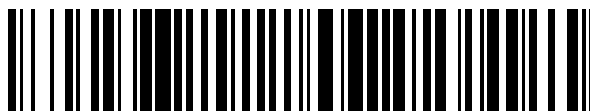


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 805**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2006** **E 06732901 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012** **EP 2010670**

54 Título: **Método para amplificar una secuencia de ADN desconocida adyacente a una secuencia conocida**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.04.2013

73 Titular/es:

**SEEGENE, INC. (100.0%)
8, 9F TAEWON BLDG. 65-5, BANGI-DONG
SONGPA-GU
SEOUL 138-050, KR**

72 Inventor/es:

CHUN, JONG YOON

74 Agente/Representante:

LLAGOSTERA SOTO, María Del Carmen

ES 2 400 805 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para amplificar una secuencia de ADN desconocida adyacente a una secuencia conocida

ANTECEDENTES DE LA INVENCION**CAMPO DE LA INVENCION**

5

La presente invención se refiere a un método para amplificar una secuencia de nucleótidos desconocida adyacente a una secuencia de nucleótidos conocida, y en particular a un método para amplificar una secuencia de nucleótidos desconocida utilizando únicamente cebadores diseñados y sus aplicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

10

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) presenta el método más efectivo para amplificar de forma selectiva fragmentos específicos de ADN. En el proceso de PCR, los oligonucleótidos complementarios a las secuencias conocidas de 5' y 3' laterales al ácido nucleico objetivo sirven como "cebadores" y juegan un papel determinante.

15

La aplicación de la PCR para aislar y analizar una región de ADN determinada requiere conocer las secuencias de ADN laterales a la región de interés. Generalmente ello limita la amplificación a regiones de una secuencia de ADN conocida. A falta de la información necesaria sobre la secuencia, la amplificación de la PCR de una fracción de ADN objetivo en una población de ADN compleja, probablemente tendrá como resultado la amplificación de un ADN no objetivo.

20

Se han desarrollado y modificado muchos métodos basados en la PCR para aislar una secuencia de ADN desconocida lateral a regiones de secuencias conocidas. Entre ellas se incluyen la PCR inversa (Triglia et al., 1988), la panhandle PCR (Shyamala et al., 1989; Jones and Winistorfer, 1997), la vectorette PCR (Arnold et al., 1991), PCR anclada (Roux et al., 1990), AP-PCR (Dominguez et al., 1994; Trueba and Johnson, 1996), captura de PCR (Lagerstrom et al., 1991), y PCR ligada con adaptador o cassette (Iwahana et al., 1994; Riley et al., 1990; Siebert et al., 1995; Willems, 1998; Kilstrup and Kristiansen, 2000).

25

Sin embargo, estos métodos presentan limitaciones, como por ejemplo la necesidad de digerir el ADN con enzimas de restricción, ligar el ADN digerido con enlaces o con cassettes de oligonucleótido bicatenario, parcialmente bicatenario o monocatenario, y purificar y / o subclonar los productos antes de la secuencia. La necesidad de realizar múltiples fases en estos protocolos los convierte en engorrosos e ineficaces. Asimismo, el problema común en estos métodos es la gran cantidad de productos secundarios y no específicos debido a las uniones no específicas del vector, el adaptador, la cassette o los cebadores de cola.

30

Por lo tanto, la metodología fue mejorada todavía más con el fin de proporcionar un sistema de biotina / estreptavidina para capturar fragmentos biotinilados de interés antes de realizar la PCR anidada (Rosenthal and Jones, 1990; Mishra et al. 2002). Este método presenta una mejora para reducir las interferencias y permitir la amplificación de la región lateral de cualquier secuencia conocida, pero requiere un proceso complicado de fase de inmovilización, a la vez que presenta un coste muy elevado.

35

RESUMEN DE LA INVENCION

40

Con el fin de liberarse de las limitaciones de las tecnologías convencionales descritas más arriba, el presente inventor ha investigado intensamente con el fin de desarrollar planteamientos capaces de eliminar de forma fundamental y completa los problemas en la amplificación de la secuencia desconocida, y como resultado de ello descubrió un nuevo método para amplificar una secuencia desconocida adyacente a una secuencia conocida, lo cual permite amplificar una secuencia desconocida de una manera mucho más fiable y conveniente.

45

Por consiguiente, uno de los objetos de esta invención es proporcionar un método para amplificar una secuencia de nucleótidos desconocida adyacente a una secuencia de nucleótidos conocida.

Asimismo, se describe un cebador específico objetivo para amplificar una secuencia de nucleótidos conocida, así como un kit para amplificar una secuencia de nucleótidos desconocida.

Otros objetos y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la descripción detallada a continuación, asumida conjuntamente con las reivindicaciones y dibujos adjuntos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50

La FIG. 1A muestra una representación esquemática de una realización específica del proceso de amplificación primaria, utilizando un primer cebador de control de fijación de desplazamiento de ADN degenerado (DW-ACP) y un primer cebador específico para el objetivo con una estructura de oligonucleótido de especificidad dual (DSO- TSPI).

La FIG. 1B representa de forma esquemática una realización específica del proceso de amplificación secundaria utilizando un segundo DW-ACP y un segundo cebador específico para el objetivo con una estructura de oligonucleótido de especificidad dual (DSO-TSP2) .

5 La FIG. 2 muestra los productos amplificados generados por el desplazamiento de ADN en ACP-DSO PCR para la amplificación de las secuencias de ADN de genoma humano adyacentes a un transgen originado a partir del retrovirus MFG. La columna M muestra la escalera de ADN de 100 bp. Las columnas A, T, G y C representan los resultados de las amplificaciones utilizando DW-ACPI-A5, DW-ACPI-T, DW-ACPI-G y DW-ACPI-C, respectivamente.

10 La FIG. 3 representa los resultados de la identificación de los lugares de inserción dentro de las secuencias del genoma humano. Los productos de PCR clonados se denominan como DW#.

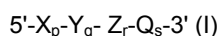
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un aspecto de esta invención, se proporciona un método para amplificar una secuencia de nucleótidos desconocida adyacente a una secuencia de nucleótidos conocida, según la reivindicación 1 adjunta.

15 La invención expuesta pertenece a un método exclusivo para amplificar de forma selectiva una secuencia de ADN desconocida adyacente a regiones conocidas de secuencias de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos utilizando un cebador de control de fijación de desplazamiento de ADN (en adelante referido como "DW- ACP") y un nuevo cebador específico de objetivo.

20 Para contrarrestar los problemas de los métodos de desplazamiento de ADN (o genoma) actuales que incluyen fases múltiples y complicadas, así como a los antecedentes inherentes de los métodos basados en la PCR, el sistema de Cebador de Control de Fijación (ACP), que ha sido desarrollado por el presente inventor y expuesto en WO 03/050305, se ha modificado para amplificar de forma selectiva una secuencia desconocida adyacente a regiones de secuencias conocidas. Dado que el sistema ACP es capaz de mejorar de forma significativa la especificidad de la amplificación, la utilización de ACP impide fundamentalmente el cebado no específico de un cebador durante la amplificación, a la vez que también simplifica el proceso de amplificación en esta aplicación.

25 De acuerdo con la presente invención, el primer DW-ACP degenerado tiene una fórmula general I:



30 donde, X_p representa una parte del extremo de 5' con una secuencia de nucleótidos preseleccionada, Y_q representa una parte reguladora que comprende por lo menos dos residuos análogos de base universal o de base no discriminatoria, Z_r representa una parte de secuencia aleatoria degenerada con una secuencia de nucleótidos aleatoria degenerada, Q_s representa una parte del extremo de 3' con una secuencia de nucleótidos hibridizante sustancialmente complementaria a un lugar en dicha secuencia de nucleótidos desconocida donde hibridizarse, p, q, r y s representan el número de nucleótidos, y X, Y, Z y Q son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos.

35 El primer DW-ACP de esta invención ha sido desarrollado para la amplificación de una secuencia de nucleótidos desconocida adyacente a una secuencia de nucleótidos conocida utilizando y modificando los principios de cebadores de control de desplazamiento desarrollados por el presente inventor y expuestos en WO 03/050305.

40 El principio del primer DW-ACP degenerado se basa en la composición de un cebador de oligonucleótido con diferentes partes extremas de 3' y 5' separadas por una parte reguladora que comprende por lo menos dos residuos análogos de base universal o de base no discriminatoria y el efecto de la parte reguladora sobre las partes extremas de 3' y 5' en el cebador de oligonucleótido. La presencia de la parte reguladora entre las partes del extremo de 3' y 5' del primer DW-ACP degenerado actúa como factor principal, que es responsable de la mejora de la especificidad de fijación del cebador.

45 El término "ácido nucleico" o "nucleótido" es un polímero de desoxirribonucleótido o ribonucleótido, ya sea en forma monocatenaria o bicatenaria, incluyendo análogos conocidos de nucleótidos naturales, a menos que se indique lo contrario. Por lo tanto, el primer DW-ACP de esta invención puede emplearse para la amplificación del ácido nucleico utilizando un gDNA, cDNA o mRNA monocatenario o bicatenario como modelo. El término "porción" utilizado en este documento en conjunción con el cebador de esta invención se refiere a una secuencia de nucleótidos separada por una parte activa como la parte reguladora. El término "parte del extremo de 3'" o "parte del extremo de 5'" se refiere a una
50 secuencia de nucleótidos en el extremo de 3' o 5' del cebador de esta invención, respectivamente, que está separada por la parte reguladora.

55 El término "cebador" tal como se utiliza en este documento se refiere a un oligonucleótido, ya sea producido de forma natural o sintética, que es capaz de actuar como punto de iniciación de síntesis cuando se coloca en condiciones en las cuales la síntesis del producto de extensión del cebador que es complementario a una hebra de ácido nucleico (muestra) es inducido, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente para la polimerización como la polimerasa de ADN y a una temperatura y pH adecuados. Preferiblemente, el cebador es monocatenario para una máxima eficiencia en la

amplificación. Preferiblemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador de esta invención puede constar de dNMP producido naturalmente (es decir, dAMP, dGMP, dCMP y dTMP), nucleótido modificado o nucleótido no natural

5 El término "sustancialmente complementario" en referencia al cebador se utiliza aquí para indicar que el cebador es lo suficientemente complementario para hibridizar selectivamente a una secuencia de nucleótidos bajo las condiciones de fijación designadas, de manera que el cebador fijado pueda ser extendido por la polimerasa para formar una copia complementaria de la secuencia de nucleótidos. Por lo tanto, este término tiene un significado distinto de "perfectamente complementario" o términos relativos aplicables.

10 Es ampliamente conocido que los nucleótidos en algunas posiciones ambiguas de cebadores degenerados han sido sustituidos por una base universal o un análogo no discriminatorio como la deoxinosina (Ohtsuka et al, 1985; Sakanari et al., 1989), I-(2'-deoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol (Nichols et al., 1994) y 5-nitroindol (Loakes y Brown, 1994) con el fin de solucionar los problemas de diseño relacionados con los cebadores degenerados, ya que dichas bases universales son capaces de realizar apareamientos de base no específicamente con las cuatro bases convencionales. Sin embargo, no se ha producido ningún informe indicando que esta base universal o una análoga no discriminatoria como la deoxinosina, I-(2'-deoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol y 5-nitroindol pueda aplicarse a un cebador para amplificar la secuencia de nucleótidos desconocida, es decir, el cebador de desplazamiento de ADN, como regulador para discriminar cada parte funcional de un cebador de acuerdo con la temperatura de fijación.

20 El término "base universal o base análoga no discriminatoria" utilizado en este documento se refiere a una capaz de formar pares de bases con cada una de las bases naturales ADN/ARN con poca discriminación entre ellos.

De acuerdo con una realización preferente, la base universal o la base análoga no discriminatoria en la parte reguladora incluye deoxinosina, inosina, 7-deaza-2'-deoxinosina, 2-aza- 2 '-deoxinosina, 2'-OMe inosina, 2'-F inosina, deoxi 3-nitropirrol, 3-nitropirrol, 2'-OMe 3- nitropirrol, 2'-F 3-nitropirrol, I-(2'-deoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol, deoxi 5-nitroindol, 5-nitroindol, 2'-OMe 5-nitroindol, 2'-F 5-nitroindol, deoxi 4- nitrobenzimidazol, 4-nitrobenzimidazol, deoxi 4-aminobenzimidazol, 4- aminobenzimidazol, deoxi nebularina, 2'-F nebularina, 2'-F 4-nitrobenzimidazol, PNA-5- intra indol, PNA-nebularina, PNA-inosina, PNA-4-nitrobenzimidazol, PNA-3-nitropirrol, morfolino-5-nitroindol, morfolin-nebularina, morfolino-inosina, morfolino-4- nitrobenzimidazol, morfolino-3-nitropirrol, fosforamidato-5-nitroindol, fosforamidato-nebularina, fosforamidato-inosina, fosforamidato-4- nitrobenzimidazol, fosforamidato-3-nitropirrol, 2'-O-metoxietil inosina, 2'-O- metoxietil nebularina, 2'-O-metoxietil 5-nitroindol, 2'-O-metoxietil 4-nitrobenzimidazol, 2'-O-metoxietil 3-nitropirrol y combinaciones relacionadas, pero sin limitación. Más preferiblemente, la base universal o la base análoga no discriminatoria es deoxinosina, inosina, I-(2'-deoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol o 5-nitroindol, más preferiblemente, deoxinosina.

