

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 234**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06016881 .2**
96 Fecha de presentación: **10.06.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1724361**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.11.2006**

54 Título: **MÉTODO PARA LA DETECCIÓN EFICIENTE DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE DOBLE CADENA.**

30 Prioridad:
18.06.2001 JP 2001183716

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2012

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

72 Inventor/es:
**Tomita, Norihiro y
Mori, Yasuyoshi**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 373 234 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

Método para la detección eficiente de ácidos nucleicos de doble cadena.

5 Área técnica

La presente invención está relacionada con un equipo para detectar ácidos nucleicos que pueden detectar ácidos nucleicos de doble cadena usando un agente intercalante con una sensibilidad superior.

10 Antecedentes

15 El método más general para detectar el producto de amplificación obtenido de la amplificación de ácidos nucleicos, como las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), se lleva a cabo tras la amplificación sometiendo la solución a una electroforesis en gel de agarosa y uniendo un agente intercalante fluorescente como el bromuro de etidio, y observando luego la fluorescencia específica. Cuando no hay posibilidad de contaminación por otro DNA y sólo interesa la aparición del producto de la amplificación, la fluorescencia puede observarse añadiendo un agente intercalante fluorescente a la solución después de la amplificación y omitiendo la electroforesis. Un agente intercalante fluorescente, sin embargo, se une al DNA de cadena sencilla como un cebador y emite fluorescencia. Por consiguiente, la señal fluorescente detectada puede contener un nivel significativo de ruido de fondo.

20 Recientemente, los presentes inventores han conseguido desarrollar un nuevo método para la amplificación de ácidos nucleicos, que no requiere el complicado control de temperatura que se supone inevitable en la PCR, es decir, el método de amplificación isotérmica mediada por lazo, (LAMP, "loop-mediated isothermal amplification") (Notomi, T. et al., Nucleic Acids Res. 28 (12), e63 (2000), WO 00/28082). En el método LAMP, la región 3' terminal del molde de polinucleótidos autohíbrida, la síntesis de hebras complementarias se inicia a partir de ese punto, y se utiliza en combinación un cebador que hibrida con el bucle formado en la síntesis mencionada anteriormente. Esto permite la amplificación bajo condiciones isotérmicas, y mejora extraordinariamente la simplicidad de la amplificación del ácido nucleico.

30 En la monitorización a tiempo real del producto de amplificación de ácidos nucleicos utilizando un agente intercalante fluorescente, la intensidad de la fluorescencia varía significativamente en la PCR ya que el producto de amplificación de ácidos nucleicos se disocia y reasocia repetidamente debido a la desnaturalización térmica a medida que se realiza un ciclo térmico. En el método LAMP, sin embargo, la intensidad de la fluorescencia no varía ya que la reacción se realiza bajo condiciones isotérmicas. Por lo tanto, el método LAMP es más apropiado para la monitorización a tiempo real del producto de la amplificación de ácidos nucleicos. El método LAMP, sin embargo, requiere aproximadamente 10 veces la cantidad necesaria de cebadores en la PCR. Cuando se pretende detectar el producto de la amplificación de ácidos nucleicos obtenido por el método LAMP usando un agente intercalante fluorescente, el nivel de ruido de fondo causado por los cebadores de cadena sencilla, que también están presentes, es elevado. Por lo tanto, es difícil detectar con elevada sensibilidad solamente los ácidos nucleicos de doble cadena amplificados.

40 Un objeto de la presente invención es proporcionar los medios para detectar ácidos nucleicos que puedan detectar ácidos nucleicos de doble cadena usando un agente intercalante con una sensibilidad superior reduciendo las señales derivadas de la unión del agente intercalante a los ácidos nucleicos de cadena sencilla.

45 Los presentes inventores han realizado estudios intensivos para alcanzar el anterior objeto. Como resultado, han logrado reducir las señales derivadas de la unión del agente intercalante a los ácidos nucleicos de cadena sencilla con la adición de un compuesto a una mezcla compuesta por ácidos nucleicos de cadena doble y de cadena sencilla ambos con agentes intercalantes unidos, compuesto que reacciona preferiblemente con un agente intercalante unido a los ácidos nucleicos de cadena sencilla respecto a un agente intercalante unido a ácidos nucleicos de cadena doble, o un compuesto que se une a ácidos nucleicos de cadena sencilla de forma más fuerte que un agente intercalante y se une a los ácidos nucleicos de doble cadena de forma más débil que un agente intercalante. Esto conduce a la finalización de la presente invención.

50 La presente invención proporciona un equipo para detectar ácidos nucleicos de doble cadena que comprenden, como elementos:

un grupo de cebadores para la amplificación isotérmica mediada por lazos (LAMP), que comprende:

60 un primer cebador directo que contiene una secuencia F2, que es complementaria a una secuencia arbitraria de F2c, y, en el extremo 5' de F2, una secuencia arbitraria F1c,
un segundo cebador directo que contiene una secuencia F3 que es complementaria a una secuencia arbitraria F3c,
un primer cebador reverso que contiene una secuencia arbitraria R2 y, en el extremo 5' de R2, una secuencia R1c,
65 que es complementaria a una secuencia arbitraria R1, y

- un segundo cebador reverso que contiene una secuencia arbitraria R3, en la que la primera secuencia arbitraria de F1c, la segunda secuencia arbitraria de F2c, y la tercera secuencia arbitraria de F3c son seleccionables, en este orden, desde el extremo 3' en una región diana hacia el extremo 3' de la cadena de polinucleótidos que constituye un ácido nucleico a detectar y la cuarta secuencia arbitraria de R1, la quinta secuencia arbitraria de R2, y la sexta secuencia arbitraria de R3 son seleccionables, en este orden, desde el extremo 5' en la región diana hacia el extremo 5' de dicha cadena de polinucleótidos;
- una síntesis de tipo de desplazamiento de cadenas catalizada por polimerasa de cadenas complementarias un nucleótido que sirve como sustrato para la síntesis de cadenas complementarias;
- un intercalante, seleccionado de entre el grupo que consiste en: bromuro de etidio, naranja de acridina, TO-PRO-1, y YOPRO-1; y
- un compuesto que reacciona más preferiblemente con un intercalante unido a un ácido nucleico de cadena sencilla que con un intercalante unido a un ácido nucleico de doble cadena, en el que dicho compuesto es un oxidante seleccionado del grupo que consiste en: hipoclorito sódico, peróxido de hidrógeno, y permanganato de potasio.
- La presente invención proporciona además un equipo para detectar ácidos nucleicos de doble cadena que comprenden, como elementos:
- un intercalante, seleccionado de entre el grupo que consiste en: bromuro de etidio, naranja de acridina, TO-PRO-1, y YOPRO-1; y
- un compuesto que reacciona más preferiblemente con un intercalante unido a un ácido nucleico de cadena sencilla que con un intercalante unido a un ácido nucleico de doble cadena, en el que dicho compuesto es un reductor seleccionado del grupo que consiste en: borhidruro sódico y cianoborhidruro sódico.
- La presente invención proporciona además un equipo para detectar ácidos nucleicos de doble cadena que comprenden, como elementos:
- un grupo de cebadores para la amplificación isotérmica mediada por lazos (LAMP), que comprenden:
- un primer cebador directo que contiene una secuencia de F2, que es complementaria a una secuencia arbitraria de F2c, y, en el extremo 5' de F2, una secuencia arbitraria de F1c,
- un segundo cebador directo que contiene una secuencia de F3 que es complementaria a una secuencia arbitraria de F3c,
- un primer cebador reverso que contiene una secuencia arbitraria de R2 y, en el extremo 5' de R2, una secuencia R1c, que es complementaria a una secuencia arbitraria de R1, y
- un segundo cebador reverso que contiene una secuencia arbitraria de R3, en la que la primera secuencia arbitraria de F1c, la segunda secuencia arbitraria de F2c, y la tercera secuencia arbitraria de F3c son seleccionables, en este orden, desde el extremo 3' en una región diana hacia el extremo 3' de la cadena de polinucleótidos que constituye un ácido nucleico a detectar y la cuarta secuencia arbitraria de R1, la quinta secuencia arbitraria de R2, y la sexta secuencia arbitraria de R3 son seleccionables, en este orden, desde el extremo 5' en la región diana hacia el extremo 5' de dicha cadena de polinucleótidos;
- una síntesis de tipo de desplazamiento de cadena catalizado por polimerasa de cadenas complementarias;
- un nucleótido que sirve como sustrato para la síntesis de cadenas complementarias;
- un intercalante, seleccionado de entre el grupo que consiste en: bromuro de etidio, naranja de acridina, TO-PRO-1, y YOPRO-1; y
- un compuesto que está unido a un ácido nucleico de cadena sencilla más fuertemente que un intercalante y que está unido a un ácido nucleico de doble cadena más débilmente que un intercalante, en el que dicho compuesto es un segundo intercalante seleccionado del grupo que consiste en: azul de metileno, actinomicina D, SYBR Green 2, y OliGreen.
- Más específicamente, la presente invención se utiliza en un método para reducir las señales derivadas de un agente intercalante unido a los ácidos nucleicos de cadena sencilla, en el que un compuesto que reacciona preferiblemente con un agente intercalante unido a los ácidos nucleicos de cadena sencilla respecto a un agente intercalante unido a ácidos nucleicos de cadena doble, se añade a una mezcla que comprende ácidos nucleicos de cadena doble y de cadena sencilla ambos con agente intercalante unido (por ejemplo, bromuro de etidio, naranja de acridina, TO-PRO-1, o YO-PRO-1), reduciendo así las señales derivadas de un agente intercalante unido a los ácidos nucleicos de cadena sencilla. Ejemplos del compuesto que reacciona preferiblemente con un agente intercalante unido a los ácidos nucleicos de cadena sencilla respecto a un agente intercalante unido a ácidos nucleicos de cadena doble incluyen un oxidante, como el hipoclorito sódico, peróxido de hidrógeno, o permanganato potásico, y un agente reductor, como el borohidruro sódico o cianoborohidruro sódico.
- Además, la presente invención se utiliza en un método para reducir las señales derivadas de un agente intercalante unido a un ácido nucleico de cadena sencilla, en el que un compuesto que está unido a un ácido nucleico de cadena sencilla de forma más fuerte que un agente intercalante y que está unido a un ácido nucleico de doble cadena de forma más débil que un agente intercalante, se añade a una mezcla que comprende ácidos nucleicos de cadena doble y de cadena sencilla ambos unidos a agentes intercalantes (por ejemplo, bromuro de etidio, naranja de acridina, TO-PRO-1, o YO-PRO-1), reduciendo así las señales derivadas de un agente intercalante unido a un ácido nucleico de cadena sencilla. Un compuesto que se une a un ácido nucleico de cadena sencilla de forma más fuerte que un agente intercalante y que se une a un ácido nucleico de doble cadena de forma más débil que un agente intercalante es un segundo agente intercalante diferente del agente intercalante anterior (por ejemplo, azul de

metileno, actinomicina D, SYBR Green 2 o OliGreen).

Además, la presente invención se utiliza en un método para detectar un producto de amplificación de ácidos nucleicos que comprende los siguientes pasos:

- 5
- (a) amplificar un ácido nucleico mediante amplificación de ácidos nucleicos;
 - (b) añadir un agente intercalante a la solución de reacción tras la amplificación de ácidos nucleicos;
 - (c) reducir las señales derivadas de un agente intercalante unido a los ácidos nucleicos de cadena sencilla mediante cualquiera de los métodos mencionados previamente; y
 - 10 (d) analizar la intensidad de la fluorescencia de la solución de reacción.

