

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 868**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09007530 .0**
96 Fecha de presentación: **13.02.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **2107113**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.10.2009**

54 Título: **Cebadores para amplificación de ácido nucleico en la detección ARNm de gen constitutivo y método de ensayo que usa estos cebadores**

30 Prioridad:
20.02.2002 JP 2002043866
20.02.2002 JP 2002043867

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.06.2012

73 Titular/es:
SYSMEX CORPORATION
5-1, WAKINOHAMA-KAIGANDORI 1-CHOME
CHUO-KU
KOBE-SHI, HYOGO 651-0073, JP

72 Inventor/es:
Tada, Sachiyo

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 382 868 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

Cebadores para amplificación de ácido nucleico en la detección de ARNm de gen constitutivo y método de ensayo que usa estos cebadores.

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a cebadores para amplificación de ácido nucleico para detectar un gen constitutivo.

Antecedentes de la técnica

Debido a avances recientes en los campos de ingeniería genética y biología molecular, se pueden diagnosticar enfermedades infecciosas o genéticas a nivel de ADN o ARN. En particular, debido al desarrollo de métodos de amplificación de ácido nucleico, incluyendo el método de la reacción en cadena de polimerasa (método de PCR: Science, 230: 1350-1354, 1985) y el método NASBA (método de Amplificación de Ácido Nucleico en base a Secuencia: Nature, 350, 91-92, 1991; Patente japonesa N° 2648802 y Patente japonesa N° 2650159), la detección de una cantidad infinitesimal de ácido nucleico presente en una muestra biológica, que ha sido difícil hasta ahora, se ha vuelto posible, facilitando enormemente de ese modo los análisis genéticos.

10 Por ejemplo, en el campo de oncología, el diagnóstico de metástasis tumoral a los ganglios linfáticos es de enorme importancia. Como un enfoque al diagnóstico de metástasis tumoral a ganglios linfáticos, existe un método para la detección de proteína marcadora de tumor tal como citoqueratina (CK). Debido al desarrollo reciente de tecnología de análisis genético, la detección de expresión de ARNm de proteína marcadora de tumor ha permitido el diagnóstico eficaz de tumor (The Hokkaido journal of medical science, vol. 66(2), págs. 135-141, 1991). La RT-PCR ha permitido la detección de expresión de ARNm de CK en tejido extirpado y el subdiagnóstico de metástasis tumoral se puede evitar en cierta medida. Estos métodos de amplificación de ácido nucleico se han puesto en práctica en el campo del diagnóstico de tumor y cáncer (Manual of Clinical Laboratory Medicine, 31ª ed., Kanehara & Co., Ltd., publicado el 20 de septiembre de 1998).

Como otro método de amplificación de ADN, se ha informado el método LAMP (Documento de Patente 1). El método LAMP es un método de amplificación génica que se usa cebadores múltiples incluyendo aquellos que forman una estructura de horquilla en los extremos del producto amplificado a medida que avanza la reacción de desplazamiento de cadena. En primer lugar, en la reacción primaria, se sintetiza una estructura similar a pesa con bucles en ambos extremos a partir de ADN de molde usando un par de cebadores internos (FIP y RIP), un par de cebadores externos (cebadores F3 y R3) y ADN polimerasa de desplazamiento de cadena. Esta estructura sirve como la estructura de partida para el ciclo de amplificación y las reacciones de alargamiento y síntesis avanzan desde el extremo 3' de la estructura usándola a ella misma como un molde. El producto amplificado está compuesto de varias estructuras de repetición, cada unidad de las cuales comprende, dentro de la cadena, las regiones complementarias enlazadas en la dirección invertida que se obtienen a partir de las secuencias de nucleótidos de ácidos nucleicos de doble cadena que corresponden a la región amplificada entre los cebadores. El método LAMP tiene como características que la desnaturalización por calor de cadenas dobles a cadenas sencillas no es necesaria y que todas las reacciones de amplificación pueden avanzar de forma consecutiva a una temperatura fija (Documentos no de Patente 1 y 2). De forma similar, cuando el molde es ARN, la estructura de partida se puede sintetizar añadiendo transcriptasa inversa a la composición de la solución de reacción para molde de ADN y se puede conducir la amplificación (método RT-LAMP). El método LAMP proporciona una cantidad suficiente de producto de amplificación para la detección en aproximadamente 30 minutos. Por tanto, este método se puede aplicar al diagnóstico de metástasis tumoral a ganglios linfáticos con los fines de la determinación rápida de la estrategia terapéutica, debido a que el tiempo necesario para la detección de ácidos nucleicos es reducido. Este método también es prometedor para la aplicación a diagnóstico intraoperatorio, ya que el mismo puede dar resultados rápidos.

45 Para cuantificar ARNm, el ARNm de un gen constitutivo, cuyo nivel de expresión no difiere entre tejidos, se puede usar como un control interno en la muestra. El uso del ARNm de gen constitutivo como un control interno tiene la ventaja de ser capaz de detectar ARNm del gen diana de una manera relativa independientemente de la eficacia de extracción del ARNm del gen diana o la eficacia de síntesis de ADNc.

Los ejemplos del gen constitutivo incluyen el gen de β -actina, un componente del citoesqueleto y gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (denominada en lo sucesivo en el presente documento "GAPDH"), una enzima principal en el sistema de glicólisis.

El desarrollo de cebadores más eficaces para amplificación de ácido nucleico se desea con respecto a los genes constitutivos usados con los fines de control interno.

(Gen de β -actina)

La actina es una proteína que se encuentra de forma abundante en todas las células eucariotas. Esta proteína proporciona varias funciones estructurales y reguladoras, incluyendo el papel en mitosis, motilidad y la integridad de la estructura de células eucariotas superiores. Se han identificado seis isoformas de actina en los vertebrados; cuatro de ellas son de actina de músculo (actinas de músculo esquelético, músculo cardíaco, músculo liso aórtico y

5 músculo liso de estómago) y dos de ellas son de actina no muscular (β y γ -actina citoplasmática). Las actinas de músculo se expresan de forma específica de tejido y están implicadas en la contracción muscular. Por el contrario, las actinas citoplasmáticas se encuentran, en principio, en todas las células y están implicadas en varias funciones celulares. A pesar de su diversidad, las secuencias de aminoácidos de la actina intracelular están altamente conservadas en tres diferentes tipos de actina y entre especies de eucariotas.

10 La secuencia del gen de β -actina citoplasmática humano ya se ha determinado y comparado con las secuencias de genes de β -actinas obtenidos a partir de otras especies (Nakajima-Iijima *et al.*, PNAS 82, págs. 6133-6137 (1985); Solicitud de Patente EP Nº 0174608; Ponte *et al.*, 1984, Nucleic Acids Res. 12, págs. 1687-1696 (1984)). Los cebadores para amplificación del gen de β -actina humano completo están disponibles en el mercado en Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA) con el nombre de MAPPING Amplimershito para β -actina. También, con respecto a

15 los oligonucleótidos que se hibridan con la secuencia de nucleótidos de β -actina humana de una manera específica de especie, se ha informado que esos oligonucleótidos se usan como controles internos en la reacción para amplificación de ácido nucleico y herramientas para determinar la integridad de las muestras usadas para la amplificación de ácido nucleico (documento JP, H7-99981-A). El documento WO 94/17086 (Apollon, Inc.; Yoon Kyonggeun; Lu Meiqing; 1994-08-04) divulga un par de cebadores de PCR para detectar ARNm de β -actina.

20 (Gen de GAPDH)

La gliceraldehído-3-fosfato humana es uno de los intermediarios importantes implicados en el metabolismo de la glucosa, tal como glicólisis y ciclo de pentosa fosfato y lipogénesis en organismos vivos y esta sustancia está ampliamente distribuida en el organismo vivo. La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humana (GAPDH) también es necesaria para la síntesis de lípidos a partir de esta sustancia y esta enzima también está ampliamente

25 distribuida *in vivo* en seres humanos.

El desarrollo de cebadores más eficaces para amplificación de ácido nucleico se desea con respecto a β -actina y GAPDH, usados con el fin de control interno.

(Documento de Patente 1) Publicación Internacional: WO 00/28082 (folleto)

(Documento no de Patente 1) Bio-Venture, 2001, Vol. 1, Nº 1, págs. 109-115

30 (Documento no de Patente 2) BIO-INDUSTRY, 2001, Vol. 18, Nº 2, págs. 15-29

Divulgación de la invención

Un objeto de la presente divulgación es proporcionar cebadores para amplificación de ácido nucleico para detectar ARNm de genes constitutivos, particularmente cebadores novedosos para amplificación de ARNm para los genes de β -actina y GAPDH. La presente invención se define en y mediante las reivindicaciones adjuntas.

35 (Medios para resolver los problemas)

Para resolver el problema mencionado anteriormente, los presentes inventores condujeron revisión de investigación exhaustiva y tuvieron éxito en la construcción de cebadores para amplificación de ácido nucleico de genes constitutivos.

Por lo tanto, la presente divulgación comprende lo siguiente:

40 1. Un cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar un gen constitutivo y/o ARNm relacionado con un gen constitutivo mediante el método LAMP.

2. El cebador del punto precedente 1, en el cual el gen constitutivo es el gen de β -actina y/o el gen de GAPDH.

3. Un cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar β -actina, que comprende un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en:

45 1) un oligonucleótido que comprende al menos 5 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID Nº: 1 o la secuencia complementaria de la misma que se selecciona entre las regiones de los nucleótidos 240-380 y 401-1060 y/o las regiones complementarias a estas regiones;

2) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta como una cualquiera de SEC ID Nº: 2 y SEC ID Nº: 4-34;

50 3) un oligonucleótido complementario a uno cualquiera de los oligonucleótidos definidos en 1) o 2)

anteriormente;

4) un oligonucleótido capaz de hibridar al oligonucleótido definido en uno cualquiera de 1)-3) en condiciones rigurosas; y

5) un oligonucleótido que tiene la función de cebador, que comprende la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido definido en uno cualquiera de 1) a 4) anteriormente en el cual uno o más nucleótidos se mutan mediante sustitución, supresión, inserción o adición.

4. Un cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar β -actina, que comprende un oligonucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas como SEC ID N°: 10, 14-17 y 29-50.

5. Un cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar GAPDH, que comprende un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en:

1) un oligonucleótido que comprende al menos 5 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 51 o la secuencia complementaria de la misma que se selecciona entre la región de los nucleótidos 110-450 y/o la región complementaria a esta región;

2) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta como una cualquiera de SEC ID N°: 52-79;

3) un oligonucleótido complementario a uno cualquiera de los oligonucleótidos definidos en 1) o 2) anteriormente;

4) un oligonucleótido capaz de hibridar al oligonucleótido definido en uno cualquiera de 1)-3) en condiciones rigurosas; y

5) un oligonucleótido que tiene la función de cebador, que comprende la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido definido en uno cualquiera de 1) a 4) anteriormente en el cual uno o más nucleótidos se mutan mediante sustitución, supresión, inserción o adición.

6. Un cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar GAPDH, que comprende un oligonucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas como SEC ID N°: 58, 62-64 y 73-96.