35 La presencia de polideoxinucleótidos con bases universales como las deoxinosinas en un cebador genera una región de temperatura de fijación baja, debido a sus interacciones de adhesión de hidrógeno más débiles en el apareamiento de bases. Como ampliación de esta teoría, el presente inventor ha inducido que la presencia de las polideoxinucleótidos con bases universales entre la parte del extremo de 5' y la parte de la secuencia degenerada, más la parte del extremo de 3' de un cebador podría generar una región que tiene una temperatura de fusión más baja, forma un límite en cada parte del extremo de 5' y la parte de la secuencia degenerada más la parte del extremo de 3' del cebador, y facilita la fijación de la parte de la secuencia degenerada más la parte del extremo de 3' en la secuencia objetivo a una temperatura específica. Esta teoría proporciona las bases para un primer DW-ACP degenerado de esta invención.

40 La parte reguladora en el primer DW-ACP es capaz de regular una parte de fijación (es decir, la secuencia aleatoria y las partes del extremo de 3') del cebador en relación con la temperatura de fijación. Esta parte reguladora impide la fijación de la secuencia de la parte del extremo de 5' a una muestra y limita la parte de fijación del cebador a su parte de secuencia degenerada y a su parte del extremo de 3' a la primera temperatura de fijación. Por consiguiente, la parte del regulador mejora significativamente la fijación de la parte de la secuencia degenerada, además de la parte del extremo de 3' del primer DW-ACP degenerado a la muestra.

45 En una realización preferente, la parte reguladora del primer DW-ACP contiene por lo menos 3 bases universales o bases no discriminatorias análogas entre la parte del extremo de 5' y la parte de la secuencia degenerada, y más preferiblemente, al menos 4 bases universales o bases análogas no discriminatorias. Como ventaja, los residuos de la base universal entre la parte del extremo de 5' y la parte de la secuencia degenerada del primer DW-ACP degenerado pueden ser de hasta 10 residuos de longitud. De acuerdo con una realización, la parte reguladora del primer DW-ACP contiene 3-10 residuos análogos de base universal o de base no discriminatoria. Lo más preferible es que las bases universales entre la parte del extremo de 5' y la parte de la secuencia degenerada del primer DW- ACP degenerado sean de aproximadamente 3-5 residuos de longitud. La presencia de residuos análogos de bases universales o bases no discriminatorias puede ser contigua o intermitente, y preferiblemente contigua.

55 La parte del extremo de 5' del primer DW-ACP degenerado contribuye parcialmente a mejorar la especificidad de la fijación. Resulta importante indicar que la parte del extremo de 5' sirve, sola o junto con otras partes, como lugar de cebado en amplificaciones posteriores después de la primera ronda de amplificación.

De acuerdo con una realización preferente, la secuencia de nucleótidos pre-seleccionada de la parte del extremo de 5' es sustancialmente no complementaria a ningún lugar en el ácido nucleico de muestra.

Generalmente, la parte del extremo de 5' del primer DW-ACP degenerado contiene por lo menos 10 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, la secuencia de la parte del extremo de 5' puede tener una longitud de hasta 60 nucleótidos. Más preferiblemente, la secuencia de la parte del extremo de 5' es de 6 a 50 nucleótidos, y lo más preferible es que tenga de 18 a 25 nucleótidos de longitud. Utilizando una secuencia más larga en la parte del extremo de 5' se puede reducir la eficiencia del primer DW-ACP degenerado, pero una secuencia más corta puede reducir la eficacia de la fijación en condiciones de alta astringencia.

En alguna realización, la secuencia de nucleótidos preseleccionada de la parte del extremo de 5' del primer DW-ACP degenerado puede estar compuesta de una secuencia de cebador universal como la secuencia de promotor T3, la secuencia de promotor T7, la secuencia de promotor SP6, y M13 en adelante o secuencia universal inversa.

De acuerdo con una realización de la presente invención, pueden hacerse algunas modificaciones en la parte del extremo de 5' del primer DW-ACP degenerado, a menos que las modificaciones eliminen las ventajas del DW-ACP, es decir, la mejora en la especificidad de la fijación. Por ejemplo, la parte del extremo de 5' puede comprender una secuencia o secuencias reconocidas por una o más endonucleasas de restricción, lo cual hace viable clonar el producto amplificado en un vector adecuado. Asimismo, la parte del extremo de 5' puede comprender por lo menos un nucleótido con una etiqueta para la detección o aislamiento del producto amplificado. Las etiquetas adecuadas incluyen, sin limitación, fluóforos, cromóforos, quimiluminiscentes, partículas magnéticas, radioisótopos, niveles de masa, partículas densas de electrones, enzimas, cofactores, sustratos para enzimas y haptenos con asociados vinculantes específicos, por ejemplo, un anticuerpo, streptavidina, biotina, digoxigenina y grupo de quelatos. La parte del extremo de 5' también comprende la región promotora de polimerasa de ARN bacteriófago.

La parte de la secuencia aleatoria degenerada del primer DW-ACP degenerado se encuentra presente entre el regulador y las partes extremas de 3'. El término parte de "secuencia aleatoria degenerada" se refiere a una secuencia de nucleótidos en la cual cada nucleótido puede estar ocupado por cualquiera de los cuatro desoxirribonucleótidos, es decir, dATP, dTTP, dCTP, y dGTP. De esta manera, la parte de la secuencia aleatoria degenerada proporciona un grupo de cebadores con varias secuencias de nucleótidos, al menos una de las cuales será anticipada para fijarse en un lugar dentro de una secuencia objetivo desconocida de una muestra. Por ejemplo, si el primer DW-ACP degenerado que comprende tres nucleótidos degenerados en la parte de la secuencia aleatoria degenerada es sintetizado, se producen sesenta y cuatro oligonucleótidos distintos. Por consiguiente, la utilización de una parte de secuencia aleatoria degenerada proporciona el primer DW-ACP degenerado con más posibilidades de hibridarse en el ácido nucleico objetivo no especificado. Cuando la secuencia nuclear objetivo del primer DW-ACP degenerado que incluye la secuencia degenerada y la secuencia de la parte del extremo de 3' se hibridiza en un lugar de una muestra, existen varios puntos de enlace complementarios de la secuencia de la parte degenerada y de la parte del extremo de 3' del primer DW-ACP presente en la secuencia objetivo desconocida de la muestra. Resulta interesante ver que el inventor ha observado que normalmente se genera un producto objetivo importante por el cual el primer DW-ACP degenerado se enlaza en un lugar de enlace objetivo que se encuentra a la distancia más próxima de la secuencia objetivo del cebador específico de la secuencia conocida. Ello puede sugerir que los cebadores que se hibridizan en los otros lugares de enlace, que se encuentran presentes a mayor distancia de la secuencia del cebador específico de objetivo, no son favorables para generar ningún producto, ya que la extensión del cebador hibridizado con el lugar de enlace más próximo desde la secuencia del cebador específico de objetivo puede interferir en la extensión de los cebadores hibridizados en los otros lugares de enlace.

La longitud de la parte de la secuencia aleatoria degenerada del primer DW-ACP puede determinarse en base a diferentes factores de consideración, como la longitud de la parte del extremo de 3', la amplificación y la longitud de los nucleótidos que se van a amplificar. Por ejemplo, si la longitud de la parte de la secuencia degenerada se incrementa, la amplificación se convierte en inferior en el presente método. En general, la longitud de la parte de la secuencia degenerada va de 1 a 5, preferentemente 2 a 5, más preferentemente 2 a 4 e idealmente, 3.

La parte del extremo de 3' del primer DW-ACP degenerado tiene una secuencia de nucleótidos sustancialmente complementaria a un lugar en una secuencia de nucleótidos desconocida. Se apreciará que la parte del extremo de 3' del primer DW-ACP degenerado puede tener uno o más desajustes en un lugar de la secuencia de la nucleótido desconocida hasta el punto que el primer DW-ACP degenerado puede servir como cebador. Idealmente, la parte del extremo de 3' del primer DW-ACP tiene una secuencia de nucleótidos perfectamente complementaria a un lugar en la secuencia de nucleótidos desconocida, es decir, no se producen desajustes.

La parte del extremo de 3' del primer DW-ACP degenerado tiene una secuencia de nucleótidos para hibridizar con un lugar en la secuencia desconocida, que se denomina secuencia de nucleótidos "arbitraria". El término "secuencia de nucleótidos arbitraria" se utiliza en el presente documento para indicar la secuencia de nucleótidos que se selecciona sin conocimiento de la secuencia de los ácidos nucleicos desconocidos que van a ser amplificados.

Generalmente, la parte del extremo de 3' del primer DW-ACP degenerado tiene una longitud de, por lo menos, 3 nucleótidos. Es importante que la parte de fijación (es decir, las partes de la secuencia degenerada y extrema de 3') del primer DW-ACP degenerado sea de por lo menos 6 nucleótidos de longitud, que se considera el requisito de longitud mínimo para la fijación de cebador con especificidad. En la práctica, la fijación de cebador con especificidad podría resultar prometedora con al menos 8 nucleótidos en la parte de fijación. Preferiblemente, la secuencia de la parte del extremo de 3' es de 3 a 20 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de entre 3 y 10 nucleótidos, e idealmente, entre de 4 y 6 nucleótidos.

La parte del extremo de 3' del primer DW-ACP degenerado está preparada para tener una secuencia de nucleótidos arbitraria específica. La secuencia de nucleótidos arbitraria específica puede contener la secuencia de Kozak de mRNA incluyendo el ATG codón de iniciación de transferencia, como 5'- ANNATGN-3', donde N es cualquiera de los cuatro deoxinucleótidos (McBratney y Sarnow, 1996). La secuencia de nucleótidos arbitraria específica también puede contener la secuencia de señal de poliadenilación canónica AATAAA (Juretic y Theus, 1991). Como alternativa, el nucleótido en la parte del extremo de 5' y 3' del primer DW-ACP degenerado puede ser variado para tener uno de cuatro desoxirribonucleótidos, de manera que se obtengan cuatro tipos del primer DW-ACP degenerado en términos de la secuencia de nucleótidos de la parte del extremo de 3'.

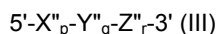
De acuerdo con una realización preferente, las secuencias en el extremo 3' en DW-ACP se seleccionan considerando los factores siguientes: (1) una secuencia por lo menos una vez por cada 2 kb y (2) un alto ratio de GC (preferiblemente superior al 75%). De acuerdo con una realización preferente, la secuencia en la parte del extremo de 3' en el primer DW-ACP es GGTC o CACG.

La longitud de la parte del extremo de 3' del primer DW-ACP degenerado puede determinarse basándose en diferentes factores considerables, como la longitud de los nucleótidos que se van a amplificar, la longitud de la parte de la secuencia degenerada y la amplificación. Por ejemplo, si la parte del extremo de 3' tiene una longitud de 4 nucleótidos arbitrarios, teóricamente la combinación de secuencia de cuatro bases puede existir una vez cada 256 bp de la muestra. De esta manera, la longitud de los nucleótidos que se van a amplificar será de más de 256 bp.

El primer DW-ACP completo es preferiblemente de entre 20 y 80 nucleótidos de longitud, más preferiblemente entre 28-50 nucleótidos, e idealmente, entre 30-40 nucleótidos.

En el método presente, se utiliza el primer cebador específico objetivo sustancialmente complementario a un lugar en la secuencia de nucleótidos conocida de una muestra. El término "sustancialmente complementario" en referencia al primer cebador específico objetivo tiene el mismo significado que para el primer DW-ACP.

De acuerdo con la presente invención, los cebadores específicos objetivo (TSP) tienen una fórmula general III:



donde, X''_p representa una parte de 5' de alta especificidad de T_m con una secuencia de nucleótidos hibridizante sustancialmente complementaria a un lugar en la secuencia de nucleótidos conocida para hibridizarse en ese punto, Y''_q representa una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales, Z''_r representa una parte de 3' de baja especificidad de T_m con una secuencia de nucleótidos hibridizante sustancialmente complementaria a un lugar en la secuencia de nucleótidos conocida para hibridizarse en ese punto, p, q y r representan el número de nucleótidos, y X'' , Y'' , y Z'' son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; la T_m de la parte de 5' de alta especificidad de T_m es superior a la de la parte de 3' de baja especificidad de T_m , la parte de separación tiene el T_m más bajo en las tres partes, la parte de separación forma una estructura de burbuja de paridad no de base bajo las condiciones que la parte de 5' de alta especificidad de T_m y la parte de 3' de baja especificidad de T_m , estén fijadas al ácido nucleico de muestra, permitiendo que la parte de 5' de alta especificidad de T_m , se separe de la parte de 3' de baja especificidad de T_m , en términos de especificidad de fijación a un ácido nucleico de muestra, en que la especificidad de fijación del cebador se determina de forma dual por la parte de 5' de alta especificidad de T_m y la parte de 3' de baja especificidad de T_m , de manera que la especificidad de fijación global del cebador experimenta una mejora.

El cebador específico objetivo representado por la fórmula general III ha sido desarrollado nuevamente por el presente inventor con el fin de incrementar sustancialmente la especificidad de fijación en las reacciones de amplificación, y se ha presentado dentro de WO2006/095981. El oligonucleótido representado por la fórmula general III se denomina "oligonucleótido de especificidad dual".