Además, la presente invención se utiliza en un método para detectar un producto de amplificación de ácidos nucleicos que comprende los siguientes pasos:

- 15
- (a) amplificar un ácido nucleico mediante la amplificación de ácidos nucleicos en presencia de un agente intercalante;
 - (b) reducir las señales derivadas de un agente intercalante unido a los ácidos nucleicos de cadena sencilla mediante cualquiera de los métodos anteriormente mencionados; y
 - 20 (c) analizar la intensidad de la fluorescencia de la solución de reacción.

La presente invención también puede utilizarse en un método para detectar un producto de la amplificación de ácidos nucleicos que comprende los siguientes pasos:

- 25
- (a) amplificar un ácido nucleico mediante la amplificación de ácidos nucleicos en presencia de un agente intercalante y un compuesto que se une a los ácidos nucleicos de cadena sencilla de forma más fuerte que un agente intercalante y que se une a los ácidos nucleicos de cadena doble de forma más débil que un agente intercalante; y
 - (b) analizar la intensidad de la fluorescencia de la solución de reacción.

30 La amplificación de ácidos nucleicos se lleva a cabo mediante los siguientes pasos:

- (a) seleccionar una primera secuencia arbitraria F1c, una segunda secuencia arbitraria F2c, y una tercera secuencia arbitraria F3c en ese orden desde el extremo 3' en una región diana hacia el extremo 3' de la cadena de polinucleótidos y una cuarta secuencia arbitraria R1, una quinta secuencia arbitraria R2, y una sexta secuencia arbitraria R3 en ese orden desde el extremo 5' en la región diana hacia el extremo 5' de la cadena de nucleótidos;
- (b) preparar un cebador que contiene la secuencia F2 que es complementaria a F2c y, en el extremo 5' de F2, tiene la misma secuencia que F1c; un cebador que contiene la secuencia F3 que es complementaria a F3c; un cebador que contiene la misma secuencia que R2 y, en el extremo 5' de la secuencia, la secuencia R1c que es complementaria a R1; y un cebador que contiene la misma secuencia que R3; y
- 40 (c) sintetizar DNA en presencia de una polimerasa de tipo desplazamiento de cadena y los cebadores utilizando la cadena de nucleótidos como molde.

La amplificación de ácidos nucleicos se lleva a cabo mediante los siguientes pasos:

- 45
- (a) seleccionar una primera secuencia arbitraria F1c y una segunda secuencia arbitraria F2c en ese orden desde el extremo 3' en la región diana hacia el extremo 3' en la cadena de polinucleótidos y una tercera secuencia arbitraria R1 y una cuarta secuencia arbitraria R2 en ese orden desde el extremo 5' en la región diana hacia el extremo 5' de la cadena de nucleótidos;
 - (b) preparar un cebador que contiene la secuencia F2 que es complementaria a F2c y, en el extremo 5' de F2, la misma secuencia que F1c; y un cebador que contiene la misma secuencia que R2 y, en el extremo 5' de la secuencia, la secuencia R1c que es complementaria a R1; y
 - 50 (c) sintetizar DNA en presencia de una polimerasa de tipo desplazamiento de cadena, los cebadores, y un regulador de la temperatura de fusión (como la betaína o N-óxido de trimetilamina) usando la cadena de nucleótidos como molde para la amplificación.

55 Descripción de la invención

La presente invención se describe a continuación en detalle.

60 La presente invención proporciona los medios para detectar ácidos nucleicos de doble cadena mediante la detección, con una sensibilidad superior, de las señales derivadas de un agente intercalante unido a ácidos nucleicos de cadena doble mediante la reducción de señales derivadas de un agente intercalante unido a los ácidos nucleicos de cadena sencilla por la adición de un compuesto a una mezcla que consta de ácidos nucleicos de doble cadena y de cadena sencilla ambos con agente intercalante unido, compuesto que reacciona preferiblemente con un agente intercalante unido a ácidos nucleicos de cadena sencilla respecto a un agente intercalante unido a ácidos nucleicos de doble cadena, o un compuesto que se une a los ácidos nucleicos de cadena sencilla de forma más

65

fuerte que un agente intercalante y se une a ácidos nucleicos de doble cadena de forma más débil que un agente intercalante.

5 De acuerdo con esto, este método es particularmente útil cuando se detectan selectivamente productos de amplificación, y permanecen cantidades significativas de cebadores además de los ácidos nucleicos de doble cadena amplificados en el sistema de reacción durante o tras la amplificación de ácidos nucleicos que utiliza cebadores como ácidos nucleicos de cadena sencilla.

10 En la presente invención, el término "agente intercalante" se refiere a un agente intercalante, que es un compuesto que puede insertarse (intercalarse) entre planos adyacentes formados por los pares de nucleótidos del DNA. El término "señal" se refiere a una sustancia que funciona como marcador para una sustancia o estado específico, como la fluorescencia derivada de un agente intercalante unido a un ácido nucleico.

15 1. Amplificación de ácidos nucleicos

Específicamente, la presente invención es útil cuando se detecta un producto de amplificación (ácidos nucleicos de doble cadena) obtenido en la amplificación de ácidos nucleicos que utiliza un cebador, que es un ácido nucleico de cadena sencilla. Ejemplos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen, además de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el método LAMP, el método de amplificación por desplazamiento de la cadena (SDA) (Núm. de Publicación de Patente Japonesa (Kokoku) 7-114718 B (1995)), y el método de amplificación basado en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) (Núm. de Patente Japonesa 2650159). Más concretamente, a causa de que se utilizan mayores cantidades de cebadores en el método LAMP que en la PCR, la cantidad de cebadores de cadena sencilla que permanecen después de la amplificación es elevada. Por consiguiente, el método para detectar ácidos nucleicos de doble cadena de acuerdo con la presente invención es muy útil para detectar los productos de amplificación obtenidos por el método LAMP.

20 En el método LAMP, se forma una estructura de bucle en un extremo de la secuencia de nucleótidos que va a ser amplificada y, simultáneamente con la elongación por parte de la polimerasa que se inicia en este, un cebador hibridado en una región del bucle resuelve el producto de elongación en una cadena sencilla mientras elonga una cadena de ácido nucleico por desplazamiento de cadenas. Ya que los ácidos nucleicos de cadena sencilla generados tienen una región de autocomplementariedad en su extremo, se forma un bucle en el extremo, y se inicia nueva elongación. El auténtico método LAMP procede bajo condiciones isotérmicas y, por lo tanto, las reacciones descritas anteriormente ocurren simultáneamente y en paralelo. El método LAMP se caracteriza por grandes cantidades de productos de amplificación además de por una reacción de tipo de desplazamiento de cadena que continúa bajo condiciones isotérmicas. Una de las razones de ello es que el método LAMP no supone la desnaturalización térmica que desactiva la polimerasa. El método LAMP se describe a continuación.

35 (1) Método LAMP

40 Como introducción, se muestra un esquema del método LAMP (Fig. 1 y Fig. 2). En el método LAMP, se prepara un polinucleótido molde, que es la diana de amplificación. El polinucleótido molde (DNA o RNA) puede prepararse por síntesis química o de acuerdo con los métodos convencionales a partir de materiales biológicos como tejidos o células. El polinucleótido molde se prepara de forma que las longitudes apropiadas de las secuencias (referidas como "secuencias bilaterales") estén presentes en los extremos (extremo 5' y extremo 3') en la región diana para la amplificación (Fig. 1A). El término "secuencia bilateral" se refiere a una secuencia que comprende una región desde el extremo 5' de la región diana hasta el extremo 5' de la cadena de polinucleótidos y una secuencia que comprende una región desde el extremo 3' de la región diana hasta el extremo 3' de la cadena de polinucleótidos (una porción indicada con flechas opuestas (← →) en la Fig. 1A). Las longitudes de las secuencias bilaterales son de 10 a 1.000 nucleótidos, y preferiblemente de 30 a 500 nucleótidos en el extremo 5' y en el extremo 3' en la región diana.

50 Las regiones predeterminadas se seleccionan de forma arbitraria a partir de las secuencias bilaterales de la cadena de polinucleótido molde (Fig. 1A) que contiene la región diana y las secuencias bilaterales. Específicamente, una primera secuencia arbitraria F1c, una segunda secuencia arbitraria F2c, y una tercera secuencia arbitraria F3c se seleccionan en ese orden desde el extremo 3' en la región diana hacia el extremo 3' de la cadena de polinucleótidos (Fig. 1B). De forma similar, una cuarta secuencia arbitraria R1, una quinta secuencia arbitraria R2, y una sexta secuencia arbitraria R3 se seleccionan en ese orden desde el extremo 5' en la región diana hacia el extremo 5' de la cadena de polinucleótidos (Fig. 1B). Cuando se seleccionan la secuencia arbitraria F1c y la secuencia arbitraria R1, la distancia entre F1c y R1 puede ser de 0 nucleótidos, es decir, contigua. Alternativamente, puede seleccionarse de forma que se permita que F1c y R1 se solapen parcialmente. De la primera a la sexta región se seleccionan respectivamente y de forma arbitraria de acuerdo con las secuencias de las cadenas de polinucleótidos preparadas. Cada región a seleccionar comprende preferiblemente de 5 a 100 nucleótidos, y preferiblemente de 10 a 50 nucleótidos. La selección de la longitud de nucleótidos facilita la hibridación del cebador descrito a continuación.

65 Cada una de las secuencias arbitrarias se selecciona preferiblemente de forma que, en lugar de hibridación intermolecular, el producto de amplificación obtenido por el método LAMP inicia preferentemente la hibridación intramolecular entre la secuencia F1c y la secuencia F1, y entre la secuencia R1 y la secuencia R1c como se

muestra en la Fig. 2L, y forma una estructura de bucle terminal. Por ejemplo, para iniciar preferiblemente la hibridación intramolecular, es importante considerar la distancia entre la secuencia F1c y la secuencia F2c y la distancia entre la secuencia R1 y la secuencia R1c cuando se seleccionan las secuencias arbitrarias. Más específicamente, ambas secuencias se sitúan preferiblemente dentro de una distancia de 0 a 500 nucleótidos, preferiblemente de 0 a 100 nucleótidos, y preferiblemente de 10 a 70 nucleótidos. Los valores numéricos representan respectivamente el número de nucleótidos que no contienen las secuencias F1c y F2c y las secuencias R1 y R2.

Posteriormente, se diseña y sintetiza un cebador denominado "cebador FA" y se hibrida a F2c. El término "cebador FA" incluye la secuencia F2 que es complementaria a la región F2c y a otra secuencia que es la misma que F1c (ésta puede denominarse "F1c" por comodidad). Ejemplos del mismo incluyen aquellos con una estructura en la que el extremo 3' de la secuencia F1c está ligado al extremo 5' de F2 (Fig. 1C). El término "hibridación" se refiere a la formación de una estructura de doble cadena de una cadena de nucleótidos a través de pares de nucleótidos en base al modelo de Watson-Crick. Tras la hibridación del cebador FA a la secuencia F2c en la cadena de polinucleótidos molde, se inicia la síntesis de la cadena de DNA empezando a partir de F2 en el cebador FA (Fig. 1D). Posteriormente, un cebador que contiene la secuencia F3, que es complementaria a F3c (a partir de ahora éste puede denominarse "cebador F3"), se hibrida a la secuencia F3c en la cadena de polinucleótidos molde (Fig. 1D). Entonces se lleva a cabo la síntesis de DNA de tipo desplazamiento de cadena a partir del cebador F3 hibridado (Fig. 1E). Cuando una estructura de doble cadena, que se ha producido a través de la hibridación de un polinucleótido a un molde para la síntesis de una cadena complementaria, se somete a una reacción que sintetiza, a partir de un cebador, una cadena complementaria mientras se separa el polinucleótido del molde, este proceso se denomina "síntesis de DNA de tipo desplazamiento de cadena". Ejemplos específicos de la misma incluyen una reacción en la que la síntesis ocurre de forma que se desplaza la cadena sintetizada por el cebador FA con la cadena sintetizada por el cebador F3. En otras palabras, la cadena complementaria de la cadena de polinucleótidos molde sintetizada por el cebador FA puede ser desplazada por una cadena elongada a partir del cebador F3 de forma que la cadena complementaria se separa.