7. El cebador para amplificación de ácido nucleico de uno cualquiera de 3 a 6 anteriormente, en el que el método para amplificación de ácido nucleico es el método LAMP.

8. Un conjunto de cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar β -actina, que se presenta mediante la selección de al menos dos cebadores a partir de los cebadores para amplificación de ácido nucleico que comprenden oligonucleótidos que tienen las secuencias de ácido nucleico seleccionadas entre el grupo que consiste en:

1) un oligonucleótido que comprende al menos 5 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 1 o la secuencia complementaria de la misma que se selecciona entre la región de nucleótidos 240-1060 y/o la región complementaria a esta región;

2) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta como una cualquiera de SEC ID N°: 2-34;

3) un oligonucleótido complementario a uno cualquiera de los oligonucleótidos definidos en 1) o 2) anteriormente;

4) un oligonucleótido capaz de hibridar al oligonucleótido definido en uno cualquiera de 1)-3) en condiciones rigurosas; y

5) un oligonucleótido que tiene la función de cebador, que comprende la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido definido en uno cualquiera de 1) a 4) anteriormente en el cual uno o más nucleótidos se mutan mediante sustitución, supresión, inserción o adición.

9. Un conjunto de cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar β -actina, que se presenta mediante la selección de al menos cuatro cebadores a partir de los cebadores para amplificación de ácido nucleico que comprende los oligonucleótidos de 8 anteriormente.

10. El conjunto de cebador para amplificación de ácido nucleico reivindicado en uno cualquiera de 8 y 9 anteriormente, que muestra que cada uno de al menos dos cebadores contenidos en el conjunto de cebador reconocen dos regiones de genes en la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 1 y/o la secuencia complementaria de la misma.

11. El conjunto de cebador para amplificación de ácido nucleico reivindicado en uno cualquiera de 9 y 10 anteriormente, que muestra que los cebadores contenidos en el conjunto de cebador reconocen al menos seis regiones de genes en la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 1 y/o la secuencia complementaria de la misma.
- 5 12. Un conjunto de cebador que comprende una combinación de cada uno de los cebadores seleccionados entre cada uno de (a) FIP: SEC ID N°: 35-42; (b) RIP: SEC ID N°: 43-50; (c) F3: SEC ID N°: 10 y 14-17 y (d) R3: SEC ID N°: 29-32, categorías que consisten en los cebadores para amplificación de ácido nucleico para detectar β -actina que comprenden los oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 10, 14-17, 29-32, 35-42 y 43-50.
- 10 13. El conjunto de cebador reivindicado en 12 anteriormente, que comprende además los oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 33 y 34.
14. Un conjunto de cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar GAPDH, que se presenta mediante la selección de al menos dos cebadores a partir de los cebadores para amplificación de ácido nucleico que comprende los oligonucleótidos definidos en 5 anteriormente.
- 15 15. Un conjunto de cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar GAPDH, que se presenta mediante la selección de al menos cuatro cebadores a partir de los cebadores para amplificación de ácido nucleico que comprende los oligonucleótidos definidos en 5 anteriormente.
- 20 16. El conjunto de cebador para amplificación de ácido nucleico reivindicado en uno cualquiera de 14 y 15 anteriormente, que muestra que al menos cada uno de los dos cebadores contenidos en el conjunto de cebador reconocen dos regiones de genes en la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 51 y/o la secuencia complementaria de la misma.
- 25 17. El conjunto de cebador para amplificación de ácido nucleico reivindicado en uno cualquiera de 14 a 16 anteriormente, que muestra que los cebadores contenidos en el conjunto de cebador reconocen al menos seis regiones de genes en la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 51 y/o la secuencia complementaria de la misma.
18. Un conjunto de cebador que comprende una combinación de cada cebador seleccionado entre cada uno de (a) FIP: SEC ID N°: 80-87 y (b) RIP: SEC ID N°: 88-96, categorías que consisten en los cebadores para amplificación de ácido nucleico para detectar GAPDH que comprende los oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 80-96.
- 30 19. El conjunto de cebador reivindicado en 18 anteriormente, que comprende además un oligonucleótido que tiene una de las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 58 o SEC ID N°: 62-64 y un oligonucleótido que tiene una cualquiera de las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 73-77.
20. El conjunto de cebador reivindicado en 18 ó 19 anteriormente, que comprende además, como cebadores, oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 78 y 79.
- 35 21. El conjunto de cebador reivindicado en uno cualquiera de 8 a 20 anteriormente, en el cual el método para amplificación de ácido nucleico es el método LAMP.
22. Un conjunto de cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar β -actina, que comprende uno cualquiera de los siguientes conjuntos de cebadores:
- 40 1) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 35, 43, 14 y 29 como cebadores;
- 2) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 36, 44, 15 y 30 como cebadores;
- 3) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 37, 45, 10 y 31 como cebadores;
- 45 4) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 41, 50, 17 y 32 como cebadores;
- 5) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 38, 45, 10 y 31 como cebadores;
- 50 6) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 39, 45, 10 y 31 como cebadores;
- 7) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos

- expuestas como SEC ID N°: 40, 45, 16 y 31 como cebadores;
- 8) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 41, 45, 16 y 31 como cebadores;
- 5 9) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 37, 46, 16 y 31 como cebadores;
- 10) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 37, 47, 16 y 31 como cebadores;
- 11) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 37, 48, 16 y 31 como cebadores;
- 10 12) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 37, 49, 16 y 31 como cebadores;
23. Un conjunto de cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar GAPDH, que comprende uno cualquiera de los siguientes conjuntos de cebadores:
- 15 1) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 80, 88, 62 y 73 como cebadores;
- 2) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 81, 89, 63 y 75 como cebadores;
- 3) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 86, 95, 58 y 76 como cebadores;
- 20 4) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 87, 96, 64 y 77 como cebadores;
- 5) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 81, 89, 62 y 75 como cebadores;
- 25 6) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 82, 89, 62 y 75 como cebadores;
- 7) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 83, 89, 63 y 75 como cebadores;
- 8) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 83, 89, 62 y 75 como cebadores;
- 30 9) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 84, 89, 62 y 75 como cebadores;
- 10) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 85, 89, 62 y 75 como cebadores;
- 35 12) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 81, 90, 63 y 75 como cebadores;
- 13) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 81, 91, 63 y 75 como cebadores;
- 14) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 81, 92, 63 y 75 como cebadores;
- 40 15) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 81, 93, 63 y 75 como cebadores;
- 16) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 81, 94, 63 y 75 como cebadores;
- 45 24. Un método para detectar ácido nucleico, en el cual se usa al menos uno de los cebadores definidos en uno cualquiera de 1 a 7 anteriormente.
25. Un método para detectar ácido nucleico, en el cual se usa al menos uno de los conjuntos de cebadores definidos en uno cualquiera de 8 a 23 anteriormente.

26. Un reactivo y/o un kit de reactivo usado en el método para detectar ácido nucleico definido en 24 ó 25 anteriormente.

27. Un sistema para detectar ácido nucleico, que usa el método de detección de ácido nucleico definido en 24 ó 25 anteriormente.

5 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra la sensibilidad cuando se usaron los cebadores para β -actina de la presente divulgación (Ejemplo 2).

La Fig. 2 muestra los resultados de la determinación usando los cebadores para β -actina de la presente divulgación en el cultivo de células LS180 y Raji (Ejemplo 3).

10 La Fig. 3 muestra la sensibilidad cuando se usaron los cebadores para GAPDH de la presente divulgación (Ejemplo 5).

La Fig. 4 muestra los resultados de la determinación usando los cebadores de GAPDH de la presente divulgación en el cultivo de células LS1 180 y Raji (Ejemplo 6).

Mejor modo de realizar la invención

15 (Diseño de cebador)

La presente divulgación proporciona un método para amplificación de ácido nucleico de genes constitutivos. Más específicamente, la presente divulgación proporciona cebadores para amplificación de ácido nucleico que son aplicables a métodos para amplificación de ácido nucleico que se refieren a ARNm para los genes de β -actina y GAPDH.

20 La idea básica de los cebadores usados en el método LAMP es como se describe en el Documento de Patente 1.

Específicamente, las regiones F3c, F2c y F1c, se proporcionan en esta secuencia desde el extremo 3' y las regiones R3, R2 y R1, se proporcionan en esta secuencia desde el extremo 5' de un ADN diana que se tiene que amplificar y las cadenas oligonucleotídicas que contienen las secuencias de nucleótidos sustancialmente idénticas o sustancialmente complementarias a al menos seis regiones se seleccionan para diseñar al menos cuatro cebadores.

25 El término "sustancialmente idéntico" se define como lo siguiente: siempre que una secuencia complementaria sintetizada usando una secuencia de nucleótidos como un molde se hibride a una secuencia de nucleótidos de interés y proporcione un punto de partida para la síntesis de su secuencia complementaria, la secuencia de nucleótidos anterior es sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos de interés. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos sustancialmente idénticas a las secuencias de nucleótidos de F2 incluyen, además de la
30 secuencia de nucleótidos exactamente iguales a la de F2, secuencias de nucleótidos que puedan funcionar como moldes para proporcionar secuencias de nucleótidos que se hibridan a F2 y sirven como puntos de partida para síntesis de secuencias complementarias.

Los términos "idéntico" o "complementario" usados para caracterizar las secuencias de nucleótidos que constituyen los oligonucleótidos de la presente invención no se refieren a "exactamente idéntico" o "exactamente
35 complementario". En otras palabras, las secuencias idénticas a una secuencia determinada incluyen una secuencia complementaria a una secuencia de nucleótidos capaz de hibridarse a una secuencia determinada. Por otra parte, el término "complementario" se refiere a una secuencia que se puede hibridar en condiciones rigurosas y proporcionar un extremo 3' que puede servir como un punto de partida para la síntesis de cadenas complementarias.

Los cebadores de la presente invención tienen una longitud suficiente para emparejamiento de bases con sus
40 cadenas complementarias a la vez que mantienen la especificidad requerida en el entorno dado en las reacciones de síntesis de ácido nucleico diferentes descritas más adelante. Específicamente, los cebadores tienen de 5 a 200 nucleótidos de longitud, más preferentemente, 10 a 50 nucleótidos de longitud. Considerando que es necesaria la longitud de un cebador de al menos aproximadamente cinco nucleótidos para el reconocimiento mediante cualquier polimerasa conocida que catalice la síntesis dependiente de secuencia de ácido nucleico, la longitud de la parte
45 sometida a hibridación debe tener más de eso. Adicionalmente, para mantener la especificidad como la secuencia de nucleótidos, los cebadores se diseñan para conservar una longitud de 10 o más nucleótidos. Por otra parte, es difícil preparar secuencias de nucleótidos excesivamente largas mediante síntesis química. Por tanto, las longitudes de nucleótidos descritos anteriormente se proporcionan como un intervalo deseable.

Como se usa en el presente documento, el término "molde" se refiere a un ácido nucleico que sirve como un molde
50 para la síntesis de una cadena complementaria. Aunque la cadena complementaria que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria al molde tiene importancia como una cadena capaz de hibridarse al molde, esta relación es siempre relativa. En otras palabras, una cadena sintetizada como una cadena complementaria puede funcionar como un molde a su vez. Es decir, las cadenas complementarias pueden servir como moldes.