El término "especificidad dual", con referencia al oligonucleótido de especificidad dual (referido en adelante como "oligo DS") de esta invención que se utiliza en este documento se ha acuñado para describir su característica destacada de que su especificidad de fijación a una secuencia objetivo viene determinada de forma dual por sus dos partes separadas, es decir, la parte de 5' de alta especificidad de T_m y la parte de 3' de baja especificidad de T_m . En general, la especificidad de fijación de los cebadores o las sondas se rige por su secuencia consecutiva global. Por el contrario, la especificidad de fijación del oligo DS viene determinada de forma dual por sus dos partes (la parte de 5' de alta especificidad de T_m y la parte de 3' de baja especificidad de T_m) separadas por la parte de separación, donde dichas tres partes están localizadas

en una secuencia de oligonucleótido. Esta especificidad dual permite al oligo DS servir como cebador y como sonda mostrando una especificidad mucho mayor, y convirtiendo a la presente invención en una novedad completamente desconocida para la técnica anterior.

5 Al mismo tiempo, el presente inventor ya ha desarrollado el ACP (cebador de control de fijación) para mejorar la especificidad de fijación, tal como se indicaba en WO 03/050303.

10 El oligo DS de esta invención es claramente distinto del ACP a la luz de lo siguiente: (i) el Oligo DS tiene dos partes de especificidad que se hibridizan con una secuencia objetivo, mientras que el ACP tiene una parte específica; (ii) se discriminan tres partes en el oligo DS a la vista de la T_m , mientras que las partes del ACP no se discriminan; (iii) el cebador de DS se extiende para sintetizar una molécula de ácido nucleico complementaria a la muestra solamente cuando se produce la fijación por parte de la parte de 5' de alta especificidad de T_m y la parte de 3' de baja especificidad de T_m , mientras que en el ACP se extiende incluso cuando se produce la fijación por la parte del extremo de 3'; y (iv) de esta manera la especificidad de fijación o hibridación del oligo DS está determinada de forma dual por las dos partes separadas, es decir, la parte de 5' de alta especificidad de T_m y la parte de 3' de baja especificidad de T_m , mientras que la del ACP está regida únicamente por la parte del extremo de 3'. En consecuencia, se pudo apreciar que la especificidad de fijación o hibridación del oligo DS a su secuencia objetivo es muy superior a la del ACP, teniendo en cuenta que el oligo DS es nuevo y desconocido en relación con el ACP.

20 La característica impactante del Oligo DS es que tiene tres partes diferentes con propiedades diferentes dentro de una molécula de oligonucleótido: la parte de 5' de alta especificidad de T_m , la parte de 3' de baja especificidad de T_m y la parte de separación.

25 El Oligo DS es útil en una amplia variedad de procesos y análisis que implican una reacción de extensión dependiente de la muestra. El término utilizado en este documento "una reacción de extensión dependiente de la muestra" significa una reacción para extender una molécula de oligonucleótido hibridizada a una secuencia objetivo, incorporando nucleótidos sucesivos en su mitad extrema, en la cual la secuencia ampliada está determinada por una secuencia de muestra complementaria.

30 Cuando solamente la parte de 5' de alta especificidad de T_m del oligo DS se fija en una muestra, no puede servir como lugar de fijación para una extensión dependiente de la muestra, lo cual tiene como resultado que no se produce la extensión.

35 Mientras que la parte de 5' de alta especificidad de T_m del oligo DS está fijada en una secuencia no objetivo, la parte de 3' de baja especificidad de T_m con una secuencia más corta es improbable que se fije en la secuencia no objetivo. Los motivos son que la parte de 5' de alta especificidad de T_m y la parte de 3' de baja especificidad de T_m están separadas por la parte de separación en términos de episodios de fijación. En otras palabras, la parte de 3' de baja especificidad de T_m está implicada en episodios de fijación de forma relativamente independiente de la parte de 5' de alta especificidad de T_m y la fijación de la parte de 3' de baja especificidad de T_m está menos afectada por la fijación de la parte de 5' de alta especificidad de T_m . En esta conexión, la probabilidad de fijación de la parte de 3' de baja especificidad de T_m a una secuencia no objetivo se reduce de forma significativa.

40 Cuando solamente la parte de 3' de baja especificidad de T_m tiene una secuencia complementaria a un lugar no objetivo, la fijación tampoco se produce bajo ciertas condiciones altamente astringentes, por ejemplo, condiciones astringentes para la fijación de la parte de 5' de alta especificidad de T_m . De acuerdo con una realización preferente, resulta ventajoso realizar reacciones de extensión dependientes de la muestra utilizando el oligo DS bajo condiciones astringentes con una temperatura de fijación muy superior a la T_m de la parte de 3' de baja especificidad de T_m .

45 Cuando la parte de 5' de alta especificidad de T_m y la parte de 3' de baja especificidad de T_m tienen una secuencia sustancialmente complementaria a una muestra, el oligo DS puede ser fijado a la muestra, y de esta manera se produce la extensión satisfactoria.

50 Sin querer quedarnos sujetos a la teoría, se cree que la parte de separación hace que la parte de 3' de baja especificidad de T_m sea más sensible a las condiciones de fijación (por ejemplo, temperatura y complementariedad de la secuencia). A este respecto, la incidencia de la hibridación no específica entre la parte de 3' de baja especificidad de T_m y las secuencias no objetivo se reduce muy significativamente bajo ciertas condiciones de fijación (o de astringencia). Cuando la parte de 3' de baja especificidad de T_m , así como la parte de 5' de alta especificidad de T_m se fijan en su secuencia objetivo, el extremo de 3' de la parte de 3' de baja especificidad de T_m es más probable que genere un lugar extensible por parte de las polimerasas de ADN.

55 El término "oligonucleótido" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un oligómero lineal de monómeros o filamentos modificados, incluyendo desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y similares, capaces de hibridizar específicamente con una secuencia de nucleótidos objetivo, ya sea de manera o natural o producida de forma sintética. El oligonucleótido es preferiblemente monocatenario para una máxima eficiencia en la hibridación. Preferiblemente, el oligonucleótido es un oligodesoxirribonucleótido. El oligonucleótido de esta invención puede constar de dNMP producidos

naturalmente (es decir, dAMP, dGM, dCMP y dTMP), análogos de nucleótido o derivados de nucleótido. El oligonucleótido también puede incluir ribonucleótidos. Por ejemplo, el oligonucleótido de esta invención puede incluir nucleótidos con modificaciones estructurales, como el ácido nucleico péptido (PNA) (M. Egholm et al., Nature, 365:566-568(1993)), fosforotioato DNA, fosforoditioato DNA, fosforamidato DNA, DNA con enlaces de amida, con enlaces de MMI DNA, 2'-O-metil RNA, alfa-DNA y metilfosfonato DNA, nucleótidos con modificaciones de azúcar como 2'-O-metil RNA, 2'-fluoro RNA, 2'-amino RNA, 2'-O-alkil DNA, 2'-O- alil DNA, 2'-O-alkinil DNA, hexosa DNA, piranosil RNA, y anhidrohexitol DNA, y nucleótidos con modificaciones de base como pirimidinas sustituidas con C-5 (los sustitutos incluyen fluor-, bromo-, cloro-, iodo-, metil-, etil-, vinil-, formil-, etinil-, propinil-, alkinil-, tiazolil-, imidazolil-, piridil-), 7-deazapurinas con sustitutos de C-7 (los sustitutos incluyen fluoro, bromo, cloro-, iodo-, metil-, etil-, vinil-, formil-, alkinil-, alkenil-, tiazolil-, imidazolil-, piridil-), inosina, y diaminopurina.

El término "parte" utilizado en conjunción con el oligo DS de esta invención se refiere a una secuencia de nucleótidos separada por la parte de separación. El término "parte de 5' de alta especificidad de T_m " o "parte de 3' de baja especificidad de T_m " se refiere a una secuencia de nucleótidos en el extremo de 5' o 3' del oligo DS de esta invención, respectivamente, que está separado por la parte de separación. El término "parte de 5' de alta especificidad de T_m " en conjunción con el oligo DS tiene como finalidad referirse a una parte con la T_m más alta entre tres partes, y con una secuencia de nucleótidos hibridizante sustancialmente complementaria a un lugar en el ácido nucleico de muestra. El término "parte de 3' de baja especificidad de T_m " en referencia al oligo DS de esta invención se refiere a una parte con una T_m inferior a la parte de 5' de alta especificidad de T_m pero superior a la parte de separación y con una secuencia de nucleótidos hibridizante sustancialmente complementaria a un lugar en el ácido nucleico de muestra.

El término " T_m " utilizado en este documento se refiere a la temperatura de fusión a la cual la mitad de las moléculas de un duplex de ácido nucleico son monocatenarias. Los términos " T_m alta" and " T_m baja" en conjunción con partes en el oligo DS tienen como finalidad describir un valor T_m relativo, no un valor T_m absoluto. Es decir solamente se refiere que la T_m de la parte de 5' de alta especificidad de T_m sea alta en relación con la de la parte de 3' de baja especificidad de T_m .

La parte de 5' de alta especificidad de T_m y la parte de 3' de baja especificidad de T_m están diseñadas para tener una secuencia de nucleótidos hibridizante sustancialmente complementaria a un lugar sobre un ácido nucleico de muestra para hibridizar. El término "sustancialmente complementaria" en referencia al oligo DS se utiliza en este documento para indicar que la molécula de oligonucleótido es suficientemente complementaria para hibridizar selectivamente a una secuencia de ácido nucleico de muestra bajo las condiciones de fijación designadas o condiciones astringentes, de manera que el oligonucleótido fijado puede ser extendido por una polimerasa para formar una copia complementaria de la muestra. Por lo tanto, este término tiene un sentido distinto de "perfectamente complementaria" o términos relativos. Se apreciará que la parte de 5' de alta especificidad de T_m y la parte de 3' de baja especificidad de T_m del oligo DS pueden tener uno o más desajustes con una muestra, hasta el punto que el oligo DS puede servir como cebador o como sonda. En condiciones ideales, la parte de 5' de alta especificidad de T_m y / o la parte de 3' de baja especificidad de T_m del oligo DS tienen una secuencia de nucleótidos perfectamente complementaria en un lugar de la muestra, es decir, no existen desajustes.

Para un rendimiento satisfactorio del oligo DS, resulta esencial que la T_m de la parte de 5' de alta especificidad de T_m sea superior a la de la parte de 3' de baja especificidad de T_m . Se prefiere que la T_m de la parte de 5' de alta especificidad de T_m esté entre 40°C y 80°C, y preferiblemente, entre 40°C y 75°C, todavía más preferiblemente, entre 50°C y 68°C, y lo más preferible sería que estuviese entre 50°C y 65°C. Se prefiere que la T_m de la parte de 3' de baja especificidad de T_m esté entre 10°C y 40°C, y preferiblemente, entre 15°C y 40°C, y lo más preferible sería que estuviese entre 20°C y 35°C. Preferiblemente, la T_m de la parte de 5' de alta especificidad de T_m sería de al menos 5°C, más preferiblemente de al menos 10°C, todavía más preferiblemente de al menos 15°C y lo ideal sería que fuera de al menos 20°C más que la parte de 3' de baja especificidad de T_m . Resultaría ventajoso que la T_m de la parte de 5' de alta especificidad de T_m fuera de 5-70 °C, preferiblemente de 10-70 °C, todavía más preferiblemente de 10-60°C, todavía más preferiblemente de 10-50° C, aún más preferiblemente de 10-40°C y lo ideal sería que fuera de al menos 20-40 °C superior a la de la parte de 3' de baja especificidad de T_m .

De acuerdo con una realización preferente, la T_m de la parte de 5' de alta especificidad de T_m es más larga que la parte de 3' de baja especificidad de T_m . La longitud de la parte de 5' de alta especificidad de T_m es preferiblemente de entre 15 y 40 residuos de nucleótido, más preferiblemente de 15 a 30 residuos de nucleótido, y lo ideal sería que fuera de 20 a 25 residuos de nucleótido. La longitud de la parte de 3' de baja especificidad de T_m es preferiblemente de 3 a 15 residuos de nucleótido, más preferiblemente de 5 a 15 residuos de nucleótido, y lo ideal sería de entre 6 y 12 residuos de nucleótido.

La parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales es parcialmente responsable de las ventajas y las características del oligo DS. El término "base universal" que aparece en este documento se refiere a una capaz de formar pares de base con cada una de las bases DNA/RNA naturales con poca discriminación entre ellos.

Es comúnmente conocido que las nucleótidos en algunas posiciones ambiguas de cebadores degenerados han sido sustituidas por base universal para resolver los problemas de diseño relacionados con los cebadores degenerados, ya que dichas bases universales son capaces de realizar apareamientos de base no específica con las cuatro bases convencionales. Sin embargo, no ha surgido ningún informe de que dichas bases universales permitan formar una parte

en una molécula de oligonucleótido para generar una estructura de burbuja durante la fijación (hibridización) o amplificación, y luego separar dos secuencias adyacentes opuestas, dando como resultado la elevación de la especificidad de fijación del cebador o sonda a una secuencia objetivo por especificidad dual a través de dos partes de especificidad separada (fijación).

5 Dichas bases universales pueden estar contenidas en la parte de separación de forma contigua o de forma interrumpida con otras nucleótidos como dNMP. Resulta preferible que la parte de separación comprenda nucleótidos contiguos con bases universales, preferiblemente deoxinosina.