Mediante la síntesis anteriormente descrita pueden obtenerse dos tipos de cadenas de nucleótidos, las siguientes (i) y (ii).

(i) Una cadena de nucleótidos que contiene la secuencia "(5') F3-F2-F1-región diana-R1c-R2c-R3c(3')" que es complementaria a la secuencia "(3')F3c-F2c-F1c-región diana-R1-R2-R3(5')" en la cadena de polinucleótidos molde (Fig. 1F).

(ii) Una cadena de nucleótidos formada en una cadena sencilla por desplazamiento (separada), es decir, una cadena de nucleótidos que contiene "(5') F1c-F2-F1-región diana -R1c-R2c-R3c (3')" con la misma secuencia que F1c en su extremo 5' (Fig. 1G). F1 y F1c son complementarias entre ellas en la cadena de nucleótidos de acuerdo con (ii) anterior y, por lo tanto, hibridan la una con la otra en base a puentes de hidrógeno intracadena entre F1 y F1c, formando así un bucle en forma de horquilla (Fig. 1G). F2 está contenido en este bucle en forma de horquilla.

Posteriormente, un cebador denominado "cebador RA" hibrida con la secuencia R2c en la cadena de nucleótidos de acuerdo con (ii) anterior. En el cebador RA, el extremo 3' de la secuencia R1c complementaria a la secuencia R1 está ligado al extremo 5' de la secuencia R2. Entonces se inicia la síntesis de la cadena de DNA empezando desde el cebador RA (Fig. 1H). Cuando el DNA elongado sintetizado a partir del cebador RA ha alcanzado el final de la doble cadena formada entre F1 y F1c, la secuencia de F1c es desplazada por el DNA elongado del mismo modo que el desplazamiento que se muestra en la Fig. 1E (Fig. 1I). Un cebador que contiene la secuencia R3, que es complementaria a la secuencia R3c (de ahora en adelante puede denominarse "cebador R3"), hibrida entonces a R3c en la cadena de polinucleótidos molde (Fig. 1I). Entonces se realiza la síntesis de DNA de tipo desplazamiento de cadena empezando a partir del cebador R3 hibridado (Fig. 2J). En base a la anterior síntesis se sintetizan dos tipos de cadenas de nucleótidos, es decir, las siguientes (iii) y (iv).

(iii) Una cadena de nucleótidos "(3') F1-F2c-F1c-región diana-R1-R2-R3 (5')", que es complementaria a la secuencia "(5') F1c-F2-F1-región diana-R1c-R2c-R3c (3')" (Fig. 2K).

(iv) Una cadena de nucleótidos "(3') F1-F2c-F1-región diana-R1-R2-R1c (3')" con F1 localizado muy cercano al extremo 3', y R1c localizado muy cercano al extremo 5' (Fig. 2L).

La secuencia de acuerdo con (iv) anterior, forma un bucle en forma de horquilla mediante puentes de hidrógeno intracadena entre las secuencias F1 y F1c que existen en el extremo 3' y entre las secuencias R1 y R1c en el extremo 5' (Fig. 2L).

Posteriormente, entre las cadenas de nucleótidos de acuerdo con (iv) anterior, la región F2 del cebador FA hibrida con F2c en la porción del bucle en forma de horquilla del extremo 3' (Fig. 2M). La síntesis de la cadena de DNA se inicia empezando por el F1 hibridado mediante puentes de hidrógeno intracadena. En la Fig. 1M, la cadena de elongación sintetizada empezando por F1 alcanza el extremo 5' abriendo el bucle en forma de horquilla formado por R1-R2-R1c. Por el contrario, cuando una reacción sucede empezando por F2, se sintetiza una cadena, que es

complementaria a una cadena constituida por "F1c-región diana -R1-R2-R1c". En este caso, F1 y la cadena "F1-región diana-R1c-R2c-R1" sintetizada empezando a partir de F1 son desplazados por la cadena que se sintetiza empezando por F2. Esto proporciona la doble cadena de DNA con una construcción protuberante de cadena sencilla denominada "-secuencia diana-R1c-R2c-R1". La porción con una construcción protuberante de cadena sencilla forma un bucle en forma de horquilla formando puentes de hidrógeno intracadena entre R1c y R1 de una porción con una construcción protuberante de cadena sencilla ("R1c-R2c-R1") (Fig. 2N). Esta construcción inicia la síntesis de cadena de DNA empezando desde el R1 hibridado mediante puentes de hidrógeno intracadena (Fig. 2N). En base a la anterior síntesis se obtienen dos tipos de cadenas de nucleótidos, las siguientes (v) y (vi).

5 (v) Secuencia "(3')R1-R2-R1c-región diana-F1-F2-F1c-región diana-R1-R2c-R1c-región diana-F1-F2c-F1c-región diana-R1-R2-R1c(5')" (Fig. 2O).

10 (vi) Una secuencia con F1c localizado muy cerca del extremo 3' y el R1 localizado muy cerca del extremo 5' "(3') F1c-F2-F1-región diana-R1c-R2c-R1(3')" (Fig. 2P).

15 Las cadenas de nucleótidos de acuerdo con (v) y (vi) anteriores respectivamente forman un bucle en forma de horquilla con R2c como una porción del bucle y un bucle en forma de horquilla con F2 y R2c como otra porción del bucle mediante puentes de hidrógeno intracadena. El cebador RA se hibrida a la porción R2c formando un bucle en forma de horquilla en dos secuencias, es decir, las anteriores (v) y (vi), empezando la síntesis de DNA a partir del cebador, y procede la síntesis de la cadena de nucleótidos (cadena complementaria con la secuencia mostrada en (vi)) que contiene una secuencia diana. Esta cadena complementaria es la misma que la secuencia mostrada en la Fig. 2L y, por lo tanto, las reacciones de acuerdo con las Fig. 2L a 2P se repiten a continuación. Por el contrario, la reacción de la Fig. 1A puede proceder y, así, sucede la amplificación de la cadena de polinucleótidos al repetirse esta serie de síntesis. La amplificación descrita anteriormente se lleva a cabo usando cuatro tipos de cebadores, es decir, el cebador FA, el cebador RA, el cebador F3, y el cebador R3. Alternativamente, la amplificación bajo condiciones isotérmicas puede iniciarse usando sólo dos tipos de cebadores, el cebador FA y el cebador RA, sin utilizar el cebador F3 y el cebador R3. En esta amplificación alternativa, debería estar presentes un regulador de la temperatura de fusión (Tm), por ejemplo, betaína o N-óxido de trimetilamina (TMANO), en el sistema de la reacción.

20 (2) Condiciones de la Reacción

En la reacción de acuerdo con el método LAMP, se añaden los ingredientes de más abajo al ácido nucleico de cadena sencilla molde:

- 25 (i) cuatro tipos de oligonucleótidos (FA, RA, cebador externo F3, y cebador externo R3);
 (ii) polimerasa de DNA para la síntesis de tipo desplazamiento de cadena de cadenas complementarias; y
 (iii) un nucleótido que sirve como sustrato para la polimerasa de DNA.

30 La reacción procede por la incubación a una temperatura tal que se forman pares de nucleótidos estables entre una secuencia de nucleótidos que constituye FA o RA y una secuencia de nucleótidos complementaria de la misma, y pueda mantenerse la actividad enzimática. La temperatura de incubación es de 50 a 75°C, y preferiblemente de 55 a 70°C. El tiempo de incubación es de 1 minuto a 10 horas, y preferiblemente de 5 minutos a 4 horas.

35 En el método LAMP de acuerdo con las dos realizaciones anteriores, el cebador FA y el cebador RA también se denominan "cebadores internos" y el cebador F3 y el cebador R3 también se denominan "cebadores externos".

40 La síntesis de cadenas de nucleótidos a partir del cebador externo debe iniciarse después de la síntesis de las cadenas de nucleótidos a partir del cebador interno. Un método para satisfacer esta condición incluye uno que fija una concentración superior del cebador interno que de cebador externo. Más específicamente, la concentración del cebador interno puede fijarse más elevada que la del cebador externo entre 2 y 50 veces, y preferiblemente entre 4 y 25 veces.

45 La polimerasa, que cataliza la síntesis del tipo desplazamiento de cadena de las cadenas complementarias (puede referirse como "polimerasa tipo desplazamiento de cadena), incluye la polimerasa de DNA Bst, polimerasa de DNA (exo-) Bca, el fragmento Klenow de la polimerasa de DNA I de E. coli, la polimerasa de DNA Vent, polimerasa de DNA (Exo-) Vent (la actividad exonucleasa se elimina de la polimerasa de DNA Vent), polimerasa de DNA DeepVent, polimerasa de DNA DeepVent (Exo-) (la actividad exonucleasa se elimina de la polimerasa de DNA DeepVent), polimerasa de DNA del fago ϕ 29, polimerasa de DNA del fago MS-2, polimerasa de DNA ZTaq (Takara Shuzo Co., Ltd.), y polimerasa de DNA KOD (Toyobo Co., Ltd.).

50 Esta reacción se realiza en presencia de, por ejemplo, un tampón que proporcione el pH apropiado en la reacción enzimática, las sales necesarias para mantener la actividad catalítica de la enzima o para la hibridación, un agente protector para la enzima, y, si es necesario, un regulador de la temperatura de fusión (Tm). Se usa un tampón, como Tris-HCl que tenga una acción tamponante en el rango de débilmente alcalino a neutro. El pH se ajusta dependiendo de la polimerasa de DNA que se use. Como sales, son apropiadas MgCl₂, KCl, NaCl, (NH₄)₂SO₄, etc. añadidas para mantener la actividad de la enzima y para regular la temperatura de fusión (Tm) del ácido nucleico. Pueden usarse

albúmina de suero bovino o azúcares como agentes protectores de las enzimas. Además, se usa betaína (N,N,N-trimetilglicina), N-óxido de trimetilamina (TMANO), dimetilsulfóxido (DMSO) o formamida como regulador de la temperatura de fusión (T_m). Por el uso del regulador de la temperatura de fusión (T_m), la hibridación del oligonucleótido puede regularse bajo condiciones de temperatura restrictivas. En particular, la betaína y el N-óxido de trimetilamina (TMANO) también son efectivos para mejorar la eficiencia del desplazamiento de la cadena en virtud de sus propiedades de isoestabilización. Añadiendo betaína en una cantidad de 0,2 a 3,0 M, y preferiblemente entre 0,5 y 1,5 M a la solución de reacción, se puede esperar que su acción promueva la amplificación de un ácido nucleico. Como estos reguladores de la temperatura de fusión actúan disminuyendo la temperatura de fusión, las condiciones para dar la astringencia y reactividad apropiadas deben determinarse empíricamente considerando otras condiciones de reacción tales como la concentración de sales y la temperatura de la reacción.

