

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 831**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2006 E 06849466 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 1929049**

54 Título: **Procedimientos para multiplexar la ampliación de la recombinasa polimerasa**

30 Prioridad:

25.07.2005 US 702533 P
18.10.2005 US 728424 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.08.2013

73 Titular/es:

ALERE SAN DIEGO, INC. (100.0%)
9975 Summers Ridge Road
San Diego, CA 92121, US

72 Inventor/es:

PIEPENBURG, OLAF;
WILLIAMS, COLIN H. y
ARMES, NIALL A.

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 420 831 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

Procedimientos para multiplexar la ampliación de la recombinasa polimerasa

5 **Solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica los derechos de prioridad de la solicitud US 60/702.533 presentada el 25 de julio de 2005 y de la solicitud US 60/728.424 presentada el 18 de octubre de 2005.

10 **Antecedentes**

La ampliación de la recombinasa polimerasa (ARP) es un proceso de ampliación de ADN que utiliza enzimas para emparejar cebadores de oligonucleótidos sintéticos con sus parejas complementarias en el ADN bicatenario. (Armes y Stemple, solicitud de patente US 60/358, 563 presentada el 21 de febrero de 2002). La ARP depende de los componentes de la replicación del ADN celular y de las herramientas de reparación. La noción de emplear algunas de estas herramientas para la ampliación de ADN *in vitro* ha existido durante algún tiempo (Zarling *et al.* patente US nº 5.223.414), sin embargo, el concepto no se ha transformado en una tecnología de trabajo hasta hace poco ya que, a pesar de una larga historia de investigación en el área de la función recombinasa que implica principalmente a la proteína recA de *E. coli*, las condiciones *in vitro* que permiten la ampliación sensible de ADN han determinado solo recientemente (Piepenburg *et al.* solicitud de patente US 10/931.916 presentada el 1 de septiembre de 2004, también Piepenburg *et al.*, *PlosBiology* 2006).

La ARP ofrece numerosas ventajas sobre los procedimientos tradicionales de ampliación de ADN. Estas ventajas incluyen la falta de una necesidad de cualquier fusión inicial térmica o química, la capacidad de operar a bajas temperaturas constantes sin necesidad de control de la temperatura absoluta, así como la observación de que las reacciones completas (que carecen de destino) se pueden almacenar en condiciones secas. Estas características demuestran que el ARP es una herramienta única y poderosa para el desarrollo de pruebas de detección de ácidos nucleicos portátiles, precisas y sin instrumentos.

30 **Breve descripción de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos de ampliación de ácidos nucleicos que incluyen nuevos protocolos de ampliación de recombinasa polimerasa (ARP) para la rápida y eficiente de ampliación de ácidos nucleicos en un proceso que puede multiplexarse fácilmente.

Una forma de realización de la invención se refiere a procedimientos de ARP que se pueden realizar simultáneamente en una sola reacción (en un solo tubo) y en el que los resultados se pueden detectar de forma simultánea. La reacción de ARP única se describe en primer lugar a continuación y los procedimientos de multiplexado de dicha reacción se describen en segundo lugar.

Un aspecto de la invención se refiere a los procedimientos de ARP que generan amplímeros fácilmente detectables (un ácido nucleico ampliado que es el producto de una reacción de ARP). El procedimiento de ARP amplió una molécula de ácido nucleico diana bicatenaria que comprende una primera y una segunda cadena de ADN. La etapa (a) implica poner en contacto un agente de recombinasa con un primer y un segundo cebador de ácido nucleico y un de la tercera ampliación que comprende uno o más restos internos no complementarios o modificados para formar unos primero, segundo y tercer cebador de nucleoproteína. La etapa (b) implica poner en contacto los primer y segundo cebadores de nucleoproteína con dicho ácido nucleico diana bicatenario formando de ese modo una primera estructura bicatenaria entre dicho primer cebador de nucleoproteína y dicha primera cadena de ADN a una primera porción de dicha primera cadena (formando un bucle D) y una segunda estructura bicatenaria entre dicho segundo cebador de nucleoproteína y dicha segunda cadena de ADN en una segunda porción de dicha segunda cadena (formando un bucle D) de tal manera que los extremos 3' de dicho primer cebador de nucleoproteína y dicho segundo cebador de nucleoproteína están orientados uno hacia el otro en la misma molécula de ácido nucleico diana con una tercera porción del ácido nucleico diana entre dichos extremos 3'; la etapa (c) implica la ampliación del extremo 3' de dicho primer cebador de nucleoproteína y segundo cebador de nucleoproteína con una o más polimerasas y dNTP para generar un primer ácido nucleico diana ampliado con una región interna que comprende la tercera porción del ácido nucleico. La etapa (d) implica poner en contacto dicho ácido nucleico diana ampliado con dicho tercer cebador de nucleoproteína para formar una tercera estructura bicatenaria en la tercera porción de dicho ácido nucleico diana ampliado (formando un bucle D) en presencia de una nucleasa; en el que dicha nucleasa específicamente escinde dicho resto interno no complementario o modificado sólo después de la formación de dicha tercera estructura bicatenaria para formar un tercer cebador bloqueado en extensión 3' y un tercer cebador en 5'. La etapa (e) implica ampliar el extremo 3' de dicho tercer cebador 5' con una o más polimerasas y dNTP para generar un segundo ácido nucleico ampliado bicatenario que comprende dicho primer cebador de ácido nucleico y dicho tercer cebador en 5'. La reacción de ARP se continúa hasta que se alcanza un grado deseado del segundo ácido nucleico ampliado bicatenario. Cabe señalar que este proceso, junto con cualquiera de las formas de realización relacionadas, puede utilizarse para multiplexar la reacción ARP (descrita a continuación).

El agente recombinasa puede ser, por ejemplo, uvsX, RecA y análogos funcionales de los mismos. Además, la reacción ARP puede llevarse a cabo en presencia de uvxY, gp32, las proteínas de unión monocatenarias y de otros reactivos de ARP habituales. Los procedimientos para la realización de ARP se describen, por ejemplo, en la solicitud US 60/358.563 presentada el 21 de febrero 2002, en la solicitud US 10/371.641, presentada el 21 de febrero del 2003, solicitud de patente US 10/931.916 presentada el 1 de septiembre 2004 y PCT/IB2005/001560 (documento WO 2005/118853) presentado el 11 de abril 2005.

La nucleasa utilizada en esta reacción de ARP debe escindir específicamente el resto no complementario o el resto interno modificado preferentemente cuando el tercer cebador bloqueado en extensión se hibrida con un ADN para formar una estructura bicatenaria. Es preferible que la nucleasa no escinden el resto no complementaria o el resto interno modificada cuando el cebador bloqueado en extensión está en forma monocatenaria - independientemente de si el cebador se une a la recombinasa o SSB. En una forma de realización preferida, la nucleasa es una ADN glucosilasa o AP endonucleasa. Si el resto interno modificado es un uracilo o inosina, la nucleasa preferida es uracilo glucosilasa o hipoxantina-ADN glucosilasa, respectivamente. La nucleasa puede reconocer la base no complementaria por la naturaleza de un error de emparejamiento que forma una región de restos no complementarios (es decir, una burbuja) en una estructura bicatenaria por lo demás. En este caso, la nucleasa reconoce un error de emparejamiento de bases entre los restos no complementarios y escinde el cebador en la base no complementaria.

La nucleasa utilizada en cualquiera de los procedimientos de la invención puede ser una ADN glucosilasa o un AP endonucleasa. La nucleasa puede funcionar por reconocimiento de un error de emparejamiento de bases entre la base de dicho primer cebador bloqueado en extensión y dicho ácido nucleico diana y que escinde al cebador bloqueado en extensión en el emparejamiento incorrecto de bases sin escindir el ácido nucleico diana. La nucleasa, alternativamente, puede reconocer un resto dañado, una zona abásica o un simulador de sitio abásico, o cualquier otra modificación que se pueda incorporar en oligonucleótidos sintéticos. La nucleasa puede ser, por ejemplo, fpg, Nth, MutY, MutS, MutM, MUG de *E. coli.*, MUG humana, Ogg1 humana, glucosilasas de tipo Nei (Neil) de vertebrados, Nfo, exonucleasa III, uracil glucosilasa, hipoxantina-ADN y análogos funcionales y homólogos de los mismos. Los análogos funcionales y homólogos pueden ser de cualquier origen mamífero, bacteriano o vírico. Como ejemplos adicionales, si la base modificada es inosina, la nucleasa puede ser hipoxantina-ADN glucosilasa; si la base modificada es uracilo, la nucleasa puede ser uracilo glucosilasa. En una forma de realización preferida, estas nucleasas pueden ser de *E. coli.* En una forma de realización preferida, la nucleasa es Nfo de *E. coli* o exonucleasa III de *E. coli* y el resto interno modificado es un resto de tetrahidrofurano o un grupo enlazador. Un "enlazador" (también llamado enlazador de carbono o "separador") es una cadena que contiene carbono que se utiliza para unir la posición 3' de un azúcar a la posición 5' (por lo general) de otro. Los separadores corrientes pueden comprender alrededor de 3, 6, 9, 12 o 18 cadenas de carbono, aunque puede ser de cualquier número de cadenas de carbono. Los enlaces carbono-oxígeno-carbono son frecuentes en estos separadores, supuestamente para reducir la hidrofobia. Nfo y exonucleasa III (y homólogos) pueden reconocer el enlace 3'-O-C del azúcar en el extremo 3' de un nucleótido unido a un separador y escindirlo. Véase, por ejemplo, el separador C18 (18-O-dimetoxitritilhexaetilenglicol, 1-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamida (Glen Research, Sterling, VA, EE.UU., n° de cat 10-1918-90).

