que muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de un producto de un producto desnaturalizado con álcali obtenido el procedimiento de síntesis de ácido nucleico de una hebra de acuerdo con la presente invención.

5 Calle 1: fragmento digerido con HindIII del fago lambda

Calle 2: El producto de la reacción en el Ejemplo 1.

Calle 3: El producto de la reacción en el Ejemplo 3.

10 La Fig. 14 es una fotografía que muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de un producto de un producto obtenido por procedimiento de síntesis de ácido nucleico de una hebra de acuerdo con la presente invención en el que se varió la concentración de M13mp18 como diana. Las fotografías superior e inferior muestran el resultado de la reacción para 1 y 3 horas respectivamente.

Calle 1: ADNds de M13mp18 1×10^{-15} mol/tubo

Calle 2: ADNds de M13mp18 1×10^{-16} mol/tubo

Calle 3: ADNds de M13mp18 1×10^{-17} mol/tubo

15 Calle 4: ADNds de M13mp18 1×10^{-18} mol/tubo

Calle 5: ADNds de M13mp18 1×10^{-19} mol/tubo

Calle 6: ADNds de M13mp18 1×10^{-20} mol/tubo

Calle 7: ADNds de M13mp18 1×10^{-21} mol/tubo

Calle 8: ADNds de M13mp18 1×10^{-22} mol/tubo

20 Calle 9: No hay diana

Calle 10: marcador de tamaño XIV

La Fig. 15 es una figura que muestra la posición de una mutación y la relación posicional de cada región hacia una secuencia nucleotídica diana (diana). La guanina subrayada está sustituida por adenina en el mutante.

25 La Fig. 16 es una fotografía que muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de un producto de un producto de acuerdo con la reacción de amplificación de la presente invención.

M: ladder 100 pb (New England Biolabs)

N: No hay molde (agua purificada)

WT: 1 fmol del molde salvaje M13mp18

MT: 1 fmol del molde mutante M13mp18 FM

30

La Fig. 17 es una figura que muestra la relación posicional de cada secuencia nucleotídica que constituye un oligonucleótido en una secuencia nucleotídica que codifica el ARNm diana.

35 La Fig. 18 es una fotografía que muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de un producto obtenido mediante el procedimiento de síntesis de ácido nucleico de una hebra de acuerdo con la presente invención usando ARNm como diana.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

Ejemplo 1. Amplificación de una región en M13mp18

40 Se intentó realizar el procedimiento de sintetizar el ácido nucleico que posee cadenas complementarias unidas alternativamente en una cadena de una hebra de acuerdo con la presente invención usando M13mp18 como molde. En el experimento se usaron cuatro tipos de cebadores, es decir, M13FA, M13RA, M13F3 y M13R3. M13F3 y M13R3 fueron los cebadores externos para desplazar el primer ácido nucleico obtenido respectivamente con M13FA y M13RA como origen de la síntesis. Dado que los cebadores externos son cebadores que sirven como origen de la síntesis de la cadena complementaria tras la síntesis con M13FA (o M13RA), estos se diseñaron para hibridar con una región contigua a M13FA (o M13RA) mediante el uso del fenómeno de apilamiento contiguo. Además, las

concentraciones de estos cebadores se establecieron a niveles elevados, de modo que la hibridación con M13FA (o M13RA) se produjera de forma preferencial.

5 La secuencia nucleotídica que constituye cada cebador se muestra en el listado de secuencias. Las características estructurales de los cebadores se resumen más adelante. Además la relación posicional de cada región hacia la secuencia nucleotídica diana (diana) se muestra en la Fig. 7.

Cebador: Región en el extremo 5'/región en el extremo 3'.

M13FA: La misma que la región F1c en la cadena complementaria sintetizada mediante M13FA/complementaria a la región F2c en M13mp18

10 M13RA: La misma que la región R1c en la cadena complementaria sintetizada mediante M13RA/complementaria a la región R2c en la cadena complementaria sintetizada mediante M13FA.

M13F3: complementaria a F3c contigua al extremo 3' de la región F2c en M13mp18

M13R3: complementaria a R3c contigua al extremo 3' de la región F2c en la cadena complementaria sintetizada mediante M13FA

15 Mediante tales cebadores, se sintetiza el ácido nucleico en el que una región se extiende de F1c a R1c en M13mp18, y su secuencia nucleotídica complementaria, están unidos alternativamente a través de una secuencia formadora de bucles que contiene F2c en una cadena de una hebra. A continuación se muestra la composición de una solución de la reacción para el procedimiento de sintetizar ácido nucleico mediante estos cebadores de acuerdo con la presente invención.

Composición de la solución de reacción (en 25 µl)

20 Tris-HCl 20 mM pH 8,8

KCl 10 mM

(NH₄)₂SO₄ 10 mM

MgSO₄ 6 mM

Triton X-100 0,1%

25 Dimetilsulfóxido (DMSO) 5%

dNTP 0,4 mM

Cebadores:

M13FA 800 nM/SEC ID N° 1

M13RA 800 nM/SEC ID N° 2

30 M13F3 200 nM/SEC ID N° 3

M13R3 200 nM/SEC ID N° 4

Diana: ADNds M13mp18/SEC ID N° 5

35 Reacción: La anterior solución de reacción se calentó a 95°C durante 5 minutos y la diana se desnaturalizó en una cadena de una hebra. La solución de reacción se transfirió a agua helada-fría y se añadieron 4 U de ADN polimerasa Bst (NEW ENGLAND Biolabs) y la mezcla se hizo reaccionar a 65°C durante 1 hora. Tras la reacción, la reacción se detuvo a 80°C durante 10 minutos y se transfirió de nuevo a agua helada-fría.

40 Confirmación de la reacción: A 5 µl de la solución de reacción anterior se añadió 1 µl de tampón de carga y la muestra se sometió a electroforesis durante 1 hora a 80 mV en gel de agarosa al 2% (TBE 0,5%). Como marcador de peso molecular, se usó XIV (ladder de 100 pb, Boehringer Mannheim). El gel tras la electroforesis se tiñó con verde SYBR I (Molecular Probes, Inc.) para confirmar el ácido nucleico. Los resultados se muestran en la Fig. 8. Las calles respectivas corresponden a las siguientes muestras.

1. Marcador de tamaño XIV
2. 1 fmol de ADNds de M13mp18
3. No hay diana.

En la calle 3, no se confirmó ninguna banda excepto que se tñeron los cebadores que no reaccionaron. En la calle 2, en presencia de una diana, los productos se confirmaron como una banda ladder de tamaño pequeño, en forma de una tinción en frotis en el tamaño elevado y como una banda que apenas pasó la electroforesis en el gel. Entre las bandas de tamaño pequeño, las bandas en las proximidades de 290 pb y 450 pb concuerdan con los productos estimados en la reacción de síntesis de esta invención, es decir, cadenas de doble hebra de SEC ID N° 11 y 12 (correspondiente a cadenas de doble hélice formadas como se muestra en las Fig. 2-(7) y 2-(10)) y una cadena de una hebra de SEC ID N° 13 (correspondiente a la cadena larga de una hebra en la Fig. 3-(9)) y, por tanto, se confirmó que la reacción procedía como estaba previsto. Se estimó que los resultados de la electroforesis del patrón de frotis en el tamaño grande y la banda que no pasó la electroforesis se produjeron porque esta reacción era básicamente una reacción continua para permitir variar los pesos moleculares del producto de la reacción y después porque el producto posee una estructura complicada que posee una cadena con una hebra parcialmente y un complejo de doble hebra.

Ejemplo 2. Confirmación de los productos de la reacción mediante digestión con enzimas de restricción

Con el fin de esclarecer la estructura del ácido nucleico que posee secuencias nucleotídicas complementarias unidas alternativamente en una cadena de una hebra obtenida en el Ejemplo 1 de acuerdo con la presente invención, se llevó a cabo la digestión de los productos con enzimas de restricción. Si teóricamente se generan fragmentos mediante digestión del mismo con enzimas de restricción y, simultáneamente, el patrón del frotis en el tamaño grande y la banda que no pasó la electroforesis según se ha observado en el Ejemplo 1 desaparece, después se puede estimar que algunos de estos productos son el ácido nucleico que posee secuencias complementarias unidas alternativamente en una cadena de una hebra sintetizada de acuerdo con la presente invención.

La solución de reacción (200 µl) de 8 tubos en el Ejemplo 1 se combinó y purificó mediante tratamiento con fenol y precipitación con etanol. Los precipitados resultantes se recuperaron y disolvieron de nuevo en 200 µl de tampón TE y una alícuota de 10 µl se digirió a 37°C durante 2 horas con las enzimas de restricción BamHI, PvuII y HindIII respectivamente. El digesto se sometió a electroforesis durante 1 hora a 80 mV en gel de agarosa al 2% (0,5% TBE). Como marcador molecular se usó Super Ladder-Low (ladder de 100 pb) (Gensura Laboratories, Inc.). El gel tras la electroforesis se tñó con verde SYBR I (Molecular Probes, Inc.) para confirmar el ácido nucleico. Los resultados se muestran en la Fig. 9. Las calles respectivas corresponden a las siguientes muestras.

1. Marcador de tamaño XIV
2. Digesto de BamHI del producto purificado
3. Digesto de PvuII del producto purificado
4. Digesto de HindIII del producto purificado

Se ha estimado que las secuencias nucleotídicas que constituyen productos de amplificación relativamente cortos son aquéllas de las SEC ID N° 13, 14, 15 y 16. A partir de estas secuencias nucleotídicas, el tamaño estimado de cada fragmento digerido con las enzimas de restricción es como se muestra en la Tabla 1. "L" en la tabla indica que su posición en la electroforesis no está establecida porque L es un fragmento que contiene un bucle (cadena de una hebra).