2. Métodos para reducir las señales derivadas de un agente intercalante unido al ácido nucleico de cadena sencilla.

Los métodos siguientes son ejemplos de métodos para reducir las señales derivadas de un agente intercalante unido a los ácidos nucleicos de cadena sencilla en una mezcla que consta de ácidos nucleicos de doble cadena y de cadena sencilla teniendo ambos agente intercalante unido.

(1) Un método en el que se añade un compuesto que reacciona preferiblemente con un agente intercalante unido a los ácidos nucleicos de cadena sencilla que con un agente intercalante unido a ácidos nucleicos de doble cadena

(1)-1 Utilización de un oxidante o un reductor

Se añade un compuesto que reacciona preferiblemente con un agente intercalante unido a los ácidos nucleicos de cadena sencilla que con un agente intercalante unido a ácidos nucleicos de doble cadena, a una mezcla que consta de ácidos nucleicos de doble cadena y de cadena sencilla teniendo agente intercalante unido. Esto puede reducir las señales derivadas de un agente intercalante unido a un ácido nucleico de cadena sencilla. Un ejemplo de un compuesto que reacciona preferiblemente con un agente intercalante unido a los ácidos nucleicos de cadena sencilla que con un agente intercalante unido a ácidos nucleicos de doble cadena es un oxidante o un reductor. Específicamente, un oxidante o un reductor se añade además a la solución mezcla de ácidos nucleicos de doble cadena y de cadena sencilla que se tinte por la adición de un agente intercalante, y el resultante se mantiene a la temperatura apropiada por un período de tiempo adecuado. Por lo tanto, el agente intercalante unido a los ácidos nucleicos de cadena sencilla se oxida o reduce preferiblemente comparado con el agente intercalante unido a los ácidos nucleicos de doble cadena. Esto disminuye la intensidad de fluorescencia derivada de un agente intercalante unido a una cadena sencilla. Ejemplos de un agente intercalante incluyen bromuro de etidio, naranja de acridina, TO-PRO-1 y YO-PRO-1. Ejemplos de un oxidante incluyen hipoclorito sódico (NaClO), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y permanganato potásico (KMnO_4). Ejemplos de un reductor incluyen borohidruro sódico (NaBH_4) y cianoborohidruro sódico (NaBH_3CN).

Cuando se detecta un producto de amplificación de ácidos nucleicos por este método, la intensidad de la fluorescencia generalmente se analiza mediante la adición de un agente intercalante a la solución de reacción después de la amplificación de ácido nucleico, seguido por la adición de un oxidante o un reductor. Alternativamente, se añade un agente intercalante a la solución de reacción antes de la amplificación de ácido nucleico, la amplificación se lleva a cabo en presencia del agente intercalante, y se añade un oxidante o un reductor después de la reacción, analizando de ese modo la intensidad de la fluorescencia.

(1)-2 Utilización de un compuesto que forma complejos

Puede usarse un compuesto que forma un complejo con un agente intercalante como compuesto que reacciona preferiblemente con un agente intercalante unido a los ácidos nucleicos de cadena sencilla que con un agente intercalante unido a ácidos nucleicos de doble cadena. Específicamente, se añade un agente intercalante y el compuesto que forma complejos a la solución mezcla de ácidos nucleicos de doble cadena y de cadena sencilla, y la mezcla se mantiene a la temperatura apropiada durante un período de tiempo adecuado. El enlace débil entre el ácido nucleico de cadena sencilla y un agente intercalante preferiblemente se inhibe por la reacción de formación de complejos comparado con un enlace entre ácidos nucleicos de doble cadena y un agente intercalante. Esto disminuye la intensidad de fluorescencia derivada de un agente intercalante unido a una cadena sencilla. Un ejemplo de combinación de un agente intercalante y un compuesto que forma complejos es el azul de metileno (un agente intercalante) y el Acid Orange 7 (un compuesto que forma complejos).

Cuando se detecta un producto de la amplificación de ácidos nucleicos por este método, la intensidad de la fluorescencia generalmente se analiza mediante adición simultánea o secuencial de un agente intercalante y un compuesto que forma complejos a la solución de reacción después de la amplificación del ácido nucleico. Alternativamente, se añade un agente intercalante a la solución de reacción antes de la amplificación del ácido nucleico, la amplificación se lleva a cabo en presencia de un agente intercalante, y se añade un compuesto que forma complejos después de la reacción, analizando así la intensidad de la fluorescencia.

La absorbancia puede analizarse en lugar de la intensidad de la fluorescencia utilizando las diferencias en el

espectro de absorción causadas por la formación del complejo. Es decir, ya que el espectro de absorción de un agente intercalante difiere de la del complejo, es posible analizar cuantitativamente sólo el agente intercalante que no formó un complejo.

- 5 (2) Método en el que se añade un compuesto que se une a los ácidos nucleicos de cadena sencilla de forma más fuerte que un agente intercalante y se une a ácidos nucleicos de doble cadena de forma más débil que un agente intercalante.

10 Se añade un compuesto que se une a los ácidos nucleicos de cadena sencilla de forma más fuerte que un agente intercalante y se une a ácidos nucleicos de doble cadena de forma más débil que un agente intercalante, a una mezcla que consta de ácidos nucleicos de doble cadena y de cadena sencilla teniendo ambos agente intercalante unido. Esto puede reducir las señales derivadas de un agente intercalante unido a un ácido nucleico de cadena sencilla. Un ejemplo de un compuesto que se une a los ácidos nucleicos de cadena sencilla de forma más fuerte que un agente intercalante y se une a ácidos nucleicos de doble cadena de forma más débil que un agente intercalante es un segundo agente intercalante diferente del agente intercalante anteriormente mencionado (en lo sucesivo se denominará "primer agente intercalante"). Se añade un segundo agente intercalante diferente del primer agente intercalante que se une a los ácidos nucleicos de cadena sencilla de forma más fuerte que el primer agente intercalante y se une a ácidos nucleicos de doble cadena de forma más débil que el primer agente intercalante, a una solución mezcla de soluciones de doble cadena y cadena sencilla, que se tiñe por la adición del primer agente intercalante, y la mezcla se mantiene a una temperatura apropiada durante un período de tiempo adecuado. Por lo tanto, el primer agente intercalante unido a los ácidos nucleicos de cadena sencilla es desplazado preferiblemente por el segundo agente intercalante comparado con el primer agente intercalante unido a ácidos nucleicos de doble cadena. Esto disminuye la intensidad de la fluorescencia derivada del primer agente intercalante unido a una cadena sencilla. Ejemplos del primer agente intercalante que se añade primero a la mezcla de ácidos nucleicos de doble cadena y de cadena sencilla incluyen el bromuro de etidio, naranja de acridina, TO-PRO-1 y YO-PRO-1. Ejemplos del segundo agente intercalante, que se añade para el desplazamiento preferente del primer agente intercalante unido a los ácidos nucleicos de cadena sencilla y es diferente del primer agente intercalante, incluyen el azul de metileno, actinomicina D, SYBR Green 2 y OliGreen.

30 Cuando se detecta un producto de amplificación de ácidos nucleicos por este método, la intensidad de la fluorescencia se analiza generalmente mediante la adición de un agente intercalante a la solución de reacción después de la amplificación de ácidos nucleicos, seguido de la adición del segundo agente intercalante diferente del agente intercalante previamente mencionado. Alternativamente, se añade un agente intercalante a la solución de reacción antes de la amplificación de ácidos nucleicos, la amplificación se lleva a cabo en presencia del agente intercalante, y se añade el segundo agente intercalante diferente del agente intercalante anteriormente mencionado después de la reacción, analizando así la intensidad de la fluorescencia. Además los dos tipos de agente intercalantes anteriores se añaden previamente a la solución de reacción antes de la amplificación de ácido nucleico, la amplificación se lleva a cabo en presencia de los dos tipos de agente intercalantes, y la intensidad de la fluorescencia puede analizarse después de la reacción.

40 3. Detección de ácidos nucleicos de doble cadena

Pueden detectarse los ácidos nucleicos de doble cadena mediante el análisis de la fluorescencia emitida por el agente intercalante unido a los ácidos nucleicos usando un fluorofotómetro tras el proceso descrito en 2. Por ejemplo, cuando se detecta el producto de amplificación obtenido en la reacción descrita en 1, se proporciona como control un sistema de reacción en el que la amplificación se lleva a cabo sin DNA molde (sistema de control 1) o un sistema de reacción sin polimerasa de DNA (sistema de control 2). El sistema de control anteriormente mencionado y un sistema en el que la amplificación se lleva a cabo como de costumbre en presencia del molde de DNA y polimerasa de DNA (un sistema de prueba) son sometidos al proceso descrito en 2, y se examinan las diferencias de intensidad de la fluorescencia entre el sistema control y el sistema de prueba. Por lo tanto, la generación de producto de amplificación en la solución de reacción puede confirmarse durante la reacción. Más específicamente, cuando la intensidad de la fluorescencia del sistema de prueba es mayor que la del sistema control 1 o 2, se puede evaluar que el producto de la amplificación se detecta en el sistema de prueba.

55 Un ejemplo de fluorofotómetro que puede usarse para analizar la intensidad de fluorescencia es el sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7700 (PE Applied Biosystems). Cuando se analiza la intensidad de la fluorescencia, la longitud de onda de excitación y la longitud de onda del ensayo se determinan adecuadamente de acuerdo con el tipo de agente intercalante usado en la tinción de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, se somete la solución de reacción después del inicio de la amplificación al proceso descrito en 2, y se analiza entonces la intensidad de fluorescencia del mismo a lo largo del tiempo. Por lo tanto, puede monitorizarse la transición en las condiciones del producto de la reacción a lo largo del tiempo de reacción.

60 4. Equipo para detectar o monitorizar ácidos nucleicos de doble cadena

65 En el método para detectar o monitorizar el producto de amplificación de ácidos nucleicos de acuerdo con 3, los reactivos necesarios para su realización pueden empaquetarse y suministrarse como un equipo. Ejemplos

específicos incluyen un equipo que comprende los siguientes elementos.

[Elementos del equipo]

- 5 (1) un agente intercalante (por ejemplo, bromuro de etidio, naranja de acridina, TO-PRO-1 y YO-PRO-1);
- (2) un compuesto que reacciona preferiblemente con un agente intercalante unido a los ácidos nucleicos de cadena sencilla que con un agente intercalante unido a ácidos nucleicos de doble cadena (por ejemplo, un oxidante como hipoclorito sódico (NaClO), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o permanganato potásico (KMnO₄) y un reductor como borohidruro sódico); y
- 10 (3) un compuesto que se une a los ácidos nucleicos de cadena sencilla de forma más fuerte que un agente intercalante y se une a los ácidos nucleicos de doble cadena de forma más débil que un agente intercalante (por ejemplo, el segundo agente intercalante diferente del agente intercalante que se añadió primero a la solución mezcla de ácidos nucleicos de doble cadena y de cadena sencilla, como el azul de metileno, actinomomicina D, SYBR Green 2 o OliGreen).