Como se utiliza en la presente memoria, un "resto abásico" en un oligonucleótido se refiere a un fragmento molecular (FM) dentro de una cadena de oligonucleótido donde el fragmento molecular se aproxima a la longitud de una ribofuranosa o de un azúcar desoxirribofuranosa de tal manera que el fragmento molecular separa una de otra las bases adyacentes al mismo, o efectivamente el mismo, la distancia como si una ribofuranosa o un azúcar desoxirribofuranosa de cualquiera de A, G, C, T, o U estuvieran presentes en el lugar del resto abásico. El resto abásico puede incorporar un anillo de ribofuranosa o deoxirribofuranosa como en A, G, C, T o U naturales. Sin embargo, el resto abásico no contiene una base u otra molécula que pueda interactuar con la base en la cadena opuesta de una doble cadena que se forma con el oligonucleótido que contiene restos abásicos. Por lo tanto, un resto abásico puede ser una estructura apurínica o apirimidínica, un análogo de la base, o un análogo de un eje central de fosfato. La sustitución abásica también puede consistir en un eje central de N-(2-aminoetil)-glicina unidas por enlaces amida. En una forma de realización preferida, el resto abásico es tetrahidrofurano o D-separador (un tipo de tetrahidrofurano). Tanto un separador D como el tetrahidrofurano efectivamente son un azúcar desoxirribosa en el que tanto la posición 1' como la 2' carece de restos OH. Normalmente, la posición 1' de un resto abásico auténtico en el ADN tendría un hidroxilo en la posición en la que normalmente se une la base, sin embargo, esto es inestable ya que la forma anular se interconvierte con una forma aldehído de anillo abierto (véase a continuación), que a continuación puede degradarse por el proceso de beta-eliminación. La eliminación de este hidroxilo conduce a una forma estable fácilmente sintetizada en oligonucleótidos. Se conocen sitios abásicos de tipo tetrahidrofurano y su utilización como restos abásicos. El tetrahidrofurano se puede colocar en oligonucleótidos durante la síntesis por reactivos pedidos de Glen Research (Sterling, Virginia, EE.UU.).

Uno o más restos internos no complementarios o modificados son internos, ya que no es la mayoría de los restos en 5' o en 3' del primer cebador bloqueado en extensión. En una forma de realización preferida, uno o más restos internos no complementarios es de por lo menos 10 restos desde el extremo 5' o 3' de un cebador. En una forma de realización más preferida, uno o más restos internos no complementarios es de por lo menos 15, o por lo menos 20 restos de distancia desde el resto en 5' o 3' de un cebador.

Uno o más restos internos no complementarios puede introducirse al sintetizar un cebador de oligonucleótido con uno o más restos no complementarios. Un resto no complementario es cualquier resto que no forma un par de bases de Watson Crick (enlace de hidrógeno) con su correspondiente resto en una estructura bicatenaria. Por ejemplo, si se necesita una "T" en una posición específica para formar un par de bases de Watson-Crick entre un cebador y un ácido nucleico diana, la utilización de una "A" haría que la "A" no fuese complementaria. Como ejemplo adicional, cada una de las bases intermedias en la siguiente estructura bicatenaria es una base no complementaria.

5 cebador aaaaa (SEC. ID. nº 1)

10 | | | |

 diana t t a t t (SEC. ID. nº 2)

15 cebador aagaa (SEC. ID. nº 3)

 | | | |

 diana t t a t t (SEC. ID. nº 4)

20 cebador aacaa (SEC. ID. nº 5)

 | | | |

25 diana t t a t t (SEC. ID. nº 6)

Es conocido que la presencia de restos no complementarios en un ácido nucleico bicatenario producirá una burbuja dentro del ácido nucleico bicatenario. Mientras que un resto interno no complementario o modificado es suficiente para el funcionamiento con los procedimientos de la invención, más de uno de los restos internos no complementarios o modificados pueden utilizarse. Cuando se utiliza más de uno, pueden ser adyacentes entre sí en un oligonucleótido o pueden estar separados. Debe apreciarse que si la nucleasa escinde el ácido nucleico diana en la posición del emparejamiento incorrecto o no complementaria, el ADN diana es reparado rápidamente por dNTP y la polimerasa utilizando el cebador como plantilla. Debido a esto, esta reacción no afectaría a los procedimientos de la presente descripción.

Uno o más restos no complementarios internos del primer cebador bloqueado en extensión puede ser un resto interno modificado. El resto interno modificado puede ser cualquier estructura química (resto) que no pueda formar una estructura de emparejamiento de bases de Watson-Crick con su correspondiente base en una estructura del ácido nucleico bicatenario. Si se utiliza más de un resto interno no complementario, pueden ser una mezcla de restos internos no complementarios o de restos internos modificados. La expresión "resto interno modificado" también incluye, al menos, cualquier resto que no se encuentra normalmente en el ADN – que es cualquier resto que no es una "A", "G", "C" o "T" tal como, por ejemplo uracilo o inosina.

El resto interno modificado puede ser inosina, uracilo, 8-oxoguanina, timina glicol, o un simulador de sitio abásico. Los simuladores de sitio abásico preferidos incluyen un resto de tetrahidrofurano o D-separador (que puede producirse como un producto del empleo de una 5'-O-dimetoxitritil-1',2'-didesoxirribosa-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamida durante la síntesis de oligonucleótidos.

El cebador está bloqueado en la extensión en su extremo 3' por lo que no puede normalmente ser alargado por la polimerasa y dNTP, incluso en presencia de una plantilla gratuita. Los procedimientos de bloqueo de un cebador son bien conocidos e incluyen, al menos, la inclusión de un nucleótido bloqueado en 3'. El nucleótido bloqueado en 3' puede contener, por ejemplo, un grupo de bloqueo que impide la ampliación de la polimerasa. En general, los grupos de bloqueo se unen al punto 3' o 2' del resto de azúcar en 3', pero son posibles otras posiciones de uniones. Uno de los métodos de bloqueo en 3' es más frecuentes es para colocar un azúcar didesoxi en el extremo 3' de un oligonucleótido. El grupo de bloqueo puede ser, por ejemplo, un marcador detectable.

Un marcador detectable se define como cualquier resto que se puede detectar con los procedimientos actuales. Estos marcadores incluyen, por lo menos, un fluoróforo (denominado también molécula fluorescente, fluorocromo), una enzima, un extintor, un inhibidor enzimático, un marcador radiactivo, un miembro de un par de unión, un resto digoxigenina, un péptido, y una combinación de los mismos.

"Un miembro de un par de unión" hace referencia a que es uno de entre un primer y un segundo resto, en el que dichos primer y dicho segundo resto tienen una afinidad de unión específica entre sí. Los pares de unión adecuados para su utilización en la invención incluyen, pero no se limitan a, antígenos/anticuerpos (por ejemplo, digoxigenina/anti-digoxigenina, dinitrofenilo (DNP)/anti-DNP, dansil-X-anti-dansilo, fluoresceína/anti-fluoresceína, amarillo lucifer/anti-amarillo lucifer, péptido/antipéptido, ligando/receptor y rodamina/anti-rodamina), biotina/avidina (o biotina/estreptavidina) y la proteína de unión a calmodulina (CBP)/calmodulina. Otros pares de unión adecuados

incluyen polipéptidos tales como el péptido FLAG (DYKDDDDK; SEC. ID. nº 7) [Hopp *et al.*, *Biotechnology*, 6:1204-1210 (1988)]; el péptido epítipo KT3 (Martin *et al.*, *Science* 255:192-194 (1992)); péptido epítipo de tubulina (Skinner *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266:15163-15166 (1991)), y la etiqueta del péptido de la proteína 10 del gen T7 (Lutz-Freyer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87:6393-6397 (1990)) y los anticuerpos contra cada uno de los mismos. Generalmente, en una forma de realización preferida, el más pequeño de los socios de par de unión sirve como el marcador detectable, como consideraciones estéricas pueden ser importantes. Además de lo expuesto anteriormente, cualquiera de los ácidos nucleicos y nucleótidos de la reacción ARP puede estar marcado con un marcador detectable.