Tabla 1. Fragmentos digeridos con enzimas de restricción de los productos de amplificación de acuerdo con la presente invención

SEC ID N°	BamHI	PvuII	HindIII
13	177 +L	56 +L	147 +L
14	15+101 +L	-	142 +L
15	171+101 +L	56 +L	147+161 +L
16	11+101+230 +L	237 +L	142+170 +L
Resumen	101,177,230	56, 237	142, 147,161,170

(11, 15; no confirmados)

Dado que casi todas las bandas antes de la digestión se habían modificado a bandas estimadas, se confirmó que los productos de la reacción objeto se habían amplificado. Además, también se mostró que no había ninguno, o había menos, productos inespecíficos.

Ejemplo 3. Estimulación de la reacción de amplificación mediante la adición de betaína

Se llevó a cabo un experimento para estudiar el efecto de la betaína (N,N,N-trimetilglicina, Sigma) añadida a la solución de la reacción de amplificación sobre la reacción de amplificación del ácido nucleico. La síntesis del ácido que posee cadenas complementarias unidas alternativamente en una cadena de una hebra de acuerdo con la presente invención se realizó usando M13mp18 como molde de forma similar en el Ejemplo 1 en presencia de betaína a varias concentraciones. Los cebadores usados en el experimento fueron idénticos a los usados en el Ejemplo 1. La cantidad de ADN molde fue 10^{-21} mol (M13mp18) y se usó agua como control negativo. Betaína se añadió a la solución de la reacción a concentraciones de 0, 0,5, 1 y 2M. La composición de la solución de la reacción se muestra a continuación.

10 Composición de la solución de reacción (en 25 μ l)

Tris-HCl 20 mM pH 8,8

MgSO₄ 4 mM

dNTP 0,4 mM

KCl 10 mM

15 (NH₄)₂SO₄ 10 mM

Triton X-100 0,1%

Cebadores:

M13FA 800 nM/SEC ID N° 1

M13RA 800 nM/SEC ID N° 2

20 M13F3 200 nM/SEC ID N° 3

M13R3 200 nM/SEC ID N° 4

Diana: ADNds M13mp18/SEC ID N° 5

La polimerasa, las condiciones de la reacción y las condiciones para la electroforesis tras la reacción fueron idénticas a las descritas en el Ejemplo 1.

25 Los resultados se muestran en la Fig. 10. En la reacción en presencia de betaína a una concentración de 0,5 ó 1,0 M, la cantidad del producto de amplificación incrementó. Además, si su concentración se incrementaba a 2,0M no se observaba ninguna amplificación. Por tanto, se ha mostrado que la reacción de amplificación se estimuló en presencia de betaína a una concentración adecuada. La razón estimada de que la cantidad del producto de amplificación disminuía cuando la concentración de betaína era 2M fue que la Tf había disminuido demasiado.

30 Ejemplo 4. Amplificación de la secuencia génica de HBV

Se intentó realizar el procedimiento de sintetizar ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, en el que como molde se usó ADNds de M13mp18 con una secuencia parcial del gen de HBV integrado en el mismo. En el experimento se usaron cuatro tipos de cebadores, HB65FA (SEC ID N° 6), HB65RA (SEC ID N° 7), HBF3 (SEC ID N° 8) y HBR3 (SEC ID N° 9). HBF3 y HBR3 fueron los cebadores externos para desplazamiento del primer ácido nucleico obtenido respectivamente con HB65FA y HB65RA como origen de la síntesis. Dado que los cebadores externos son cebadores que sirven como origen de la síntesis de la cadena complementaria tras la síntesis con HB65FA (o HB65RA), estos se diseñaron para hibridar con una región contigua a HB65FA (o HB65RA) mediante el uso del fenómeno de apilamiento contiguo. Además, las concentraciones de estos cebadores se establecieron a niveles elevados, de modo que la hibridación con HB65FA (o HB65RA) se produjera de forma preferencial. La secuencia diana (430 pb) en este ejemplo, derivada de HBV integrado en M13mp18, se muestra en la SEC ID N° 10.

La secuencia nucleotídica que constituye cada cebador se muestra en el listado de secuencias. La característica estructural de cada cebador se resume más adelante. Además, la relación posicional de cada región hacia la secuencia nucleotídica diana (diana) se muestra en la Fig. 11.

Cebador: Región en el extremo 5'/región en el extremo 3'.

45 HB65FA: La misma que la región F1c en la cadena complementaria sintetizada mediante HB65FA/complementaria a la región F2c en HBV-M13mp18

HB65RA: La misma que la región R1c en la cadena complementaria sintetizada mediante HB65RA/complementaria a la región R2c en la cadena complementaria sintetizada mediante HB65FA.

HBf3: complementaria a F3c contigua al extremo 3' de la región F2c en HBV-M13mp18

HBR3: complementaria a R3c contigua al extremo 3' de la región F2c en la cadena complementaria sintetizada mediante HB65FA

5 Mediante tales cebadores, se sintetiza el ácido nucleico en el que una región se extiende de F1c a R1c en M13mp18 (HBV-M13MP18) que posee una secuencia parcial del gen de HBV integrada en la misma, y su secuencia nucleotídica complementaria, están unidos alternativamente a través de una secuencia formadora de bucles que contiene F2c en una cadena de una hebra. La reacción se realizó en las mismas condiciones que en el Ejemplo 1 a excepción del uso de los cebadores y la solución de la reacción se analizó mediante electroforesis en agarosa. Los resultados se muestran en la fig. 12. Las respectivas calles corresponden a las muestras siguientes.

- 10 1. Marcador de tamaño XIV
2. 1 fmol de ADNds de M13mp18
3. No hay diana

15 De un modo similar al Ejemplo 1, los productos sólo se confirmaron en presencia de una diana como una banda ladder de tamaño pequeño, en forma de una tinción en frotis en el tamaño elevado y como una banda que apenas pasó la electroforesis en el gel (calle 2). Entre las bandas de tamaño pequeño, las bandas en las proximidades de 310 pb y 480 pb concuerdan con los productos estimados en la reacción de síntesis de esta invención, es decir, cadenas de doble hebra de SEC ID N° 17 y 18 y, por tanto, se confirmó que la reacción procedía como estaba previsto. Como se describe en los resultados del Ejemplo 1, se estimó que el patrón de frotis en el tamaño grande y la banda que no pasó la electroforesis se produjeron por la estructura del producto de la síntesis característica de la presente invención. A partir de este experimento, se confirmó que la presente invención se puede practicar incluso si se usa una secuencia diferente (diana) para la amplificación.

Ejemplo 5. Confirmación de los tamaños de los productos de la reacción de síntesis

25 Para confirmar la estructura del ácido nucleico sintetizado de acuerdo con la presente invención, se analizó su longitud mediante electroforesis en condiciones de desnaturalización con álcali. A 5 µl de cada A 5 µl de cada solución de reacción se añadió 1 µl de tampón de carga alcalino en presencia de la diana en el Ejemplo 1 o 4 y se sometió a electroforesis a 50 mA en gel de agarosa al 0,7% (NaOH 50 mM, EDTA 1 mM) durante 14 horas. Como marcador del tamaño del peso molecular se usaron fragmentos digeridos con HindIII del fago lambda. Tras la electroforesis el gel se neutralizó con Tris 1M, a pH 8 y se tiñó con verde SYBR I (Molecular Probes, Inc.) para confirmar el ácido nucleico. Los resultados se muestran en la Fig. 13. Las calles respectivas corresponden a las siguientes muestras.

- 30 1. Fragmentos del fago lambda digeridos con HindIII.
2. El producto de la reacción en el Ejemplo 1.
3. El producto de la reacción en el Ejemplo 4.

35 Cuando el producto de la reacción se sometió a electroforesis en condiciones de desnaturalización alcalina se pudo confirmar su tamaño en un estado de una hebra. Se confirmó que los tamaños de los productos principales en el Ejemplo 1 (calle 2) y el Ejemplo 4 (calle 3) se encontraban dentro de los 2 kbases. Además, se reveló que el producto de acuerdo con la presente invención se había extendido para que tuviera un tamaño de al menos 6 kbases o más dentro del intervalo capaz de confirmación mediante este análisis. Además, se confirmó de nuevo que las bandas que no pasaron la electroforesis en condiciones no desnaturalizantes en los Ejemplos 1 y 4 se separaban en un estado desnaturalizado en cadenas individuales de una hebra de menor tamaño.

Ejemplo 6. Confirmación de la amplificación dependiendo de la concentración de una diana en la amplificación de una región en M-13mp13

45 Se observó la influencia de una concentración variable de una diana sobre el procedimiento de síntesis del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. El procedimiento de síntesis del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se llevó a cabo en las mismas condiciones que en el Ejemplo 1 excepto porque la cantidad de ADNds de M13mp18 como la diana fue de 0 a 1 fmol y el tiempo de reacción fue de 1 hora o 3 horas. De un modo similar al Ejemplo 1, la muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2% (TBE 0,5%) y se tiñó con verde SYBR I (Molecular Probes, Inc.) para confirmar el ácido nucleico. Como marcador del tamaño molecular se usó XIV (ladder de 100 pb, Boehringer Mannheim). Los resultados se muestran en la Fig. 14 (superior: reacción de 1 hora, inferior: reacción de 3 horas). Las calles respectivas corresponden a las siguientes muestras:

- 50 1. ADNds de M13mp18 1×10^{-15} mol/tubo
2. ADNds de M13mp18 1×10^{-16} mol/tubo

3. ADNds de M13mp18 1×10^{-17} mol/tubo
4. ADNds de M13mp18 1×10^{-18} mol/tubo
5. ADNds de M13mp18 1×10^{-19} mol/tubo
6. ADNds de M13mp18 1×10^{-20} mol/tubo
- 5 7. ADNds de M13mp18 1×10^{-21} mol/tubo
8. ADNds de M13mp18 1×10^{-22} mol/tubo
9. No hay diana
10. Marcador de tamaño XIV

10 En la parte inferior del perfil electroforético aparece una banda común en las calles respectivas y muestra los cebadores teñidos que no reaccionaron. Al margen del tiempo de reacción no se observa ningún producto de amplificación en ausencia de la diana. Se obtuvo un patrón de tinción, dependiendo de la concentración de la diana, del producto de amplificación sólo en presencia de la diana. Además, el producto de amplificación se pudo confirmar a una concentración menor ya que el tiempo de reacción aumentó.