Este equipo puede usarse también para amplificar y detectar un ácido nucleico diana basándose en el método LAMP añadiendo los siguientes elementos:

20 [Elementos que pueden añadirse]

- (a) cuando se selecciona una primera secuencia arbitraria F1c, una segunda secuencia arbitraria F2c y una tercera secuencia arbitraria F3c en ese orden desde el extremo 3' en la región diana hacia el extremo 3' de la cadena de polinucleótidos que constituye un ácido nucleico a detectar, y se selecciona una cuarta secuencia arbitraria R1, una quinta secuencia arbitraria R2 y una sexta secuencia arbitraria R3 en ese orden desde el extremo 5' en la región diana hacia el extremo 5' en la cadena de polinucleótidos, un cebador que contiene la secuencia F2 que es complementaria a F2c y, en el extremo 5' de F2, la misma secuencia que F1c; un cebador que contiene la secuencia F3 que es complementaria a F3c; un cebador que contiene la misma secuencia que R2 y, en el extremo 5' de la secuencia, la secuencia R1c que es complementaria a R1; y un cebador que contiene la misma secuencia que R3;
- (b) una polimerasa que cataliza la síntesis de tipo desplazamiento de cadena de cadenas complementarias; y
- (c) un nucleótido que sirve como sustrato para la síntesis de cadenas complementarias.

Los elementos del equipo pueden variar de acuerdo con la realización del método LAMP que se emplee. Específicamente, un cebador que contiene la secuencia F3 que es complementaria a la secuencia arbitraria F3c y un cebador que contiene la misma secuencia que la secuencia arbitraria R3 pueden omitirse opcionalmente de entre los elementos. En tal caso, se añade preferiblemente un regulador de la temperatura de fusión (por ejemplo, betaína o N-óxido de trimetilamina). Además, puede añadirse opcionalmente un tampón que proporcione unas condiciones apropiadas para la reacción enzimática y los reactivos necesarios para detectar el producto de la reacción de síntesis. De acuerdo con la realización preferida de la presente invención, los reactivos necesarios para una reacción pueden suministrarse de modo que están fraccionados en tubos de reacción.

45 Breve Descripción de las Figuras

La Fig. 1 muestra un esquema de la amplificación por el método LAMP.

La Fig. 2 muestra un esquema de la amplificación por el método LAMP.

La Fig. 3 muestra la intensidad de la fluorescencia de cada solución de reacción cuando se lleva a cabo la reacción LAMP en presencia de bromuro de etidio, seguido de la adición de un reductor o un oxidante.

La Fig. 4 muestra la intensidad de la fluorescencia de cada reacción de la solución cuando se lleva a cabo la reacción LAMP en presencia de naranja de acridina, seguido de la adición de un reductor o un oxidante.

La Fig. 5 muestra la intensidad de la fluorescencia de cada solución de reacción cuando se lleva a cabo la reacción LAMP añadiendo el segundo agente intercalante además al bromuro de etidio.

La Fig. 6 muestra la intensidad de la fluorescencia de cada solución de reacción cuando se lleva a cabo la reacción LAMP añadiendo el segundo agente intercalante en adición al naranja de acridina.

La Fig. 7 muestra la intensidad de la fluorescencia de cada solución de reacción cuando se lleva a cabo la reacción LAMP añadiendo azul de metileno como segundo agente intercalante a YO-PRO-1.

La Fig. 8 muestra la absorbancia de cada solución de reacción cuando se lleva a cabo la reacción LAMP añadiendo

azul de metileno y Acid Orange 7.

Esta descripción incluye parte o todo el contenido descrito en la descripción de la Solicitud de la Patente Japonesa N° 2001-183716, que es un documento prioritario de la presente solicitud.

El Mejor Modo para Llevar a cabo la Invención

La presente invención se describirá con más detalle en referencia a los siguientes ejemplos, aunque el campo técnico de la presente invención no se limita a estos ejemplos.

[Ejemplo 1] Efecto de un oxidante o de un reductor en la detección del producto de la reacción LAMP usando bromuro de etidio

(1) Amplificación de ácidos nucleicos mediante el método LAMP

Tabla 1: Composición de la solución de reacción
Composición de la solución de reacción (en 25 µl)
Tris-HCl 20 mM pH 8,8
KCl 10 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄ 10 mM
MgSO ₄ 4 mM
Tween 20 al 0,1%
dNTP 0,4 mM
8 U polimerasa de DNA Bst (NEB)
cebador FA 1,6 µM
cebador RA 1,6 µM
cebador F3 0,4 µM
cebador R3 0,4 µM

A la solución de reacción anterior, se añadieron 6×10^{-20} mol del DNA de antígeno específico de próstata (PSA) como molde para la reacción LAMP y bromuro de etidio (BrEt, 0,5 µl/ml) para detectar los productos de amplificación. La amplificación se llevó a cabo entonces a 65°C durante 30 minutos. La solución de reacción a la que se añadió el DNA molde se determinó que era una solución de reacción positiva, y la solución de reacción sin la adición de DNA

molde se determinó que era una solución de reacción negativa. En esta amplificación, la siguiente secuencia (Id. de Sec. N°: 1) incluida en el molde se determinó que era un polinucleótido de interés.

**5'-TGCTTGTGGCCTCTCGTGGCAGGGCAGTCTGCGGCGGTGTTCTGGTGCACCC
 CCAAGTGGGTCCTCACAGCTGCCCACTGCATCAGGAAACAAAAGCGTGATCTTGC
 TGGGTCGGCACAGCCTGTTTCATCCTGAAGACACAGGCCAGGTATTTACAGGTC
 AGCCACAGCTTCACACACCC-3'**

Los cebadores internos (cebador FA y cebador RA) y cebadores externos (cebador F3 y cebador R3) en la solución de reacción se diseñaron como sigue basándose en la secuencia de nucleótidos que se muestra en Id. de Sec. N°: 1.

[Cebadores internos]

Cebador FA

5'-TGTTCTGATGCAGTGGGCAGCTTTAGTCTGCGGCGGTGTTCTG-3' (Id. de Sec. N°: 2)

Cebador RA

5'-TGCTGGGTCGGCACAGCCTGAAGCTGACCTGAAATACCTGGCCTG-3' (Id. de Sec. N°: 3)

[Cebadores externos]

Cebador F3

5'-TGCTTGTGGCCTCTCGTG-3' (Id. de Sec. N°: 4)

Cebador R3

5'-GGGTGTGTGAAGCTGTG-3' (Id. de Sec. N°: 5)

(2) Oxidación o reducción

5 Las soluciones de reacción positiva y negativa después de la amplificación se sometieron a oxidación o reducción. Específicamente, la oxidación se llevó a cabo añadiendo hipoclorito sódico (NaClO) a ambas soluciones de reacción a concentraciones de 2,8% y manteniendo la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas. La reducción se llevó a cabo añadiendo borohidruro sódico (NaBH₄) 4 mM e hidróxido sódico (NaOH) 0,4 mM a ambas soluciones de reacción y manteniendo la mezcla en hielo durante 10 minutos. Tras la reacción, se analizó la intensidad de la fluorescencia de cada solución de reacción usando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7700 (PE Applied Biosystems) a una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de ensayo de 605 nm.

15 Los resultados del ensayo se muestran en la Fig. 3. En el caso de las soluciones de reacción que no se sometieron a oxidación o reducción (BrEt en la Fig. 3), la intensidad de la fluorescencia de la solución de reacción positiva era 3.012, y la de la solución de reacción negativa era 2.695. Es decir, que la diferencia en la intensidad de la fluorescencia que resulta de la presencia de ácidos nucleicos de doble cadena como productos de amplificación era de 317. Por el contrario, en el caso de las soluciones de reacción que estaban sometidas a oxidación usando hipoclorito sódico (BrEt+NaClO en la Fig. 3), la intensidad de la fluorescencia de la solución de reacción positiva era 1.784, y la de la solución de reacción negativa era 648. Es decir, que la diferencia en la intensidad de la fluorescencia que resulta de la presencia de ácidos nucleicos de doble cadena como productos de amplificación era tan elevada como 1.136. En el caso de las soluciones de reacción que estaban sometidas a reducción usando borohidruro sódico (BrEt+NaBH₄ en la Fig. 3), la intensidad de la fluorescencia de la solución de reacción positiva era 1.051, y la de la solución de reacción negativa era 218. Es decir, que la diferencia en la intensidad de la fluorescencia que resulta de la presencia de ácidos nucleicos de doble cadena como productos de amplificación era tan elevada como 833.

25 Por lo tanto, la sensibilidad para detectar los productos de amplificación de ácidos nucleicos de doble cadena usando bromuro de etidio puede aumentarse oxidando o reduciendo los productos de amplificación teñidos con bromuro de etidio.

30 [Ejemplo 2] Efecto de un oxidante o un reductor en la detección del producto de reacción LAMP usando naranja de acridina

35 Los efectos de un oxidante o un reductor en la eficiencia para detectar el producto de la reacción LAMP se examinaron bajo las mismas condiciones experimentales usadas en el Ejemplo 1, con la excepción de que se añadió naranja de acridina en lugar del bromuro de etidio y la longitud de onda del ensayo se fijó a 575 nm en la amplificación de los ácidos nucleicos descritos en el Ejemplo 1. Los resultados del ensayo se muestran en la Fig. 4. En el caso de las soluciones de reacción que no se sometieron a oxidación o reducción (NA en la Fig. 4), la intensidad de la fluorescencia de la solución de reacción positiva era 7.053, y la de la solución de reacción negativa era 6.155. Es decir, que la diferencia en la intensidad de la fluorescencia que resulta de la presencia de ácidos nucleicos de doble cadena como productos de amplificación era 898. Por el contrario, en el caso de las soluciones de reacción que se sometieron a oxidación usando hipoclorito sódico (NA+NaClO en la Fig. 4), la intensidad de la fluorescencia de la solución de reacción positiva era 5.521, y la de la solución de reacción negativa era 201. Es decir, que la diferencia en la intensidad de la fluorescencia que resulta de la presencia de ácidos nucleicos de doble cadena como productos de amplificación era tan elevada como 5.320. En el caso de las soluciones de reacción que se sometieron a reducción usando borohidruro sódico (NA+NaBH₄ en la Fig. 4), la intensidad de la fluorescencia de la solución de reacción positiva era 6.214, y la de la solución de reacción negativa era 596. Es decir, que la diferencia en la intensidad de la fluorescencia que resulta de la presencia de ácidos nucleicos de doble cadena como productos de amplificación era tan elevada como 5.618.

50 Por lo tanto, la sensibilidad para detectar los productos de amplificación de ácidos nucleicos de doble cadena usando naranja de acridina puede aumentarse oxidando o reduciendo los productos de amplificación teñidos con naranja de acridina.

55 [Ejemplo 3] Efecto de otro agente intercalante en la detección del producto de la reacción LAMP usando bromuro de etidio

60 La reacción LAMP se llevó a cabo bajo las mismas condiciones de reacción del Ejemplo 1 con la excepción de que, además de bromuro de etidio, se añadieron azul de metileno 20 µM, actinomicina D 1 µg/ml, o SYBR Green 2 diluido 100.000 veces (Molecular Probes) como segundo agente intercalante. Por lo tanto, se analizaron los efectos de cada segundo agente intercalante mencionado anteriormente en la eficiencia de detección del producto de reacción LAMP. Los resultados se muestran en la Fig. 5. En el caso de las soluciones de reacción a las que no se añadió el segundo agente intercalante además del bromuro de etidio (BrEt en la Fig. 5), la intensidad de la fluorescencia de la solución de reacción positiva era 3.085, y la de la solución de reacción negativa era 2.701. Es decir, que la diferencia en la intensidad de la fluorescencia que resulta de la presencia de ácidos nucleicos de doble cadena como productos de amplificación era 384. Por el contrario, en el caso de las soluciones de reacción a las que se añadió

65

azul de metileno (BrEt+AM en la Fig. 5), la intensidad de la fluorescencia de la solución de reacción positiva era 860, y la de la solución de reacción negativa era 116. Es decir, que la diferencia en la intensidad de la fluorescencia que resulta de la presencia de ácidos nucleicos de doble cadena como productos de amplificación era tan elevada como 744. En el caso de las soluciones de reacción a las que se añadió actinomicina D (BrEt+AD en la Fig. 5), la intensidad de la fluorescencia de la solución de reacción positiva era 3.158, y la de la solución de reacción negativa era 2.322. Es decir, que la diferencia en la intensidad de la fluorescencia que resulta de la presencia de ácidos nucleicos de doble cadena como productos de amplificación era tan elevada como 836. Además, en el caso de las soluciones de reacción a las que se añadió SYBR Green 2 (BrEt+SYBR-G en la Fig. 5), la intensidad de la fluorescencia de la solución de reacción positiva era 2.822, y la de la solución de reacción negativa era 2.268. Es decir, que la diferencia en la intensidad de la fluorescencia que resulta de la presencia de ácidos nucleicos de doble cadena como productos de amplificación era tan elevada como 554.