En cualquiera de los procesos de ARP de la invención en los que se utiliza un marcador detectable, el marcador detectable puede utilizarse para seguir el avance (la producción de amplímeros) de la reacción ARP. En un aspecto, si se etiquetan los cebadores, el seguimiento puede implicar la detección de un marcador en un amplímero. Dado que es de esperar que amplímeros sean mayores que los cebadores utilizados, la detección puede implicar, por ejemplo, electroforesis en gel y la detección del amplímero de tamaño adecuado. Alternativamente, los amplímeros marcados pueden estar separados por cebadores marcados por un procedimiento más rápido, tal como la cromatografía en columna (incluyendo columnas de centrifugación, columnas de empuje y similares). Dado que los procedimientos de ARP de la invención tiene una alta especificidad y baja producción de artillugos (relación alta señal a ruido), el seguimiento puede implicar la realización de ARP utilizando nucleótidos unidos a marcadores detectables y la medición de la cantidad de marcadores unidos a ácidos nucleicos de alto peso molecular (por ejemplo, ácido nucleico de más de 100 bases de longitud). Por ejemplo, se pueden utilizar dNTP radioactivos y el avance de la reacción ARP se puede controlar siguiendo la incorporación de la radiación en el ADN de alto peso molecular. Las técnicas que controlan la incorporación de nucleótidos en el ADN de alto peso molecular incluyen la electroforesis en gel, la columna de exclusión por tamaño (por ejemplo, columnas convencional, de centrifugación y de empuje) y la precipitación ácida.

Si el primer cebador de ácido nucleico y el tercer cebador de 5' se marcan cada uno con un marcador detectable diferente, entonces el producto ampliado (el segundo ácido nucleico ampliado bicatenario) será la única especie de ácido nucleico con ambos marcadores. Esta especie de ácidos nucleicos con doble marcaje se pueden detectar por varios medios. En un procedimiento preferido, el producto ampliado puede detectarse utilizando una tira de flujo. En una forma de realización preferida, un marcador detectable produce un color y el segundo marcador es un epítipo que es reconocido por un anticuerpo inmovilizado. Un producto que contiene ambos marcadores atacará a un anticuerpo inmovilizado y producirá un color en la posición del anticuerpo inmovilizado. Un ensayo basado en este método de detección puede ser, por ejemplo, una tira de flujo (varilla sumergida) que se puede aplicar a toda la reacción ARP. Una ampliación positiva producirá una banda en la tira de flujo mientras que una ampliación negativa no produciría ninguna banda de color.

Debe apreciarse que este proceso de ampliación ARP utilizando 3 cebadores puede multiplexarse (denominado en la presente memoria como ARP múltiple). Es decir, proceso de ARP múltiple utilizando 3 cebadores, como se expuso anteriormente, se puede realizar en la misma reacción (tubo). La ARP múltiple se puede realizar con uno o más ácidos nucleicos diana. Cada proceso se lleva a cabo con una combinación diferente de los primer y segundo cebadores de ácido nucleico que es específica para una región diferente de uno o más ácidos nucleicos diana. En una forma de realización preferida, cuando se llevan a cabo múltiples procesos del ARP en la misma reacción, cada proceso de ARP utiliza un primer ácido nucleico con el mismo marcador, pero no necesariamente la misma secuencia. Además, cada proceso utiliza el mismo tercer cebador bloqueado en extensión con un segundo marcador detectable. De esta manera, midiendo la acumulación de producto de ácido nucleico bicatenario tanto con el primer marcador detectable como con el segundo marcador detectable, se puede medir la ampliación acumulativa de cada proceso de ARP.

La ARP múltiple es útil para muchos fines. Por ejemplo, múltiples patógenos pueden compartir una secuencia de ácido nucleico común que es demasiado pequeño para la ampliación directa por el ARP. Además, la secuencia de ácido nucleico común tiene diferente secuencia flanqueante en cada organismo de modo que un único conjunto de cebadores ARP no puede diseñarse para ampliar esta secuencia de ácido nucleico común en múltiples organismos. Utilizando el proceso de ARP múltiple como se describió anteriormente, se puede utilizar un gran número de combinaciones de cebadores de ARP en una reacción, en el que cada combinación ampliaría la secuencia de ácido nucleico común en un organismo y esta secuencia de ácido nucleico común sería simultáneamente ampliada por el tercer cebador común (tercer cebador bloqueado en extensión). La ARP múltiple con combinaciones de cebadores diseñadas para detectar múltiples patógenos, puede utilizarse, por ejemplo, en un ensayo para detectar cepas de *S. aureus* resistentes a la metilicina por ampliación y detección de una secuencia común (por ejemplo, *mec2*) en cada cepa. Utilizando la ARP múltiple de la invención, un gran número de locus (secuencias de ADN) se puede detectar por ampliación ARP simultánea. En una forma de realización preferida, se realizan por lo menos 2 ARP simultáneas en un ARP. En una forma de realización más preferida, se realizan por lo menos 3, por lo menos 5, por lo menos 7 o por lo menos 10 reacciones de ARP en el mismo tubo.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento múltiple de ARP, que comprende las etapas de realizar más de un proceso de ARP en una reacción. Cada reacción individual se lleva a cabo como se describió anteriormente para ARP utilizando 3 cebadores. En pocas palabras, cada reacción implica las etapas de (a1) poner

en contacto un agente de recombinasa con un primer y un segundo cebador de ácido nucleico y un tercer cebador bloqueado en extensión que comprende un resto interno no complementario o modificado para formar un primer, segundo y tercer cebador de nucleoproteína; (a2) poner en contacto los primer y segundo cebadores de nucleoproteína con dicho ácido nucleico diana bicatenario formando de ese modo una primera estructura bicatenaria entre dicho primer cebador de nucleoproteína y dicha primera cadena de ADN en una primera porción de dicha primera cadena y una segunda estructura bicatenaria entre dicho segundo cebador de nucleoproteína y dicha segunda cadena de ADN en una segunda porción de dicha segunda cadena de tal manera que los extremos 3' de dicho primer cebador de nucleoproteína y dicho primer cebador de nucleoproteína están orientados uno hacia el otro en la misma molécula de ácido nucleico diana con una tercera porción de ácido nucleico entre dichos extremos 3'; (a3) extendiendo el extremo 3' de dicho primer cebador de nucleoproteína y segundo cebador de nucleoproteína con una o más polimerasas y los dNTP para generar un primer ácido nucleico diana ampliado con una región interna que comprende la tercera porción de ácido nucleico; (a4) poner en contacto dicho ácido nucleico diana ampliado con dicho tercer cebador de nucleoproteína para formar una tercera estructura bicatenaria en la tercera porción de dicho ácido nucleico diana ampliado en presencia de una nucleasa; en el que dicha nucleasa escinde específicamente dicho resto interno no complementario o modificado sólo después de la formación de dicha tercera estructura bicatenaria para formar un tercer cebador bloqueado en extensión 3' y un tercer cebador en 5'; (a5) ampliar el extremo 3' de dicho tercer cebador 5' con una o más polimerasas y los dNTP para generar un segundo ácido nucleico ampliado bicatenario que comprende dicho primer cebador de ácido nucleico y dicho tercer cebador 5'; (a6) continuar la reacción mediante la repetición de (a2) y (a5) hasta que se alcance un grado deseado del segundo ácido nucleico ampliado bicatenario. En este proceso, cada proceso de ARP se lleva a cabo con una combinación diferente de los primer y segundo cebadores de ácido nucleico pero cada proceso se realiza con el mismo tercer cebador bloqueado en extensión.

Debe apreciarse que, si bien cada proceso de ARP tendrá una combinación diferente de los primer y segundo cebadores de ácido nucleico, los cebadores pueden todavía compartirse entre los procesos del ARP. Por ejemplo, el proceso 1 de ARP puede utilizar los cebadores 1 y 2 mientras que el proceso 2 de ARP sólo podrá utilizar los cebadores 2 y 3. Por lo tanto, el proceso 1 de ARP y el proceso 2 de ARP comparten el mismo cebador (cebador 2).