Ejemplo 7. Detección de una mutación puntual

- 15 (1) Preparación de M13mp18FM (mutante)

El ADN diana usado fue M13mp18 (salvaje) y M13mp18FM (mutante). Para la construcción del mutante M13mp18FM se usó el kit de LA PCR™ in vitro Mutagénesis (Takara Shuzo Co., Ltd) para sustituir un nucleótido por la mutación. Después, la secuencia se confirmó mediante secuenciación. La secuencia de la región F1 se muestra a continuación:

- 20 Salvaje: CCGGGGATCCTCTAGAGTCG (SEC ID N° 19)

Mutante: CCGGGGATCCTCTAGAGTCA (SEC ID N° 20)

- (2) Diseño de los cebadores

25 Los cebadores FA usados para el salvaje y el mutante se proporcionaron en el extremo 5' de la región F1c del mismo con diferentes secuencias nucleotídicas, respectivamente. La localización de la mutación y la relación posicional de cada región hacia la secuencia nucleotídica diana (diana) se muestran en la Fig. 15.

- (3) Reacción de amplificación

Se llevó a cabo un experimento para examinar si se produce reacción de amplificación específica del molde usando una combinación de cebadores específicos que se muestra más adelante mediante el uso de M13mp18 (salvaje) y M13mp18FM (mutante) como cebadores.

- 30 Conjunto de cebadores para la amplificación salvaje: FAd4, RAd4, F3, R3

Conjunto de cebadores para la amplificación mutante: FAMd4, RAd4, F3, R3

La secuencia nucleotídica de cada cebador es la siguiente:

- 35 FAd4: CGACTCTAGAGGATCCCCGGTTTTTGTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT (SEC ID N° 21)
 FAMd4: TGA CTCTAGAGGATCCCCGGTTTTTGTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT (SEC ID N° 22)
 RAd4 : CGTCGTGACTGGGAAAACCCTTTTTGTGCGGGCCTCTTCGCTATTAC (SEC ID N° 23)
 F3: ACTTTATGCTTCCGGCTCGTA (SEC ID N° 24)
 R3: GTTGGGAAGGCGATCG (SEC ID N° 25)

- (4) Detección de la mutación puntual en M13mp18

La composición de la solución de la reacción es la siguiente:

		Concentración final
D2W	3,75 µl	
10 x Tampón thermo (NEB)	2,5 µl	Tris-HCl pH 8,8 KCl 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 10 mM MgSO ₄ 6 mM Triton X-100 0,1%
dNTP 2,5 mM	4 µl	400 µM
MgSO ₄ 100 mM	0,5 µl	
Betaína 4 M	6,25 µl	1M
Cebador M13FAd4 (10 pmol/µl) o Cebador M13FAMd4 (10 pmol/µl)	2 µl	800 Nm
Cebador M13RAd4 (10 pmol/µl)	2 µl	
Cebador M13F3 (10 pmol/µl)	0,5 µl	800 Nm
Cebador M13R3 (10 pmol/µl)	0,5 µl	
Cantidad total	22 µl	200 nM 200 nM

- 1 fmol (2 µl) del M13mp18 o M13mp18FM diana se añadió a la solución de la reacción y se calentó a 95°C durante 5 minutos, tras lo cual la diana se desnaturalizó en una cadena de una hebra. La solución de reacción se transfirió a agua helada-frío y se añadió a la misma 1 µl (U) de ADN polimerasa Bst (NEW ENGLAND Biolab) y se hizo reaccionar durante 1 hora a 68°C o 68,5°C. Tras la reacción, la reacción se terminó a 80°C durante 10 minutos y la solución de reacción se transfirió de nuevo a agua helada-fría.

Como se muestra en la Fig. 16, cuando se usó Fad4 para el salvaje como el cebador FA se observó una amplificación eficaz únicamente en presencia del molde salvaje. Por otro lado, cuando se usó FAMd4 para el mutante como el cebador FA, se observó una amplificación eficaz únicamente en presencia del molde salvaje [sic.].

- 10 A partir de los resultados descritos antes se mostró que la mutación puntual podía detectarse de un modo eficiente mediante el uso de la reacción de amplificación de la presente invención.

Ejemplo 8. Reacción de amplificación del ARNm como diana

- Se intentó realizar el procedimiento de la síntesis de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención usando ARNm como el ácido nucleico diana. Para preparar el ARNm diana células dLNCaP de la línea celular de cáncer de próstata (ATCC N° CRL-1740) que expresan antígeno específico de próstata (PSA) se mezclaron con una línea celular K562 de células leucemia mieloide crónica (ATCC N° CRL-243) como células que no expresan a 1:10⁶ a 100:10⁶, seguido por la extracción del ARN total mediante el uso de un RNeasy Mini kit de Qiagen (Alemania). En el experimento se usaron cuatro tipos de cebadores, es decir, PSAFA, PSARA, PSAF3 y PSAR3. PSAF3 y PSAR3 son los cebadores externos para desplazar el primer ácido nucleico obtenido respectivamente con PSAFA y PSARA como origen de la síntesis. Además, se establecieron unas concentraciones de estos cebadores elevadas de modo que se produjera la hibridación de PSAFA (o PSARA) de forma preferencial. Las secuencias nucleotídicas que constituyen los respectivos cebadores son las siguientes.

Cebador:

PSAFA: TGTTCTGATGCAGTGGGCAGCTTTAGTCTGCGGCGGTGTTCTG (SEC ID N° 26)

PSARA: TGCTGGGTCGGCACAGCCTGAAGCTGACCTGAAATACCTGGCCTG (SEC ID N° 27)

PSAF3: TGCTTGTGGCCTCTCGTG (SEC ID N° 28)

5 PSAR3: GGGTGTGGGAAGCTGTG (SEC ID N° 29)

Las características estructurales de los cebadores se resumen más adelante. Además, la relación posicional de cada cebador hacia la secuencia nucleotídica de ADN codificadora para el ARNm diana y los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción Sau3AI se muestran en la Fig. 17.

Cebador: Región en el extremo 5'/región en el extremo 3'.

10 PSAFA: La misma que la región F1c en la cadena complementaria sintetizada mediante PSAFA/complementaria a la región F2c en la secuencia nucleotídica diana

PSARA: La misma que la región R1c en la cadena complementaria sintetizada mediante PSARA/complementaria a la región R2c en la cadena complementaria sintetizada mediante PSAFA.

PSAF3: complementaria a F3c contigua al extremo 3' de la región F2c en la secuencia nucleotídica diana

15 PSAR3: complementaria a R3c contigua al extremo 3' de la región F2c en la cadena complementaria sintetizada mediante PSAFA

La composición de una solución de la reacción para el procedimiento de síntesis de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es el siguiente:

Composición de la solución de reacción (en 25 µl)

20 Tris-HCl 20 mM pH 8,8

MgSO₄ 4 mM

dNTP 0,4 mM

KCl 10 mM

(NH₄)₂SO₄ 10 mM

25 Triton X-100 0,1%

Betaina 0,8M

DTT 5 mM

Cebador PSAFA y PSARA 1600 nM

Cebador PSAF3 y PSAR3 200 nM

30 ADN polimerasa Bst 8 U

Rever Tra Ace 100 U (Toyobo Co., Ltd, Japón)

ARN total 5 µg

35 Todos los ingredientes se mezclaron en hielo. En este experimento, el ARNm (cadena de una hebra) se usa como diana y, por tanto, la etapa de conseguir una cadena de una hebra mediante desnaturalización con calor no es necesaria. La reacción se llevó a cabo a 65°C durante 45 minutos y la reacción se finalizó a 85°C durante 5 minutos. Tras la reacción, 5 µl de la solución de reacción se sometieron a electroforesis en agarosa al 2% y se detectó mediante Verde SYBR I.

Los resultados se muestran en la Tabla 18. Las calles respectivas corresponden a las muestras siguientes.

40

ES 2 369 818 T3

Calle	Bst	TR	Número de células LNCaP/células K562 10^6
1	-	+	0
2	-	+	10
3	+	-	0
4	+	-	10
5	+	+	0
6	+	+	1
7	+	+	10
8	Digesto de Sau3AI del alícuota de 1 μ l de la solución de reacción en la calle 6		
9	Digesto de Sau3AI del alícuota de 1 μ l de la solución de reacción en la calle 7		
10	Marcador de tamaño, ladder de 100 pb (New England Biolabs)		

En ausencia de ADN polimerasa Bst o Rever Tra Ace no se pudo obtener ningún producto de amplificación (calles 1 a 4). En presencia de ambas enzimas se detectó un producto de amplificación (Calles 5 a 7) en presencia de ARN derivado de LNCaP. Se pudo detectar ARN extraído de una célula LNCaP/un millón de células K562 (calle 6). Cuando el producto de amplificación se digirió en el sitio de la enzima de restricción Sau3AI localizado dentro de la diana, el producto se digirió en un fragmento de un tamaño estimado (calles 8 y 9).

A partir de los resultados descritos antes, se confirmó que el producto de reacción deseado se puede obtener en el procedimiento de síntesis de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, aunque si se usa el ARN como diana.

10 Aplicabilidad industrial

De acuerdo con el nuevo kit de oligonucleótido de acuerdo con la presente invención y el procedimiento de síntesis de ácido nucleico usando dicho oligonucleótido, se proporciona un procedimiento de síntesis de ácido nucleico que posee secuencias nucleotídicas complementarias unidas alternativamente en una cadena de una hebra, sin requerir ningún complicado control de la temperatura. Una cadena complementaria sintetizada con el oligonucleótido como cebador basado en la presente invención sirve como origen de la síntesis de una nueva cadena complementaria con el extremo 3' de dicha cadena sintetizada como molde. Esto se acompaña de la formación de un bucle que causa la hibridación de un nuevo cebador y un producto de la reacción de síntesis de la cadena complementaria con la cadena sintetizada previamente a medida que el molde se desplaza de nuevo mediante la síntesis de la cadena complementaria a partir del bucle y queda lista para el apareamiento de bases. El ácido nucleico obtenido de este modo sintetizado con él mismo como molde se combina con, por ejemplo, un procedimiento conocido de síntesis de ácido nucleico tal como SDA, para contribuir a la mejora de la eficiencia de la síntesis del ácido nucleico.