Por lo tanto, la sensibilidad para detectar productos de amplificación de ácidos nucleicos de doble cadena usando bromuro de etidio puede aumentarse realizando la reacción LAMP en presencia del segundo agente intercalante junto con el bromuro de etidio.

[Ejemplo 4] Efecto de otro agente intercalante en la detección del producto de la reacción LAMP usando naranja de acridina

La reacción LAMP se llevó a cabo bajo las mismas condiciones de la reacción del Ejemplo 1 con la excepción de que, además del naranja de acridina que se añadió en lugar del bromuro de etidio, se añadió azul de metileno 20 μM , actinomicina D 1 $\mu\text{g/ml}$, o SYBR Green 2 diluido 100.000 veces (Molecular Probes) como segundo agente intercalante y la longitud de onda del ensayo se fijó a 575 nm. Por lo tanto, se analizó el efecto de cada agente intercalante en la eficiencia de detección del producto de reacción LAMP. Los resultados se muestran en la Fig. 6. En el caso de las soluciones de reacción a las que no se añadió el segundo agente intercalante además del naranja de acridina (NA en la Fig. 6), la intensidad de la fluorescencia de la solución de reacción positiva era 7.121, y la de la solución de reacción negativa era 6.195. Es decir, que la diferencia en la intensidad de la fluorescencia que resulta de la presencia de ácidos nucleicos de doble cadena como productos de amplificación era 926. Por el contrario, en el caso de las soluciones de reacción a las que se añadió azul de metileno (NA+AM en la Fig. 6), la intensidad de la fluorescencia de la solución de reacción positiva era 3.500, y la de la solución de reacción negativa era 350. Es decir, que la diferencia en la intensidad de la fluorescencia que resulta de la presencia de ácidos nucleicos de doble cadena como productos de amplificación era tan elevada como 3.150. En el caso de las soluciones de reacción a las que se añadió actinomicina D (NA+AD en la Fig. 6), la intensidad de la fluorescencia de la solución de reacción positiva era 7.368, y la de la solución de reacción negativa era 4.762. Es decir, que la diferencia en la intensidad de la fluorescencia que resulta de la presencia de ácidos nucleicos de doble cadena como productos de amplificación era tan elevada como 2.606. Además, en el caso de las soluciones de reacción a las que se añadió SYBR Green 2 (NA+SYBR-G en la Fig. 6), la intensidad de la fluorescencia de la solución de reacción positiva era 9.435, y la de la solución de reacción negativa era 4.721. Es decir, que la diferencia en la intensidad de la fluorescencia que resulta de la presencia de ácidos nucleicos de doble cadena como productos de amplificación era tan elevada como 4.714.

Por lo tanto, la sensibilidad para detectar productos de la amplificación de ácidos nucleicos de doble cadena usando naranja de acridina puede aumentarse realizando la reacción LAMP en presencia del segundo agente intercalante junto con el naranja de acridina.

[Ejemplo 5] Efecto del azul de metileno en la detección del producto de la reacción LAMP usando YO-PRO-1

La reacción LAMP se llevó a cabo bajo las mismas condiciones de reacción del Ejemplo 3 con la excepción de que se añadieron YO-PRO-1 1 $\mu\text{g/ml}$ y azul de metileno 10 μM como segundos agentes intercalantes en lugar del bromuro de etidio. Por lo tanto, se analizó el efecto del azul de metileno en la eficiencia de detección del producto de la reacción LAMP usando YO-PRO-1. La intensidad de la fluorescencia se analizó usando 20 μl de la solución de reacción tras la amplificación y un lector de placas (Polarion, Tecan) a una longitud de onda de excitación de 485 nm, a una longitud de onda de ensayo de 535 nm y a 25°C. Los resultados del ensayo se muestran en la Fig. 7.

En el caso de las soluciones de reacción a las que no se añadió azul de metileno (YO-PRO-1 en la Fig. 7), la intensidad de la fluorescencia de la solución de reacción positiva era 39.194, y la de la solución de reacción negativa era 34.047. Es decir, que la diferencia en la intensidad de la fluorescencia que resulta de la presencia de ácidos nucleicos de doble cadena como productos de amplificación era de 5.147.

Por el contrario, en el caso de las soluciones de reacción a las que se añadió azul de metileno (YO-PRO-1+AM en la Fig. 7), la intensidad de la fluorescencia de la solución de reacción positiva era 33.596 y la de la solución de reacción negativa era 13.592. Es decir, que la diferencia en la intensidad de la fluorescencia que resulta de la presencia de ácidos nucleicos de doble cadena como productos de amplificación era tan elevada como 20.004.

Por lo tanto, la sensibilidad para detectar los productos de la amplificación de ácidos nucleicos de doble cadena usando YO-PRO-1 pueden aumentarse realizando la reacción LAMP en presencia de azul de metileno como segundo agente intercalante junto con YO-PRO-1.

[Ejemplo 6] Efecto de un compuesto que forma complejos en la detección del producto de la reacción LAMP usando azul de metileno

5 Se mezclan el azul de metileno y el Acid Orange 7 en una solución acuosa. Esto forma un complejo. Tras la formación del complejo, varía el espectro de absorción del azul de metileno y el del Acid Orange 7 (AdO). Por lo tanto, la formación de un complejo puede confirmarse analizando el espectro de absorción.

10 Se añadieron azul de metileno 500 μ M o una solución mezcla de azul de metileno y AdO (500 μ M de cada uno; el azul de metileno forma un complejo con AdO) a la solución de reacción LAMP, y la mezcla se sometió a una amplificación de ácidos nucleicos de la misma manera que en el Ejemplo 1. La absorbancia de la solución de reacción después de la amplificación se analizó usando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2200 (usando una cubeta de 10 mm) a una longitud de onda de ensayo de 680 nm. Los resultados del ensayo se muestran en la Fig. 8. En el caso de las soluciones de reacción a las que no se añadió AdO (AM en la Fig. 8), la absorbancia de la solución de reacción positiva era 0,75 y la de la solución de reacción negativa era 0,71. Es decir, que la diferencia en la absorbancia que resulta de la presencia de ácidos nucleicos de doble cadena como productos de amplificación era 0,04. Por el contrario, en el caso de las soluciones de reacción a las que se añadió AdO (AM+AdO en la Fig. 8), la absorbancia de la solución de reacción positiva era 0,46 y la de la solución de reacción negativa era 0,38. Es decir, que la diferencia en la absorbancia que resulta de la presencia de ácidos nucleicos de doble cadena como productos de amplificación era 0,08.

20 Esto indica que AdO reguló la inserción de azul de metileno en el DNA. Más específicamente, la inserción del azul de metileno en el DNA de cadena sencilla es débil y por lo tanto se inhibe con AdO. Por el contrario, la inserción de azul de metileno en el DNA de cadena doble es fuerte y no puede inhibirse con AdO. Por lo tanto, se considera que el azul de metileno se libera de un complejo.

25 Por consiguiente, un enlace de un agente intercalante a los ácidos nucleicos de cadena sencilla se inhibe preferiblemente por la formación de un complejo además de por oxidación o reducción. Por lo tanto, puede aumentarse la sensibilidad para detectar los productos de la amplificación de ácidos nucleicos de doble cadena.

30 Aplicabilidad Industrial

35 La presente invención proporciona los medios para detectar eficientemente los productos de la amplificación de ácidos nucleicos de doble cadena. En particular, la aplicación de la presente invención para detectar productos de la amplificación de ácidos nucleicos por el método LAMP puede reducir efectivamente los ruidos de fondo, que derivan de ácidos nucleicos de cadena sencilla y son causados por el uso de gran cantidad de cebadores en comparación con el caso de la PCR.

Texto libre de listado de Secuencias

40 Id. de Sec. Nº: 1; DNA sintético
 Id. de Sec. Nº: 2; DNA sintético
 Id. de Sec. Nº: 3; DNA sintético
 Id. de Sec. Nº: 4; DNA sintético
 Id. de Sec. Nº: 5; DNA sintético

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA

5

<120> Método eficiente para la detección de ácidos nucleicos de doble cadena

<130> PE 200314

<150> JP 2001-183716

10

<151> 2001-06-18

<160> 5

15

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 178

20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: DNA sintético

<400> 1

30

<210> 2

```
tgcttgtggc ctctcgtggc agggcagtct gcggcgggtgt tctggtgcac ccccagtggg 60
tcctcacagc tgcccactgc atcaggaaca aaagcgtgat cttgctgggt cggcacagcc 120
tgtttcatcc tgaagacaca ggccaggtat ttcaggtcag ccacagcttc acacaccc 178
```

<211> 44

35

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

40

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: DNA sintético

<400> 2

45

tgttctgat gcagtgggca gcttagtct gcggcgggtgt tctg 44

<210>

<211> 45

50

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

55

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: DNA sintético

<400> 3

tgctgggtcg gcacagcctg aagctgacct gaaatacctg gcctg 45

<210> 4

5 <211> 18

<212> DNA

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: DNA sintético

15 <400> 4

tgcttggtgc ctctcgtg 18

<210> 5

20 <211> 17

<212> DNA

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: DNA sintético

30 <400> 5

gggtgtgtga agctgtg 17

REIVINDICACIONES

1. Un equipo para detectar ácidos nucleicos de doble cadena que comprenden, como elementos:

- 5 -un grupo de cebadores para la amplificación isotérmica mediada por lazos (LAMP), que comprende:
un primer cebador directo que contiene una secuencia F2, que es complementaria a una secuencia arbitraria de F2c,
y,
en el extremo 5' de F2, una secuencia arbitraria F1c,
un segundo cebador directo que contiene una secuencia F3 que es complementaria a una secuencia arbitraria F3c,
10 un primer cebador reverso que contiene una secuencia arbitraria R2 y, en el extremo 5' de R2, una secuencia R1c,
que es complementaria a una secuencia arbitraria R1, y
un segundo cebador reverso que contiene una secuencia arbitraria R3,

15 en la que la primera secuencia arbitraria de F1c, la segunda secuencia arbitraria de F2c, y la tercera secuencia arbitraria de F3c son seleccionables, en este orden, desde el extremo 3' en una región diana hacia el extremo 3' de la cadena de polinucleótidos que constituye un ácido nucleico a detectar y la cuarta secuencia arbitraria de R1, la quinta secuencia arbitraria de R2, y la sexta secuencia arbitraria de R3 son seleccionables, en este orden, desde el extremo 5' en la región diana hacia el extremo 5' de dicha cadena de polinucleótidos,

- 20 -una síntesis de tipo de desplazamiento de cadenas catalizada por polimerasa de cadenas complementarias,
-un nucleótido que sirve como sustrato para la síntesis de cadenas complementarias,
-un intercalante, seleccionado de entre el grupo que consiste en: bromuro de etidio, naranja de acridina, TO-PRO-1,
y YOPRO-1, y
-un compuesto que reacciona más preferiblemente con un intercalante unido a un ácido nucleico de cadena sencilla
25 que con un intercalante unido a un ácido nucleico de doble cadena, en el que dicho compuesto es un oxidante
seleccionado del grupo que consiste en: hipoclorito sódico, peróxido de hidrógeno, y permanganato de potasio.