En cualquier proceso de ARP que implica un cebador bloqueado en extensión (por ejemplo, el tercer cebador bloqueado en extensión) el cebador puede comprender además uno o más marcadores detectables y el avance de la ARP se puede hacer el seguimiento de una segunda forma controlando el marcador detectable en este cebador. El marcador detectable puede ser un fluoróforo, una enzima, un extintor, un inhibidor enzimático, un marcador radiactivo, un miembro de un par de unión y una combinación de los mismos. Cuando se utiliza un fluoróforo o extintor, la unión puede ser por un resto de fluoróforo-dT amidada o un resto de extintor-dT amidada.

En una forma de realización preferida, el tercer cebador bloqueado en extensión comprende un fluoróforo y un extintor. El fluoróforo y el extintor están separados por 0 a 2 bases, 0 a 5 bases, 0 a 8 bases o 0 a 10 bases, 3 a 5 bases, 6 a 8 bases u 8 a 10 bases. Además, el fluoróforo y el extintor pueden estar separados por una distancia mayor cuando el cebador bloqueado en extensión no está hibridado que cuando el cebador bloqueado en extensión se hibrida con el ácido nucleico diana. Por otra parte, el fluoróforo o extintor pueden estar unido al resto interno no complementario o modificado, siempre y cuando el fluoróforo y el extintor se separen después de la escisión de la base interna modificada por la nucleasa. Los fluoróforos preferidos incluyen fluoresceína, FAM, TAMRA y los extintores preferidos incluyen un extintor oscuro (por ejemplo, Dark Quencher 1, Dark Quencher 2, Black Hole Quencher 1 y Black Hole Quencher 2).

Una de las ventajas de los procedimientos de este proceso de ARP es que puede llevarse a cabo a baja temperatura, tal como entre 14 °C y 21 °C, entre 21 °C y 25 °C, entre 25 °C y 30 °C, entre 30 °C y 37 °C, o entre, 40 °C y 43 °C. En estas condiciones de temperatura, la reacción se acelera en presencia de 1% a 12% de PEG tal como entre 6% al 8% de PEG.

Otra ventaja de la utilización de cebadores bloqueados en extensión, para cualquiera de los procedimientos de la invención, es que el avance de la reacción se puede seguir en tiempo real. El seguimiento puede implicar, por ejemplo, medir la fluorescencia en la reacción de ARP. En este procedimiento, el fluoróforo y el extintor se encuentran a una distancia lo suficientemente cerca (separados por menos de 10 restos, como se describe en la presente memoria) en el cebador de tal manera que el inhibidor previene la fluorescencia del fluoróforo. Sin embargo, como el tercer cebador bloqueado en extensión es escindido por la nucleasa, el extintor está separado del fluoróforo y el cebador resulta fluorescente. Esto permite el seguimiento de ARP en tiempo real, simplemente utilizando una fuente de luz que puede excitar el fluoróforo a fluorecer y utilizando un detector óptico para detectar cualquier fluorescencia del fluoróforo que se ha separado del extintor.

Los cebadores para cualquiera de las reacciones de ARP de esta descripción, incluyendo los cebadores bloqueados en extensión, pueden encontrarse entre 2 y 100 restos de longitud, tales como entre 12 y 30 restos de longitud, 12 y 40 restos de longitud, 12 y 50 restos de longitud o 12 y 60 restos, 30 y 40 restos de longitud, 40 y 45 restos de longitud, o 45 y 50 restos de longitud. En una forma de realización preferida, los cebadores pueden estar entre 30 a 100, entre 35 a 100, entre 40 y 100 o entre 45 y 100 restos de longitud. En la forma de realización más preferida, los cebadores están entre 30 y 60 restos de longitud, entre 35 y 60, entre 40 y 60 o entre 45 y 60 restos de longitud -

5 estos cebadores se pueden utilizar en cualquier reacción de ARP y son especialmente preferidos para las reacciones de ARP por debajo 30°C, por debajo de 15°C o por debajo de 20°C. Las longitudes de cebadores mayores de 30, mayores de 35, mayores de 40, mayores de 45 o mayores de 50 bases se prefieren para los procesos del ARP realizados a o por debajo de 30°C. Se entiende que en el campo de la biología molecular, las subunidades de un ácido nucleico que se conocen como "bases" o "restos". Por ejemplo, las estructuras y longitudes de ADN y oligonucleótidos se expresan en bases (kilobases), pares de bases o restos.

10 Cualquier reacción de ARP de la invención puede llevarse a cabo entre 14°C y 21°C, entre 21°C y 25°C, entre 25°C y 30°C, entre 30°C y 37°C, entre 38°C a 40°C o entre 40°C y 48°C. Se ha observado que las reacciones de ARP son óptimas a 25°C en presencia de entre el 1% y el 12% de PEG. Preferentemente, la concentración de PEG está entre 6 y 9%, tal como, por ejemplo, entre 7 y 8%. Estas condiciones óptimas del ARP se aplican a las reacciones ARP descritas en esta solicitud y a todas las reacciones de ARP en general.

15 En una reacción ARP típica de la invención, al menos una cadena del ácido nucleico diana se amplía por lo menos 10^7 veces, por lo menos 10^8 veces o por lo menos 10^9 veces.

20 Para cualquiera de los procedimientos de ARP de la invención, se entiende que el ácido nucleico diana puede ser monocatenario. El ácido nucleico monocatenario puede convertirse en ácido nucleico bicatenario por procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, por ejemplo, la hibridación de cebadores aleatoria seguida de alargamiento por la polimerasa. Por otra parte, la reacción ARP puede llevarse a cabo directamente con el ácido nucleico diana monocatenario, porque en una primera etapa, un cebador de ARP se hibridaría con dicho ácido nucleico diana monocatenario y ampliación (en la presencia de nucleasa en el caso del primer cebador bloqueado en extensión) por la polimerasa generaría un ácido nucleico diana bicatenario para la ARP posterior. Además, un cebador específico se puede añadir al principio de la reacción de ARP para hibridar con el ácido nucleico diana monocatenario y por ampliación con polimerasa ya presente en la reacción de ARP, convertir el ácido nucleico diana monocatenario en un ácido nucleico diana bicatenario.

30 Para reducir el fondo y la contaminación, cualquiera de las reacciones de ARP de la invención puede llevarse a cabo con dUTP en la mezcla de dNTP. Se ha descubierto, sorprendentemente, que una ARP puede llevarse a cabo en presencia de dUTP y uracil glucosilasa activa durante un primer periodo antes de que se inactive la uracil glucosilasa. Este primer periodo es preferiblemente inferior a 20 minutos, inferior a 10 minutos inferior a 5 minutos o inferior a 2 minutos. Por otra parte, la uracil glucosilasa se puede añadir en cualquier momento durante el primer período. Es decir, la reacción ARP puede iniciarse con dUTP (y otros dNTP) sin uracil glucosilasa y la uracil glucosilasa se puede añadir en cualquier momento durante el primer período.

35 Después del primer período, se añade inhibidor de uracil glucosilasa a la reacción ARP y se deja que la reacción continúe durante el resto de la reacción de ARP - hasta que se alcanza un grado deseado de ampliación. Es importante destacar que, el proceso se lleva a cabo sin inactivación basada en la temperatura de la uracil glucosilasa. El inhibidor de uracil glucosilasa en esta reacción puede ser un inhibidor de uracil glucosilasa de fagos de *Bacillus subtilis* PBS1 o un inhibidor de uracil glucosilasa de fagos de *Bacillus subtilis* PBS2. Cuando se utiliza dUTP, para cualquier ARP de esta descripción, el dNTP puede consistir en (1) dTTP, dATP, dUTP, dCTP y dGTP o (2) dATP, dUTP, dCTP y dGTP. En una forma de realización preferida, cuando se utiliza dUTP, la mezcla de dNTP no contiene dTTP. Este procedimiento de reducción de fondo, mediante la adición de dUTP y uracil glucosilasa a una primera parte de una reacción ARP tiene una aplicación general a cualquier tipo de ARP. Además, este método se puede combinar con cualquiera de los procesos del ARP de esta descripción.

50 Otro aspecto de la descripción se refiere a un procedimiento de realización de ARP de una molécula de ácido nucleico diana bicatenario que comprende una primera y una segunda cadena de ADN con un aumento de la relación señal a ruido. En la etapa A, un agente de recombinasa se pone en contacto con (1) un primer cebador bloqueado en extensión que comprende uno o más restos internos no complementarios o modificados que pueden ser un resto interno modificado, y (2) un segundo cebador de ácido nucleico para formar un primer y un segundo cebador de nucleoproteína.