De acuerdo con un modo preferido adicional de la presente invención, se proporciona un nuevo procedimiento de síntesis de ácido nucleico, que alcanza la mejora de la eficiencia del procedimiento conocido de síntesis de ácido nucleico, no requiere un control complicado de la temperatura, cabe esperar que alcance una elevada eficiencia de amplificación y puede conseguir una elevada especificidad. Es decir, los oligonucleótidos del kit basados en la presente invención se aplican a una cadena molde y su cadena complementaria tras lo cual se puede sintetizar sucesivamente el ácido nucleico que posee secuencias complementarias unidas alternativamente en una cadena de una hebra. Esta reacción continúa teóricamente hasta que se agotan los materiales de partida necesarios para la síntesis, durante la cual se continúan formando nuevos ácidos nucleicos que se sintetizan a partir del bucle. La elongación a partir del oligonucleótido que se ha hibridado con el bucle realiza un desplazamiento de hebra para suministrar 3'-OH para la elongación de ácido nucleico de una hebra (es decir, ácido nucleico que posee pares plurales de cadenas complementarias unidas a los mismos). Por otro lado, el 3'-OH de la cadena larga de una hebra realiza la reacción de síntesis de la cadena complementaria con él mismo como molde, tras lo cual se consigue su elongación, durante la cual se desplaza una nueva cadena complementaria cuya síntesis se ha iniciado a partir del bucle. Tal etapa de reacción de amplificación procede en condiciones isotérmicas mientras mantiene una elevada especificidad.

Los oligonucleótidos en el kit de la presente invención pueden, cuando dos regiones contiguas están dispuestas como se ha diseñado, funcionar como cebadores para la reacción de síntesis de ácido nucleico de acuerdo con la

5 presente invención. Esto contribuye significativamente a la conservación de la especificidad. Por comparación con, por ejemplo, la PCR en la que se inicia una reacción de amplificación inespecífica mediante una hibridación errónea inespecífica con independencia de la relación posicional prevista de 2 cebadores, puede explicarse con facilidad que en la presente invención se puede esperar una especificidad elevada. Esta característica se puede utilizar para detectar SNP con una sensibilidad y precisión muy elevadas.

10 El rasgo característico de la presente invención reside en que tal reacción se puede alcanzar fácilmente mediante una constitución de reactivos muy sencilla. Por ejemplo, los oligonucleótidos del kit de acuerdo con la presente invención presentan una estructura especial, pero esto depende de la selección de la secuencia nucleotídica y es un oligonucleótido sencillo como sustancia. Además, en un modo preferido, la reacción puede proceder mediante únicamente una ADN polimerasa que cataliza la reacción de tipo desplazamiento de hebra de síntesis de la cadena complementaria. Además, si la presente invención se lleva a cabo con ARN como molde, se usa una ADN polimerasa tal como ADN polimerasa Bca que posee tanto actividad de transcriptasa inversa y actividad de ADN polimerasa de tipo desplazamiento de hebra de modo que todas las reacciones enzimáticas se puedan realizar mediante la enzima única. El principio de la reacción de realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico de alto grado mediante una reacción enzimática tan simple no se conoce. Incluso para la aplicación de la presente invención a una reacción de síntesis de ácido nucleico conocida, como SDA, no es necesaria ninguna enzima adicional para su combinación y una combinación tan sencilla con el oligonucleótido basado en la presente invención se puede aplicar a varios sistemas de reacción. En consecuencia, puede decirse que el procedimiento de síntesis del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención también es ventajoso respecto al coste.

20 Como se ha descrito antes, el procedimiento de síntesis del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y el oligonucleótido de la misma proporcionan un nuevo principio de resolución simultánea de una pluralidad de problemas difíciles tales como la capacidad de funcionamiento (no es necesario controlar la temperatura), mejora de la eficiencia de la síntesis, economización y elevada especificidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Eiken Kagaku Kabushiki Kaisha
<120> Procedimiento de síntesis de ácido nucleico
- 5 <130> EP23152IIFzpau
<140> todavía sin asignar
<141> 2009-01-15
<150> EP 07 014 809.3
<151> 2007-07-27
- 10 <150> JP-1998-317476
<151> 1998-11-09
<160> 29
<170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
- 15 <211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado
- 20
<400>1
cgactctaga ggatccccgg gtacttttg ttgtgtgaa ttgtgagcgg at 52
- <210>2
- 25 <211>51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
- 30 <223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado

<400> 2
acaacgtcgt gactgggaaa accctttttg tgcgggcctc ttcgetatta c 51

<210> 3
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado

<400> 3
actttatgct tccggtcgt a 21

<210> 4
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia del cebador artificial

<220>
<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado

<400> 4
gttgggaagg gcgatcg 17

<210> 5
<211> 600
<212> ADN
<213> Bacteriófago M13mp18

<400> 5
gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 60
cgacaggttt cccgactgga aagcggggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct 120
cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat 180
tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcgagct 240
cggtaaccgg ggatcctcta gagtcgacct gcaggcatgc aagcttggca ctggccgctg 300
ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcgc cttgcagcac 360
atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac 420
agttgcgcag cctgaatggc gaatggcgct ttgcctgggt tccggcacca gaagcgggtgc 480
cggaaagctg gctggagtgc gatcttcctg aggccgatac ggtcgtcgtc ccctcaaact 540
gcgagatgca cggttacgat gcgcccattc acaccaacgt aacctatccc attacggtca 600

<210> 6
<211> 63
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado

<400> 6
ctcttccaaa agtaaggcag gaaatgtgaa accagatcgt aatttggaag acccagcatc 60
cag 63

<210> 7
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado

<400> 7
gtggatcgc actcctcccg ctgacgggga cctgcctcgt cgt 43

<210> 8
<211> 16
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado

<400> 8

gccacctggg tgggaa 16

<210> 9

<211> 22

<212>

<213>

<220>

<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado

<400> 9

ggcgaggag ttcttctct ag 22

<210> 10

<211> 430

<212> ADN

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 10

ctccttgaca ccgctctgc tcgtatcgg gagccttag agtctccgga acattgttca 60
 cctcaccata cagcactcag gcaagetatt ctgtgttggg gtgagttaat gaatctggcc 120
 acctgggtgg gaagtaattt ggaagacca gcatccaggg aattagtagt cagctatgtc 180
 aatgtaata tgggcctaaa aatcagacaa ctattgtggt ttcacatitc ctgccttact 240
 ttggaagag aaactgtttt ggagtatttg gtatcttttg gagtgtggat tcgcactcct 300
 cccgcttaca gaccacaaa tgcccctatc ttatcaaac ttcgggaaac tactgttggt 360
 agacgacgag gcaggtccc tagaagaaga actccctcgc ctgcgagacg aaggtctcaa 420
 tcgccgctc 430

<210> 11

<211> 293

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado

<400> 11

```
acaacgtcgt gactgggaaa acccttttgg tgcgggectc ttccttatta cgccagctgg 60
cgaaggggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggtt tcccagtcac 120
gacgttgtaa aacgacggcc agtgccaagc ttgcatgcct gcaggtegac tctagaggat 180
ccccgggtac cgagctcgaa ttctaatca tggctatagc tgtttcctgt gtgaaattgt 240
taccgctca caattccaca caacaaaag taccgggga tctctagag tgc          293
```

<210> 12

<211> 293

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado

<400> 12

```
cgactctaga ggatecccg gtaacttttg ttgtgtggaa ttgtgagcg ataacaattt 60
cacacaggaa acagctatga ccatgattac gaattcgagc tcggtaccg gggatcctct 120
agagtegacc tgcaggcatg caagcttggc actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg 180
ggaaaacctt ggcgttacc aacttaatcg ccttgcagca catccccctt tcgccagctg 240
gcgtaatage gaagaggccc gcacaaaag ggttttccca gtcacgacgt tgc          293
```

<210> 13

<211> 459

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado

<400> 13

```

acaacgtcgt gactgggaaa acccttttgg tgcgggecte ttcgctatta cgccagctgg 60
cgaaaggggg atgtgctgca aggcgattaa gtgggtaac gccagggtt tcccagtcac 120
gacgttgtaa aacgacggcc agtgccaage ttgatgect gcaggtcgac tctagaggat 180
ccccgggtac cgagctcgaa ttcgtaatca tggteatage tgtttcctgt gtgaaattgt 240
tatecgctca caattccaca caacaaaag taccgggga tectctagag tcgacctgca 300
ggcatgcaag ctggcactg gccgtgctt tacaacgtc tgactgggaa aacctggcg 360
ttaccaact taatgcctt gcagcacate ccccttgcg cagctggcgt aatagcgaag 420
aggeccgcac aaaaagggtt tcccagtcac cgacgttgt                               459
    
```

<210> 14

<211> 458

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado

<400> 14

```

cgactctaga ggatccccgg gtacttttgg ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt 60
cacacaggaa acagctatga ccatgattac gaattcgagc tcggtaaccg gggatcctct 120
agagtgcacc tgcagcatg caagcttggc actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg 180
ggaaaacctt ggcgttacc aacttaatcg ccttgcagca cctccccctt tcgccagctg 240
gcgtaatage gaagagggcc gcacaaaaag ggttttccca gtaacgacgt tgtaaaacga 300
cggccagtgc caagcttgc tgcctgcagg tcgactctag aggatecccc ggtaccgagc 360
tcgaattcgt aatcatgtc atagctgtt cctgtgtgaa attgttatcc gtcacaatt 420
ccacacaaca aaaagtacce gggatcctc tagagtcg                               458
    
```