10 Resulta crítico que la parte de separación en el oligo DS tenga la T_m más baja de las tres partes, con el fin de que la parte de separación forme una estructura de burbuja de pares no de base bajo unas condiciones en las cuales la parte de 5' de alta especificidad de T_m y la parte de 3' de baja especificidad de T_m se fijan en el ácido nucleico de muestra, permitiendo que la parte de 5' de alta especificidad de T_m se separe de la parte de 3' de baja especificidad de T_m en términos de especificidad de fijación en el ácido nucleico de muestra, por lo cual la especificidad de fijación del oligonucleótido se determina de forma dual por la parte de 5' de alta especificidad de T_m y la parte de 3' de baja especificidad de T_m de manera que la especificidad de fijación global del oligonucleótido mejora considerablemente. Preferiblemente, la T_m de la parte de separación oscila entre 3°C y 15°C, más preferiblemente, entre 4°C y 15°C, y lo ideal es que se encuentre entre 5°C y 10°C.

15 De acuerdo con una realización preferente, la parte de separación entre la parte de 5' de alta especificidad de T_m y la parte de 3' de baja especificidad de T_m contiene por lo menos 3 bases universales, más preferiblemente por lo menos 4 bases universales, y lo ideal es que contenga por lo menos 5 bases universales. De acuerdo con una realización preferente, la parte de separación contiene entre 2 y 10 bases universales, más preferiblemente entre 3 y 10 bases universales, aún más preferiblemente entre 4 y 8 bases universales, y lo ideal es que contenga entre 5 y 7 bases universales.

20 Cuando se necesita un cebador o sonda con una secuencia más larga, las ventajas del oligo DS se ven más resaltadas. Por ejemplo, de acuerdo con una técnica convencional, un cebador con una secuencia de nucleótidos más larga de 35 bp como secuencia de hibridización es muy probable que genere amplicones no específicos. Por el contrario, el oligo DS puede generar amplicones específicos incluso con secuencias largas, dado que lleva dos secuencias de hibridización (es decir, la parte de 5' de alta especificidad de T_m y la parte de 3' de baja especificidad de T_m) separadas entre sí en términos de interacción molecular con muestras (es decir, fijación). Por ejemplo, el oligo DS puede contener entre 35 y 45 bp de secuencia de hibridización complementaria a una secuencia objetivo. A este respecto, puede apreciarse que la presente invención permite que los cebadores sean diseñados con secuencias mucho más largas, que se consideraban impracticables en estrategias de diseño de cebadores convencionales.

25 De acuerdo con una realización preferente, la parte de 5' de alta especificidad de T_m tiene una longitud de entre 15 y 25 nucleótidos, la parte de separación tiene una longitud de entre 3 y 15 nucleótidos y la parte de 3' de baja especificidad de T_m tiene una longitud de entre 3 y 15 nucleótidos.

30 Más preferiblemente, la parte de 5' de alta especificidad de T_m tiene una longitud de entre 15 y 25 nucleótidos, la parte de separación tiene una longitud de entre 3 y 10 nucleótidos y la parte de 3' de baja especificidad de T_m tiene una longitud de entre 3 y 15 nucleótidos. Lo ideal es que la parte de 5' de alta especificidad de T_m tenga una longitud de entre 15 y 25 nucleótidos, la parte de separación tenga una longitud de entre 5 y 7 nucleótidos y la parte de 3' de baja especificidad de T_m tenga una longitud de entre 6 y 10 nucleótidos. De acuerdo con el oligo DS ejemplar e ilustrativo descrito en los Ejemplos, la parte de 5' de alta especificidad de T_m tiene una longitud de unos 20 nucleótidos, la parte de separación tiene una longitud de unos 5 nucleótidos y la parte de 3' de baja especificidad de T_m tiene una longitud de entre 8 y 10 nucleótidos.

35 En la realización más preferente, el oligo DS está representado por la fórmula general siguiente: 5'-X"_p-(dl)_q-Z"_r-3' (la definición y las características de X"_p y Z"_r son las mismas que se han descrito anteriormente, dl representa deoxinosina, (dl)_q representa una parte de separación que comprende nucleótidos contiguos con bases universales y q es un número entero entre 5 y 7).

40 La amplificación primaria en la presente invención está dirigida por una amplificación en dos fases bajo diferentes temperaturas de fijación, con el fin de aprovechar el sistema DW-ACP y el oligo DS.

45 Los métodos de la presente invención pueden utilizarse para amplificar cualquier molécula de ácido nucleico deseada. Dichas moléculas pueden ser de DNA o RNA. La molécula puede estar en forma monocatenaria o bicatenaria, y preferiblemente, bicatenaria. Cuando el ácido nucleico como material inicial es bicatenario, es preferible convertir las dos hebras en monocatenarias, o parcialmente monocatenarias. Los métodos conocidos para separar las hebras incluyen, pero sin limitación, tratamientos de calor, alcalinos, de formamida, de urea y de glicoxal, métodos enzimáticos (por ejemplo, la acción de la helicasa) y proteínas de unión. Por ejemplo, la separación de hebras puede conseguirse por calentamiento a una temperatura de entre 80°C y 105°C. Los métodos generales para conseguir este tratamiento están proporcionados por Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001).

5 Cuando se utiliza una mRNA como material inicial para amplificación, es necesaria una fase de transcripción antes de la amplificación, cuyos detalles pueden encontrarse en Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); y en Noonan, K. F. et al., *Nucleic Acids Res.* 16:10366 (1988)). Para la transcripción inversa, se utiliza un cebador dT de oligonucleótido hibridizable para polimerizar una cola de mRNA. La transcripción inversa puede realizarse con una transcriptasa inversa.

10 Los presentes métodos no requieren que las moléculas que van a ser amplificadas tengan ninguna secuencia o longitud determinada. En particular, las moléculas que pueden ser amplificadas incluyen cualquier ácido nucleico procariótico, eucariótico (por ejemplo, protozoos y parásitos, hongos, levadura, vegetales superiores, animales inferiores y superiores, incluyendo mamíferos y humanos) o virales (por ejemplo, virus de Herpes, HIV, virus de la gripe, virus de Epstein-Barr, virus de la hepatitis, virus de la polio, etc.) o viroide. La secuencia de nucleótidos también puede ser cualquier molécula de ácido nucleico que haya sido o pueda ser sintetizada químicamente. De esta manera, la secuencia de nucleótidos puede encontrarse o no en la naturaleza.

15 El primer DW-ACP degenerado utilizado en la presente invención se hibridiza o se fija a un lugar en la secuencia de nucleótidos desconocida de manera que se forme una estructura bicatenaria. Las condiciones de la hibridización del ácido nucleico adecuadas para formar dichas estructuras bicatenarias están descritas por Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) y Haymes, B. D., et al., *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985). La secuencia de la parte de fijación (es decir, la parte de la secuencia degenerada y la del extremo de 3') del primer DW-ACP no necesita mostrar una complementariedad específica, sino que necesita solamente ser sustancialmente complementaria en secuencia para ser capaz de formar una estructura bicatenaria estable. De esta manera, resultan permisibles algunas desviaciones de la completa complementariedad, siempre y cuando dichas desviaciones no sean suficientes para impedir completamente que la hibridización forme una estructura bicatenaria. La hibridización del primer DW-ACP en un lugar de la secuencia desconocida es un pre-requisito para su polimerización dependiente de la muestra con polimerasas. Los factores (ver Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); and Haymes, B.D., et. al., *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C.(1985)) que afectan al apareamiento de bases del primer DW-ACP en sus ácidos nucleicos complementarios afectan posteriormente la eficiencia del cebado. La composición de la nucleótido del primer DW-ACP degenerado puede afectar a la temperatura a la cual la fijación es óptima, y por lo tanto puede afectar a su eficiencia de fijación.

30 Puede utilizarse una variedad de polimerasas de ADN en la fase de amplificación de los presentes métodos, que incluyen el fragmento "Klenow" de la polimerasa I del ADN de *E. coli*, una polimerasa de ADN termoestable y una polimerasa de ADN T7. Preferiblemente, la polimerasa es una polimerasa de ADN termoestable como la que puede obtenerse de una variedad de especies bacterianas, que incluyen *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, y *Pyrococcus furiosus* (Pfu). Cuando se realiza una reacción de polimerización, es preferible proporcionar los componentes requeridos para dicha reacción en exceso en el recipiente de reacción. El exceso en referencia a los componentes de la reacción de amplificación se refiere a la cantidad de cada componente para la cual la capacidad de conseguir la amplificación deseada no queda limitada sustancialmente por la concentración de dicho componente. Resulta deseable proporcionar a la mezcla de reacción una cantidad de cofactores necesarios como Mg^{2+} , y dATP, dCTP, dGTP y dTTP en cantidades suficientes para soportar el grado de amplificación deseado.

40 Todas las enzimas utilizadas en esta reacción de amplificación pueden estar activas bajo las condiciones de reacción. En realidad, existen buffers en los cuales todas las enzimas se encuentran cerca de sus condiciones óptimas de reacción.

45 Dos fases de amplificación del presente método se encuentran separadas solamente por el tiempo. La amplificación de la primera fase debería ir seguida de la amplificación de la segunda fase. Por lo tanto, la amplificación de dos fases puede realizarse en una reacción que incluya todo tipo de cebadores, el cebador del primer DW-ACP y el cebador del primer objetivo específico.

50 La fijación o hibridización en la amplificación de dos fases se realiza bajo condiciones astringentes que permiten la unión específica entre una secuencia de nucleótidos y los cebadores. Dichas condiciones astringentes para la fijación dependerán de la secuencia y variarán en función de los parámetros ambientales. En los métodos actuales, se prefiere realizar dos fases de amplificación bajo condiciones distintas, *inter alia*, a temperaturas de fijación distintas una de otra. Preferiblemente, la fijación en la amplificación de la primera fase se realiza bajo condiciones de baja astringencia, *inter alia*, a una temperatura de fijación baja. Más preferiblemente, la primera temperatura de fijación está entre uno 35°C y 50°C, y lo más preferible es que esté entre 40°C y 48°C. En la primera temperatura de fijación, la parte de fijación del primer DW-ACP está limitada a la parte de la secuencia degenerada y la parte del extremo de 3', mejorando de esta manera la especificidad de fijación.

55 De acuerdo con el presente método, la amplificación de la primera fase bajo condiciones de baja astringencia se realiza durante al menos un ciclo de fijación, extensión y desnaturalización para mejorar la especificidad de la fijación del cebador durante la amplificación de la primera fase, y a través de los ciclos siguientes, la amplificación de la segunda fase se procesa de forma más eficiente bajo condiciones de alta astringencia. Lo más preferible es que la amplificación de la primera fase se realice durante más de un ciclo. Un ciclo de la amplificación de la primera fase puede ser importante, ya

que puede impedir fundamentalmente que el primer DW-ACP degenerado sólo pueda generar productos de amplificación no específicos. Durante el ciclo de la amplificación primaria (amplificación de primera fase), la parte del extremo de 3' del primer DW-ACP se une a los lugares objetivo desconocidos de la muestra bajo tales condiciones de baja astringencia. Sin embargo, durante los ciclos siguientes de la amplificación primaria (amplificación de segunda fase) bajo condiciones de alta astringencia, por ejemplo, una temperatura de fijación superior, solamente la parte del extremo de 3' del primer DW-ACP deja de funcionar como cebador para unirse a la muestra o a la secuencia extendida del cebador. Por el contrario, todas las partes del primer DW-ACP, así como el primer TSP están implicados en la amplificación de la segunda fase para generar el producto de amplificación primario.

La amplificación de segunda fase se realiza preferiblemente bajo condiciones de alta astringencia, *inter alia*, a una temperatura de fijación alta. Resulta ventajoso que la temperatura de la segunda fijación se encuentre entre 50°C y 72°C, más preferiblemente entre 50°C y 65°C, y lo ideal es que esté entre 52°C y 65°C. A una temperatura de fijación alta como la temperatura de la segunda fijación, solamente la parte del extremo del primer DW-ACP degenerado ya no sirve como cebador; por el contrario, todas las partes del primer DW-ACP y el primer TSP funcionan como cebador con una alta especificidad.

La amplificación de la segunda fase bajo condiciones de alta astringencia se realiza durante por lo menos un ciclo, preferiblemente al menos 5 ciclos para generar el producto de amplificación primario sin una secuencia de nucleótidos degenerada aleatoria derivada del primer DW-ACP degenerado. En una realización más preferente, la amplificación de la segunda fase se realiza durante entre 10 y 40 ciclos, más preferiblemente entre 10 y 30 ciclos, y lo ideal es que se realice durante 10-20 ciclos.

Las condiciones de astringencia alta y baja pueden determinarse fácilmente a partir de las normas conocidas en el estado de la técnica. "Ciclo" se refiere al proceso que tiene como resultado la producción de una copia del ácido nucleico objetivo. Un ciclo incluye una fase de desnaturalización, una fase de fijación y una fase de extensión.

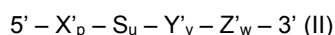
En la realización más preferente, la amplificación se realiza de acuerdo con la PCR que se indica en las Patentes Estadounidenses Nos. 4,683,195, 4,683,202, y 4,800,159.

En la amplificación de segunda fase de la reacción de amplificación primaria, el primer TSP se fija en su secuencia complementaria de la secuencia de nucleótidos conocida para generar un producto de extensión del cebador específico para el objetivo. Si la parte del regulador del primer DW-ACP degenerado comprende bases universales o bases análogas no discriminatorias, su hebra opuesta en el producto de extensión del cebador específico para el objetivo comprende los nucleótidos preferiblemente reconocidos por la polimerasa de ADN tal como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, cuando la parte del regulador del primer DW-ACP degenerado comprende por lo menos dos residuos de deoxinosina o inosian, por lo menos se incorporan 2 nucleótidos de deoxicitidina en su hebra opuesta en el producto de extensión de cebador específico para el objetivo.