En la presente invención, cada cebador seleccionado entre la secuencia de nucleótidos de un ADN diana está categorizado en FIP (cebador interno directo), cebador F3 (cebador externo directo), RIP (cebador interno inverso) o cebador R3 (cebador externo inverso).

5 Se diseña un FIP para que tenga la secuencia de nucleótidos de la región F2, que es sustancialmente complementaria a la región F2c del ADN diana, en el extremo 3' así como también que tenga una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a la región F1c del ADN diana en el extremo 5'. Este diseño permite que exista una secuencia intermedia independiente del ADN diana entre F2 y F1c. Esta secuencia independiente de ADN diana es aceptable si la longitud es de 0-50 nucleótidos, preferentemente 0-40 nucleótidos.

10 Se diseña un cebador F3 para que tenga una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a la región F3, que es sustancialmente complementaria a la región F3c del ADN diana.

Se diseña un RIP para que tenga la secuencia de nucleótidos de la región R2, que es sustancialmente complementaria a la región R2c del ADN diana, en el extremo 3' así como también para que tenga una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a la región R1c del ADN diana en el extremo 5'. Al igual que FIP, RIP permite que exista una secuencia intermedia independiente del ADN diana entre R2 y R1c.

15 Se diseña un cebador R3 para que tenga una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a la región R3, que es sustancialmente complementaria a la región R3c del ADN diana.

20 En el método LAMP, la combinación de al menos un cebador de bucle puede reducir el tiempo de amplificación (documento WO 02/24902). El término "cebador de bucle" se refiere a la parte de cadena única del bucle en el extremo 5' de la estructura de pesa, en particular, significa un cebador que tiene una secuencia complementaria entre, por ejemplo, la región R1 y R2 o la región F1 y F2. El uso del cebador de bucle permite la proliferación del material del punto de partida para la síntesis de ADN. Un cebador del bucle de este tipo se diseña para hibridarse a la región de bucle a la cual generaron FIP o RIP durante el proceso de síntesis de ADN.

25 Como las regiones de genes seleccionadas para construcción de los cebadores mencionados anteriormente, se pueden seleccionar secuencias de al menos 5 nucleótidos de longitud, preferentemente 10-30 nucleótidos de longitud y más preferentemente 17-25 nucleótidos de longitud que reconocen la región de ADN, prestando atención a los factores que incluyen la composición de nucleótidos, el contenido de GC, la estructura secundaria y el valor de Tm. En general, los valores de Tm se pueden obtener usando el método del Vecino Más Próximo. Las regiones de ADN con un valor de Tm de 55-65°C, preferentemente 58-64°C y con un contenido de GC del 40-70%, preferentemente el 50-65% se pueden seleccionar.

30 Los cebadores de la presente invención se seleccionan y diseñan de acuerdo con el principio descrito anteriormente.

Las regiones del gen de β -actina seleccionadas para la presente invención están incluidas en la región de nucleótidos 240-1060 de la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 1 y/o la región complementaria de la misma, preferentemente nucleótidos 240-380 o nucleótidos 401-1060 y más preferentemente nucleótidos 740-990 de la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 1 y/o la región complementaria de la misma.

35 En la presente divulgación, un cebador para detección de β -actina es un oligonucleótido disponible como un cebador y se selecciona y diseña a partir de lo siguiente: 1) un oligonucleótido de al menos 5 nucleótidos que está incluido en la región de nucleótidos 240-1060, preferentemente nucleótidos 240-380 o nucleótidos 401-1060, y más preferentemente nucleótidos 740-990 de la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 1 y/o la secuencia complementaria de la misma; 2) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta como una cualquiera de SEC ID N°: 2-50, 3) un oligonucleótido complementario a uno cualquiera de los oligonucleótidos definidos en 1) o 2) anteriormente; 4) un oligonucleótido capaz de hibridarse al oligonucleótido definido en uno cualquiera de 1) a 3) en condiciones rigurosas; y 5) un oligonucleótido que tiene la función de cebador, que comprende la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido definido en uno cualquiera de 1) a 4) anteriormente en el cual uno o más nucleótidos se mutan mediante sustitución, supresión, inserción o adición.

45 Las regiones del gen de GAPDH seleccionado para la presente divulgación están incluidas en la región de nucleótidos 110-450 de la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 51 y/o la región complementaria a la misma.

50 En la presente divulgación, un cebador para GAPDH es un oligonucleótido disponible como un cebador y se selecciona y se diseña a partir de lo siguiente: 1) un oligonucleótido de al menos 5 nucleótidos que está incluido en la región de nucleótidos 110-450 de la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 51 y/o la secuencia complementaria de la misma; 2) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta como una cualquiera de SEC ID N°: 52-96; 3) un oligonucleótido complementario a uno cualquiera de los oligonucleótidos definidos en 1) o 2) anteriormente; 4) un oligonucleótido capaz de hibridarse al oligonucleótido definido en uno cualquiera de 1) a 3) en condiciones rigurosas; y 5) un oligonucleótido que tiene la función de cebador, que comprende la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido definido en uno cualquiera de 1) a 4) anteriormente en el cual uno o más nucleótidos se mutan mediante sustitución, supresión, inserción o adición.

Los oligonucleótidos se pueden producir mediante cualquier método conocido, por ejemplo, mediante síntesis química. Como alternativa, un ácido nucleico de origen natural se escinde con un agente tal como una enzima de restricción para modificar o conectar la secuencia que se tiene constituir con las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente. Específicamente, los oligonucleótidos se pueden sintetizar usando un sintetizador oligonucleotídico (Applied BioSystems; Expedite Model 8909 DNA Synthesizer). La síntesis de oligonucleótidos mutados en la cual uno o más nucleótidos se sustituye, suprime, inserta o añade se puede realizar usando cualquier proceso conocido. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida, recombinación homóloga, el alargamiento de cebador o método de PCR, en solitario o en combinación, se pueden realizar de acuerdo con los métodos descritos en la bibliografía, incluyendo Sambrook *et al.* (ed.), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989; Masami Muramatsu (ed.), *Labo-Manual: Genetic Engineering*, MARUZEN Inc., 1988; y Ehrlich, HE. (ed.), *PCR Technology; Principle and Applications for DNA amplification*, o mediante el uso de cualquier modificación de los métodos. Por ejemplo, se puede usar el método de Ulmer (*Science* (1983) 219: 666).

Se puede seleccionar cualquier condición conocida comúnmente como condiciones rigurosas para la hibridación. Las condiciones ilustrativas son las siguientes: hibridación durante una noche a 42°C en una solución que contiene formamida al 50%, SCC 5 x (NaCl 150 mM y citrato trisódico 15 mM), fosfato de sodio 50 mM, pH 7,6, solución de Denhardt 5 x, sulfato de dextrano al 10% y 20 µg/ml de ADN, lavado primario en SSC 2 x con SDS al 0,1% a temperatura ambiente, seguido por lavado secundario en SSC 0,1 x con SDS al 0,1% a aproximadamente 65°C.

Debido a que el molde para el ácido nucleico que se tiene que amplificar en la presente divulgación es ARNm para un gen constitutivo, es necesario que los cebadores usados se diseñen de forma de no amplificar el ADN genómico contenido en la muestra de ensayo. Específicamente, al menos uno de los cebadores incluidos en el conjunto de cebador de la presente divulgación contiene de forma deseable una región que se extiende una pluralidad de exones en, por ejemplo, el gen de β -actina o de GAPDH. Tal diseño puede evitar la amplificación de las secuencias a partir de ADN genómico y permite la amplificación selectiva de la secuencia a partir de ARNm de β -actina o GAPDH.

(Conjuntos de cebadores)

Para usar los cebadores de la presente divulgación para amplificar un ácido nucleico, al menos dos cebadores se combinan como un conjunto de cebador. Para el método LAMP, se combinan al menos cuatro cebadores (FIP, cebador F3, RIP y cebador R3) como un conjunto de cebador. Adicionalmente, uno o más cebadores de bucle se pueden combinar y usarse como un conjunto de cebador.

(Método RT-LAMP)

El método RT-LAMP es un método LAMP en el cual se usa ARN como molde. La idea fundamental que subyace a LAMP es como se describe en el Documento de Patente 1. En el método RT-LAMP, la estructura de partida para LAMP se sintetiza como el ADNc se sintetiza a partir de ARN de molde en una solución. Específicamente, la amplificación de ADN diana se realiza repitiendo las siguientes etapas 2) a 5) de alargamiento de ADN después de la siguiente etapa 1):

1) FIP se une a una cadena de ARN de molde para alargar una cadena de ADN complementaria a la cadena de ARN de molde. En esta reacción se usa una transcriptasa inversa, tal como la obtenida a partir de AMV.

2) Mientras el cebador F3 desplaza la cadena de ADN sintetizada a partir de FIP en la etapa 1) anteriormente, una cadena de ADN complementaria al ARN de molde se alarga. En las siguientes etapas, la ADN polimerasa alarga cadenas de ADN.

3) RIP se une a la cadena de ADN desplazada en la etapa 2) anteriormente para alargar una cadena de ADN.

4) Mientras el cebador R3 desplaza la cadena de ADN alargada a partir de RIP en la etapa 3) anteriormente, una cadena de ADN complementaria a la cadena de ADN alargada a partir de FIP se alarga para formar la construcción de partida para el método LAMP.

5) Las secuencias de ambas regiones terminales de la cadena de ADN desplazada en la etapa 4) anteriormente contienen secuencias complementarias a su propia cadena de ADN y cada secuencia complementaria se hibrida para tener una estructura de bucle en ambos extremos.

A este respecto, si existe una enzima como ADN polimerasa de Bca, que tiene actividades tanto de transcriptasa inversa como de ADN polimerasa y se usa tal enzima, esta reacción se puede llevar a cabo usando una enzima.

(Método de detección)

En el método LAMP, cadenas de ADN sintetizadas tienen secuencias complementarias dentro de su propia secuencia y la mayoría de las secuencias complementarias forman pares de bases. Utilizando esta característica se posibilita la detección de los productos amplificados. Cuando se realiza amplificación de ácido nucleico usando los cebadores de la presente invención en presencia de un intercalador doble fluorescente, tal como bromuro de etidio,

5 SYBER GREEN I o Pico Green, se observa un aumento de la intensidad de fluorescencia en relación con el aumento del producto. El rastreo simultáneo de amplificación de ADN y el aumento de la fluorescencia en un sistema cerrado puede ser posible supervisando tales cambios (véase Manual of Clinical 55 Laboratory Medicine, 31ª ed., pág. 1318; documento JP 2001-242169-A, denominado en lo sucesivo en el presente documento simplemente como "Método en Tiempo Real").

(Reactivos, Kit de reactivo, etc.)