55 En la etapa B, el primer y el segundo cebadores de nucleoproteína se mezclan con (en contacto con) una nucleasa y con el ácido nucleico diana bicatenario de tal manera que se forma una primera estructura bicatenaria (parte de un primer bucle D) entre el primer cebador de nucleoproteína y dicha primera cadena de ADN en una primera porción de dicha primera cadena. Además, también se forma una segunda estructura bicatenaria (parte de un segundo bucle D) entre dicho segundo cebador de nucleoproteína y dicha segunda cadena de ADN en una segunda porción de dicha segunda cadena. Los extremos 3' del primer cebador bloqueado en extensión y dicho segundo cebador de ácido nucleico están orientados uno hacia el otro en la misma molécula de ácido nucleico diana bicatenario. La nucleasa específicamente reconoce y escinde uno o más restos internos no complementarios o modificados en el primer cebador bloqueado en extensión sólo después de que el cebador forma una estructura bicatenaria. Después de la escisión por la nucleasa, el primer cebador bloqueado en extensión se escinde en dos cebadores, un primer cebador en 5' y un primer cebador bloqueado en extensión en 3'. Debido a que el grupo de bloqueo está en el extremo 3' del primer cebador bloqueado en extensión, el primer cebador en 5' no está bloqueado, pero el primer cebador bloqueado en extensión en 3' está bloqueado y no puede ser alargado por la polimerasa.

- En la etapa C, el extremo en 3' del primer cebador en 5' y el segundo cebador de nucleoproteína se prolonga con una o más polimerasas y los dNTP (por ejemplo, una mezcla de dATP, dTTP, dCTP y dGTP) para generar un ácido nucleico diana ampliado. El ácido nucleico diana ampliado puede ser monocatenario (por ejemplo, una cadena desplazada) o bicatenario. Además, el ácido nucleico diana ampliado monocatenario puede hibridarse para formar ácido nucleico diana bicatenario. Por otra parte, el sistema de ARP de la presente descripción puede ampliar tanto el ácido nucleico diana monocatenario (expuesto a continuación) o el ácido nucleico diana bicatenario de este modo la producción de ácido nucleico diana ampliado monocatenario o bicatenario única no afectaría al resultado de la ARP.
- La etapa B y la etapa C se repiten hasta que se alcance el grado deseado de ampliación. Cabe señalar que la reacción ARP se perpetúa a sí misma siempre y cuando los reactivos no se agoten. El producto de una ronda de ampliación (ácido nucleico diana ampliado) actúa como la entrada para la posterior ronda de ARP. Por lo tanto, una reacción ARP puede continuarse por incubación meramente continuada de la reacción a una temperatura deseada. Además, puesto que la reacción de ARP descrita no es sensible a la temperatura, la reacción se puede continuar incluso si existe fluctuación en la temperatura. Por ejemplo, un tubo de reacción de ARP puede funcionar en un baño de agua, en la parte superior del banco (temperatura ambiente), o incluso en el bolsillo del experimentador (cuando trabaja en campo, por ejemplo). Por lo tanto, la reacción ARP puede llevarse a cabo a menos de 50 °C, a menos de 40 °C, a menos de 37 °C, menos de 30 °C, a menos de 25 °C o a menos de 20 °C.
- En un procedimiento preferido, el primer cebador bloqueado en extensión comprende además uno o más marcadores detectables. Cuando el marcador detectable es un fluoróforo o un extintor, puede estar unido al cebador bloqueado en extensión por un resto de fluoróforo-dT amidita o un resto de extintor-dT amidita respectivamente. Son posibles otras uniones y ampliamente conocidas.
- En otro procedimiento preferido, el cebador bloqueado en extensión comprende tanto un fluoróforo como un extintor. El fluoróforo y el extintor pueden estar separados por entre 0 a 2 bases, 0 a 5 bases, 0 a 8 bases o 0 a 10 bases. Naturalmente, se prefiere que el fluoróforo y el extintor estén lo suficientemente próximos uno del otro de tal manera que la combinación no sea fluorescente hasta que estén separados. Se prefiere que el fluoróforo y el extintor estén separados por una distancia mayor en el cebador de nucleoproteína que cuando el cebador se hibrida con el ácido nucleico diana. Esto es posible debido a la acción de las proteínas adjuntas (recombinasa y/o proteína SSB) que tienden a estirar la cebador no hibridado.
- En otro aspecto, el fluoróforo o el extintor pueden estar unidos al resto interno modificado y el fluoróforo y el extintor se pueden separar después de la escisión del resto interno modificado por la nucleasa.
- Mientras que cualquier fluoróforo puede funcionar para los métodos de la invención, la fluoresceína, FAM y TAMRA son los fluoróforos preferidos. El extintor preferido es un extintor oscuro que puede ser, por ejemplo, Dark Quencher 1, Dark Quencher 2, Black Hole Quencher 1 o Black Hole Quencher 2.
- Otro aspecto se refiere a un proceso de ARP de ampliación de ADN de una molécula de ácido nucleico diana monocatenario que comprende las etapas siguientes (a) hibridar un primer cebador de ácido nucleico con dicho ácido nucleico diana monocatenario y alargar dicho cebador una o más polimerasas y unos dNTP para generar una molécula de ácido nucleico diana bicatenario que comprende una primera y una segunda cadena; (b) poner en contacto un agente recombinasa con un primer cebador bloqueado en extensión que comprende un resto interno no complementario, y un segundo cebador de ácido nucleico para formar una primera y un segundo cebador de nucleoproteína; (c) poner en contacto los primer y segundo cebadores de nucleoproteína con una nucleasa y con dicho ácido nucleico diana bicatenario formando de ese modo una primera estructura bicatenaria entre dicho primer cebador de nucleoproteína y dicha primera cadena de ADN en una primera porción de dicha primera cadena y una segunda estructura bicatenaria entre dicho segundo cebador de nucleoproteína y dicha segunda cadena de ADN en una segunda porción de dicha segunda cadena de tal manera que los extremos 3' de dicho primer cebador bloqueado en extensión y dicho segundo cebador de ácido nucleico están orientados uno hacia el otro en la misma molécula de ácido nucleico diana bicatenario, en el que dicha nucleasa escinde específicamente dicho resto interno no complementario modificado sólo después de la formación de dicha primera estructura bicatenaria para formar un primer cebador en 5' y un primer cebador bloqueado en extensión en 3'; (d) prolongar el extremo 3' de dicho primer cebador en 5' y el segundo cebador de nucleoproteína con una o más polimerasas y unos dNTP para generar una molécula de ácido nucleico diana ampliada; (e) continuar la reacción mediante la repetición de (c) y (d) hasta que se alcance un grado deseado de ampliación. Como se explicó anteriormente, el primer cebador de ácido nucleico puede ser el primer cebador bloqueado en extensión, dicho segundo cebador de ácido nucleico, primer cebador de nucleoproteína o segundo cebador de nucleoproteína. Naturalmente, si el primer cebador es el primer cebador bloqueado en extensión, la etapa (a) se debe realizar en presencia de la nucleasa. Además, debe tenerse en cuenta que cualquier reacción ARP que utilice un ADN diana de ácido nucleico monocatenario como material de partida necesariamente atravesará una etapa intermedia en la que el ácido nucleico diana es bicatenario y se ampliaría por ampliación de la doble cadena.
- Otro aspecto se refiere a un cebador para ARP que es un cebador bloqueado en extensión de entre 12 a 100 restos de longitud y en el que el cebador comprende uno o más restos internos modificados. Este cebador puede ser

cualquier cebador bloqueado en extensión, incluidos algunas variantes de los mismos, descritas en cualquier lugar de esta solicitud. En pocas palabras, el resto interno modificado se selecciona del grupo que consta de un resto de uracilo, un resto de inosina, 8-oxoguanina, timina glicol, un simulador de sitio abásico y análogos de los mismos. El simulador de sitio abásico puede ser un resto tetrahidrofurano o un 5'-O-dimetoxitritil-1',2'-didesoxirribosa-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (comúnmente conocido como una "separador D") y análogos de los mismos.

El cebador está bloqueado en extensión y no puede ser alargado por la polimerasa (por ejemplo, fragmento de Klenow) y dNTP. Los métodos de bloqueo de un cebador en la ampliación son conocidos y se describen también en la presente descripción. Así, el cebador puede tener un resto 3' bloqueado. El resto 3' bloqueado puede ser un resto bloqueador. El resto bloqueador, que opcionalmente puede comprender un marcador detectable, puede estar unido al punto 2' o 3' de la mayoría de los restos 3' del cebador. Por ejemplo, el resto 3' bloqueado puede ser un 2',3'-didesoxi nucleótido.