<210> 15

<211> 790

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado

<400> 15

```

acaacgtcgt gactgggaaa accctttttg tgcgggcctc ttcgttatta cgccagctgg 60
cgaaaggggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac 120
gacgttgtaa aacgacggcc agtgccaagc ttgcatgcct gcaggtcgac tctagaggat 180
ccccgggtac cgagctcgaa ttctaatca tggatcatage tgtttcctgt gtgaaattgt 240
tatecgtca caattccaca caacaaaag taccggggga tctctagag tcgacctgca 300
ggcatgcaag cttggcactg gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa aacctggcg 360
ttaccaact taatgcctt gcagcacatc ccccttctgc cagctggcgt aatagcgaag 420
aggcccgca aaaaagggtt tcccagtcga cgacttgta aaacgacgc cagtccaag 480
cttgcctgac tgcaggtcga ctctagagga tcccgggta cttttgttg tgtggaattg 540
tgagcggata acaattcac acaggaaaca gctatgacca tgattacgaa ttcagctcg 600
gtaccggggg atcctctaga gtcgacctgc agcatgcaa gcttggcact ggccgtcgtt 660
ttacaacgic gtactggga aaccttggc gttaccaac ttaatgcct tgcagcacat 720
cccccttctg ccagctggcg taatagcga gagcccgca caaaaagggt tttccagtc 780
acgacttgt                                     790
    
```

<210> 16

<211> 789

<212> **ADN**

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado

<400> 16

```

cgactctaga ggatccccgg gtactttttg ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt 60
cacacaggaa acagctatga ccatgattac gaattcgagc tcggtaccgg gggatcctct 120
agagtcgacc tgcaggcatg caagcttggc actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg 180
ggaaaaccct ggcgttaccc aacttaatcg ccttgcagca catccccctt tcgccagctg 240
gcgtaatagc gaagaggccc gcacaaaag ggttttcca gtcacgacgt tgtaaaacga 300
cggccagtgc caagcttgca tgacctgagg tgcactctag aggatccccg ggtaccgagc 360
tcgaattcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gctcacaatt 420
ccacacaaca aaaagtacc gggatcctc tagagtcgac ctgcaggcat gcaagcttgg 480
cactggccgt cgttttaciaa cgctgtgact gggaaaacc tttttgtgcg ggcctcttcg 540
ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca 600
gggttttccc agtcaacgag ttgtaaacg acggccagt ccaagcttgc atgcctgcag 660
gtcactcta gaggatcccc gggatccgag ctcgaattcg taatcatggt catagctgtt 720
tcctgtgtga aattgttatc cgctcacaat tccacacaac aaaaagtacc cggggatcct 780
ctagactcg                                     789
    
```

<210> 17

<211> 310

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado

<400> 17

```
gtggattcgc actcctcccg ctgatcggga cctgcctcgt cgtctaaca cagtagtttc 60
cggaagtgtt gataagatag gggcatttgg tggctctgtaa gcgggaggag tgcgaatcca 120
cactcaaaaa gataccaaat actccaaaac agtttctctt caaaagtaa ggcaggaaat 180
gtgaaaccac aatagttgtc tgatttttag gcccatatta acattgacat agctgactac 240
taattccttg gatgctgggt cttccaaatt acgatctggt ttcacatttc ctgccttact 300
tttgaagag                                     310
```

<210> 18

<211> 465

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado

<400> 18

```
gtggattcgc actcctcccg ctgatcggga cctgcctcgt cgtctaaca cagtagtttc 60
cggaagtgtt gataagatag gggcatttgg tggctctgtaa gcgggaggag tgcgaatcca 120
cactcaaaaa gataccaaat actccaaaac agtttctctt caaaagtaa ggcaggaaat 180
gtgaaaccac aatagttgtc tgatttttag gcccatatta acattgacat agctgactac 240
taattccttg gatgctgggt cttccaaatt acgatctggt ttcacatttc ctgccttact 300
tttgaagag aaactgtttt ggagtatttg gtatcttttg gagtgtggat tcgcactcct 360
cccgttaca gaccaccaa tgcccctatc ttatcaacac ttccggaac tactgttgtt 420
agacgacgag gcaggtcccg atcagcggga ggagtgcgaa tccac                                     465
```

<210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M13mp18

<400> 19
 ccggggatcc tctagagtcg 20

<210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M13mp18 mutant

<400> 20
 ccggggatcc tctagagtca 20

<210> 21
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado

<400> 21
 cgactetaga ggatccccgg tttttgttgt gtggaattgt gageggat 48

<210> 22
 <211> 48

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado

<400> 22

tgactctaga ggatccccgg tttttgttgt gtggaattgt gagcggat 48

<210> 23

<211> 47

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado

<400> 23

cgctcgtgact gggaaaaccc tttttgtgcg ggcctcttcg ctattac 47

<210> 24

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado

<400> 24

actttatgct tccgctcgt a 21

<210> 25

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado	
<400> 25	
gttgggaagg gcgatcg	17
<210> 26	
<211> 44	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado	
<400> 26	
tgttcctgat gcagtgggca gcttagtct gcggcgggtg tctg	44
<210> 27	
<211> 45	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado	
<400> 27	
tgctgggtcg gcacagcctg aagctgacct gaaatacctg gectg	45
<210> 28	
<211> 18	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado	
<400> 28	
tgcttggtggc ctctcgtg	18
<210> 29	
<211> 17	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Secuencia del cebador artificialmente sintetizado	
<400> 29	
gggtetggga agctgtg	17

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para sintetizar ácido nucleico que está provisto en sus extremos 3' y 5' con una región que consta de una región nucleotídica complementaria a cada región terminal en la misma cadena y que tras la hibridación de estas secuencias nucleotídicas complementarias mutuamente forma un bucle capaz de aparear bases entre ellas, en el que el procedimiento comprende:
- 5
- i) la etapa de hibridarse a una región F2c en un ácido nucleico que sirva como molde, una región F2 en un oligonucleótido que comprende una región F2 y una región F1c, donde F1c está unida al extremo 5' de F2, y donde
- 10 F2 es una región que posee una secuencia nucleotídica complementaria a una región arbitraria F2c en el ácido nucleico molde que posee una secuencia nucleotídica específica y
- F1c es una región que posee sustancialmente la misma secuencia nucleotídica que la región F1c localizada en el extremo 5' de la región F2c en el ácido nucleico molde que posee una secuencia nucleotídica específica,
- ii) la etapa de sintetizar un primer ácido nucleico que posea una secuencia nucleotídica complementaria al molde, en la que F2 en el primer oligonucleótido sirve como el origen de la síntesis,
- 15 iii) la etapa de proporcionar una región arbitraria R2c en el primer ácido nucleico sintetizado en la etapa ii) lista para el apareamiento de bases, en la que la etapa se lleva a cabo mediante la síntesis por desplazamiento de hebras de una cadena complementaria mediante una polimerasa que cataliza la reacción por desplazamiento de hebras, en la que un cebador externo que hibrida con el extremo 3' de F2c en el molde sirve como el origen de la síntesis,
- 20 iv) la etapa de hibridarse a una región R2c en el primer ácido nucleico en la etapa iii), un oligonucleótido que posea una región R2 y una región R1c, en la que R1c está unida al extremo 5' de R2, y en la que R2 es una región que tiene una secuencia nucleotídica complementaria a la de la región R2c en el primer ácido nucleico que tiene una secuencia de ácidos nucleicos específica, y
- 25 R1 es una región que tiene sustancialmente la misma secuencia de nucleótidos en la región R1c localizada en el extremo 5' de la región R2c en el primer ácido nucleico que tiene una secuencia de ácidos nucleicos específica
- v) la etapa de sintetizar un segundo ácido nucleico con dicho oligonucleótido como el origen de síntesis.
- vi) la etapa de proporcionar F1 en el terminal 3' del segundo ácido nucleico listo para el apareamiento de bases, en la que la etapa se lleva a cabo mediante la síntesis desplazamiento por hebra de una cadena complementaria mediante una polimerasa que cataliza la reacción por desplazamiento por hebra, donde un cebador externo, que hibrida con el extremo 3' de R2c en el primer ácido nucleico, sirve como el origen de la síntesis, y
- 30 vii) la etapa de síntesis de ácido nucleico de una cadena complementaria a partir del bucle formado por hibridación intramolecular de la región F1 terminal de 3', donde
- 35 la síntesis de la cadena complementaria se inicia cuando el oligonucleótido que comprende una región F2 se hibrida al bucle en el terminal 3'.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la temperatura de fusión de cada oligonucleótido y su región complementaria en el molde usado en la reacción se encuentra en la relación siguiente con la misma rigurosidad:
- 40 $(\text{cebador externo/región en el extremo } 3' \text{ en el molde}) \leq (F2c/F2 \text{ y } R2c/R2) \leq (F1c/F1 \text{ y } R1c/R1).$
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el ácido nucleico que sirve como molde es ARN, y la síntesis de cadena complementaria en la etapa ii) se realiza mediante una enzima que posee una actividad de transcriptasa inversa.
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera reivindicación 1 a 3, en el que la reacción por desplazamiento de hebra de síntesis de cadena complementaria se lleva a cabo en presencia de un regulador de la temperatura de fusión.
- 45
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el regulador de la temperatura de fusión es betaína.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que se permite la presencia en la solución de la
- 50

reacción de betaína 0,2 - 3,0M.