10 Varios reactivos necesarios para usar los cebadores de la presente invención para detectar un ácido nucleico se pueden empaquetar como un kit. Específicamente, tal kit incluye diversos oligonucleótidos necesarios como los cebadores para síntesis de cadena complementaria o para desplazamiento, una enzima con actividad de transcriptasa inversa, sustratos de dNTP para síntesis de cadena complementaria, ADN polimerasa para síntesis de desplazamiento de cadena de cadenas complementarias, solución tampón para proporcionar condiciones adecuadas para reacción enzimática, y si fuera necesario, otros reactivos para detección de productos de reacción.

15 La presente divulgación incluye cebadores y conjuntos de cebadores para amplificación de ácido nucleico y un método para la detección de ácido nucleico que usa los cebadores, reactivos usados para la detección de ácido nucleico y kits para la detección de ácido nucleico y el sistema completo para la detección de ácido nucleico.

Ejemplos

La presente invención se ilustrará más específicamente más adelante en los Ejemplos, pero no se limita a los mismos.

(Ejemplo 1) Selección de regiones génicas en el gen de β -actina

20 Se investigaron los emplazamientos de las regiones génicas en el gen de β -actina que son adecuados para el método LAMP a partir de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante el uso de software de diseño de sonda. La selección de las regiones génicas se realizó al valor de T_m que varía entre 58,5 y 63,5°C para F1c y Rc1, entre 61,5 y 62,5°C para F2 y R2 y entre 58,5 y 62,5°C para F3 y R3 y como un resultado se seleccionaron las regiones indicadas más adelante que están contenidas en la región que abarca desde el nucleótido 240 hasta 1060 de las secuencias de nucleótidos expuestas en SEC ID N°: 1 y las regiones correspondientes de la cadena complementaria de la misma.

F1c: Regiones génicas en la cadena complementaria de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1

343-327 5' -tggccttgggttcagg-3' (SEC ID N°: 2)

400-381 5' -cgtacatggctgggtgttg-3' (SEC ID N°: 3)

30 822-803 5' -gatgccacaggactccatgc-3' (SEC ID N°: 4)

838-817 5' -tgaaggtagttcgtggatgcc-3' (SEC ID N°: 5)

922-904 5' -caggtacatggtgtgcc-3' (SEC ID N°: 6)

F2: Regiones génicas en la secuencia expuesta en SEC ID N° 1

265-284 5' -accttctacaatgagctgcg-3' (SEC ID N°: 7)

35 341-357 5' -ccaaccgagagaagatg-3' (SEC ID N°: 8)

748-766 5' -attggcaatgagcgggtcc-3' (SEC ID N°: 9)

750-766 5' -tggcaatgagcgggtcc-3' (SEC ID N°: 10)

774-790 5' -tgaggcactctccagc-3' (SEC ID N°: 11)

782-799 5' -tctccagcctcctcc-3' (SEC ID N°: 12)

40 851-868 5' -agtgtgacgtggacatcc-3' (SEC ID N°: 13)

F3: Regiones génicas en la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1

240-259 5' -cgacatggagaaaatctggc-3' (SEC ID N°: 14)

274-290 5' -aatgagctgcgtgtggc-3' (SEC ID N°: 15)

718-734 5' -tacgagctgcctgacgg-3' (SEC ID N°: 16)

45 750-766 5' -tggcaatgagcgggtcc-3' (SEC ID N°: 10)

818-837 5' -gcatccacgaaactaccttc-3' (SEC ID N°: 17)

R1c: Regiones génicas en la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1

346-366 5' -cgcgagaagatgaccagatc-3' (SEC ID N°: 18)

402-423 5' -tgctatccaggctgtgctatcc-3' (SEC ID N°: 19)

5 848-868 5' -tgaagtgtgacgtggacatcc-3' (SEC ID N°: 20)

857-876 5' -acgtggacatccgaaasac-3' (SEC ID N°: 21)

925-945 5' -atigccgacaggatgcagaag-3' (SEC ID N°: 22)

R2: Regiones génicas en la cadena complementaria de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1

414-396 5' -agcctggatagcaacgtac-3' (SEC ID N°: 23)

10 461-444 5' -tccatcacgatgccagt-3' (SEC ID N°: 24)

921-905 5' -agggtacatggtgtgc-3' (SEC ID N°: 25)

925-909 5' -tgccagggtacatggt-3' (SEC ID N°: 26)

929-911 5' -gcaatgccagggtacatg-3' (SEC ID N°: 27)

1011-994 5' -gtacttgcgctcaggagg-3' (SEC ID N°: 28)

15 R3: Regiones génicas en la cadena complementaria de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1

454-438 5' -cgatgccagtggtacgg-3' (SEC ID N°: 29)

497-480 5' -tagatgggcacagtgtg-3' (SEC ID N°: 30)

947-930 5' -tccttctscatcctgtcg-3' (SEC ID N°: 31)

1059-1043 5' -ctgsaaggtggacagcg-3' (SEC ID N°: 32)

20 Bucle F: Regiones génicas en la cadena complementaria de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1

816-801 5' -acaggactccateccc-3' (SEC ID N°: 33)

Bucle R: Regiones génicas en la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1

878-895 5' -tgtaceccaacacagtgc-3' (SEC ID N°: 34)

(Ejemplo 2) Diseños de cebador para β -actina

25 Los cebadores indicados más adelante, que se aplican al método LAMP para amplificación de ácido nucleico de β -actina, se han obtenido a partir de las secuencias de las regiones seleccionadas.

FP1: (secuencias conectadas de una secuencia de nucleótidos de las regiones F1c y una secuencia de nucleótidos de las regiones F2)

AFA-1 (SEC ID N°: 35) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 2 y 7

30 AFA-2 (SEC ID N°: 36) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 3 y 8

AFA-4 (SEC ID N°: 37) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 5 y 11

AFA-4a (SEC ID N°: 38) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 5 y 12

AFA-4b (SEC ID N°: 39) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 5 y 10

AFA-4d (SEC ID N°: 40) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 4 y 9

35 AFA-4e (SEC ID N°: 41) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 4 y 10

AFA-6 (SEC ID N°: 42) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 6 y 13 RIP: (secuencias conectadas de una secuencia de nucleótidos de las regiones R1c y una secuencia de nucleótidos de las regiones R2)

ARA-1 (SEC ID N°: 43) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 18 y 23

- ARA-2 (SEC ID N°: 44) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 19 y 24
- ARA-4 (SEC ID N°: 45) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 20 y 25
- ARA-4a (SEC ID N°: 46) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 20 y 27
- ARA-4b (SEC ID N°: 47) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 20 y 26
- 5 ARA-4d (SEC ID N°: 48) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 21 y 27
- ARA-4e (SEC ID N°: 49) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 21 y 26
- ARA-6 (SEC ID N°: 50) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 22 y 28 cebadores F3: (idéntico a las secuencias de nucleótidos de las regiones F3)
- AF3-1 (SEC ID N°: 14)
- 10 AF3-2 (SEC ID N°: 15)
- AF3-4 (SEC ID N°: 10)
- AF3-6 (SEC ID N°: 17)
- AF3-9 (SEC ID N°: 16)
- Cebadores R3: (idénticos a las secuencias de nucleótidos de las regiones R3)
- 15 AR3-1 (SEC ID N°: 29)
- AR3-2 (SEC ID N°: 30)
- AR3-4 (SEC ID N°: 31)
- AR3-6 (SEC ID N°: 32)
- Cebadores de bucle:
- 20 (Idénticos a las secuencias de nucleótidos de las regiones de bucle F o bucle R)
- AD-LPFI (SEC ID N°: 33)
- AD-LPR1 (SEC ID N°: 34)

(Ejemplo 3) Selección de regiones génicas en el gen de GAPDH

- 25 Se investigaron los emplazamientos de las regiones génicas en el gen de β -actina que es adecuado para el método LAMP a partir de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID N°: 51 usando software de diseño de sonda. La selección de las regiones génicas se realizó al valor de Tm que varía entre 58,5 y 63,5°C para F1c y R1c, entre 61,5 y 62,5°C para F2 y R2, y entre 58,5 y 62,5°C para F3 y R3 y como un resultado se seleccionaron las regiones indicadas más adelante que están contenidas en la región que abarca desde el nucleótido 110 hasta 450 de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID N°: 51 y las regiones correspondientes de la cadena complementaria
- 30 de las mismas.

F1c: Regiones génicas en la cadena complementaria de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 51

- 213-192 5' -tccattgatgacaaacttccc-3' (SEC ID N°: 52)
- 236-217 5' -tcctggaagatggtgatggg-3' (SEC ID N°: 53)
- 246-228 5' -gggatctcgtcctggaag-3' (SEC ID N°: 54)
- 35 234-265 5' -acgtactcagcgccagcatc-3' (SEC ID N°: 55)
- 335-316 5' -aatgagccccagccttctc-3' (SEC ID N°: 56)

F2: Regiones génicas en la secuencia expuesta en SEC ID N°: 51

- 152-169 5' -ccaccttgcaaatcc-3' (SEC ID N°: 57)
- 163-180 5' -aaattcatggcaccgtc-3' (SEC ID N°: 58)
- 40 179-195 5' -tcaaggctgagaacggg-3' (SEC ID N°: 59)

ES 2 382 868 T3

217-235 5' -cccatcaccatcttccagg-3' (SEC ID N°: 60)

276-293 5' -tgagtacgtcgtgsagtc-3' (SEC ID N°: 61)

F3: Regiones génicas en la secuencia expuesta en SEC ID N°: 51

103-120 5' -gacccttcattgacctc-3' (SEC ID N°: 62)

5 159-176 5' -tggcaaattccatggcac-3' (SEC ID N°: 63)

163-180 5' -aaattccatggcaccgtc-3' (SEC ID N°: 58)

227-244 5' -tctccaggagcgagatc-3' (SEC ID N°: 64)

R1 c: Regiones génicas en la secuencia expuesta en SEC ID N°: 51

216-235 5' -tcccatcaccatcttccagg-3' (SEC ID N°: 65)

10 248-268 5' -ccaaaatcaagtggggcgatg-3' (SEC ID N°: 66)

254-271 5' -tcaagtggggcgatgctg-3' (SEC ID N°: 67)

305-323 5' -tcaccaccatggagaaggc-3' (SEC ID N°: 68)

338-354 5' -aggggggagccaaaagg-3' (SEC ID N°: 69)

R2: Regiones génicas en la cadena complementaria de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 51

15 295-279 5' -tgactccacgacgtac-3' (SEC ID N°: 70)

305-289 5' -aagacgccagtggactc-3' (SEC ID N°: 71)

310-294 5' -tggtaagacgccagtg-3' (SEC ID N°: 72)

324-308 5' -agccttctccatggtg-3' (SEC ID N°: 73)

327-311 5' -cccagccttccatgg-3' (SEC ID N°: 74)

20 365-346 5' -gagatgatgaccttttggc-3' (SEC ID N°: 75)

399-383 5' -catgacgaacatggggg-3' (SEC ID N°: 76)

R3: Regiones génicas en la cadena complementaria de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 51

324-308 5' -agccttctccatggtg-3' (SEC ID N°: 73)

25 365-346 5' -gagatgatgaccttttggc-3' (SEC ID N°: 75)

399-383 5' -catgacgaacatggggg-3' (SEC ID N°: 76)

445-426 5' -tgctgatgatcttgaggctg-3' (SEC ID N°: 77)

Bucle F: Regiones génicas en la cadena complementaria de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 51

30 227-212 5' -atgtsatgggatttc-3' (SEC ID N°: 78)

Bucle R: Regiones génicas en la secuencia expuesta en SEC ID N°: 51

275-293 5' -ctgagtacgtcgtggagtc-3' (SEC ID N°: 79)

(Ejemplo 4) Diseños de cebador para GAPDH

35 Los cebadores indicados más adelante, que se aplican al método LAMP para amplificación de ácido nucleico de GAPDH, se han obtenido a partir de las secuencias de las regiones seleccionadas.