Entretanto, el presente inventor había desarrollado un proceso similar a la presente invención y había presentado una solicitud de PCT (WO 2005/045073). El proceso desarrollado previamente utiliza un segundo DW-ACP en lugar del primer DW-ACP en la amplificación de segunda fase de la amplificación primaria. Por lo tanto, la amplificación de segunda fase contiene dos tipos de DW-ACP, lo cual convierte el ajuste de las condiciones de amplificación en algo complicado. Asimismo, WO 2005/045073 no revela cebadores específicos para el objetivo que tengan la estructura de oligonucleótido de especificidad dual para mejorar significativamente la especificidad de fijación.

De acuerdo con una realización preferente, el presente método también comprende la fase de (b) realizar una amplificación secundaria a una tercera temperatura de fijación, que comprende por lo menos un ciclo de fijación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando (i) un segundo DW-ACP con una secuencia de nucleótidos para hibridizar con la secuencia de nucleótidos del sentido opuesto para la primera secuencia de DW-ACP degenerado presente en el extremo de 3' del producto de amplificación primaria o un cebador con una secuencia de nucleótidos correspondiente a la parte del extremo de 5' del primer DW-ACP degenerado y (ii) un segundo TSP anidado diseñado para amplificar una región interna del producto de amplificación primario.

El segundo DW-ACP utilizado en la reacción de amplificación secundaria se representa preferiblemente por una fórmula general II:



en que X'_p representa una parte del extremo de 5' con una secuencia de nucleótidos correspondiente a la parte del extremo de 5' del primer DW-ACP degenerado, S_u representa una parte de fijación suplementaria que comprende una secuencia de nucleótidos para hibridizar con una parte opuesta a la parte del regulador del primer DW-ACP degenerado en el producto de amplificación primario de la fase (a-2), Y'_v representa una parte del regulador que comprende por lo menos dos bases universales o bases análogas no discriminatorias y que previene la fijación de dichas partes de X'_p y S_u en secuencias no objetivas excepto en la secuencia de nucleótidos complementaria al primer DW-ACP degenerado, Z'_w representa una parte del extremo de 3' con una secuencia de nucleótidos correspondiente a la parte del extremo de 3' del primer DW-ACP degenerado, p, u, v y w representan el número de nucleótidos y X', S, Y' y Z' son desoxirribonucleótidos

o ribonucleótidos.

El término “correspondiente a” que se utiliza en este documento con referencia a dos secuencias de nucleótidos relacionadas se utiliza para expresar secuencias perfectamente o parcialmente idénticas hasta el punto en que una secuencia de nucleótidos puede ser hibridizada con una secuencia de nucleótidos hibridizable con las otras secuencias de nucleótidos comparativas.

El segundo DW-ACP de la fórmula III tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente a la del primer DW-ACP degenerado. El cebador de la fórmula II muestra una especificidad de fijación muy superior.

La parte del extremo de 5' del segundo DW-ACP tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente a la parte del extremo de 5' del primer DW-ACP. Es decir, la secuencia de nucleótidos de la parte del extremo de 5' del segundo DW-ACP puede ser completamente idéntica o parcialmente idéntica a la del extremo de 5' del primer DW-ACP. Las desviaciones de la identidad completa son permisibles, siempre y cuando dichas desviaciones no sean suficientes para impedir completamente que la hibridización forme una estructura bicatenaria entre la parte del extremo de 5' del segundo DW-ACP y la secuencia de nucleótidos con el sentido opuesto de la parte del extremo de 5' del primer DW-ACP.

La parte de fijación suplementaria (S_u) es muy exclusiva en el segundo DW-ACP de la fórmula III, que es parcialmente responsable de la eliminación completa de los grandes problemas que aparecían históricamente como resultado de la unión no específica del cebador en lugares no específicos. La parte de fijación suplementaria comprende una secuencia de nucleótidos para hibridizarse con una parte opuesta a la parte reguladora del primer DW-ACP degenerado. Esta estrategia para diseñar la parte de fijación suplementaria emplea el reconocimiento de la base universal por la polimerasa de ADN (por ejemplo, polimerasa *Taq*) para dirigir la incorporación de dNMP naturales. El reconocimiento de la base universal por parte de la polimerasa de ADN ha sido indicado por Geoffrey C. Hoops, et al. (*Nucleic Acids Research*, 25(24):4866-4871(1997)). Por ejemplo, 8-hidroxiguanina, 2-hidroxiadenina, 6-O-metilguanina y xantina dirigen la incorporación de (C y A), (T y A), (T y C) y (T y C), respectivamente. Asimismo, Geoffrey C. Hoops, et al. han obtenido como resultado que una base con nitropirrol e inosina dirigen de forma más preferente la incorporación de dAMP y dCMP, respectivamente.

Por lo tanto, si la parte reguladora del primer DW-ACP degenerado comprende por lo menos dos residuos de deoxinosina o inosina, la parte de fijación suplementaria debería comprender por lo menos 2 nucleótidos de deoxiguanosina, porque los nucleótidos de deoxicitidina se incorporan de forma ideal a la parte opuesta a la parte reguladora por parte de la polimerasa *Taq*.

En el segundo DW-ACP, Y'_v , una parte reguladora, impide la fijación de las partes de X'_p y S_u a secuencias no objetivo excepto en la secuencia complementaria al primer DW-ACP. Asimismo, la parte reguladora proporciona una parte de fijación adicional por medio de la unión indiscriminada de bases universales o de bases análogas no discriminatorias, de manera que el segundo DW-ACP es capaz de fijarse selectivamente en las secuencias complementarias a las secuencias del primer DW-ACP degenerado en los productos resultantes.

La parte reguladora de la fórmula III está hibridizada con una parte opuesta a la parte de la secuencia degenerada del primer DW-ACP degenerado. La base universal o base análoga no discriminatoria adecuada en la parte reguladora puede incluir cualquier base que muestre pérdida de discriminación cuando participe en la réplica de ADN conocida en el estado de la técnica.

La longitud de la parte reguladora de la fórmula II está determinada principalmente por la de la parte de la secuencia degenerada del primer DW-ACP degenerado. Además, si la nucleótido en el extremo de 5' de la parte del extremo de 3' del primer DW-ACP degenerado está diseñada para tener una nucleótido específica a partir de cuatro desoxirribonucleótidos, la parte reguladora se alarga en 1 nucleótido. Las bases universales en la parte reguladora de la fórmula II existen preferentemente en una disposición contigua.

La parte del extremo de 3' de la segunda DW-ACP tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente a la parte del extremo de 3' del primer DW-ACP degenerado. La secuencia de nucleótidos de la parte del extremo de 3' del segundo DW-ACP puede ser completa o parcialmente idéntica a la del extremo de 3' del primer DW-ACP. Resultan permisibles algunas desviaciones de la completa complementariedad, siempre y cuando dichas desviaciones no sean suficientes para impedir completamente que la hibridización forme una estructura bicatenaria. Entre la parte del extremo de 3' del segundo DW-ACP y la secuencia de nucleótidos con el sentido opuesto a la parte del extremo de 3' del primer DW-ACP. Lo más preferible es que la secuencia de nucleótidos de la parte del extremo de 3' del segundo DW-ACP sea completamente idéntica al extremo de 3' del primer DW-ACP, ya que el encaje perfecto de la parte del extremo de 3' del cebador que hay que muestrear es necesario para una amplificación satisfactoria.

El cebador con una secuencia de nucleótidos correspondiente a la parte del extremo de 5' del primer DW-ACP degenerado puede utilizarse en lugar del segundo DW-ACP en la amplificación secundaria.

La amplificación secundaria sigue un proceso de amplificación anidada conocida en el estado de la técnica por amplificar de forma selectiva un producto objetivo desconocido a partir de los productos de amplificación primarios. El segundo TSP

anidado está diseñado para amplificar una región interna del producto de amplificación primaria. De acuerdo con una realización preferente, el segundo TSP anidado está construido para tener la estructura de oligo DS representada por la fórmula general III.

La amplificación secundaria se realiza preferentemente bajo unas condiciones de alta astringencia, *inter alia*, a una temperatura de fijación alta. Resulta ventajoso que la temperatura de fijación alta esté entre 50°C y 72°C, más preferiblemente entre 50°C y 70°C, y lo ideal es que esté entre 55°C y 68°C. A una temperatura de fijación alta, todas las partes, no una parte, del segundo DW-ACP están implicadas en la fijación. Por lo tanto, el segundo DW-ACP es capaz de fijarse exclusivamente en una secuencia de nucleótidos complementaria al segundo DW-ACP. La amplificación secundaria bajo condiciones de alta astringencia se realiza durante al menos un ciclo, y preferiblemente al menos 5 ciclos para amplificar el producto de amplificación primaria. En una realización más preferente, la amplificación secundaria se realiza durante 10-40 ciclos.

En la realización más preferente, la amplificación secundaria se realiza de acuerdo con la PCR que se indica en las patentes estadounidenses Nos. 4,683,195, 4,683,202 y 4,800,159.

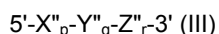
La amplificación secundaria da lugar a productos amplificados que no tienen la secuencia aleatoria degenerada derivada del primer DW-ACP. Cuando la tercera amplificación va seguida de la amplificación secundaria, la eliminación de la secuencia aleatoria degenerada en el producto de amplificación asegura que la tercera amplificación se realice con mayor especificidad y fiabilidad.

Cuando los resultados deseados en el sentido de superar completamente la amplificación no específica no se alcanzan o son dudosos, o cuando los productos amplificados de la fase (b) no son visibles en geles de agarosa, la amplificación anidada puede ser realizada durante al menos un ciclo más con otro cebador específico de objetivo designado para amplificar una región interna del producto de amplificación secundario.

De acuerdo con una realización preferente, el presente método también comprende la fase (c) de realizar una tercera amplificación en una cuarta temperatura de fijación, que comprende por lo menos un ciclo de fijación de cebador, extensión de cebador y desnaturalización, utilizando (i) el segundo DW-ACP o un cebador con una secuencia de nucleótidos correspondiente a la parte del extremo de 5' del primer DW-ACP degenerado y (ii) un tercer TSP anidado diseñado para amplificar una región interna del producto de amplificación secundario.

De acuerdo con una realización preferente, el presente método también comprime la fase (a') de purificación de una reacción resultante de la fase (a) para eliminar el primer DW-ACP degenerado, el segundo DW-ACP y el primer cebador específico de objetivo antes de realizar la fase (b). Por ejemplo, la purificación del producto amplificado puede conseguirse por electroforesis de gel, cromatografía de columna, cromatografía de afinidad o hibridización. Lo más preferible es que la purificación se realice utilizando una columna de giro con membrana de gel de sílice a los cuales los productos amplificados se adsorben en presencia una alta concentración de sal, mientras que los contaminantes como el cebador pasan a través de la columna. Por lo tanto, los productos amplificados se purifican rápidamente y se obtienen a partir de las reacciones de amplificación.

Asimismo, en este documento se describe un cebador específico de objetivo que se utiliza para un método para amplificar una secuencia de nucleótidos desconocida adyacente a una secuencia de nucleótidos conocida, que se representa a través de la siguiente fórmula general III:



en que X''_p representa una parte de 5' de alta especificidad de T_m con una secuencia de nucleótidos hibridizante sustancialmente complementaria a un lugar en la secuencia de nucleótidos conocida para hibridizarse, Y''_q representa una parte de separación que comprende por los menos dos bases universales, Z''_r representa una parte de 3' de baja especificidad de T_m con una secuencia de nucleótidos hibridizante sustancialmente complementaria a un lugar en la secuencia de nucleótidos para hibridizarse, p , q y r representan el número de nucleótidos, y X'' , Y'' y Z'' son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; la temperatura de la parte de 5' de alta especificidad de T_m es superior a la de la parte de 3' de baja especificidad de T_m , la parte de separación tiene la T_m más baja de las tres partes; la parte de separación forma una estructura de burbuja de base de no paridad bajo condiciones en las que la parte de 5' de alta especificidad de T_m y la parte de 3' de baja especificidad de T_m son fijadas al ácido nucleico de muestra, por lo cual la especificidad de fijación del cebador se determina de forma dual por la parte de 5' de alta especificidad de T_m y la parte de 3' de baja especificidad de T_m de manera que la especificidad de fijación global del cebador experimenta una mejora.

Dado que el cebador específico de objetivo (TSP) referido se emplea en el proceso de amplificación de esta invención descrito más arriba, las descripciones comunes entre ellos se omiten con el fin de evitar que complejidad de esta memoria descriptiva provoque una multiplicidad indebida.

Asimismo también se describe un kit utilizado para un método de amplificación de una secuencia de nucleótidos desconocida adyacente a una secuencia de nucleótidos conocida, que comprende el cebador específico de objetivo con la fórmula general III descrita más arriba.