7. Un procedimiento para sintetizar ácido nucleico que está provisto en su terminal 3' con una región F1 capaz de hibridarse a una parte de F1c en la misma cadena y que tras la hibridación de la región F1 a f1c, es capaz de formar un bucle que contiene una región F2c capaz de aparear las bases, donde el procedimiento comprende:

- 5 i) la etapa de hibridarse a una región F2c en un ácido nucleico que sirva como molde, una región F2 en un oligonucleótido que comprende una región F2 y una región F1c, en la que F1c está unida al extremo 5' de F2, y donde

F2 es una región que posee una secuencia nucleotídica complementaria a una región arbitraria F2c en el ácido nucleico molde que posee una secuencia nucleotídica específica y

- 10 F1c es una región que posee sustancialmente la misma secuencia nucleotídica que la región F1c localizada en el extremo 5' de la región F2c en el ácido nucleico molde que posee una secuencia nucleotídica específica,

ii) la etapa de sintetizar un primer ácido nucleico que posea una secuencia nucleotídica complementaria al molde, en la que F2 en el primer oligonucleótido sirve como el origen de la síntesis,

- 15 iii) la etapa de proporcionar una región arbitraria en el primer ácido nucleico sintetizado en la etapa ii) lista para el apareamiento de bases, en la que la etapa se lleva a cabo mediante la síntesis por desplazamiento de hebras de una cadena complementaria mediante una polimerasa que cataliza la reacción por desplazamiento de hebras, en la que un cebador externo que hibrida con el extremo 3' de F2c en el molde sirve como el origen de la síntesis,

- 20 iv) la etapa de hibridarse a un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la región lista para el apareamiento de bases en el primer ácido nucleico en la etapa iii), seguido de una síntesis de un segundo ácido nucleico con dicho oligonucleótido como el origen de la síntesis, y

- 25 v) la etapa de que proporciona F1 en el terminal 3' del segundo ácido nucleico listo para el apareamiento de bases, en la que la etapa se lleva a cabo mediante la síntesis desplazamiento por hebra de una cadena complementaria mediante una polimerasa que cataliza la reacción por desplazamiento por hebra, donde un cebador externo, que hibrida con el extremo 3' de la región usada como el origen de síntesis en la etapa iv) en el primer ácido nucleico, sirve como el origen de la síntesis, y

vi) la etapa de síntesis de ácido nucleico de una cadena complementaria a partir del bucle formado por hibridación intramolecular de la región F1 terminal de 3', en la que

- 30 la síntesis de la cadena complementaria se completa cuando la reacción alcanza R1,

síntesis de la cadena complementaria se inicia cuando el oligonucleótido que comprende una región F2 se hibrida al bucle en el terminal 3'.

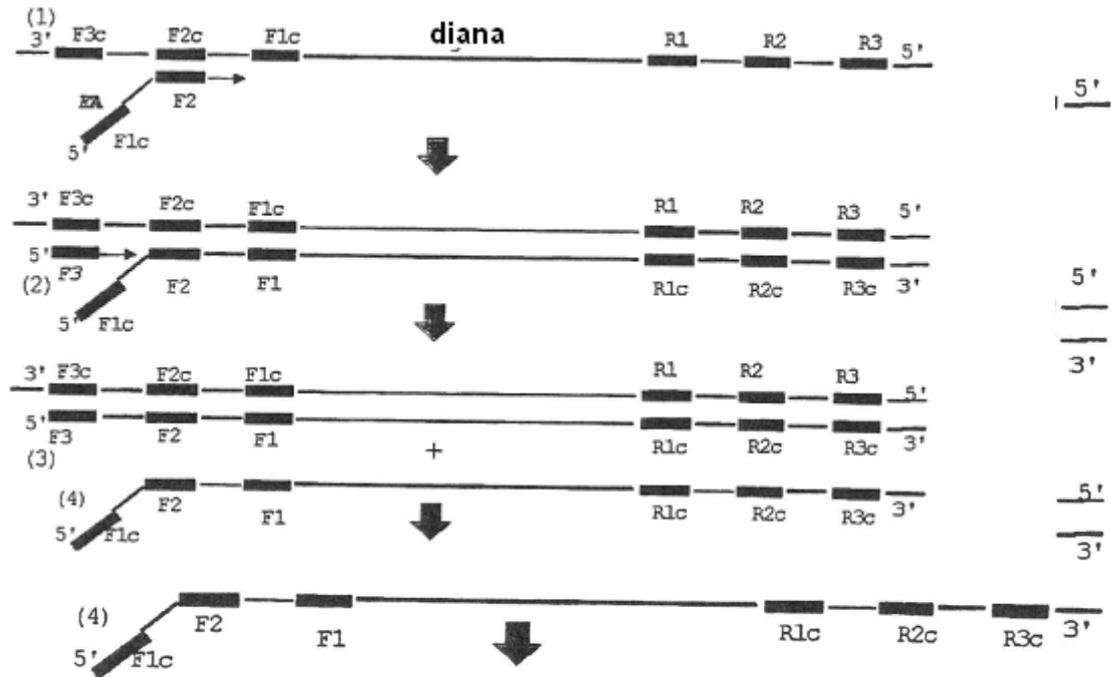
- 35 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el ácido nucleico que sirve como el molde es ARN, y la síntesis de la cadena complementaria en la etapa ii) se lleva a cabo por una enzima que tiene una actividad de transcriptasa inversa.

9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en el que la reacción por desplazamiento de hebra de la síntesis de la cadena complementaria se lleva a cabo en la presencia de un regulador para la temperatura de fusión.

- 40 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el regulador para la temperatura de fusión betaína.

11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que se permite que betaína 0,2 - 3,0 M. esté presente en la solución de reacción.