FIP: (secuencias conectadas de una secuencia de nucleótidos de las regiones F1c y una secuencia de nucleótidos de las regiones F2)

- FA-2 (SEC ID N°: 80) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 52 y 57
FA-3 (SEC ID N°: 81) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 54 y 59
FA-3b (SEC ID N°: 82) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 54 y 58
FA-3d (SEC ID N°: 83) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 53 y 59
5 FA-3e (SEC ID N°: 84) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 53 y 59
FA-3g (SEC ID N°: 85) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 53 y 57
FA-5 (SEC ID N°: 86) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 55 y 60
FA-7 (SEC ID N°: 87) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 56 y 61
- 10 RIP: (secuencias conectadas de una secuencia de nucleótidos de las regiones R1c y una secuencia de nucleótidos de las regiones R2)
- RA-2 (SEC ID N°: 88) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 65 y 80
RA-3 (SEC ID N°: 89) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 67 y 83
RA-3a (SEC ID N°: 90) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 67 y 84
RA-3b (SEC ID N°: 91) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 67 y 82
15 RA-3c (SEC ID N°: 92) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 67 y 81
RA-3d (SEC ID N°: 93) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 66 y 83
RA-3e (SEC ID N°: 94) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 66 y 84
RA-5 (SEC ID N°: 95) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 68 y 75
- 20 RA-7 (SEC ID N°: 96) conexión entre las secuencias de SEC ID N°: 69 y 76 cebadores F3: (idénticos a las secuencias de nucleótidos de las regiones F3)
- F3-3 (SEC ID N°: 63)
F3-4 (SEC ID N°: 68)
F3-6 (SEC ID N°: 64)
F3-8 (SEC ID N°: 62)
- 25
- R3: (idéntica a las secuencias de nucleótidos de las regiones RF3)
- R3-2 (SEC ID N°: 73)
R3-3 (SEC ID N°: 75)
R3-5 (SEC ID N°: 76)
30 R3-7 (SEC ID N°: 77)
- Cebadores de bucle:
(Idénticos a las secuencias de nucleótidos de las regiones de bucle F o bucle R)
- GC-LPFI (SEC ID N°: 78)
GC-LPR1 (SEC ID N°: 79)
- 35 (Experimento 1)

La reacción de amplificación mediante RT-LAMP se inició usando los cebadores de β -actina enumerados en el Ejemplo 2 en las combinaciones indicadas en la Tabla 1. Se examinó el tiempo necesario para confirmar la amplificación.

1) Muestras de ARNm de β -actina humana

Se usó ARN total humano disponible en el mercado (obtenido a partir de células Raji; ABI) como el molde para β -actina humana.

2) Cebadores para β -actina

5 Cada cebador se usó en las combinaciones indicadas en la Tabla 1.

(Tabla 1) Conjuntos de Cebador y Tiempo Necesario para Confirmación de Amplificación

FIP	RIP	Cebador F3	Cebador R3	Tiempo necesario para confirmación de amplificación (min.)
AFA-1	ARA-1	AF3-1	AR3-1	35
AFA-2	ARA-2	AF3-4	AR3-2	34
AFA-4	ARA-4	AF3-4	AR3-6	25
AFA-6	ARA-6	AF3-6	AR3-6	45
AFA-4a	ARA-4	AF3-4	AR3-4	37
AFA-4c	ARA-4	AF3-9	AR3-4	33
AFA-4d	ARA-4	AF3-9	AR3-4	28
AFA-4e	ARA-4	AF3-9	AR3-4	28
AFA-4	ARA-4a	AF3-4	AR3-4	40
AFA-4	ARA-4b	AF3-4	AR3-4	26
AFA-4	ARA-4d	AF3-4	AR3-4	40
AFA-4	ARA-4e	AF3-4	AR3-4	31

3) Componentes de reacción:

dNTP (GIBCO) 0,4 mM

10 MgSO₄ 2 mM

Ditiotreitol 5 mM

Betaína (Sigma) 640 mM

Tampón Thermopol (New England BioLabs)

Transcriptasa inversa de AMV (Promega) 1,25 U

15 ADN polimerasa Bst (New England BioLabs) 16 U

Bromuro de etidio 0,125 mg/ml

Cebadores:

FIP 40 pmol, RIP 40 pmol

Cebador F3 5 pmol, cebador R3 5 pmol

20 4) Método RT-LAMP

Dos microlitros de muestra de ARN (que contiene 20 ng de ARN total humano) se añadieron a 23 μ l de la solución de reacción que contiene los cuatro cebadores anteriores y se calentó a 65°C durante una hora.

5) Confirmación de amplificación

Ya que los productos amplificados toman la estructura de doble hélice, el bromuro de etidio se interpone en esta

estructura para generar fluorescencia. El aumento de la intensidad de fluorescencia se determinó usando ABI PRISM 7700.

6) Resultados

5 La Tabla 1 muestra el tiempo necesario para confirmación de la amplificación del gen de β -actina para cada conjunto de cebador usado en la reacción. Los resultados revelan que para cada conjunto de cebador, toma 45 minutos como máximo, 30 minutos en la mayoría de los casos, para confirmar la amplificación.

(Experimento 2)

10 Un conjunto de cebador con el cual se confirmó la amplificación en el tiempo más corto se seleccionó a partir de los conjuntos de cebadores para β -actina usados en el Experimento 1. Este conjunto de cebador se combinó posteriormente con cebadores de bucle y se usó para la determinación de la sensibilidad del método de RT-LAMP.

1) Muestras de ARNm de β -actina humana

Las muestras se prepararon como se ha descrito en el Experimento 1.

2) Conjuntos de cebadores

(Tabla 2) Conjuntos de Cebador

FIP	RIP	Cebador F3	Cebador R3	Cebador de bucle F	Cebador de bucle R
AFA-4	ARA-4	AF3-4	AR3-4	AD-LPF1	AD-LPR1

15

3) Componentes de reacción:

Se añadieron adicionalmente cebadores de bucle F3 y R3 a una concentración de 5 pmol cada uno a los mismos componentes como se ha descrito en el Experimento 1.

4) Método de RT-LAMP

20 El método de RT-LAMP se realizó como se ha descrito en el Experimento 1. Dos microlitros de muestra de ARN (que contiene 20 ng de ARN total humano) se añadieron a 23 μ l de la solución de reacción que contiene los seis cebadores anteriores y se calentó a 65°C durante una hora.

5) Confirmación de amplificación

La amplificación se confirmó como se ha descrito en el Experimento 1.

25 6) Resultados

Los resultados se muestran en la Fig. 1. Los mismos muestran que la cantidad más grande del molde de ARNm para β -actina permitió la confirmación más temprana de la amplificación. La amplificación se confirmó en 30 minutos con 0,02 ng del molde y en aproximadamente 15 minutos con 20 ng del molde.

(Experimento 3)

30 La amplificación de β -actina se investigó en cultivos celulares, células LS 180 (línea de células tumorales colónicas) y células Raji (línea de células de linfoma de Burkitt).

35 Una solución de células LS180 positivas a citokeratina se diluyó con una solución de células Raji negativas a citokeratina, y la amplificación de β -actina se examinó para diferentes concentraciones de solución de células LS 180, examinando de ese modo si β -actina está disponible como un control para la corrección de datos en la determinación de marcadores tumorales de citokeratina.

1) Muestras

Se prepararon muestras para ajustar el número de células totales de células LS180 y Raji a 8000. Entre el número de células totales de 8000, el número de células LS180 se ajustó a 8000, 800, 80, 8 ó 0.

2) Cebadores para β -actina

40 Se seleccionaron los mismos cebadores que los descritos en el Experimento 2.

3) Componentes de reacción

Se usó la solución de reacción que contiene los mismos componentes de reacción descritos en el Experimento 2.

4) Método de RT-LAMP

El método de RT-LAMP se llevó a cabo como se ha descrito en el Experimento 2.

5) Detección de ácidos nucleicos

- 5 Se añadieron dos microlitros de la suspensión de células a 23 μ l de la solución de reacción que contiene los mismos seis cebadores como se ha descrito en el Experimento 2 y se calentó a 65°C durante una hora.

6) Resultados

- 10 Los resultados se muestran en la Fig. 2. Los mismos demostraron que β -actina se amplificó en aproximadamente 15 minutos, independientemente de la proporción entre células LS 180 y Raji. Esto confirmó que la β -actina se expresa constitutivamente en las células humanas independientemente de la presencia o ausencia de marcadores tumorales, sugiriendo que β -actina está disponible como un control para corrección de datos en el método LAMP.

(Experimento 4)

- 15 La reacción de amplificación mediante RT-LAMP se inició usando los cebadores para GAPDH enumerados en el Ejemplo 4 en las combinaciones indicadas en la Tabla 3. Se examinó el tiempo necesario para confirmar la amplificación.

1) Muestras de ARNm de GAPDH

Se usó ARN total humano disponible en el mercado (obtenido a partir de células Raji; ABI) como el molde para GAPDH.

2) Cebadores para GAPDH

- 20 Cada cebador se usó en las combinaciones indicadas en (Tabla 3).

(Tabla 3) Conjuntos de Cebador y Tiempo Necesario para Confirmación de Amplificación

FIP	RIP	Cebador F3	Cebador R3	Tiempo necesario para confirmación de amplificación (min.)
FA-2	RA-2	F3-8	R3-2	40
FA-3	RA-3	F3-3	R3-3	20
FA-5	RA-5	F3-4	R3-5	50
FA-7	RA-7	F3-6	R3-7	45
FA-3	RA-3	F3-8	R3-3	18
FA-3b	RA-3	F3-8	R3-3	21
FA-3d	RA-3	F3-3	R3-3	10
FA-3d	RA-3	F3-8	R3-3	10
FA-3e	RA-3	F3-8	R3-3	42
FA-3g	RA-3	F3-8	R3-3	32
FA-3	RA-3a	F3-3	R3-3	27
FA-3	RA-3b	F3-3	R3-3	21
FA-3	RA-3c	F3-3	R3-3	28
FA-3	RA-3d	F3-3	R3-3	22
FA-3	RA-3e	F3-3	R3-3	33

3) Componentes de reacción:

Se usó la solución de reacción que contiene los mismos componentes de reacción que se han descrito en el Experimento 1.