2. Un equipo para detectar ácidos nucleicos de doble cadena que comprenden, como elementos:

- 30 -un intercalante, seleccionado de entre el grupo que consiste en: bromuro de etidio, naranja de acridina, TO-PRO-1,
y YOPRO-1, y
-un compuesto que reacciona más preferiblemente con un intercalante unido a un ácido nucleico de cadena sencilla
que con un intercalante unido a un ácido nucleico de doble cadena, en el que dicho compuesto es un reductor
35 seleccionado del grupo que consiste en: borhidruro sódico y cianoborhidruro sódico.

3. Un equipo para detectar ácidos nucleicos de doble cadena que comprenden, como elementos:

- un grupo de cebadores para la amplificación isotérmica mediada por lazos (LAMP), que comprenden:
40 un primer cebador directo que contiene una secuencia de F2, que es complementaria a una secuencia arbitraria de F2c, y, en el extremo 5' de F2, una secuencia arbitraria de F1c,
un segundo cebador directo que contiene una secuencia de F3 que es complementaria a una secuencia arbitraria de F3c,
un primer cebador reverso que contiene una secuencia arbitraria de R2 y, en el extremo 5' de R2, una secuencia R1c, que es complementaria a una secuencia arbitraria de R1, y
45 un segundo cebador reverso que contiene una secuencia arbitraria de R3,

50 en la que la primera secuencia arbitraria de F1c, la segunda secuencia arbitraria de F2c, y la tercera secuencia arbitraria de F3c son seleccionables, en este orden, desde el extremo 3' en una región diana hacia el extremo 3' de la cadena de polinucleótidos que constituye un ácido nucleico a detectar y la cuarta secuencia arbitraria de R1, la quinta secuencia arbitraria de R2, y la sexta secuencia arbitraria de R3 son seleccionables, en este orden, desde el extremo 5' en la región diana hacia el extremo 5' de dicha cadena de polinucleótidos,

- una síntesis de tipo de desplazamiento de cadena catalizado por polimerasa de cadenas complementarias,
-un nucleótido que sirve como sustrato para la síntesis de cadenas complementarias,
55 -un intercalante, seleccionado de entre el grupo que consiste en: bromuro de etidio, naranja de acridina, TO-PRO-1,
y YOPRO-1, y
-un compuesto que está unido a un ácido nucleico de cadena sencilla más fuertemente que un intercalante y que
está unido a un ácido nucleico de doble cadena más débilmente que un intercalante, en el que dicho compuesto es
un segundo intercalante seleccionado del grupo que consiste en: azul de metileno, actinomicina D, SYBR Green 2, y
60 OliGreen.