El cebador puede comprender uno o más marcadores detectables. El marcador detectable puede ser un fluoróforo, una enzima, un extintor, un inhibidor enzimático, un marcador radiactivo, un miembro de un par de unión y una combinación de los mismos. En un caso más preferido, el cebador comprende tanto un fluoróforo como un extintor. El inhibidor puede encontrarse próximo al fluoróforo para suprimir la fluorescencia del fluoróforo. Por ejemplo, la separación entre el fluoróforo y el extintor puede ser 0 a 2 bases, 0 a 5 bases, 0 a 8 bases, de 0 a 10 bases, 3 a 5 bases, 6 a 8 bases y 8 a 10 bases. En un cebador preferido, el fluoróforo y el extintor están separados por una distancia mayor cuando el cebador bloqueado en extensión no está hibridado (sino unido a recombinasa y/o a proteína de unión monocatenaria) que cuando el cebador bloqueado en extensión se hibrida con el ácido nucleico diana. El fluoróforo y el extintor pueden ser cualquier fluoróforo y extintor conocido por operar conjuntamente incluyendo, pero sin limitarse al, fluoróforo y extintores de cualquiera de los fluoróforos descritos en la presente descripción.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 representa datos experimentales que demuestran que el alargamiento de cebadores acelera la cinética de reacción en el caso de cebadores dirigidos a un locus genómico de *Bacillus subtilis*.

Figura 2 representa los resultados experimentales que muestran sólo los cebadores más largos (45 monómeros) y más rápidos logran amplían el ADN a niveles detectables de gel utilizando tinción de bromuro de etidio a 25°C, 23°C, 20°C y 17°C.

Figura 3 representa que la cinética de ampliación a 25°C aparece aproximadamente la mitad de los de 37°C. Esta figura también demuestra que los niveles de PEG influyen tanto en la velocidad como en la especificidad (un artilugio cebador aumenta a altas concentraciones de PEG).

Figura 4 muestra que los cebadores para el locus de apolipoproteína B humana, ApoB4 y Apo300, demuestran cinética rápida cuando sólo 33 y 32 restos de longitud, respectivamente, y las cinéticas de reacción (a 37°C) no se aceleran por alargamiento.

Figura 5 muestra que los cebadores para el locus de apolipoproteína B humana, ApoB4 y Apo300, demuestran ampliación a 25°C, independientemente de si el extremo 3' se alarga.

Figura 6 muestra que el péptido inhibidor UNG del fago *Bacillus* se puede utilizar en combinación con UNG de *E. coli* para un sistema de contaminación por arrastre, que evita la necesidad de desnaturalización térmica de UNG.

Figura 7 representa los datos experimentales que muestran (a) una sonda de detección en tiempo real que comprende un fluoróforo FAM, (b) un extintor oscuro profundo, (c) un simulador de sitio abásico, y (d) un extremo 3' bloqueado, proporcionan excelentes características en las reacciones del ARP para el seguimiento de la acumulación de producto específico.

Figura 8 representa el desarrollo de un tercer sistema de detección de sondas. Los datos de fluorescencia se pueden interpretar mejor mediante un proceso de normalización y trazado del logaritmo de la fluorescencia.

Figura 9 representa la utilización de los cebadores bloqueados de manera reversible para obtener relaciones altas de señal a ruido para ensayos de tipo sándwich. Las reacciones de ARP configuradas con una sonda activa, bloqueada, divisible, sólo después de la división por la enzima Nfo pueden analizarse directamente en las tiras de prueba de flujo lateral.

Figura 10 representa los resultados experimentales que muestran el desarrollo de un sistema de ampliación/detección de doble sonda para la superbacteria SARM de hospital.

- Figura 11 representa la detección en tiempo real con sonda de control de las secuencias de ADN de SASM.
- Figura 12 representa un esquema de un proceso de ARP.
- Figura 13 representa el uso de anticuerpos específicos para inmovilizar y detectar complejos que contienen dos marcadores antigénicos en una tira de flujo.
- Figura 14 muestra electroforesis en gel de poliacrilamida de las reacciones de ARP utilizando cebadores para el locus Sry humano.
- Figura 15 muestra electroforesis en gel de agarosa de reacciones ARP utilizando cebadores para el locus de apolipoproteína B humana.
- Figura 16 representa una investigación sobre el tamaño mínimo necesario de oligonucleótidos para soportar ARP

Descripción detallada de la invención

- En ARP la ampliación isotérmica de fragmentos específicos de ADN se consigue mediante la unión de cebadores que se oponen a oligonucleótidos a la plantilla de ADN y su ampliación por una polimerasa (figura 1A). A diferencia de la RCP, que requiere la fusión global de la plantilla objetivo, el ARP emplea complejos recombinasa-cebador para explorar ADN bicatenario y facilitar el intercambio de cadenas en puntos afines. Las estructuras resultantes se estabilizan mediante proteínas de unión a ADN monocatenario (SSB) que interactúan con la cadena de la plantilla desplazada, evitando de este modo la expulsión del cebador por migración de la ramificación. El desensamblado de la recombinasa deja el extremo 3' del oligonucleótido accesible a una cadena que desplaza la ADN polimerasa en este caso el fragmento grande de Poll (Bsu) de *B. subtilis* (Véase, Okazaki *et al.*, 1964), y la ampliación del cebador se produce. La ampliación exponencial se lleva a cabo por repetición cíclica de este proceso.
- En la presente descripción, se presentó una serie de mejoras sobre el proceso ARP básico. En primer lugar, se descubrió que con modificaciones en condiciones normales, la ARP puede llevarse a cabo de manera eficiente a 25 °C o 30 °C. Estas temperaturas de reacción permiten pruebas de ARP sin equipo con resultados en menos de una hora.
- En segundo lugar, se ha mejorado la sensibilidad y la especificidad de las reacciones ARP utilizando enzimas de reparación del ADN en la reacción ARP. En este estudio, se ha empleado un amplio espectro de enzimas de reparación previamente identificadas directamente en reacciones de ARP para comprobar si estas enzimas tendrían un efecto sobre la eficiencia y fidelidad de ARP. Se ha supuesto que los cebadores surgen en ARP principalmente por ampliación errante de estructuras en horquilla de corta duración formadas por los cebadores, o, posiblemente, por formación de dímeros de cebadores (solicitud PCT/IB2005/001560 a PCT presentada el 11 de abril de 2005). Aunque dichos casos son presuntamente raros, la alta concentración de oligonucleótido en una reacción, normalmente del orden de 10^{12} - 10^{13} moléculas tenderían a favorecer un grado significativo de dichos casos cuando la concentración de ácido nucleico diana plantilla (es decir, el ácido nucleico que debe ampliarse) es baja. Cabe señalar que estas reacciones secundarias son de distinta naturaleza de las descritas a menudo en la RCP en la que las secuencias poco relacionadas se amplían en muestras de ADN complejas debido a la baja fidelidad de la ampliación de los productos de hibridación en las que sólo un número limitado de restos 3' son homólogas con partes del ADN de la muestra. En la ARP se cree que el emparejamiento mediado por recombinasa primaria requiere homología significativa sobre regiones significativas, y en lugar de que los ADN monocatenarios son las especies son principalmente sensibles a los artilugios a través de casos de recuperación rápida que ocurren a las temperaturas relativamente bajas empleadas. Debido a esta distinción, los procedimientos para reducir los artilugios de cebadores en la RCP no funcionan necesariamente en la reacción ARP. Esta distinción es importante para comprender el enfoque y el mecanismo descrito a continuación para disminuir el ruido de fondo generado en el sistema, incluso en ausencia de cualquier de los ácidos nucleicos diana, y la forma en que esto aumenta la sensibilidad al disminuir el ruido del cebador competitivo.
- Se da a conocer en la presente memoria el uso de cebadores modificados deliberadamente con un grupo de bloqueo en 3' (con una biotina, resto ddC, o de otra manera), y que contiene además una base modificada (o ausente) colocada aproximadamente en el centro. La modificación colocada internamente se convirtió en un objetivo de la nucleasa para una enzima de reparación endonucleasa, lo que podría dividir el cebador para generar dos cebadores separados solamente si en primer lugar se empareja a un objetivo para generar una doble cadena estable, y en segundo lugar, a continuación, es procesado por la enzima. Si uno de los nuevos cebadores hijo (es decir, el relativamente más situado en 5') posee, o se puede procesar posteriormente para que posea, un grupo hidroxilo en 3' extensible libre, entonces podría funcionar posteriormente como un sustrato de polimerasa. Por el contrario, el oligonucleótido hijo situado relativamente en 3' mantendría la modificación de bloqueo original y sería incapaz de funcionar como un sustrato de polimerasa. Una dependencia de la división del oligonucleótido para formar dos híbridos bicatenarios separados por una muesca o un hueco de un solo nucleótido añade reducción de

ruido al sistema ARP ya que hay pocas o ninguna oportunidad para que el cebador no dividido se amplíe erróneamente en estructuras temporales plegadas debido a la presencia del grupo bloqueador en 3'. Se ha demostrado la utilidad de este enfoque para reducir el ruido del cebador, demostrando que las muestras de ADN de seguimiento pueden detectarse y discriminarse en agua simplemente evaluando si dos cebadores de ADN marcados

5 llegan a estar físicamente unidos. La posibilidad de dichos ensayos sencillos presenta a ARP como una herramienta poderosa en el desarrollo de pruebas de ADN sin equipos, económicas y desechables.