4) Método de RT-LAMP

5 Se realizó RT-LAMP como se ha descrito en el Experimento 1. Específicamente, dos microlitros de la muestra de ARN (que contiene 20 ng de ARN total humano) se añadieron a 23 µl de la solución de reacción que contiene los cuatro cebadores anteriores y se calentó a 65°C durante una hora.

5) Confirmación de amplificación

La amplificación se confirmó como se ha descrito en el Experimento 1.

6) Resultados

10 La Tabla 3 muestra el tiempo necesario para confirmación de la amplificación del gen de GAPDH para cada conjunto de cebador usado en la reacción. Los resultados revelan que para conjunto de cebador, toma como máximo 45 minutos y 30 minutos en la mayoría de los casos, para confirmar la amplificación.

(Experimento 5)

15 Un conjunto de cebador con el cual se confirmó la amplificación en el tiempo más corto se seleccionó entre los conjuntos de cebadores para GAPDH usados en el Experimento 4. Este conjunto de cebador se combinó adicionalmente con cebadores de bucle y se usó para determinación de sensibilidad del método de RT-LAMP.

1) Muestras de ARNm de GAPDH humano

Se usó ARN total humano disponible en el mercado (obtenido a partir de células Raji, ABI) como el molde para GAPDH.

20 2) Conjuntos de cebadores

(Tabla 4) Conjuntos de cebadores

FIP	RIP	Cebador F3	Cebador R3	Cebador de bucle F	Cebador de bucle R
FA-3d	RA-3	F3-3	R3-3	GC-LPF1	GC-LPR1

3) Componentes de reacción:

Se usó la solución de reacción que contiene los mismos componentes de reacción descritos en el Experimento 2.

25 4) Método de RT-LAMP

Se realizó el método de RT-LAMP como se ha descrito en el Experimento 2.

5) Detección de ácidos nucleicos

La detección de ácidos nucleicos se realizó como se ha descrito en el Experimento 2.

6) Resultados

30 Los resultados se muestran en la Fig. 3. Los mismos muestran que la cantidad más grande ARNm de GAPDH de molde para β-actina permitió la confirmación más temprana de la amplificación. La amplificación se confirmó en 30 minutos incluso con 0,02 ng del molde y en aproximadamente 10 minutos con 20 ng del molde.

(Experimento 6)

35 La amplificación de GAPDH se investigó en cultivos celulares, células LS180 (línea de células de tumorales colónicas) y células Raji (línea de células de linfoma de Burkitt).

Se diluyó una solución de células LS180 positiva a citokeratina con una solución de células Raji negativas a citokeratina y la amplificación de GAPDH se examinó para concentraciones diferentes de solución de células LS 180, examinando de ese modo si GAPDH está disponible como un control para corrección de datos en determinación de marcadores tumorales de citokeratina.

40 1) Muestras

Se prepararon muestras para ajustar el número de células totales de células LS180 y Raji a 8000. Entre el número

de células totales de 8000, el número de células LS 180 se ajustó a 8000, 800, 80, 8 ó 0.

2) Conjuntos de cebador para GAPDH

Se seleccionaron los mismos conjuntos de cebador como se han descrito en el Experimento 5.

3) Componentes de reacción

5 Se usó la solución de reacción que contenía los mismos componentes de reacción que se han descrito en el Experimento 2.

4) Método de RT-LAMP

10 Se realizó el método de RT-LAMP como se ha descrito en el Experimento 2. Dos microlitros de la suspensión de células se añadieron a 23 μ l de la solución de reacción que contenía los mismos seis cebadores descritos en el Experimento 5 y se calentó a 65°C durante una hora.

5) Detección de ácidos nucleicos

La detección de ácidos nucleicos se realizó como se ha descrito en el Experimento 2.

6) Resultados

15 Los resultados se muestran en la Fig. 4. Los mismos demostraron que GAPDH se amplificó en aproximadamente 10 minutos, independientemente de la proporción entre células LS180 y Raji. Esto confirmó que GAPDH se expresa constitutivamente en las células humanas independientemente de la presencia o ausencia de los marcadores tumorales, sugiriendo que GAPDH está disponible como un control para corrección de datos en el método LAMP.

Aplicabilidad industrial

20 Como se ha descrito anteriormente, el uso de los cebadores o conjuntos de cebadores de la presente invención en el método LAMP permite la confirmación de amplificación de β -actina en 15 minutos como el tiempo más corto.

La presencia de β -actina y GAPDH se observó en las células humanas, independientemente de la presencia o ausencia de un marcador tumoral tal como citokeratina. Estos resultados muestran que estos genes están disponibles como un control para corrección de datos en el método LAMP.

25 Tomados en conjunto, el uso de los cebadores o conjuntos de cebadores de la presente invención reducirá el tiempo necesario para realizar un diagnóstico durante el proceso de diagnóstico de metástasis usando amplificación de ácido nucleico, posibilitando de ese modo diagnóstico fiable.

Aspectos preferidos

1. Un cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar un gen constitutivo y/o un ARNm relacionado con gen constitutivo mediante el método LAMP.

30 2. El cebador del punto 1, en el que el gen constitutivo es un gen de β -actina y/o un gen de GAPDH.

3. Un cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar β -actina, que comprende un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en:

35 1) un oligonucleótido que comprende al menos 5 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 1 o la secuencia complementaria de la misma que se selecciona entre las regiones de los nucleótidos 240-380 y 401-1060 y/o las regiones complementarias a estas regiones;

2) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta como una cualquiera de SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 4-34;

3) un oligonucleótido complementario a uno cualquiera de los oligonucleótidos definidos en 1) o 2) anteriormente;

40 4) un oligonucleótido capaz de hibridarse al oligonucleótido definido en uno cualquiera de 1)-3) en condiciones rigurosas; y

5) un oligonucleótido que tiene la función de cebador, que comprende la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido definido en uno cualquiera de 1) a 4) anteriormente en el cual uno o más nucleótidos se mutan mediante sustitución, supresión, inserción o adición.

45 4. Un cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar β -actina, que comprende un oligonucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas como SEC ID N°: 10, 14-17 y 29-50.

5. Un cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar GAPDH, que comprende un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en:
- 1) un oligonucleótido que comprende al menos 5 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 51 o la secuencia complementaria de la misma que se selecciona entre la región de los nucleótidos 110-450 y/o la región complementaria a esta región;
 - 2) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta como una cualquiera de SEC ID N°: 52-79;
 - 3) un oligonucleótido complementario a uno cualquiera de los oligonucleótidos definidos en 1) o 2) anteriormente;
 - 4) un oligonucleótido capaz de hibridar al oligonucleótido definido en uno cualquiera de 1)-3) en condiciones rigurosas; y
 - 5) un oligonucleótido que tiene la función de cebador, que comprende la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido definido en uno cualquiera de 1) a 4) anteriormente en el cual uno o más nucleótidos se mutan mediante sustitución, supresión, inserción o adición.
6. Un cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar GAPDH, que comprende un oligonucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas como SEC ID N°: 58, 62-64 y 73-96.
7. El cebador para amplificación de ácido nucleico de uno cualquiera de los puntos 3 a 6, en el que el método para amplificación de ácido nucleico es el método LAMP.
8. Un conjunto de cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar β -actina, que se presenta mediante la selección de al menos dos cebadores a partir de los cebadores para amplificación de ácido nucleico que comprende los oligonucleótidos que tienen secuencias de ácido nucleico seleccionadas entre el grupo que consiste en:
- 1) un oligonucleótido que comprende al menos 5 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 1 o la secuencia complementaria de la misma que se selecciona entre la región de nucleótidos 240-1060 y/o la región complementaria a esta región;
 - 2) un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta como una cualquiera de SEC ID N°: 2-34;
 - 3) un oligonucleótido complementario a uno cualquiera de los oligonucleótidos definidos en 1) o 2) anteriormente;
 - 4) un oligonucleótido capaz de hibridarse al oligonucleótido definido en uno cualquiera de 1)-3) en condiciones rigurosas; y
 - 5) un oligonucleótido que tiene la función de cebador, que comprende la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido definido en uno cualquiera de 1) a 4) anteriormente en el cual uno o más nucleótidos se mutan mediante sustitución, supresión, inserción o adición.
9. Un conjunto de cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar β -actina, que se presenta mediante la selección de al menos cuatro cebadores entre los cebadores para amplificación de ácido nucleico que comprenden los oligonucleótidos del punto 8.
10. El conjunto de cebador para amplificación de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 8 y 9, que muestra que al menos dos cebadores contenidos en el conjunto de cebador reconocen cada uno dos regiones de genes en la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 1 y/o la secuencia complementaria de la misma.
11. El conjunto de cebador para amplificación de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 9 y 10, que muestra que los cebadores contenidos en el conjunto de cebador reconocen al menos seis regiones de genes en la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 1 y/o la secuencia complementaria de la misma.
12. Un conjunto de cebador que comprende una combinación de cada cebador seleccionado entre cada uno de (a) FIP: SEC ID N°: 35-42; (b) RIP: SEC ID N°: 43-50; (c) F3: SEC ID N°: 10 y 14-17 y (d) R3: SEC ID N°: 29-32, categorías que consisten en los cebadores para amplificación de ácido nucleico para detectar β -actina que comprende los oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas en SEC ID N°: 10, 14-17, 29-32, 35-42 y 43-50.
13. El conjunto de cebador del punto 12, que comprende además los oligonucleótidos que tienen las secuencias

de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 33 y 34.

14. Un conjunto de cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar GAPDH, que se presenta mediante la selección de al menos dos cebadores a partir de los cebadores para amplificación de ácido nucleico que comprende los oligonucleótidos del punto 5.

5 15. Un conjunto de cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar GAPDH, que se presenta mediante la selección de al menos cuatro cebadores a partir de los cebadores para amplificación de ácido nucleico que comprende los oligonucleótidos del punto 5.

10 16. El conjunto de cebador para amplificación de ácido nucleico de acuerdo con el punto 14 ó 15, que muestra que al menos dos cebadores contenidos en el conjunto de cebador reconocen cada uno dos regiones de genes en la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 51 y/o la secuencia complementaria de la misma.

17. El conjunto de cebador para amplificación de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 14 a 16, que muestra que los cebadores contenidos en el conjunto de cebador reconocen al menos seis regiones de genes en la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 51 y/o la secuencia complementaria de la misma.

15 18. Un conjunto de cebador que comprende una combinación de cada cebador seleccionado entre cada uno de (a) FIP: SEC ID N°: 80-87 y (b) RIP: SEC ID N°: 88-96, categorías que consisten en los cebadores para amplificación de ácido nucleico para detectar GAPDH que comprende los oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 80-96.

20 19. El conjunto de cebador del punto 18, que comprende además un oligonucleótido que tiene una de las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 58 o SEC ID N°: 62-64 y un oligonucleótido que tiene una cualquiera de las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 73-77.

20. El conjunto de cebador del punto 18 ó 19, que comprende además, como cebadores, oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 78 y 79.

25 21. El conjunto de cebador de uno cualquiera de los puntos 8 a 20, en el que el método para amplificación de ácido nucleico es el método LAMP.