5 El kit presente también puede comprender el primer DW-ACP degenerado y / o el segundo DW-ACP. Los kits presentes pueden incluir opcionalmente los reactivos necesarios para realizar la amplificación de ADN, como buffers, polimerasa de ADN, cofactores de polimerasa de ADN, deoxirribonucleótido-5' -trifosfatos. Opcionalmente, los kits pueden incluir también diversas moléculas de polinucleótido, transcriptasa inversa, diferentes buffers y reactivos, y anticuerpos que inhiban la actividad de la polimerasa de ADN. Las cantidades óptimas de reactivos que deben utilizarse en una reacción específica pueden ser rápidamente determinados por un profesional con conocimientos que tenga el beneficio de la descripción actual. Normalmente, los kits están adaptados para contener los constituyentes anteriormente reseñados en embalajes o compartimentos separados.

10 La invención en cuestión puede proporcionar un método mejorado para amplificar selectivamente una secuencia de nucleótidos desconocida a partir de un ácido nucleico o una mezcla de ácidos nucleicos (ADN o mRNA) realizando amplificaciones de ácido nucleico, preferiblemente PCR.

La presente invención puede aplicarse a una gran variedad de tecnologías basadas en la amplificación del ácido nucleico. Algunos ejemplos representativos son:

15 (i) desplazamiento de genoma para obtener series de regiones de ADN desconocidas a cada lado de las regiones cromosómicas de la secuencia de nucleótidos conocida. Como ejemplos podemos citar los proyectos de secuenciación de genoma, clonación de regiones de promotores, identificación de estructuras de genes como la unión exon/intron, relleno de huecos y localización u orientación de transgenes;

(ii) rápida amplificación de los extremos de 5' y 3' de cDNA (RACE) para clonar o secuenciar cDNA de longitud completa de cDNA o para análisis de corte y empalme;

20 (iii) mapeo de regiones que contengan eliminaciones, inserciones y translocaciones; y
(iv) amplificación rápida de extremos BAC sin clonación dirigida para toda la secuencia del genoma.

Los siguientes ejemplos específicos se pretende que sean ilustrativos de la invención, y no deberían considerarse como limitativos del ámbito de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

25 EJEMPLO 1: Determinación de la Localización del Transgen

Para demostrar la aplicación del método PCR de ACP-DSO del desplazamiento del ADN de la invención en cuestión, las células madre de la sangre periférica (PBSC) fueron infectadas con el retrovirus MFG-GFP y se determinó la localización del transgen.

30 A. Diseño del Cebador

A-1 : Cebadores de control de fijación del desplazamiento del ADN (DW-ACP)

35 Los cebadores de control de fijación del desplazamiento del ADN (DW-ACP) fueron diseñados para amplificar una secuencia desconocida adyacente al transgen. El DW-ACP estaba en una estructura tripartita con un filamento de polideoxinosina [poly(dI)] entre la secuencia de unión objetivo del extremo de 3' y la secuencia de cola no objetivo del extremo de 5', en que la secuencia de unión objetivo de extremo de 3' comprende una secuencia arbitraria predeterminada en su extremo de 3' y una secuencia aleatoria en su extremo de 5', y una de las nucleótidos A, C, T y G entre los extremos de 3' y 5' de la parte del extremo de 3'. Por lo tanto, se generarán por lo menos cuatro cebadores DW-ACP distintos dependiendo de la secuencia arbitraria en el extremo 3' de la parte del extremo 3' del DW-ACP.

40 Se diseñaron cuatro cebadores de control de fijación de desplazamiento de ADN (DW-ACP), en los cuales el cebador de control de fijación (ACP) ha sido desarrollado por el presente inventor y reseñado en WO 03/050305, en la forma siguiente:

45 DW-ACPI-A: 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIINNACACG-S' (SEC ID NO:1); DW-ACPI-C: 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIINNCCACG-S' (SEC ID NO:2);

DW-ACPI-T: 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIINNNTCACG-S' (SEC ID NO:3); y DW-ACPI-G: 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIrNMNGCACG-S' (SEC ID NO:4).

50 En los DW-ACP degenerados, CACG (correspondiente a la parte del extremo de 3' del primer DW-ACP degenerado) fue seleccionado como secuencia arbitraria predeterminada. Las secuencias arbitrarias predeterminadas en el extremo de 3' en DW-ACP fueron seleccionadas considerando los factores siguiente: (1) existe una secuencia al menos una vez por cada 2 kb, y (2) el ratio de GC de la secuencia es preferiblemente superior al 75%. Además, la secuencia CACG fue elegida en el sentido de que no estaba incluida en la corriente arriba de los lugares de unión de TSP (cebadores específicos de objetivo) descritos en A-2.

Se utilizaron los segundos cebadores de control de fijación de desplazamiento de ADN (segundos DW-ACP) o cebadores

universales en la amplificación secundaria.

Los segundos cebadores de control de fijación de desplazamiento de ADN (segundos DW-ACP) fueron diseñados en la forma siguiente: DW-ACP2-N: 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAGGGGIIICACG-S' C SEC ID NO:5);

5 La secuencia del segundo DW-ACP fue diseñada para fijarse exclusivamente en las secuencias completamente complementarias en todo el grupo de los primeros DW-ACP degenerados, y ningún otro lugar no objetivo de una muestra debido a las características de la estructura de ACP.

El cebador universal correspondiente a la secuencia de la parte del extremo de 5' del DW-ACP es como sigue: Cebador universal: 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGA-S' (SEQ ID NO:6).

10 A-2: Diseño de Cebadores Específicos de Objetivo (TSP)

Los cebadores específicos de objetivo fueron diseñados considerando la región retroviral (transgen).

MFG-TSPI : 5'-CGAAGTCCCTGGGACGTCTCCAGGGTTGC-S' (SEC ID NO:7); MFG-TSP2: 5'-GTCAGTTCCACCACGGGTCCGCCAGATACAGAGCTA-S' (SEC ID NO:8);

Y

15 MFG-TSP3 : 5'-ATAAGGCACAGGGTCATTTTCAG-3' (SEC ID NO:9).

MFG-TSP1 y MFG-TSP2 fueron seleccionados a partir de la región del gen gag, y MFG-TSP3 fue seleccionado a partir de la región LTR de 5' del retrovirus objetivo.

20 La estructura de los Oligonucleótidos de Especificidad Dual (DSO) desarrollada por el presente invento fue aplicada al diseño del TSP, mejorando significativamente de esta manera la especificidad de fijación.

Los siguientes cebadores de oligonucleótidos de especificidad dual (DSO) comprenden la parte de separación que tiene un filamento de polideoxinosina [poly(dI)] entre su parte del extremo de 5' y su parte del extremo de 3'. Asimismo, los cebadores DS están diseñados para comprender una parte de 5' de alta especificidad de T_m y una parte de 3' de baja especificidad de T_m de manera que la T_m parte de 5' de alta especificidad de T_m es superior a la de la parte de 3' de baja especificidad de T_m , mientras que la parte de separación tiene la T_m más baja entre las tres partes.

25 Los cebadores de especificidad dual específicos objetivo (DSO-TSPs) fueron diseñados en la forma siguiente:

MFG-DSO-TSPI : 5'-CGAAGTCCCTGGGACGIIIIICAGGGTTGC-S' (SEC ID NO: 10); y MFG-DSO-TSP2: 5'-GTCAGTTCCACCACGGGTCCIIIIATACAGAGCTA-S' (SEC ID NO:11);

30 B. Preparación de ADN Genómico

Las células madre de sangre periférica CD34 humana normal (PSBC) infectada con el retrovirus MFG-GFP fueron proporcionadas por el Dr. Choi Eui-Mook (NIH). El ADN genómico fue purificado y utilizado como muestra de PCR.

35 C. PCR Primaria

La PCR primaria fue dirigida por una amplificación de PCR en dos fases en cuatro tubos individuales, cada uno de los cuales contenía uno de los DW-ACP degenerados y el primer cebador específico de objetivo (DSO- TSPI).

40 La amplificación de la PCR en dos fases fue realizada a dos temperaturas de fijación diferentes en un volumen final de 50 μ l conteniendo 50 ng de ADN genómico de PBSC, 25 μ l de 2 x SeeAmpTM ACPTM Master mixII (E1012), 4 μ l de uno de los DW-ACP (2.5 μ M) y 1 μ l de cebador específico objetivo (MFG-DSO-TSPI (10 μ M)); el tubo que contenía la mezcla de reacción se colocó en un termociclador (94°C) precalentado; la reacción de PCR de primera fase consiste en un ciclo de 94°C durante 5 min., 40-45°C durante 1 min., y 72°C durante 2 min., seguidos de la reacción de PCR de segunda fase por 10-30 ciclos de 94°C durante 30 seg., 55-60°C durante 30 seg., y 72°C durante 100 seg., y seguidos de una extensión final de 5 min. a 72°C.

45 D. Purificación de los Productos de PCR Primaria

Para eliminar cebadores como los DW-ACP degenerados y el primer DSO-TSP utilizado en la PCR primaria, los primeros productos de amplificación fueron purificados utilizando una columna (Kit de purificación de PCR, QIAGEN).

50 E. PCR Secundaria

Para amplificar solamente un producto específico de objetivo desconocido a partir de los productos de PCR primaria que pueden tener productos no específicos debido al cebador no específico de los cebadores utilizados en la PCR primaria, se realizó una PCR secundaria utilizando el segundo DW-ACP2-N o cebador universal y un cebador específico de objetivo

anidado (MFG-DSO-TSP2) diseñado para amplificar una región interna del producto de PCR primaria. La amplificación de PCR secundaria se realizó en un volumen final de 20 µl que contenía 1-5 µl de los productos de amplificación de PCR primaria, 10 µl de 2 x SeeAmp™ ACP™ Master mixII (E1012), 1 µl del segundo DW-ACP-N o universal (2.5 µM) y 1 µl de cebador específico de objetivo anidado (MFG-TS-DSP2 (10 µM)); el tubo que contenía la mezcla de reacción se colocó en un termociclador (94°C) precalentado; las reacciones de PCR a fase consisten en una desnaturalización de 94°C durante 5 min., seguidos de 20-35 ciclos de 94°C durante 5 min., 55-65°C durante 30 seg., y 72°C durante 100 seg., y seguidos de una extensión final de 5 min. a 72°C.

Si los productos de la amplificación secundaria no son visibles en geles de agarosa, a continuación se realiza la tercera amplificación utilizando otro cebador de objetivo específico anidado, MFG-TSP3 diseñado para amplificar una región interna del producto de amplificación secundaria con el cebador universal. La tercera amplificación de PCR se realizó en un volumen final de 20 µl que contenían 1-5 µl de los productos de amplificación de PCR primaria, 10 µl de 2 x SeeAmp™ ACP™ Master mixII (E1012), 1 µl del cebador universal (2.5 µM) y 1 µl de cebador específico de objetivo anidado (MFG-TSP3 (10 µM)); el tubo que contenía la mezcla de reacción se colocó en un termociclador (94°C) precalentado; las reacciones de PCR a fase consisten en una desnaturalización de 94°C durante 5 min., seguidos de 20-35 ciclos de 94°C durante 30 seg., 55-65°C durante 30 seg., y 72°C durante 100 seg., y seguidos de una extensión final de 5 min. a 72°C.

F. Extracción de Gel

Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y detectados por tinción con bromato de etidio. Los productos PCR resultantes también pueden ser detectados en un gel de poliacrilamida desnaturizante por autoradiografía o métodos de detección no radioactivos. Después de la electroforesis en gel de agarosa tinción con Et Br, cada producto de PCR fue extraído utilizando GENE CLEAN II Kit (Q-BIOgene, USA).

G. Clonado o Secuenciado

Los fragmentos extraídos fueron clonados en un vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, USA) tal como describe el fabricante. Los plásmidos fueron transformados en las células competentes TOP10. Las células transformadas fueron depositadas en placas de agar de LB/ampicilina. Los plásmidos fueron aislados de las colonias sencillas y blancas. Las inserciones fueron confirmadas por digestión con enzima de restricción *EcoR1*. El plásmido con la inserción fue secuenciado utilizando el analizador genético ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, USA). Como alternativa, los fragmentos extraídos fueron utilizados como muestra para ser secuenciados directamente por el Analizador Genético ABI PRISM 310 (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT) utilizando el kit de secuencia de ciclo BigDye Terminator (Perkin-Elmer Corp.). El análisis de la secuencia asistido por ordenador se llevó a cabo utilizando el programa GeneRunner (Hastings, Inc.).

La Fig. 2 muestra los productos amplificados generados por ACP-DSO PCR de desplazamiento de ADN para la amplificación de las secuencias de ADN adyacentes al transgen. Algunos productos importantes con un tamaño diferente fueron generados por cada primer DW-ACP, DW-ACP-A (columna 1), DW- ACP-T (columna 2), DW-ACP-G (columna 3), y DW-ACP-C (columna 4) diferente.

Cada banda indicada en la Fig. 2 fue clonada y secuenciada. Los resultados del secuenciado muestran que las secuencias de 5'-LTR fueron incluidas en todos los clones. Asimismo, resultó que los productos de PCR clonados contenían la secuencia de DNA genómico huésped.

Los lugares de inserción del retrovirus MFG-GFP se determinaron utilizando el explorador de genoma de la UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) con los resultados de secuencia de los productos de PCR clonados.

La Fig. 3 resume los resultados de la identificación de los lugares de inserción de MFG. Los productos de PCR clonados fueron denominados como DW# correspondiente a los números de la banda indicados en la Fig. 2.

Cuando se utilizó DSO-TSPI en la PCR primaria, los resultados de amplificación se obtuvieron en un nivel satisfactorio en la PCR secundaria. Los resultados del tercer PCR fueron casi similares a los de la PCR secundaria. En consecuencia, puede apreciarse que el DSPO-TSP permite obtener resultados de amplificación a un nivel satisfactorio dentro de la PCR secundaria.