Por último se ha adaptado el sistema de nucleasa específico para doble cadena anterior para el desarrollo de sondas fluorescentes patentadas en tiempo real. Se anticipó que el diseño de sondas fluorescentes eficaces sería muy distinto en el sistema ARP en comparación con otros sistemas descritos, tales como en el procedimiento de la RCP. ¿A qué se debe esto? Se identificaron dos áreas clave de diferencia. En primer lugar, la organización de los grupos funcionales de la sonda probablemente sería necesariamente diferente debido a la extrema diferencia entre los entornos de reacción de ARP y los de otros sistemas de ampliación. Al principio el trabajo demostró que el medio de reacción de ARP era fundamental y críticamente distinto del encontrado en otras reacciones de ampliación de ácidos nucleicos. Cantidades saturantes de proteína de unión a ADN monocatenario y la proteína recombinasa garantizan que los oligonucleótidos con ejes centrales no modificados no adoptan una estructura espiral aleatoria. Los ADN están relativamente "extendidos" y rígidos ya que estas proteínas impregnan el filamento de nucleoproteína con una longitud de filamento de aproximadamente 1,5 veces la de la forma B del ADN (Yang *et al.*, 2001; Scheerhagen *et al.*, 1985; Kuil ME *et al.*, 1990). Por consiguiente, la suposición de que las sondas unidas por enlace covalente a fluoróforos y extintores distantes en la secuencia primaria todavía se seguirán extinguiendo debido al frecuente enfoque aleatorio no se mantiene como cierta. La segunda área clave en la que se preveía que las sondas de ARP era una forma completamente distinta que en otros sistemas descritos se refiere a las enzimas empleadas en el tratamiento de las sondas. Se descubrió experimentalmente que los métodos descritos utilizando el dominio 5' exonucleasa de las enzimas de la clase pol I parecían incompatibles con la ARP (el denominado "método Taqman"), probablemente debido a la actividad endonucleasa FLAP de estas enzimas (Kaiser *et al.*, 1999). Se previó, además, que otros sistemas tales como las balizas moleculares o las sondas escorpión era igualmente poco probable que fuesen prácticas (debido a la inestabilidad de los anclajes dúplex cortos en condiciones de ARP). En su lugar, se demuestra que es posible configurar sondas de ARP excelentes en tiempo real colocando restos de fluoróforo y extintor próximos separados por una base modificada que conduce a la división del eje central sólo en un contexto bicatenario. Este enfoque promete añadir un valor tremendo al proceso de ARP, ya que produce la detección cuantitativa en tiempo real y las especificaciones de multiplexado en alineación con la técnica actual más avanzada utilizando otros métodos. Específicamente, se proporciona un método para evaluar el número absoluto de moléculas de ácido nucleico diana en una muestra, para aumentar la especificidad y la sensibilidad que permita la detección de una sola molécula, y también para permitir el análisis múltiple de varias dianas. Todas estas propiedades se puede alcanzar utilizando este método sin necesidad de una electroforesis en gel, u otros métodos que requieren intervención experimental, pero bastantes reacciones se pueden seguir continua y automáticamente mediante equipos dedicados. Para ilustrar el poder de combinar el proceso de ARP con estos métodos de detección muy fiables se ha desarrollado una prueba ultrasensible, internamente controlada, para el SARM patógeno de hospital, un objetivo difícil debido a la naturaleza compleja y diversa de cepas patógenas, y a la necesidad de multiplexado.

40 Cada aspecto de la invención se describe con mayor detalle a continuación:

ARP a baja temperatura

45 Las reacciones de ARP funcionan de manera óptima a aproximadamente 37°C, lo que refleja la temperatura óptima de las enzimas que participan en una reacción ARP. Aunque 37°C se consiguen fácilmente en el laboratorio, una reacción de ARP que puede funcionar eficientemente a 30°C o 25°C aumentaría la utilidad de ARP y permitiría la ampliación en tiempo real en condiciones de campo, donde un incubado a 37°C no está disponible.

50 Para determinar si la longitud del cebador tiene un efecto sobre la eficacia de ARP, se llevaron a cabo reacciones de ARP a 37°C con pares de cebadores de diferentes longitudes (figura 1). Los resultados de los experimentos, como se muestra en la figura 1, demuestra que las "proporciones" de cebador se pueden mejorar alargando los cebadores. El cuadro A de la figura 1 muestra la organización del cebador en el locus de *B. Subtilis* dirigido por los cebadores BsA1 y BsB3 para la ampliación ARP. Los cebadores BsA1 y BsB3 (de 30 y 31 restos, respectivamente), o los derivados que contiene extensiones que conservan homólogos apropiados con las dianas que se utilizaron en las reacciones ARP. El cuadro B muestra los resultados de la cinética de ampliación seguidos en un lector de microplacas Flix-800 BIOTEK con la fase climatizada ajustada a 38°C. Se empleó SYBR-green para evaluar la acumulación de ADN. Las condiciones de reacción exactas y las concentraciones de los componentes son las siguientes: 10 copias/μl; acetato de Mg 10 mM; Tris 50 mM, pH 7,9; dNTP 100 μM; 600 ng/μl gp32; 120 ng/μl uvsX; 30 ng/μl uvsY; oligos 300 nM; 5% de Carbowax 20 M; 1:50.000 SYBR green; acetato potásico 100 mM; fosfocreatina 20 mM, 100 ng/ml CK (creatina cinasa); ATP 3 mM.

65 Debe apreciarse que los cebadores para cualquiera de los métodos de la invención se pueden preparar a partir de ADN, ARN, APN, ALN, ácido nucleico con eje central de morfolino, ácido nucleico con eje central de fosfortioato y una combinación de los mismos. Las combinaciones de los mismos en este caso se refieren a una sola molécula de ácido nucleico que puede contener una o más bases conectadas a una o más de otras bases. La concentración

preferida de estas moléculas puede estar comprendida en el intervalo de entre 25 nM a 1000 nM. En una forma de realización preferida, los cebadores pueden contener un enlace distinto de fosfato entre las dos bases en su extremo 3' y es resistente a la actividad de nucleasa 3' a 5'.

5 Los resultados demuestran que se experimentó un aumento gradual de la tasa cinética a medida que se alargaban los cebadores. De hecho alargando los cebadores de 30/31 monómeros a 45 monómeros se redujo el tiempo de ampliación para la detección del umbral en aproximadamente 10 minutos, desde más o menos 35 minutos a 25 minutos en las condiciones utilizadas en este documento (magnesio 10 mM, 5% de Carbowax 20M). Basándose en los resultados de este experimento, se concluyó que los cebadores con cinética lenta pueden mejorarse aumentando de la longitud del cebador.

También se ha investigado si la longitud del cebador tiene un efecto sobre ARP realizado a temperaturas más bajas. La ARP puede que no funcione a una temperatura inferior por al menos dos razones. En primer lugar, puede producirse un cese repentino y dramático de la función de reacción ARP por debajo de una cierta temperatura si, por ejemplo, uno de los componentes de la reacción dejan de funcionar por debajo de una cierta temperatura. Por ejemplo, el carbowax puede atravesar una transición de fase a una temperatura más baja y dejar de funcionar de la manera deseada. En segundo lugar, la velocidad de reacción puede simplemente disminuir progresivamente de manera que duplicando los tiempos se alarguen, reflejo de la catálisis y difusión enzimática lenta. En el segundo caso, la "proporción" de cebador podría ser muy importante, ya que la reacción sería posiblemente ir "contrarreloj" con respecto al agotamiento de los componentes de la reacción, tal como el ATP.