Fig. 1

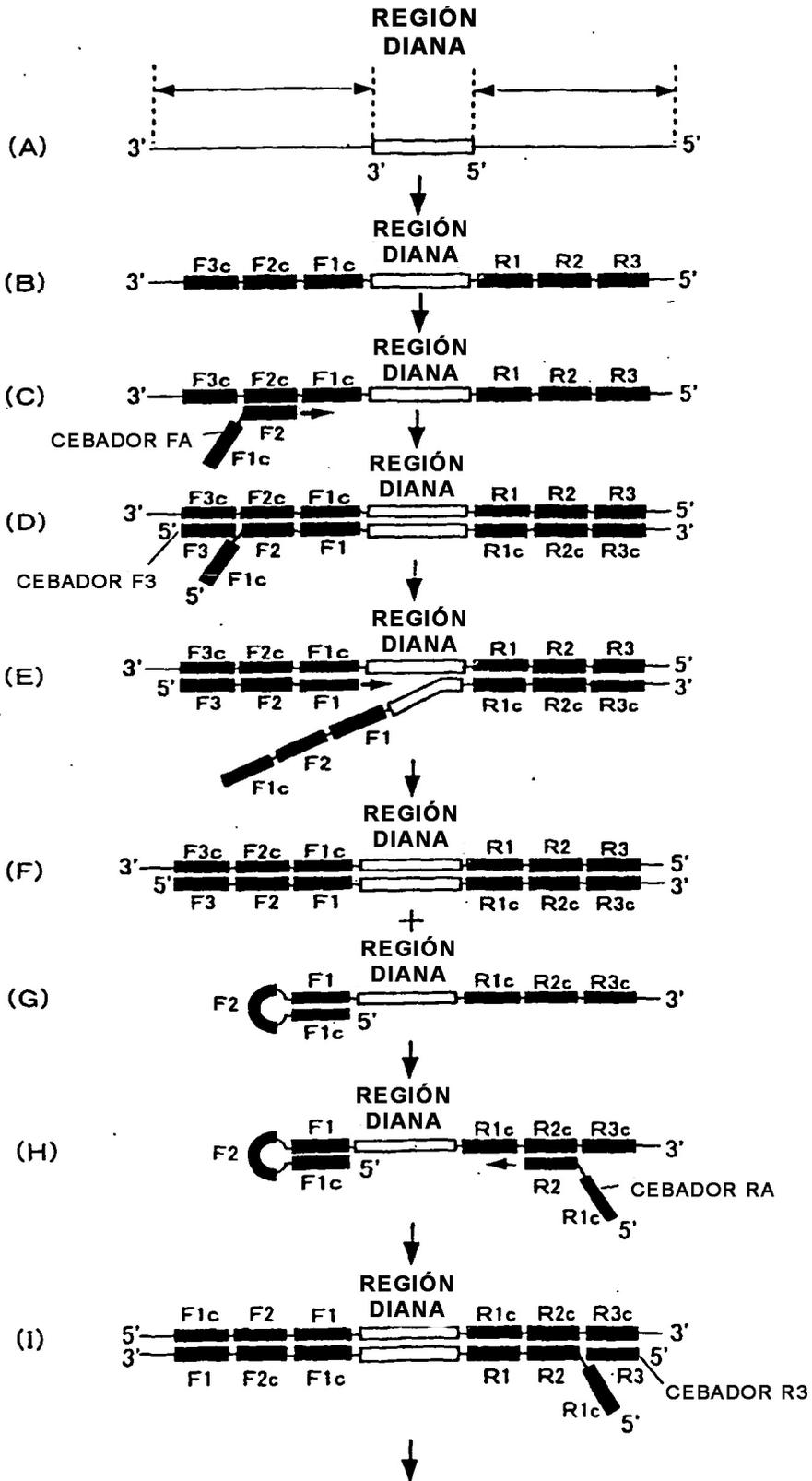


Fig. 2

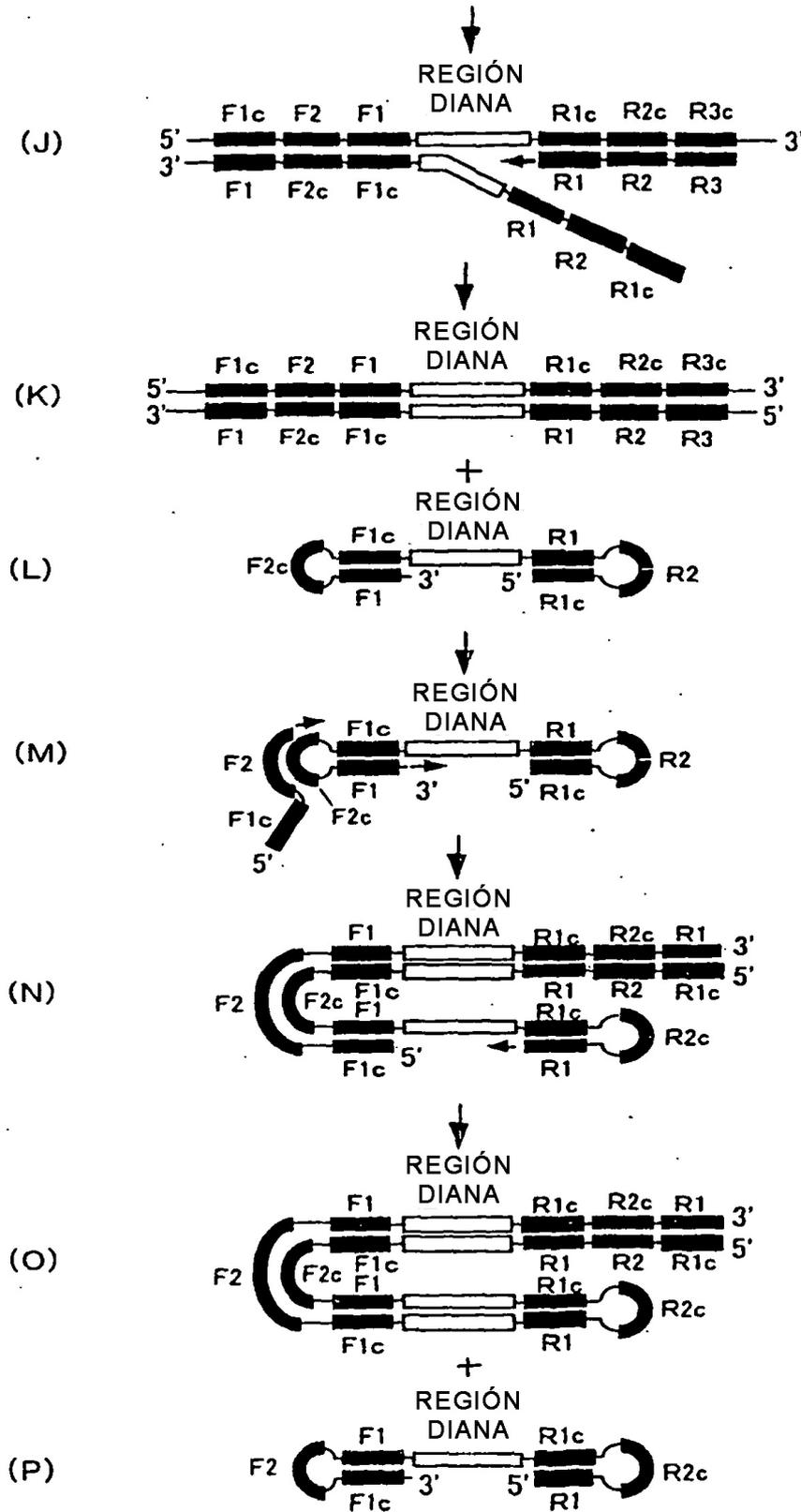


Fig. 3

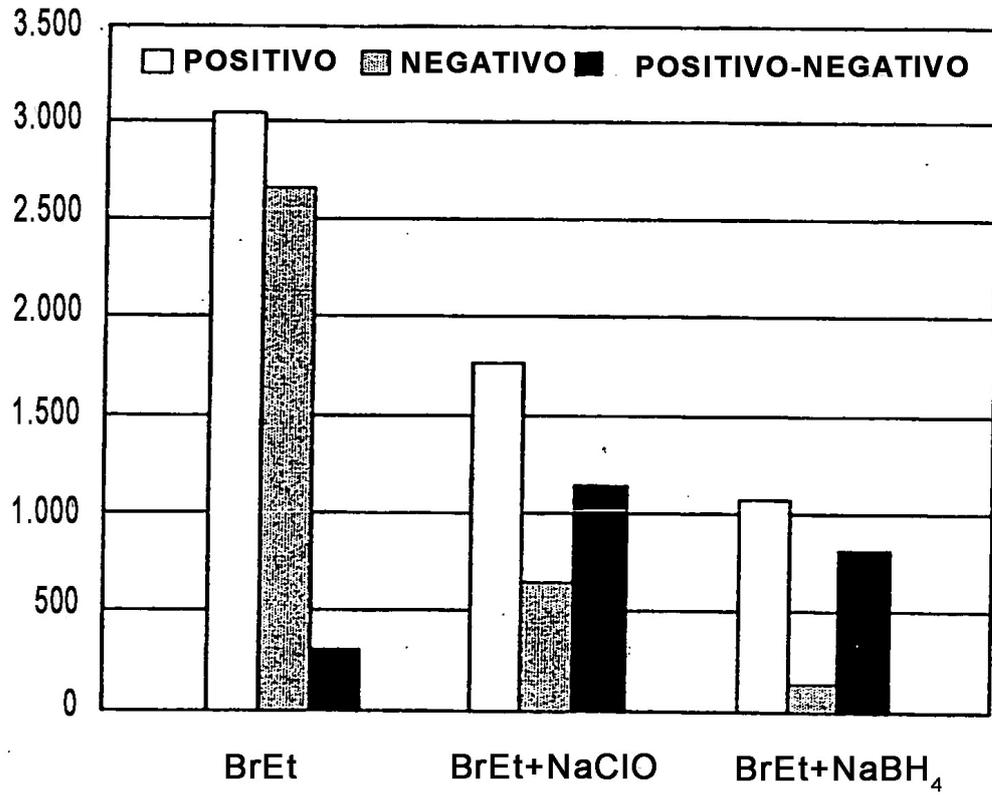


Fig. 4

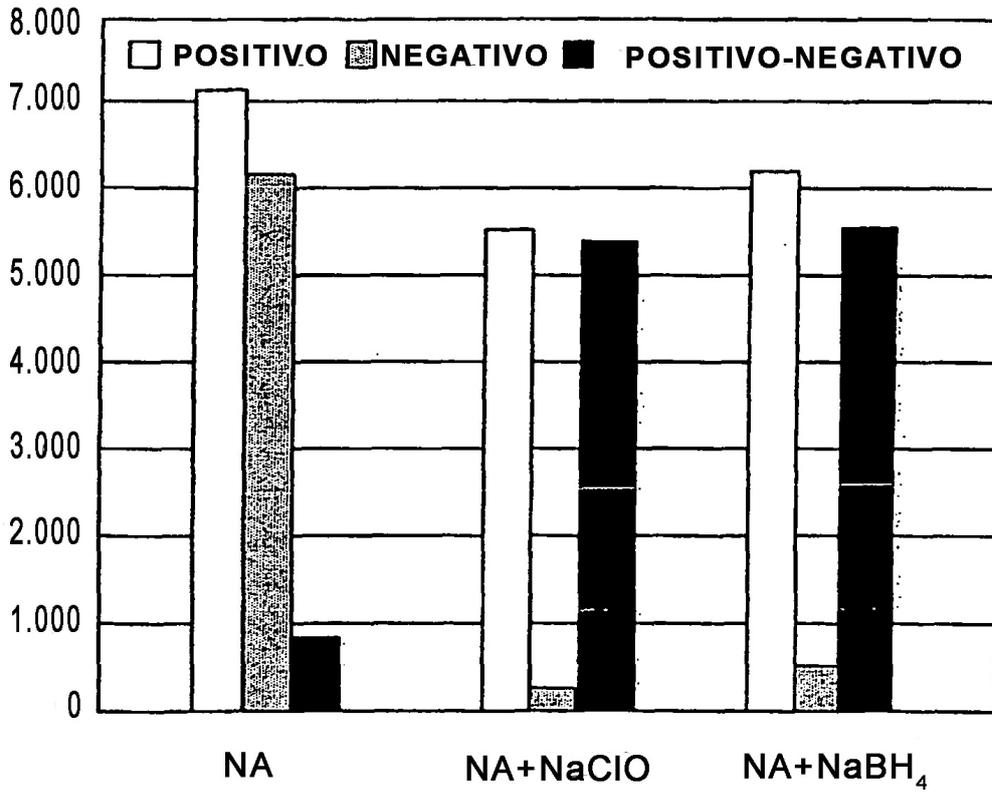


Fig. 5

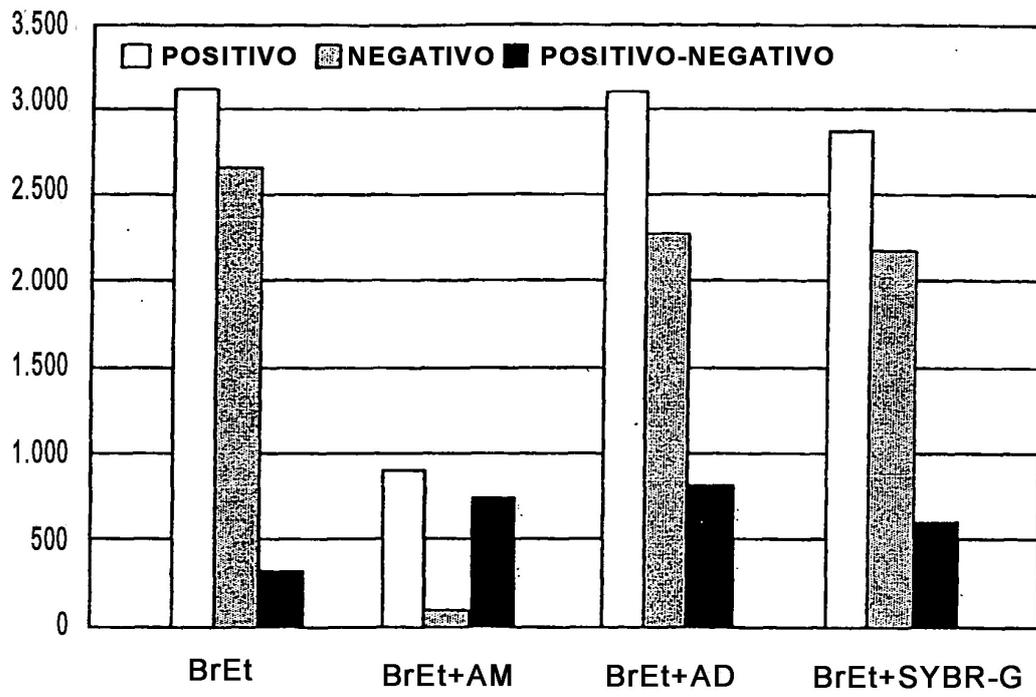


Fig. 6

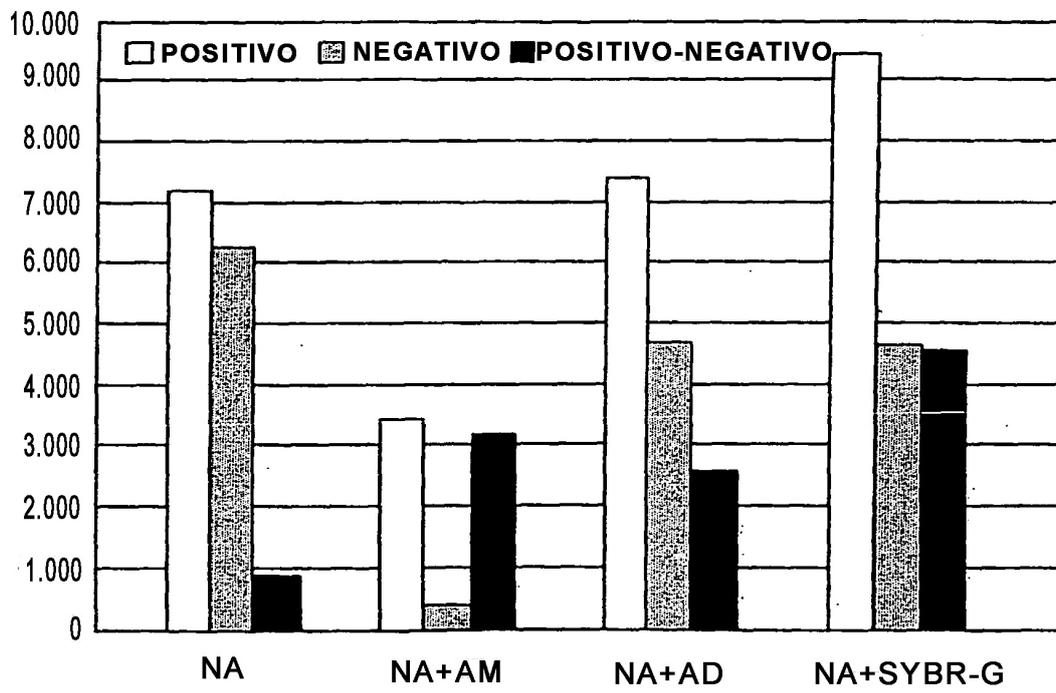


Fig. 7

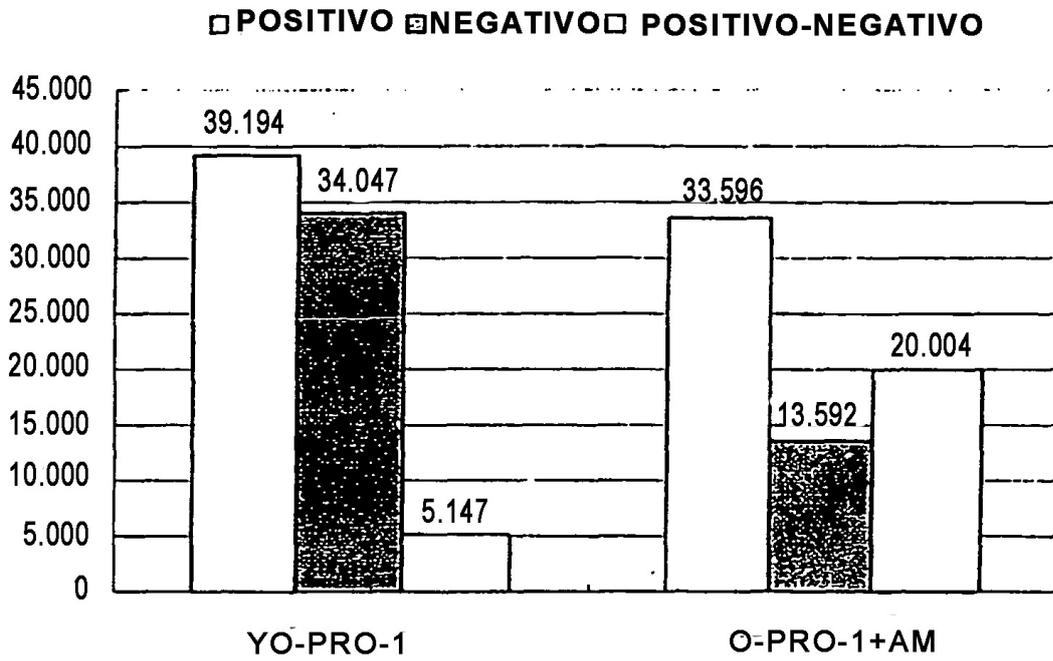


Fig. 8