El ámbito de esta invención será determinado por las reivindicaciones adjuntas.

Referencias

Arnold, C5 Hodgson, IJ. (1991) Vectorette PCR: a novel approach to genomic walking. PCR Methods Appl. 1:39-42.

Chun, J.Y. (2001) Annealing control primers and its uses. PCT/KR02/01781. Dominguez, O., Lopez-larrea, C. (1994) Gene walking by unpredictably primed PCR.

Nucleic Acids Res. 22:3247-3248.

Hwang, L.T., Kim, Y.H., Kim, S.H., Kwak, C.I., Gu, Y.Y., Chun, J.Y. (2003) Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *BioTechniques* (en impresión).

5

Hwang, I.T., Lee, Y.H., Moon, B.C., Ahn, K.Y., Lee, S.W., Chun, J. Y. (2000) Identification and characterization of a new member of the placental prolactin-like protein-C (PLP-C) subfamily, PLP-C[beta]. *Endocrinology* 141 :3343-3352.

10

Iwahana, H., Tsujisawa, T., Katashima, R., Yoshimoto, K., Itakura, M. (1994) PCR with end trimming and cassette ligation: a rapid method to clone exon-intron boundaries and a 5'- upstream sequences of genomic DNA based on a cDNA sequence. *PCR Methods Appl.* 4: 19-25.

15

Jones, D.H., Winistorfer, S.C. (1997) Amplification of 4-9 kb human genomic DNA flanking a known site using a panhandle PCR variant. *BioTechniques* 23: 132-138.

Juretic, N., Theus, M. (1991) Analysis of the polyadenylation consensus sequence context in the genes of nuclear encoded mitochondrial proteins. *FEBS Lett.* 290:4-8.

20

Kilstrup, M., Kristiansen, K.N. (2000) Rapid genome walking: a simplified oligo-cassette mediated polymerase chain reaction using a single genome-specific primer. *Nucleic Acids Res.* 28:e55.

Lagerstrom, M., Parik, J., Malmgren, H., Stewart, J., Pettersson, U., Landegren, U. (1991) Capture PCR: efficient amplification of DNA fragments adjacent to a known sequence in human and YAC DNA. *PCR Methods Appl.* 1: 111-119.

25

McBratney, S., Sarnow, P. (1996) Evidence for involvement of trans-acting factors in selection of the AUG start codon during eukaryotic translation initiation. *Mol Cell Biol.* 16:3523-3534.

30

Riley, J., Butler, R., Ogilvie, D., Finnear, R., Jenner, D., Powell, S., Anand, R., Smith, J.C., Markham, A.F. (1990) A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones. *Nucleic Acids Res.* 18:2887-2890.

Rosenthal, A., Jones, D.S.C. (1990) Genomic walking and sequencing by oligo-cassette mediated polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 18:3095-3096.

35

Roux, K.H., Dhanarajan, P. (1990) A strategy for single site PCR amplification of dsDNA: priming digested cloned or genomic DNA from an anchor-modified restriction and a short internal sequence. *BioTechniques* 8:48-57.

40

Shyamala, V., Ames, G.F.L. (1989) Genome walking by single-specific primer polymerase chain reaction: SSP-PCR. *Gene* 84: 1-8.

Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S.A. (1995) An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 23: 1087-1088.

45

Triglia, T., Peterson, M.G., Kemp, D.J. (1988) A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.* 16: 8186.

Trueba, G.A., Johnson, R.C. (1996) Random primed genome walking PCR: a simple procedure to retrieve nucleotide fragments adjacent to known DNA sequences. *BioTechniques* 21:20.

5 Willems, H. (1998) Adaptor PCR for the specific amplification of unknown DNA fragments. *BioTechniques* 24:26-28.

<110> SeeGene, Inc.

10 <120> MÉTODO PARA AMPLIFICAR SECUENCIA ADN DESCONOCIDA ADYACENTE A SECUENCIA CONOCIDA

<160> 11

<170> Kopatent In 1.71

15 <210> 1
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> DW-ACP1-A

20 <220>
<221> base modificada
<222> (22)..(25)
<223> n denota deoxinosina

<400> 1

tcacagaagt atgccaagcg annnnnnnac acg

33

25 <210> 2
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> DW-ACP1-C

<220>

<221> base modificada

<222> (22)..(25)

<223> n denota deoxinosina

35 <400> 2

tcacagaagt atgccaagcg annnnnnncc acg

33

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> DW-ACP1-T

	<220>		
	<221>	base modificada	
	<222>	(22)..(25)	
	<223>	n denota deoxinosina	
5	<400>	3	
		tcacagaagt atgccaagcg annnnnnntc acg	33
	<210>	4	
	<211>	33	
	<212>	DNA	
10	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	DW-ACP1-G	
	<220>		
	<221>	base modificada	
15	<222>	(22)..(25)	
	<223>	n denota deoxinosina	
	<400>	4	
		tcacagaagt atgccaagcg annnnnnngc acg	33
	<210>	5	
20	<211>	33	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	DW-ACP2-N	
25	<220>		
	<221>	base modificada	
	<222>	(26)..(29)	
	<223>	n denota deoxinosina	
	<400>	5	
30		tcacagaagt atgccaagcg agggggnnnnc acg	33
	<210>	6	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia Artificial	
35	<220>		
	<223>	Cebador universal	
	<400>	6	
		tcacagaagt atgccaagcg a	21
	<210>	7	
40	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	MFG-TSP1	

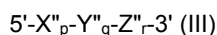
	<400> 7 cgaagtcctt gggacgtctc ccagggttgc	30
5	<210> 8 <211> 36 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> MFG-TSP2	
10	<400> 8 gtcagttcca ccacgggtcc gccagataca gagcta	36
	<210> 9 <211> 22 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	
15	<220> <223> MFG-TSP3	
	<400> 9 ataaggcaca gggtcatttc ag	22
20	<210> 10 <211> 30 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> MFG-DSO-TSP1	
25	<220> <221> base modificada <222> (16)..(21) <223> n denota deoxinosina	
30	<400> 10 cgaagtcctt gggacgnnnn ncagggttgc	30
	<210> 11 <211> 36 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> MFG-DSO-TSP2	
	<220> <221> base modfiicada <222> (21)..(25) <223> n denota deoxinosina	
40	<400> 11 gtcagttcca ccacgggtcc nnnnnataca gagcta	36

REIVINDICACIONES

1. Método para amplificar una secuencia de nucleótidos desconocida adyacente a una secuencia de nucleótidos conocida, que comprende la fase de (a) realizar una amplificación primaria de la secuencia de nucleótidos desconocida utilizando un cebador de control de fijación de desplazamiento de ADN (DW-ACP) y un primer cebador específico objetivo (TSP) hibridizable con un lugar en la secuencia de nucleótidos conocida; en el cual la fase (a) comprende:
5 (a-1) realizar una amplificación de la primera fase de la secuencia de nucleótidos desconocida a una primera temperatura de fijación, comprendiendo al menos un ciclo de fijación de cebador, extensión de cebador y desnaturalización, utilizando un primer DW-ACP degenerado con una fórmula general I de $5'-X_p-Y_q-Z_r-Q_s-3'$; donde, X_p representa una parte del extremo de 5' con una secuencia de nucleótidos preseleccionada, Y_q representa una parte reguladora que comprende por lo menos dos residuos análogos de base universal o de base no discriminatoria, Z_r representa una secuencia aleatoria degenerada con una secuencia de nucleótidos aleatoria degenerada, Q_s representa una parte del extremo de 3' con una secuencia de nucleótidos hibridizante sustancialmente complementaria a un lugar en dicha secuencia de nucleótidos desconocida donde hibridizarse, p, q, r y s representan el número de nucleótidos, y X, Y, Z y Q son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos donde dicha parte del extremo de 3' (Q_s) tiene una secuencia de nucleótidos arbitraria; cuando la primera temperatura de fijación permite que el primer DW-ACP degenerado funcione como cebador, por el cual se genera un primer producto de extensión de DW-ACP degenerado; y (a-2), realizar una amplificación de segunda fase del producto de amplificación generado a partir de la fase (a-1) en una segunda temperatura de fijación que es superior a la primera temperatura de fijación, que comprende al menos un ciclo de fijación de cebador, extensión de cebador y desnaturalización utilizando el primer DW-ACP degenerado tal como se utiliza en la fase (a-1) y el primer TSP, bajo condiciones en las cuales cada cebador se fija en su secuencia de nucleótidos objetivo, por las cuales se genera un producto de amplificación primario.
10
15
20
2. Método de acuerdo con la reivindicación no. 1, en que dicha amplificación de primera fase se realiza para un ciclo.
3. Método de acuerdo con la reivindicación no. 1, en que la amplificación de segunda fase se realiza para al menos 5 ciclos.
4. Método de acuerdo con la reivindicación no.1, en que dicha primera temperatura de fijación se encuentra entre 35°C y 50°C.
25
5. Método de acuerdo con la reivindicación no.1, en que dicha segunda temperatura de fijación se encuentra entre 50°C y 72°C.
6. Método de acuerdo con la reivindicación no. 1, en que el método también comprende la fase (b) de realizar una amplificación secundaria a una tercera temperatura de fijación, que comprende al menos un ciclo de fijación de cebador, extensión de cebador y desnaturalización, utilizando (i) un segundo DW-ACP con una secuencia de nucleótidos para hibridizar con la secuencia de nucleótidos del sentido contrario con la primera secuencia de DW-ACP degenerada presente en el extremo de 3' del producto de amplificación primario o un cebador con una secuencia de nucleótidos correspondiente a la parte del extremo de 5' del primer DW-ACP degenerado y (ii) un segundo TSP anidado diseñado para amplificar una región interna del producto de amplificación primaria
30
35
7. Método de acuerdo con la reivindicación no. 6, en que el segundo DW-ACP tiene una fórmula general II:
$$5'-X'_p-S_u-Y'_v-Z'_w-3' \text{ (II)}$$

en que X'_p representa una parte del extremo de 5' con una secuencia de nucleótidos correspondiente a la parte del extremo de 5' del primer DW-ACP degenerado, S_u representa una parte de fijación suplementaria que comprende una secuencia de nucleótidos para hibridizar en una parte opuesta a la parte del regulador del primer DW-ACP degenerado en el producto de amplificación degenerado de la fase (a-2), Y'_v representa una parte reguladora que comprende al menos dos residuos análogos de base universal o de base no discriminatoria e impide la fijación de dichas partes X'_p y S_u en secuencias no objetivo, excepto en la secuencia complementaria al primer DW-ACP degenerado, Z'_w representa una parte del extremo de 3' con una secuencia de nucleótidos correspondiente a la parte del extremo de 3' del primer DW-ACP degenerado, p, u, v y w representan el número de nucleótidos y X' , S, Y' , y Z' son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos.
40
45
8. Método de acuerdo con la reivindicación no. 7, en que el método también comprende la fase (a') de purificación de una reacción resultante de la fase (a) para eliminar el primer DW-ACP degenerado, el segundo DW-ACP y el primer cebador específico de objetivo antes de realizar la fase (b).
50
9. Método de acuerdo con la reivindicación no. 7, en que el método también comprende la fase (c) de realizar una tercera amplificación a una cuarta temperatura de fijación, que comprende por lo menos un ciclo de fijación de cebador, extensión de fijador y desnaturalización, utilizando (i) el segundo DW-ACP o un cebador con una secuencia de nucleótidos correspondiente a la parte del extremo de 5' del primer DW-ACP degenerado y (ii) un tercer TSP anidado diseñado para amplificar una región interna del producto de amplificación secundaria.
55

10. Método de acuerdo con la reivindicación no. 1, en que el primer, segundo y / o tercer TSP tiene una fórmula general III:



en que X''_p representa una parte de 5' de alta especificidad de T_m con una secuencia de nucleótidos hibridizante sustancialmente complementaria a un lugar en la secuencia de nucleótidos conocida para hibridizarse, Y''_q representa una parte de separación que comprende por los menos dos bases universales, Z''_r representa una parte de 3' de baja especificidad de T_m con una secuencia de nucleótidos hibridizante sustancialmente complementaria a un lugar en la secuencia de nucleótidos conocida para hibridizarse, p, q y r representan el número de nucleótidos, p es un número entero del 15 al 40, q es un número entero del 3 al 10, r es un número entero del 3 al 15 y X'' , Y'' y Z'' son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; la temperatura de la parte de 5' de alta especificidad de T_m es superior a la de la parte de 3' de baja especificidad de T_m , la parte de separación tiene la T_m más baja de las tres partes; la T_m de la parte de alta especificidad de T_m de 5' está entre 40°C y 80°C, la T_m de la parte de baja especificidad de T_m de 3' está entre 10°C y 40°C y la T_m de la parte de separación está entre 3°C y 15°C; la parte de separación forma una estructura de burbuja de base de no paridad bajo condiciones en las que la parte de 5' de alta especificidad de T_m y la parte de 3' de baja especificidad de T_m son fijadas al ácido nucleico de muestra, permitiendo que la parte de alta especificidad de T_m de 5' se separe de la parte de baja especificidad de T_m de 3' en términos de especificidad de fijación a un ácido nucleico de muestra, por lo cual la especificidad de fijación del cebador se determina de forma dual por la parte de 5' de alta especificidad de T_m y la parte de 3' de baja especificidad de T_m de manera que la especificidad de fijación global del cebador experimenta una mejora.