Fig. 1



5

Fig. 2

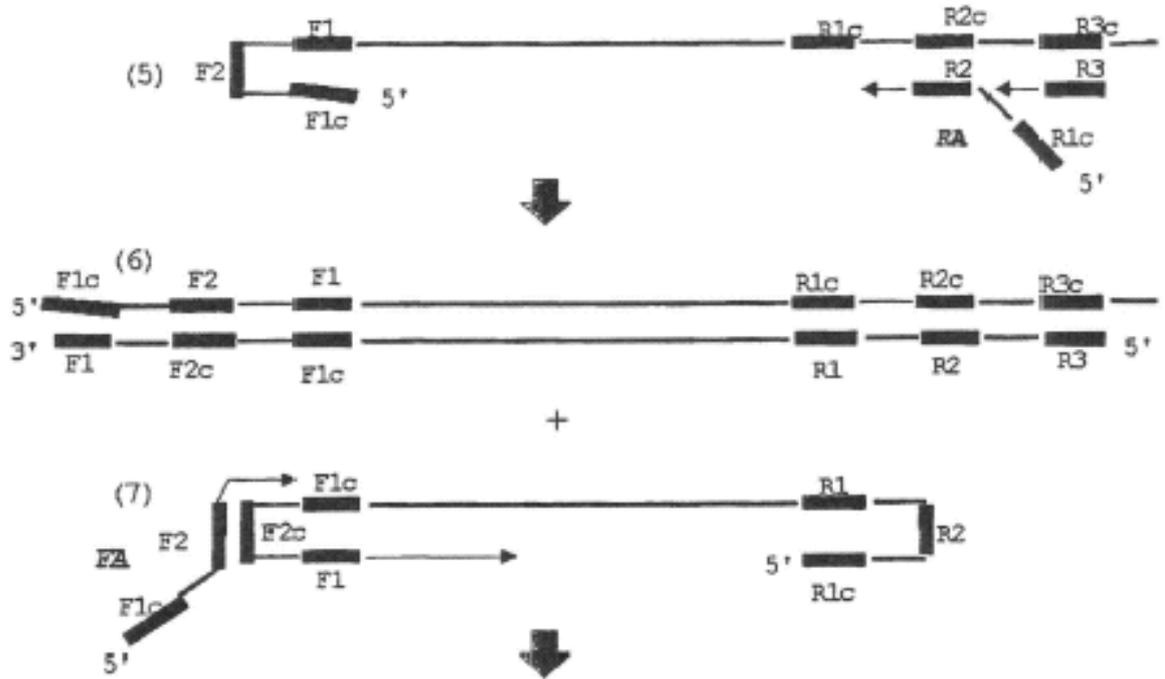


Fig. 3

5

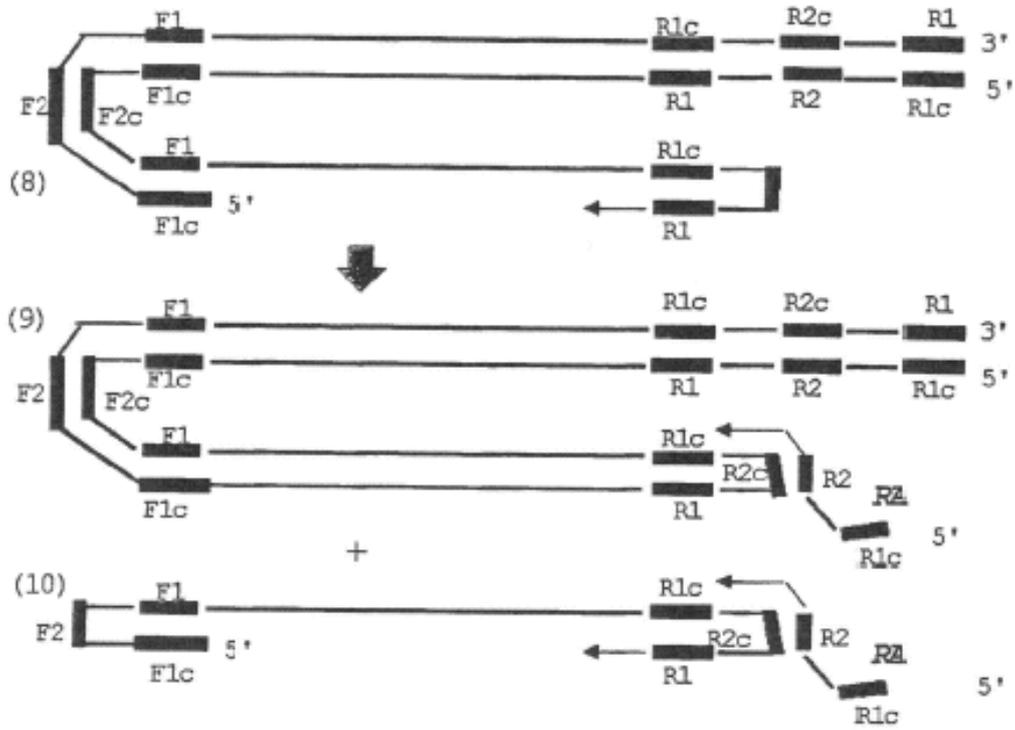


Fig. 4

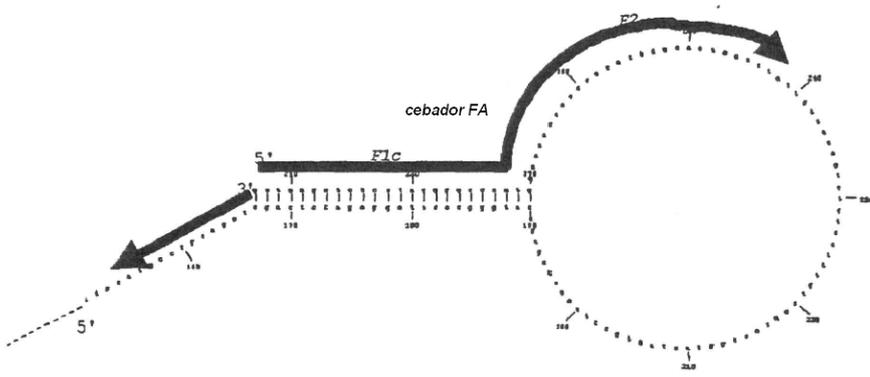


Fig. 5

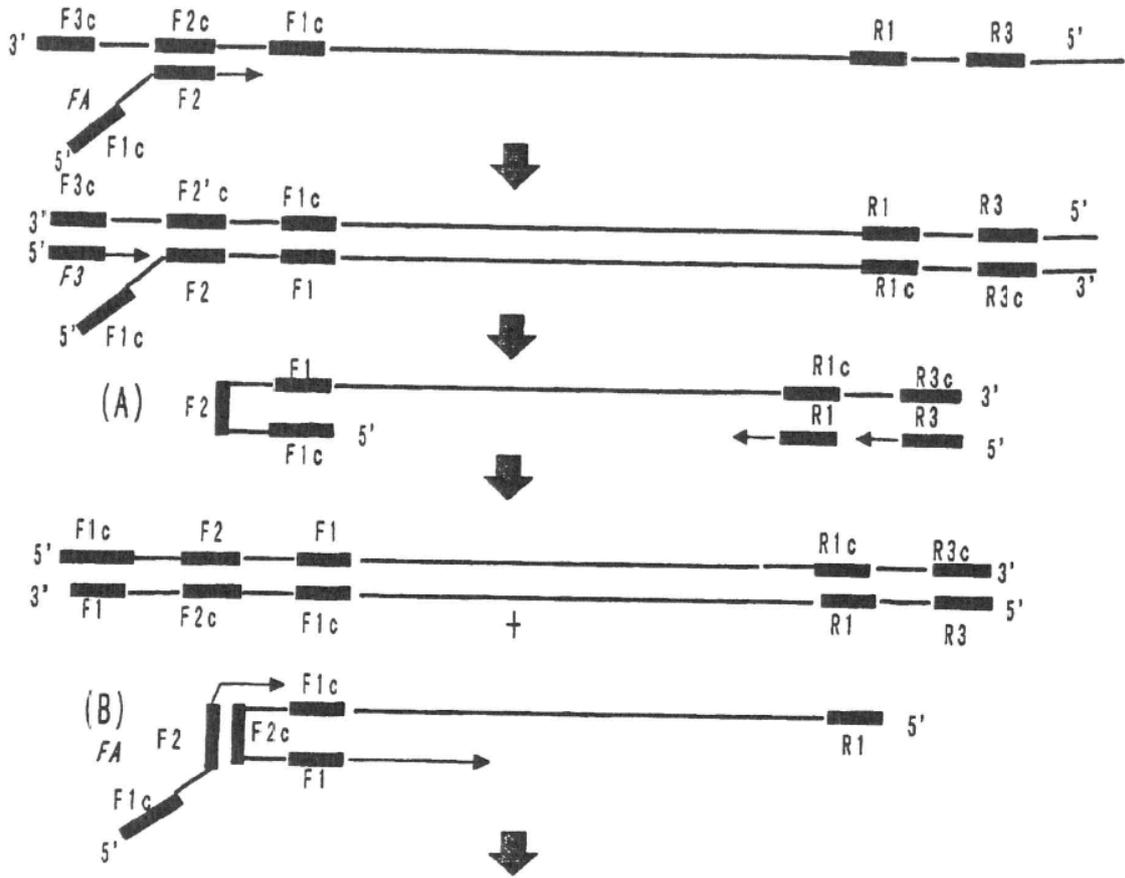


Fig. 6

5

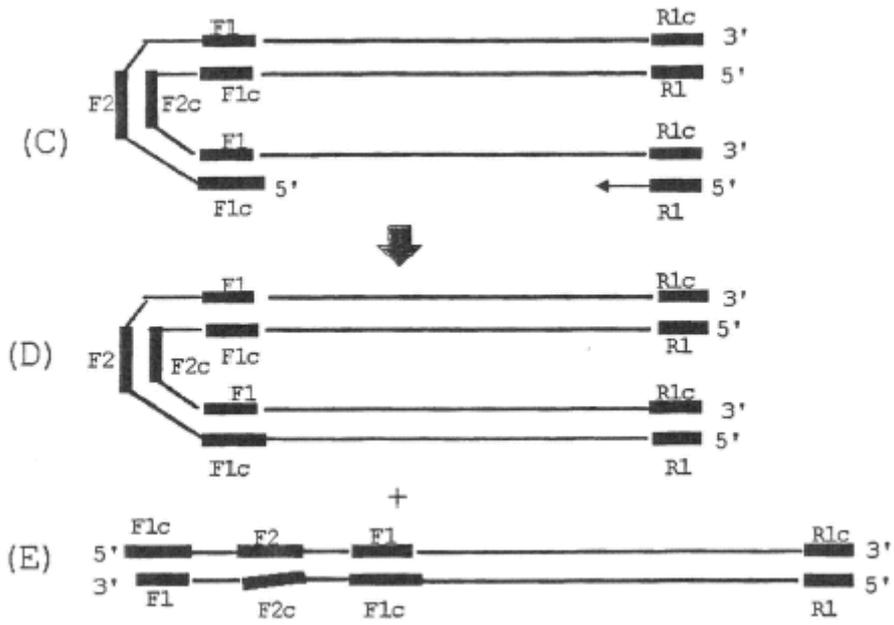


Fig. 7

5

6001 GGGCCCAATA CGCAAACCGC CTCTCCCGGC GGGTTGGGCG ATTCATTAAT GCAGCTGGCA
 6061 CGACAGGTTT CCGACTGGA AAGGGGGCAG TGAGCGCAAC GCAATTAATG TGMGTTAGCT
 6121 CACTCATTAG GCACCCAGG CTTTACACTT $\xrightarrow{\text{M13F3}}$ $\xrightarrow{\text{M13F2}}$ TATGCTTCOG GCTCGTATGT TG7GTGGAAAT
 6181 $\xrightarrow{\text{M13F1e}}$ TGTGAGGGGA TAACAATTTC ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTACG AATTCGAGCT
 6241 $\xleftarrow{\text{M13F1e}}$ CGGTACCCGG GGATCCTCTA GAGTCGACT GCAGGCATGC AAGCTTGGCA CTGGCCGTGC
 6301 $\xrightarrow{\text{M13R1e}}$ TTTTACAACG TGTGACTGG GAAAACCCCTG GCGTTAOCOA ACTTAATCGC CTTCACAGCAC
 6361 $\xleftarrow{\text{M13R2}}$ $\xleftarrow{\text{M13R3}}$ ATCCCCCTTT CGCCAGCTGG CGTAATAGCG AAGAGGCGCG CACCGATCGC CCTTCCCAAC
 6421 AGTTGGGCAG CDTGAATGCC GAATGGCGCT TTGCTGGTT TOCGGCACCA GAAGCGGTGC
 6481 CGGAAAGCTG GCTGGAGTGC GATCTTCTTG AGGCGGATAC GGTCGTGTC COCTCAAAC
 6541 GGCAGATGCA CGGTACGAT GGGCCCATCT ACACCAAAGT AACCTATCC ATTACGGTCA