22. Un conjunto de cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar β -actina, que comprende uno cualquiera de los siguientes conjuntos de cebadores:

1) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 35, 43, 14 y 29 como cebadores;

30 2) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 36, 44, 15 y 30 como cebadores;

3) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 37, 45, 10 y 31 como cebadores;

35 4) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 41, 50, 17 y 32 como cebadores;

5) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 38, 45, 10 y 31 como cebadores;

6) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 39, 45, 10 y 31 como cebadores;

40 7) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 40, 45, 16 y 31 como cebadores;

8) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 41, 45, 16 y 31 como cebadores;

45 9) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 37, 46, 16 y 31 como cebadores;

10) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 37, 47, 16 y 31 como cebadores;

11) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 37, 48, 16 y 31 como cebadores;

12) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 37, 49, 16 y 31 como cebadores;

23. Un conjunto de cebador para amplificación de ácido nucleico para detectar GAPDH, que comprende uno cualquiera de los siguientes conjuntos de cebadores:

5 1) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 80, 88, 62 y 73 como cebadores;

2) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 81, 89, 63 y 75 como cebadores;

10 3) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 86, 95, 58 y 76 como cebadores;

4) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 87, 96, 64 y 77 como cebadores;

5) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 81, 89, 62 y 75 como cebadores;

15 6) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 82, 89, 62 y 75 como cebadores;

7) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 83, 89, 63 y 75 como cebadores;

20 8) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 83, 89, 62 y 75 como cebadores;

9) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 84, 89, 62 y 75 como cebadores;

10) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 85, 89, 62 y 75 como cebadores;

25 12) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 81, 90, 63 y 75 como cebadores;

13) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 81, 91, 63 y 75 como cebadores;

30 14) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 81, 92, 63 y 75 como cebadores;

15) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 81, 93, 63 y 75 como cebadores;

16) un conjunto de cebador que comprende oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 81, 94, 63 y 75 como cebadores;

35 24. Un método para detectar ácido nucleico, en el que se usa al menos uno de los cebadores de los puntos 1 a 7.

25. Un método para detectar ácido nucleico, en el que se usa al menos uno de los cebadores de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 8 a 23.

40 26. Un reactivo y/o un kit de reactivo usado en el método para detectar ácido nucleico definido en el punto 24 ó 25.

27. Un sistema para detectar ácido nucleico, que usa el método de detección de ácido nucleico del punto 24 ó 25.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Sysmex Corporation

45 <120> Cebador de gen constitutivo

<130> GP02-1019

ES 2 382 868 T3

<150> JP P2002-043866

<151> 20-02-2002

<150> JP P2002-043867

<151> 20-02-2002

5 <160> 96

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 1128

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

```
atggatgatg atatcgccgc gctcgtcgtc gacaacggct ccggcatgtg caaggccggc      60
ttcggggggc acgatgcccc ccgggcccgtc ttcccctcca tcgtggggcg ccccaggcac      120
cagggcggtg tggtagggcat gggtcagaag gattcctatg tgggcgacga ggcccagagc      180
aagagaggca tcttcaccct gaagtacccc atcgagcacc gcatcgtcac caactgggac      240
gacatggaga aaatctggca ccacacctc tacaatgagc tgcgtgtggc tcccaggagc      300
caccctgtgc tgctgaccga ggccccctg aaccccaagg ccaaccgcca gaagatgacc      360
cagatcatgt ttgagacctt caacacccca gccatgtacg ttgctatcca ggctgtgcta      420
tccctgtacg cctctggccg taccactggc atcgtgatgg actccgggtg cggggtcacc      480
```

ES 2 382 868 T3

cacactgtgc ccacttacga ggggtatgcc ctecccatg ccactcctgcg tctggacctg 540
gctggccggg acctgactga ctacctcatg aagatcctca ccgagcggg ctacagcttc 600
accaccacgg ccgagcggga aatcgtgcgt gacattaagg agaagctgtg ctacgtcgcc 660
ctggacttcg agcaagagat ggccacggct gcttccagct cctccctgga gaagagctac 720
gagctgcctg acggccaggt catcaccatt ggcaatgagc eggtccgctg ccctgaggca 780
ctcttcacgc ctcccttccct gggcatggag tccgtgtggca tccacgaaac taccttcaac 840
tccatcatga agtgtgacgt ggacatccgc aaagacctgt acgccaacac agtgcgtgtct 900
ggcggcacca ccactgtacc tggcattgcc gacaggatgc agaaggagat cactgccctg 960
gcaccacgca caatgaagat caagatcatt gctcctcctg agcgaagta ctccgtgtgg 1020
atcggcggct ccactcctggc ctccgtgtcc acctccacgc agatgtggat cagcaagcag 1080
gagtatgacg agtccggccc ctccatcgtc caccgcaaat gcttctag 1128

<210> 2

<211> 16

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> ADN diseñado en base a beta-actina

<400> 2

tggcctggg ttcagg 16

10 <210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial

<220>

15 <223> ADN diseñado en base a beta-actina

<400> 3

cgtacatggc tggggtgtg 20

<210> 4

<211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 5 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 4
 gatgccacag gactccatgc 20
 <210> 5
 <211> 22
 10 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 5
 15 tgaaggtagt ttcgtggatg cc 22
 <210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> artificial
 20 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 6
 cagogtacat ggtggtgcc 19
 <210> 7
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 30 <400> 7
 accttctaca atgagctgcg 20
 <210> 8
 <211> 17
 <212> ADN
 35 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina

<400> 8
 ccaaccgcca gaagatg 17
 <210> 9
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 9
 10 attggcaatg agcggttcc 19
 <210> 10
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 10
 tggcaatgag cggttcc 17
 <210> 11
 20 <211> 17
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 25 <400> 11
 tgaggcactc tccagc 17
 <210> 12
 <211> 18
 <212> ADN
 30 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 12
 tctccagcc ttccttc 18
 35 <210> 13
 <211> 18
 <212> ADN

<213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 13
 5 agtgtgacgt ggacatcc 18
 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 14
 cgacatggag aaaatctggc 20
 <210> 15
 15 <211> 17
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 20 <400> 15
 aatgagctgc ggtgtggc 17
 <210> 16
 <211> 17
 <212> ADN
 25 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 16
 tacgagctgc ctgacgg 17
 30 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 35 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 17
 gcatccacga aactacctc 20

<210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 5 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 18
 cgcgagaaga tgaccagat c 21
 <210> 19
 10 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 15 <400> 19
 tgctatccag gctgtgctat cc 22
 <210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 20
 tgaagtgtga cgtggacatc c 21
 25 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 30 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 21
 acgtggacat ccgcaaagac 20
 <210> 22
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>

<223> ADN diseñado en base a beta-actina
<400> 22
attgccgaca ggatgcagaa g 21
<210> 23
5 <211> 19
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> ADN diseñado en base a beta-actina
10 <400> 23
agcctggata gcaacgtac 19
<210> 24
<211> 18
<212> ADN
15 <213> artificial
<220>
<223> ADN diseñado en base a beta-actina
<400> 24
tccatcacga tgccagtg 18
20 <210> 25
<211> 17
<212> ADN
<213> artificial
<220>
25 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
<400> 25
agggtacatg gtggtgc 17
<210> 26
<211> 17
30 <212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> ADN diseñado en base a beta-actina
<400> 26
35 tgccagggta catggtg 17
<210> 27
<211> 19

<212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 5 <400> 27
 gcaatgccag ggtacatgg 19
 <210> 28
 <211> 18
 <212> ADN
 10 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 28
 gtacttgccg tcaggagg 18
 15 <210> 29
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 20 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 29
 cgatgccagt ggtacgg 17
 <210> 30
 <211> 18
 25 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 30
 30 tagatgggca cagtgtgg 18
 <210> 31
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 31

tccttctgca tcctgtcg 18
 <210> 32
 <211> 17
 <212> ADN
 5 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 32
 ctggaagggtg gacagcg 17
 10 <210> 33
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 33
 acaggactcc atgccc 16
 <210> 34
 <211> 18
 20 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 34
 25 tgtacgcaa cacagtgc 18
 <210> 35
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 35
 tggccttggg ttcaagacct tctacaatga gctgcg 36
 <210> 36
 35 <211> 37
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 36
 cgtacatggc tggggtgtg ccaaccgca gaagatg 37
 5 <210> 37
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 10 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 37
 tgaaggtagt ttcgtgatg cctgaggcac tctccagc 39
 <210> 38
 <211> 40
 15 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 38
 20 tgaaggtagt ttcgtgatg cctctccag cctccitcc 40
 <210> 39
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 39
 tgaaggract ttcgtgatg cctggcaatg agcggttcc 39
 <210> 40
 30 <211> 37
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 35 <400> 40
 gatgccacag gactccatgc tggcaatgag cggttcc 37
 <210> 41

<211> 39
 <212> ADN <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 5 <400> 41
 gatgccacag gactccatgc attggcaatg agcgggtcc 39
 <210> 42
 <211> 38
 <212> ADN
 10 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 42
 gatgccacag gactccatgc agtgtgacgt ggacatcc 38
 15 <210> 43
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 20 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 43
 cgcgagaaga tgaccagat cagcctggat agcaacgtac 40
 <210> 44
 <211> 40
 25 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 44
 30 tgctatccag gctgtgctat cctccatcac gatgccagtg 40
 <210> 45
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 45

tgaagtgga cgtggacatc caggtacat ggtggtgc 38
 <210> 46
 <211> 40
 <212> ADN
 5 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 46
 tgaagtgga cgtggacatc cgcaatgcca ggtacatgg 40
 10 <210> 47
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 47
 tgaagtgga cgtggacatc ctgccagggt acatggtg 38
 <210> 48
 <211> 39
 20 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 48
 25 acgtggacat ccgcaaagac gcaatgccag ggtacatgg 39
 <210> 49
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> ADN diseñado en base a beta-actina
 <400> 49
 acgtggacat ccgcaaagac tgccagggta catggtg 37
 <210> 50
 35 <211> 39
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>

<223> ADN diseñado en base a beta-actina

<400> 50

attgccgaca ggatgcagaa ggtactgcg ctcaggagg 39

5

<210> 51

<211> 1008

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 51

ES 2 382 868 T3

atggggaagg tgaaggtcgg agtcaacgga ttgggtcgta ttggggcct ggtcaccagg 60
gctgctttra actctggtaa agtggatatt gttgcatca atgacccctt cattgaccte 120
aactacatgg ttacatggt ccaatatgat tccacccatg gcaaattcca tggcaccgtc 180

aaggctgaga acgggaaget tgtcatcaat ggaaatccca tcaccatctt ccaggagcga 240
gatccctcca aatcaagtg gggcgatgct ggcgctgagt acgtcgtgga gtccactggc 300
gtcttcacca ccatggagaa ggctggggct catttgcagg ggggagccaa aagggtcatc 360
atctctgccc cctctgctga tgccccatg ttcgatcatgg gtgtgaaCCA tgagaagtat 420
gacaacagcc tcaagatcat cagcaatgcc tctgcaacca ccaactgctt agcaccctg 480
gccaaggcca tccatgacaa ctttggtatc gtggaaggac tcatgaccac agtccatgcc 540
atcaactgcca ccagaagac tgtggatggc ccctccggga aactgtggcg tgatggccgc 600
ggggctctcc agaacatcat ccctgcctct actggcgctg ccaaggctgt gggcaaggtc 660
atccctgagc tgaacgggaa gctcaactggc atggccttcc gtgtcccccac tgccaacgtg 720
tcagtgggtg acctgacctg ccgtctagaa aaacctgcca aatgatgta catcaagaag 780
gtggtgaagc aggcgtcggg gggccccctc aagggcctcc tgggctacac tgagcaccag 840
gtggtctctt ctgacttcaa cagcgacacc cactcctcca cctttgacgc tggggctggc 900
attgcctca acgaccactt tgtcaagctc atttcttggg atgacaacga atttggctac 960
agcaacaggg tgggtgacct catggcccac atggcctcca aggagtaa 1008