11. Método de acuerdo con la reivindicación no. 1, en que el residuo análogo de la base universal o de la base no discriminatoria se selecciona a partir del grupo que consta de deoxinosina, inosina, 7-deaza-2'-deoxinosina, 2-aza-2'-deoxinosina, 2'-OMe inosina, 2'-F inosina, deoxi 3-nitropirrol, 3-nitropirrol, 2'-OMe 3-nitropirrol, 2'-F 3-nitropirrol, I-(2'-deoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol, deoxi 5-nitroindol, 5-nitroindol, 2'-OMe 5-nitroindol, 2'-F 5-nitroindol, deoxi 4-nitrobenzimidazol, 4-nitrobenzimidazol, deoxi 4-aminobenzimidazol, 4-aminobenzimidazol, deoxi nebularina, 2'-F nebularina, 2'-F 4-nitrobenzimidazol, PNA-5-nitroindol, PNA-nebularina, PNA-inosina, PNA-4-nitrobenzimidazol, PNA-3-nitropirrol, morfolino-5-nitroindol, morfolino-nebularina, morfolino-inosina, morfolino-4-nitrobenzimidazol, morfolino-3-nitropirrol, fosforamidato-5-nitroindol, fosforamidato-nebularina, fosforamidato-inosina, fosforamidato-4-nitrobenzimidazol, fosforamidato-3-nitropirrol, 2'-O-metoxietil inosina, 2'-O-metoxietil nebularina, 2'-O-metoxietil 5-nitroindol, 2'-O-metoxietil 4-nitrobenzimidazol, 2'-O-metoxietil 3-nitropirrol, y combinaciones de los mismos.

12. Método de acuerdo con la reivindicación no. 12, en que el residuo análogo de base universal o de base no discriminatoria es deoxinosina, inosina, I-(2'-deoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol o 5-nitroindol.

13. Método de acuerdo con la reivindicación no. 1, en que la parte reguladora y la parte de separación comprenden nucleótidos contiguos con residuos análogos de bases universales o de bases no discriminatorias.

14. Método de acuerdo con la reivindicación no. 1, en que p representa un número entero entre 10 y 60.

15. Método de acuerdo con las reivindicaciones no. 1 o 7, en que q o u es por lo menos 3.

16. Método de acuerdo con las reivindicaciones no. 1 o 7, en que q o u representa un número entero entre 3 y 10.

17. Método de acuerdo con las reivindicaciones no. 1 o 7, en que r o v representa un número entero entre 2 y 5.

18. Método de acuerdo con las reivindicaciones no. 1 o 7, en que s o w representa un número entero entre 3 y 10.

19. Método de acuerdo con la reivindicación no. 7, en que S comprende por lo menos 2 nucleótidos de deoxiguanosina contiguas.

20. Método de acuerdo con la reivindicación no. 10, en que la parte de alta especificidad de T_m de 5' es más larga que la parte de baja especificidad de T_m de 3'.

21. Método de acuerdo con la reivindicación no. 10, en que la parte de baja especificidad de T_m de 3' tiene la secuencia de nucleótidos hibridizante perfectamente complementaria con el lugar en la secuencia de nucleótidos conocida para hibridizarse.

22. Método de acuerdo con la reivindicación no. 10, en que la parte de alta especificidad de T_m de 5' tiene una longitud de entre 15 y 25 nucleótidos.

Fig. 1A

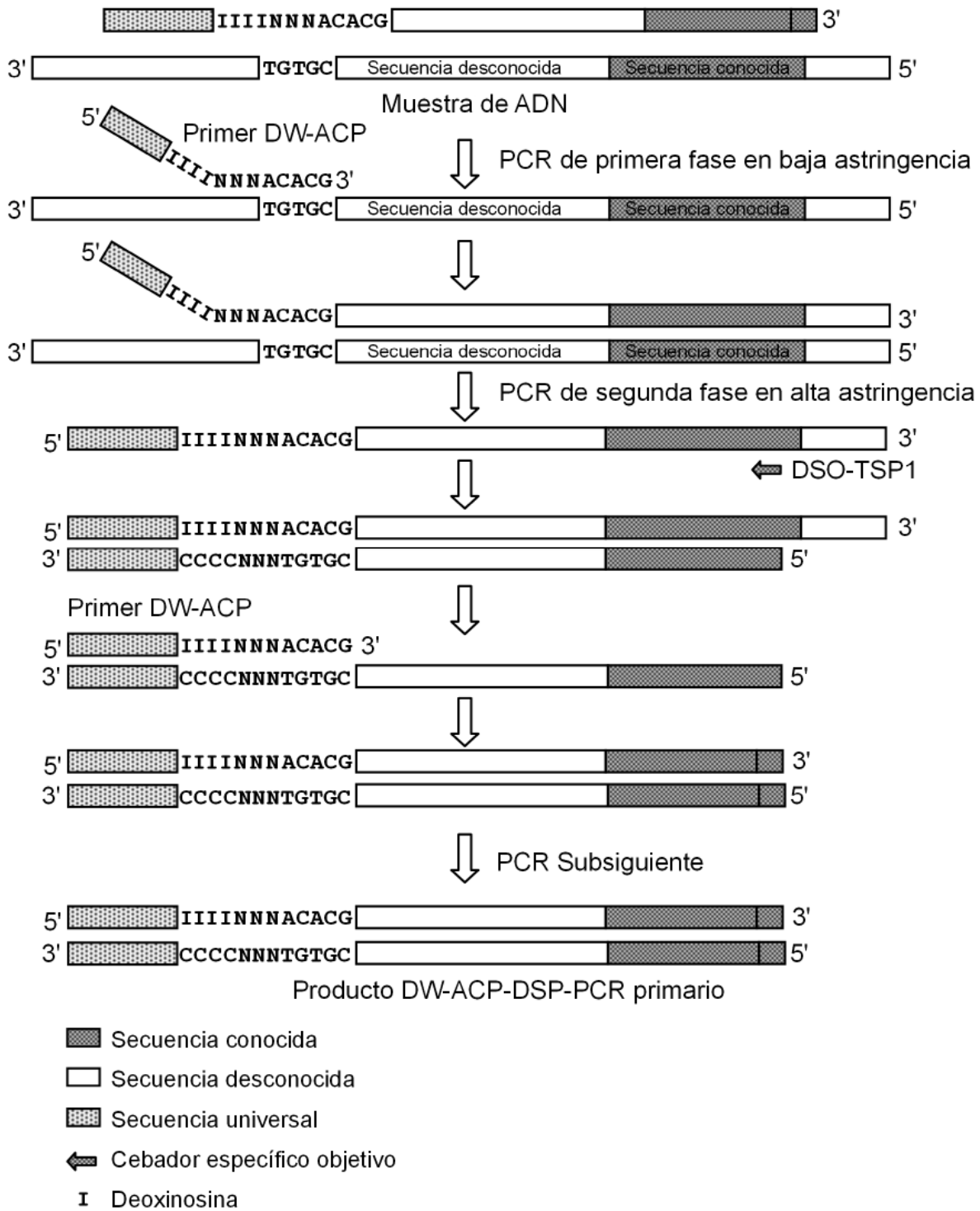
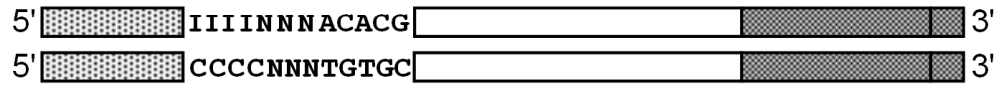
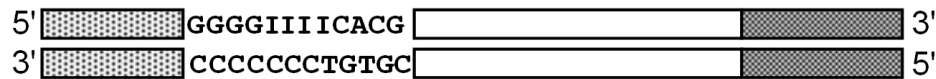
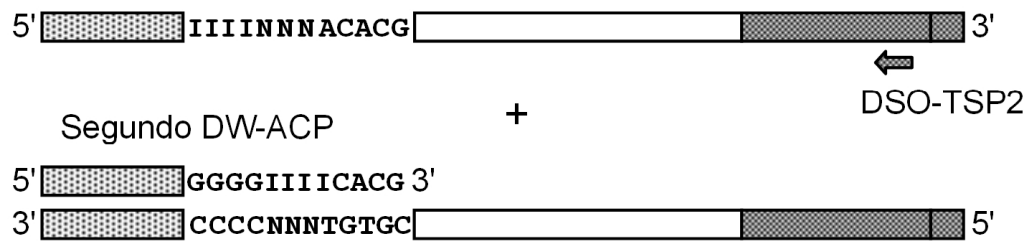


Fig. 1B



Producto DW-ACP -DSO PCR Primario

↓ DW-ACP -DSO PCR Secundario que
utiliza un segundo DW-ACP y un
cebador específico para objetivo anidado



Producto DW-ACP-DSO PCR específico para objetivo desconocido



Secuenciación directa
ó clonación

-  Secuencia conocida
-  Secuencia desconocida
-  Secuencia universal
-  Cebador específico objetivo
- I Deoxinosina

Fig. 2

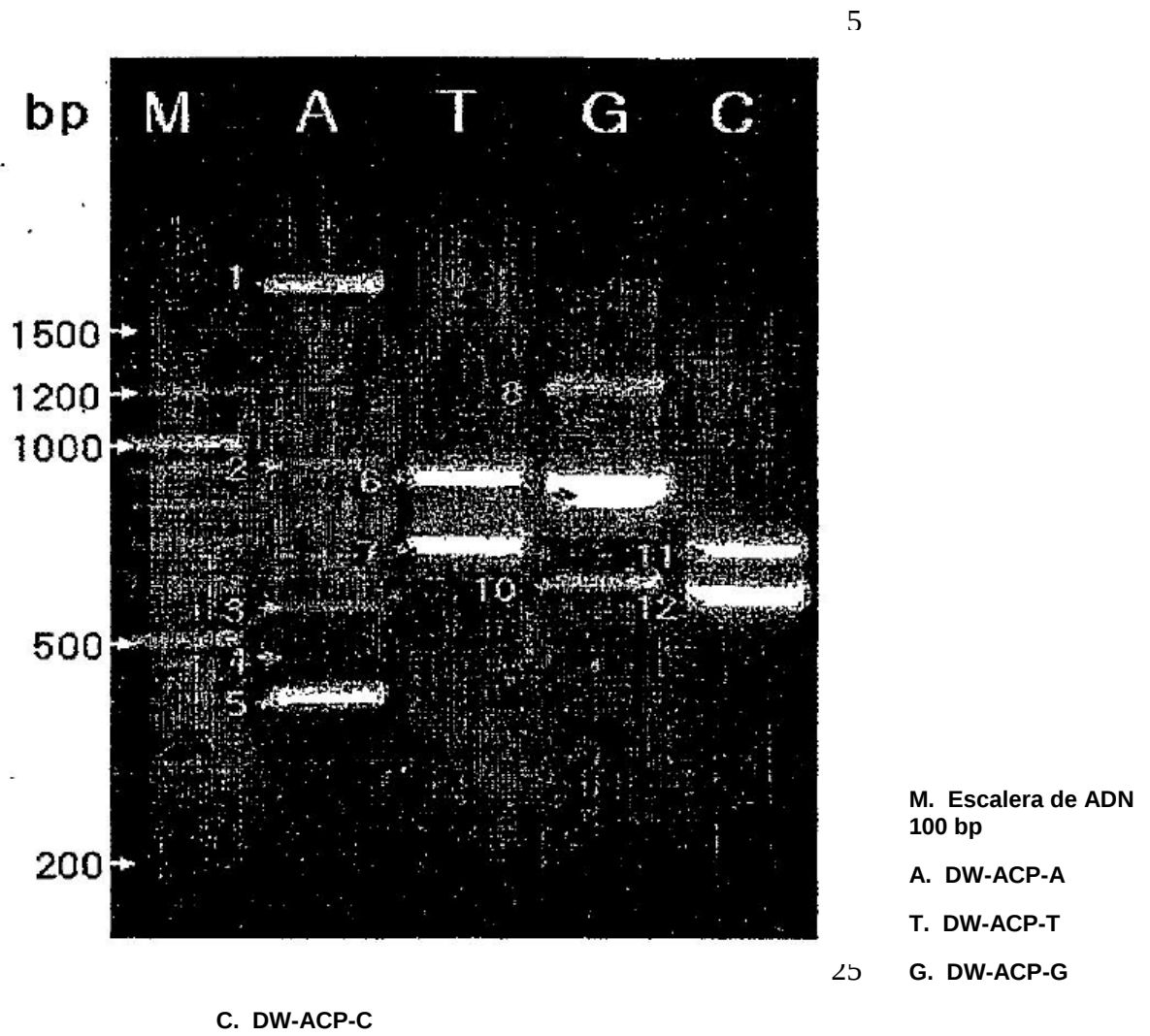


Fig. 3

Identificación de lugares de inserción de MFG por búsqueda BLAT en humanos

Clon	Cromosoma	HEBRA	Inicio	Final (Lugar de inserción)
DW1	1	+	9843694	9844037
DW2	13	+	40059031	40059568
DW3	16	+	68156026	68156201
DW4	2	+	25429017	25429108
DW5	2	+	25429022	25429108
DW6	21	-	41407558	41408014
DW7	19	-	12884434	12884823
DW8	7	-	68695357	68696030
DW9	16	-	73665022	73665507
DW10	7	+	867386	867600
DW11	4	-	90007703	90008006
DW12	16	-	30455287	30455486