Fig. 8

5

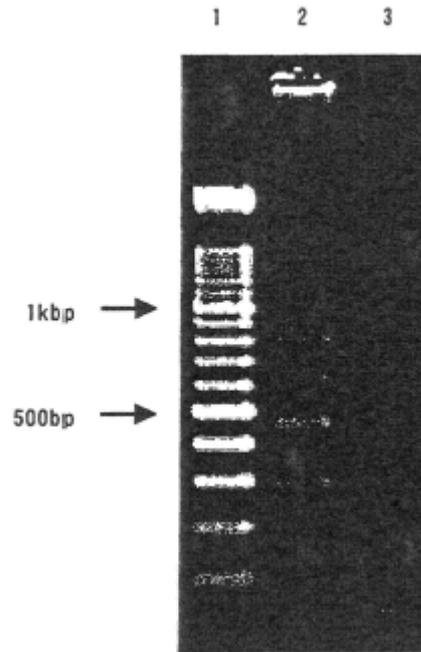


Fig. 9

5

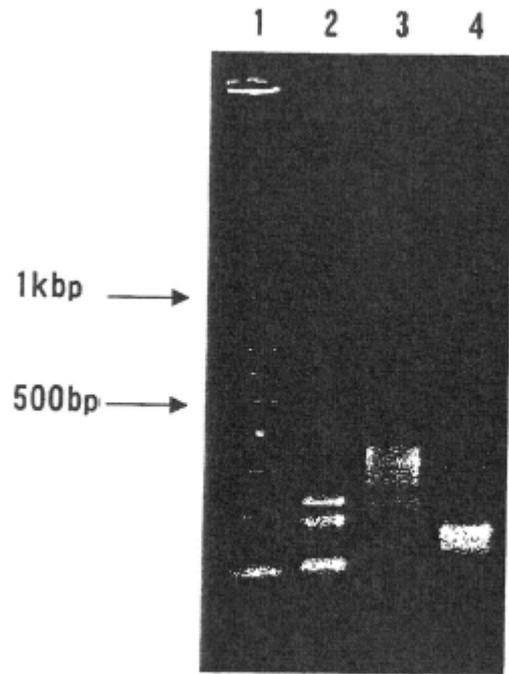


Fig. 10

0 0.5 1 2M
-21 N -21 N -21 N -21 N

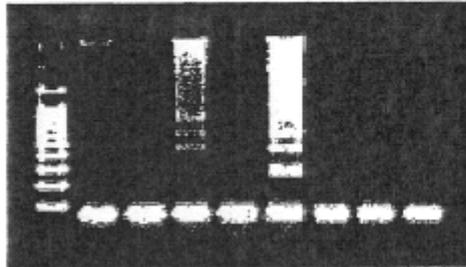


Fig. 11

5

1 CTCCITGACA CCGCCTCTGC TCTGTATCGG GAGGCOCTTAG AGTCTOOGGA ACATTGTICA
 61 OCTCACCATA CAGCACTCAG GCAAGCTATT CTGTGTGGG GTGAGTTAAT GAATCTGGCC
 HBF3 → HB65F2 →
 121 ACCTGGGTGG GAAGTAATTT GGAGAGCCCA GCATOCAGGG AATTAGTAGT CAGCTATGTC
 ← HB65F1c
 181 AATGTTAATA TGGGCTAAA AATCAGACAA CTATTGTGGT TTCACATTTT CTGCCTTACT
 ← HB65R1c
 241 TTTGGARGAG AACTGTTTT GGAGTATTIG GLATCTTTTG GAGTGTGGAT TOGCACTCCT
 →
 301 CCGCTTACA GACCACAAA TGCCCTATC TTATCAACAC TTOGGAAAC TACTGTTGTT
 ← HB65R2 ← HBR3
 361 AGAOGACGAG GCAGGT00CC TAGAAGAAGA ACTOCCTOGC CTOGCAGAG AAGGTCTCAA
 421 TGG00GGTC

Fig. 12

5

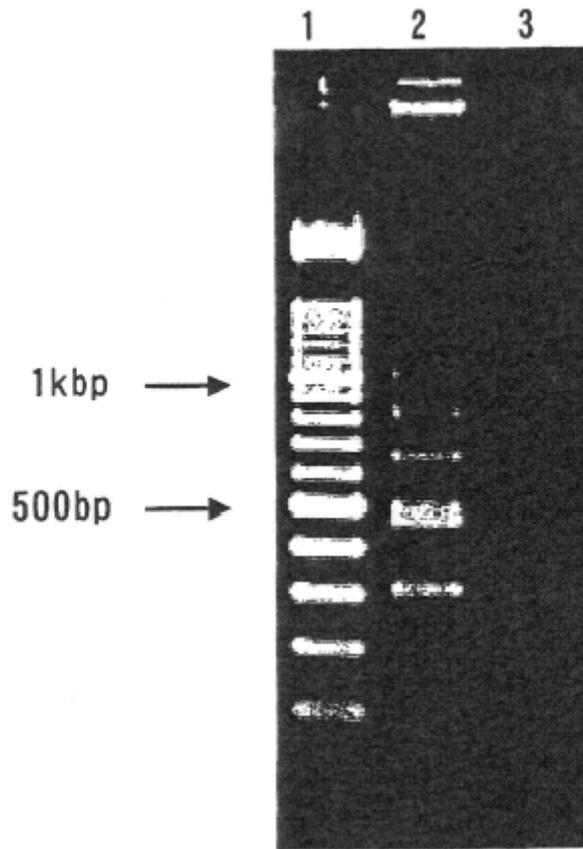


Fig. 13

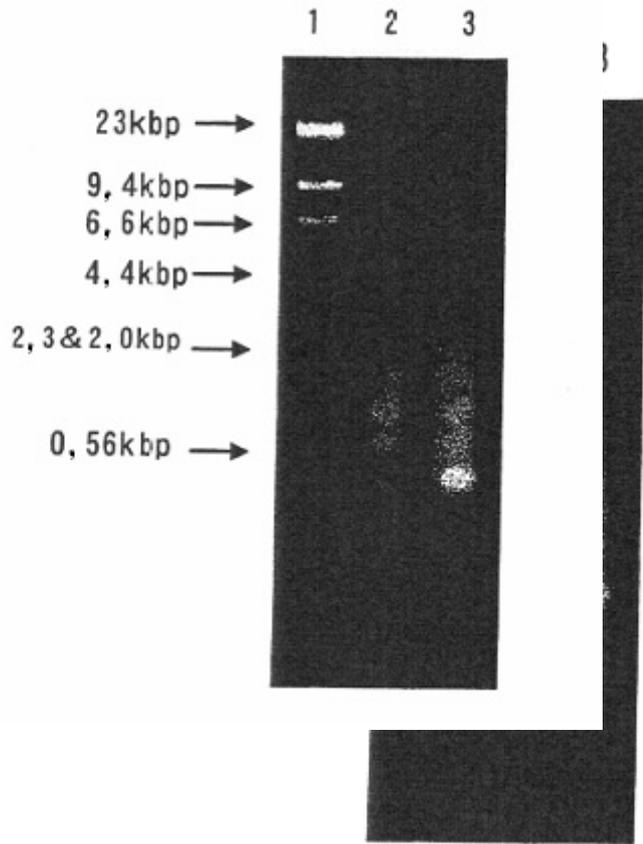


Fig. 14

5

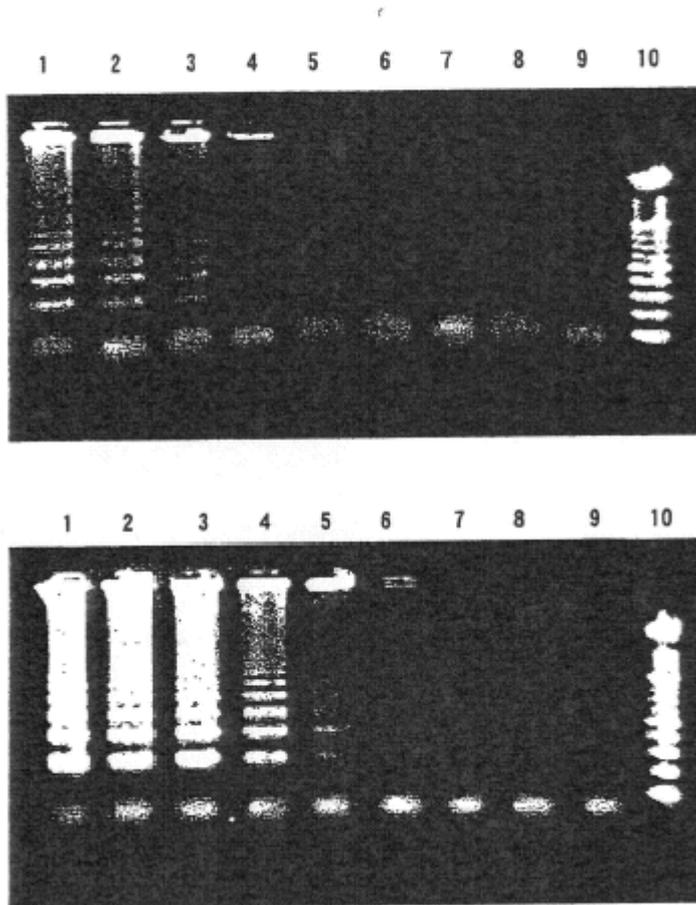


Fig. 15

```

6001 GCGCCCAATA CGCAAACCGC CTCTCCCCGC GCGTTGGCCG ATTCATTAAT GCAGCTGGCA
6061 CGACAGGTTT CCCGACTGGA AAGCGGGCAG TGAGCGCAAC GCAATTAATG TGAGTTAGCT
                                     M13F3 → M13F2 d4
6121 CACTCATTAG GCACCCCAGG CTTTACACTT TATGCTCCG GCTCGTATGT TGTGTGGAAT
←→
6181 TGTGAGCGGA TAACAATTC ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTACG AATTCGAGCT
                                     M13F1c d4
6241 CCGTACCCGG GGATCCTCTA GAGTCGACCT GCAGGCATGC AAGCTTGGCA CTGGCCGTCG
                                     M13R1c d4
6301 TTTTACAACG TCGTGACTGG GAAAACCCTG GCGTTACCCA ACTTAATCGC CTTGCAGCAC
                                     M13R2 d4 M13R3
6361 ATCCCCCTTT EGCCAGCTGG CGTAATAGCG AAGAGGCCCG CACCGATCGC CCTTCCCAAC
6421 AGTTGCGCAG ECTGAATGGC GAATGGCGCT TTGCTGGTT TCCGGCACCA GAAGCGGTGC
6481 CGGAAAGCTG GCTGGAGTGC GATCTTCCTG AGGCCGATAC GGTGTCGTC CCCTCAAAC
6541 GGCAGATGCA CGTTACGAT GCGCCCATCT ACACCAACGT AACCTATCCC ATTACGGTCA
    
```

5

Fig. 16

5

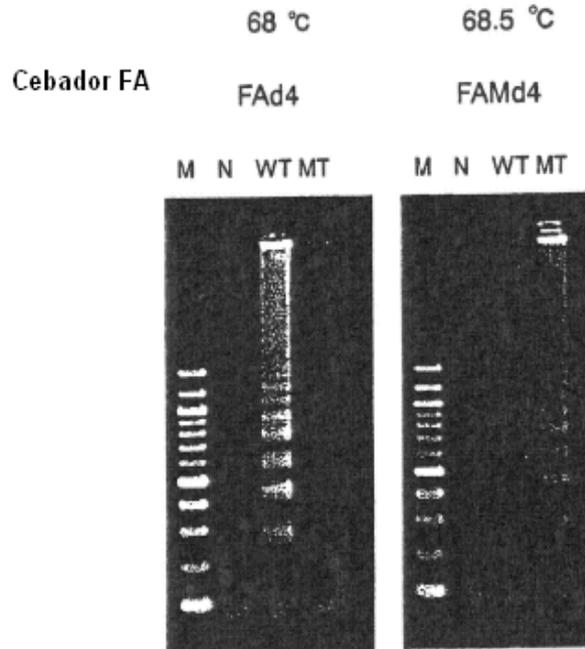


Fig. 18

5