<210> 52

<211> 22

<212> ADN

<213> artificial

<220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 52
 tcattgatg acaagcttcc cg 22
 5 <210> 53
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 10 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 53
 tcctggaaga tggatgagg 20
 <210> 54
 <211> 19
 15 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 54
 20 gggatctcgc tcctggaag 19
 <210> 55
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 55
 acgtactcag cgccagcatc 20
 <210> 56
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 35 <400> 56
 aaatgagccc cagccttctc 20
 <210> 57

<211> 18
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 5 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 57
 ccacccatgg caaattcc 18
 <210> 58
 <211> 18
 10 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 58
 15 aaattccatg gcaccgtc 18
 <210> 59
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> artificial
 20 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 59
 tcaaggctga gaacggg 17
 <210> 60
 25 <211> 19
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 30 <400> 60
 cccatcacca tctccagg 19
 <210> 61
 <211> 18
 <212> ADN
 35 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH

<400> 61
 tgagtacgtc gtggagtc 18
 <210> 62
 <211> 18
 5 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 62
 10 gacccttca ttgacccc 18
 <210> 63
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 63
 tgcaaatc catggcac 18
 <210> 64
 20 <211> 18
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 25 <400> 64
 tctccagga gcgagatc 18
 <210> 65
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 65
 tccatcacc atctccagg 20
 35 <210> 66
 <211> 21
 <212> ADN

<213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 66
 5 ccaaaatcaa gtggggcgat g 21
 <210> 67
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 67
 tcaagtgggg cgatgctg 18
 <210> 68
 15 <211> 19
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 20 <400> 68
 tcaccacat ggagaaggc 19
 <210> 69
 <211> 17
 <212> ADN
 25 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 69
 aggggggagc caaaagg 17
 30 <210> 70
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 35 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 70
 tggactccac gacgtac 17

<210> 71
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> artificial
 5 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 71
 aagacgccag tggactc 17
 <210> 72
 10 <211> 17
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 15 <400> 72
 tgatgaagac gccagtg 17
 <210> 73
 <211> 17
 <212> ADN
 20 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 73
 agccttctcc atggtgg 17
 25 <210> 74
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 30 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <900> 74
 cccagccttc tccatgg 17
 <210> 75
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>

<223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 75
 gagatcatga ccctttggc 20
 <210> 76
 5 <211> 17
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 10 <400> 76
 catgacgaac atggggg 17
 <210> 77
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 77
 tgctgatgat cttgaggctg 20
 20 <210> 78
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 25 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 78
 atgatgatgg gatttc 16
 <210> 79
 <211> 19
 30 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 79
 35 ctgagtacgt catggagtc 19
 <210> 80
 <211> 40

<212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 5 <400> 80
 tcattgatg acaagcttc cgccacccat ggcaaattcc 40
 <210> 81
 <211> 36
 <212> ADN
 10 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 81
 gggatctcgc tctgcaagt caaggctgag aacggg 36
 15 <210> 82
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 20 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 82
 gggatctcgc tctggaaga aattccatgg caccgtc 37
 <210> 83
 <211> 37
 25 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 83
 30 tctggaaga tggatgagg tcaaggctga gaacggg 37
 <210> 84
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 84

tcctagaaga tggatgagg aaattccatg gcaccgtc 38
 <210> 85
 <211> 38
 <212> ADN
 5 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 85
 tcctggaaga tggatgagg ccaccatgg caaattcc 38
 10 <210> 86
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 86
 acgtactcag cgccagcatc cccatcacca tctccagg 39
 <210> 87
 <211> 38
 20 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 87
 25 aaatgagccc cagcctctc tgagtacgtc gtggagtc 38
 <210> 88
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 88
 tccatcacc atctccagg tggactccac gacgtac 37
 <210> 89
 35 <211> 35
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 89
 tcaagtaggg cgatgctgag ccttctccat ggtgg 35
 5 <210> 90
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 10 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 90
 tcaagtgggg cgatgctgcc cagccttctc catgg 35
 <210> 91
 <211> 35
 15 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 91
 20 tcaagtgggg cgatcctgtg gtgaagacgc cagtg 35
 <210> 92
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 92
 tcaaatgagg cgatgctgaa gacgccagtg gactc 35
 <210> 93
 30 <211> 38
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 35 <400> 93
 ccaaatcaa gtggggcgat gagccttctc catggtgg 38
 <210> 94

<211> 38
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 5 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 94
 ccaaaatcaa gtggggcgat gccagcctt ctccatgg 38
 <210> 95
 <211> 39
 10 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 95
 15 tcaccacat ggagaaggcg agatgatgac cctttggc. 39
 <210> 96
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> artificial
 20 <220>
 <223> ADN diseñado en base a GAPDH
 <400> 96
 aggggggagc caaaaggcat gacgaacatg Hg. 34

REIVINDICACIONES

1. Un reactivo para detectar ARNm de β -actina mediante el método de RT-LAMP, que comprende un conjunto de cebador que comprende un cebador FIP, RIP, F3 y R3, en el que el cebador FIP comprende una secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 37, el cebador RIP comprende una secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 45, el cebador F3 comprende una secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 10 y el cebador R3 comprende una secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 31.
2. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un conjunto de cebador en el que el cebador FIP consiste en una secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 37, el cebador RIP consiste en una secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 45, el cebador F3 consiste en una secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 10 y el cebador R3 consiste en una secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 31.
3. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que comprende además un cebador que comprende una secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 33.
4. El reactivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo además un cebador que comprende una secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 34.
5. El reactivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo además una enzima con actividad de transcriptasa inversa, sustratos de dNTP y ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena.
6. Un método para detectar ARNm de β -actina, en el que se usa al menos uno de los conjuntos de cebador de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Uso de al menos uno de los reactivos de las reivindicaciones 1 a 5 para un método para detectar ARNm de β -actina mediante método de RT-LAMP.

Fig. 1

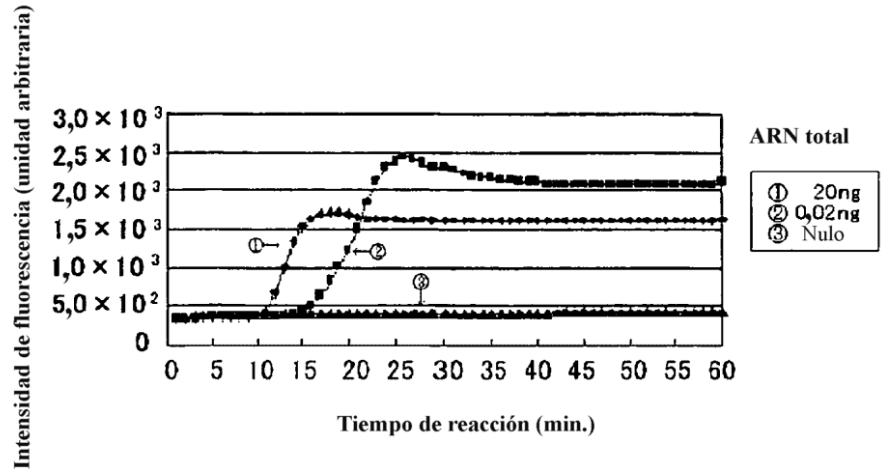


Fig. 2

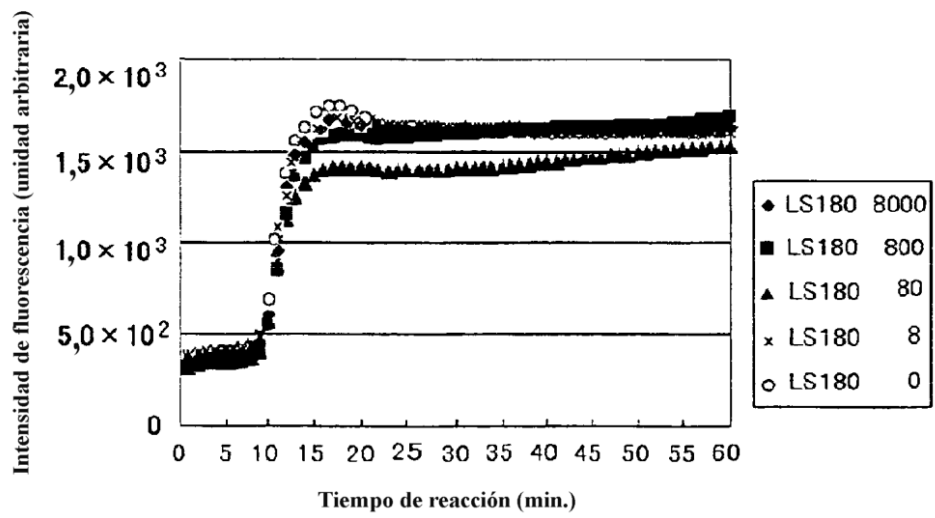


Fig. 3

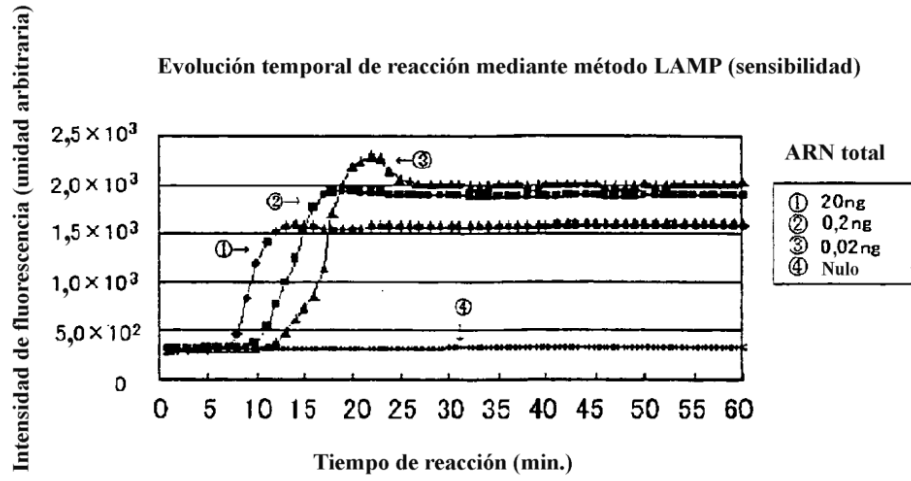


Fig. 4