Para probar la hipótesis de los autores, los autores intentaron ampliar los mismos fragmentos que en la figura 1 pero a 25°C. Los resultados, mostrados en la figura 2, indican que los cebadores con cinética rápida pueden ampliar el ADN a temperaturas ambiente típicas. Los cebadores utilizados en la figura 1 se utilizaron para ampliar un fragmento específico del genoma de *B. subtilis*. La figura 2A muestra la disposición esquemática de los cebadores. La figura 2B muestra que sólo 45 monómeros se amplían a niveles detectables a 25°C. Las condiciones utilizadas fueron: Tris 50 mM, pH 8,4, acetato de potasio 100 mM, acetato de magnesio 10 mM, DTT 2 mM, compuesto de PEG al 7,5% (Carbowax-20M), ATP 3 mM, fosfocreatina 25 mM, 100 ng/μl de creatina cinasa, 700 ng/μl de gp32, 160 ng/μl de uvsX, 40 ng/μl de uvsY, dNTP 200 μM, cada oligonucleótido 300 nM. Tiempo de reacción, 90 minutos. Densidad de copia de partida 2 copias/μl, volumen de reacción 50 μl. La figura 2C muestra que sólo 45 monómeros amplían el ADN a 23°C, y la ampliación a niveles detectables también puede ocurrir en 20°C y 17°C cuando se utiliza el 45-mero aunque progresivamente se recuperó menos producto de ampliación. Condiciones utilizadas: Tris 50 mM, pH 8,4, acetato de potasio 100 mM, acetato de magnesio 14 mM, DTT 2 mM, compuesto de PEG al 7,5% (Carbowax-20M), ATP 3 mM, fosfocreatina 50 mM, 100 ng/μl de creatina cinasa, 650 ng/μl de gp32, 125 ng/μl de uvsX, 40 ng/μl de uvsY, dNTP 200 μM, cada oligonucleótido 300 nM. Tiempo de reacción, 120 minutos. Densidad de copias de partida 1 copia/μl, volumen de reacción 20 μl.

Como se aprecia en la figura 2, se observó una ampliación específica de aproximadamente 10^{10} veces incluso a temperaturas tan bajas como 17°C. El tiempo hasta la detección fue de 2 horas. En los experimentos llevados a cabo a 23°C o menos se añadieron sólo 20 copias de ADN genómico, y aunque algún rastro de contaminación por arrastre se puso de manifiesto en las referencias de agua (no mostradas), la obtención de producto visible cuando se utiliza tinción de bromuro de etidio (20 ng estimados a 17°C) sugiere un nivel de ampliación de aproximadamente 10^9 veces, o 30 ciclos. Es importante destacar que los altos niveles de "ruido" no son evidentes, aunque se observó una banda más con migración rápida de naturaleza no identificada (muy posiblemente dímero de cebador clásico, o ADN monocatenario relacionado con el producto).

El comportamiento cinético de los cebadores de 45-mero a 25°C, a diferentes concentraciones de PEG, se muestra en la figura 3. En la figura 3, se utilizaron los cebadores de 45 monómeros utilizados en las figuras 1 y 2 para ampliar un fragmento del genoma de *B. subtilis* a 25°C. La figura 3A muestra la disposición del par de cebadores utilizado. La figura 3B muestra electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio de la muestras en el punto final de reacción. La banda esperada (*) está acompañada de una banda adicional a concentraciones más altas de PEG (#). La figura 3C muestra la cinética de la reacción de ampliación seguida utilizando SYBR-green. Las condiciones utilizadas era la siguiente: Tris 50 mM, pH 8,4, acetato de potasio 100 mM, acetato de magnesio 10 mM, DTT 2 mM, compuesto de PEG (Carbowax-20M) como se indica, ATP 3 mM, fosfocreatina 25 mM, 100 ng/μl de creatina cinasa, 650 ng/μl de gp32, 160 ng/μl de uvsX, 40 ng/μl de uvsY, dNTP 200 μMs, cada oligonucleótido 300 nM, SYBR-green 1:50.000 den solución madre. Tiempo de reacción, 120 minutos. Densidad de copias de partida 10 copias/μl, volumen de reacción 50 μl.

La falta de una señal en la banda del 4% se debe posiblemente a un error experimental. Los resultados demuestran que las concentraciones mayores de PEG pueden acelerar la cinética de hasta un punto, y a continuación se observa cierta inhibición en la velocidad de reacción y en el comportamiento/resultado general. En este caso el 7% o el 8% de PEG eran óptimos para maximizar la cantidad de ácidos nucleicos ampliados de la longitud correcta. Cuando las concentraciones de PEG son superiores, existe una dominación progresiva de la banda anómala que migra más rápida. En presencia de 8% de PEG la detección se observó durante aproximadamente 37 minutos a 25°C, lo que corresponde a un tiempo de duplicación de alrededor de 1 minuto 25 segundos. En la detección de PEG al 5% se hizo en unos 54 minutos (lo que corresponde a un tiempo de duplicación de 2 minutos). Esta reacción

a 25°C es aproximadamente la mitad de rápida que el experimento mostrado en la figura 1 (tiempo de detección de 27 minutos y tiempo de duplicación 1 minuto. Basándose en esta éste, se estiman las velocidades de reacción de ARP se reducir a la mitad con más o menos cada descenso de 10°C en la temperatura. Además, debido a las mezclas limitadas de reactivos tales como el ATP, la formación de producto detectable puede estar limitada, independientemente del tiempo de incubación en función de la temperatura, de la actividad de los cebadores y de la longitud del producto. Los resultados sugieren que la ARP efectiva a baja temperatura mejoraría con cebadores que presentan cinética rápida, y que no limitan la velocidad de la reacción.

Se repitió el experimento de la figura 3 utilizando cebadores dirigidos al gen de apolipoproteína B humana y los resultados se muestran en la figura 4. La figura 4A muestra la disposición de cebadores dirigidos al locus de la apolipoproteína B humana. Se utilizaron tres pares de cebadores tal como se muestra, y los cebadores superpuestos compartían un extremo 5' común, pero diferentes extremos 3'. (B) Cinética de ampliación a 38°C. Se hizo el seguimiento en tiempo real de las reacciones con los pares de cebadores indicados utilizando colorante verde con SYBR. El número de copias de la diana de partida era 1 copia/µl ó 100 copias/µl de ADN humano. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: Tris 50 mM, pH 7,9, acetato de potasio 100 mM, acetato de magnesio 10 mM, DTT 2 mM, compuesto de PEG al 5% (Carbowax-20M), ATP 3 mM, fosfocreatina 25 mM, 100 ng/µl de creatina cinasa, 600 ng/µl de gp32, 120 ng/µl de uvsX, 30 ng/µl de uvsY, dNTP 100 µM, 300 nM de cada oligonucleótido, SYBR-verde 1:50.000 en solución madre. Tiempo de reacción, 60 minutos. Volumen de reacción 50 µl.

Los cebadores para el locus de la apolipoproteína B humana presentan cinéticas rápidas sin alargamiento del cebador. En este caso, los estudios cinéticos utilizando SYBR-verde pusieron de manifiesto que no se encontró aumento de velocidad con los cebadores del ARP más largos. Parece que los cebadores ApoB4 y Apo300 utilizados, incluso cuando se cortan, poseen comportamiento del tipo de alta velocidad en la medida en que no son el factor limitativo en la reacción. Supuestamente, en esta reacción, la proporción de polimerasa es la parte principal limitativa de la velocidad de la reacción y los cebadores más activos (más largos) no puede conseguir una ventaja general de la velocidad. De acuerdo con la hipótesis, se descubre que todos los cebadores de apolipoproteína B generan el producto esperado a 25°C (figura 5). La figura 5A es la misma que la figura 4A en la que se muestra la disposición de los cebadores utilizados. La figura 5B muestra la electroforesis en gel de las reacciones del ARP realizadas a 25°C utilizando los pares de cebadores indicados. En cada caso se probó el número de copias de cero o 10 copias/µl. Las condiciones utilizadas fueron como en la figura 4 con la excepción de la omisión de SYBR-verde. En este caso, no se aprecia ninguna banda del artilugio - apoyando la idea de que las reacciones de ARP no toleran significativamente "ruido" a temperaturas reducidas.

Control de la contaminación utilizando el inhibidor de UNG de bacteriófago PBS2

Las reacciones de ARP son compatibles con la utilización de dUTP como método de control de la contaminación por arrastre. Una advertencia con los datos experimentales anteriores es que para iniciar la reacción la enzima uracil glucosilasa tenía que ser inactivada térmicamente. Esto plantea dos problemas de incompatibilidad con ARP. En primer lugar, la inactivación térmica también inactivaría las reacciones completas de ARP porque los reactivos del ARP no son termoestables. En segundo lugar, la inactivación térmica es incompatible con un objetivo de ARP – evitar el ciclo térmico.

Debido a los motivos anteriores, los autores investigaron otra ruta técnica para realizar el control de la contaminación. Se sabe que los fagos PBS1 del *Bacillus subtilis* (véase, Sava y Pearl, 1995) y PBS2 (véase, Wang, Z. y Mosbaugh, DW (1989)) poseen un inhibidor específico del péptido pequeño de uracil glucosilasa-ADN de *E. coli* y *B. subtilis* (Wang y Mosbaugh, 1988). Requieren un sistema muy eficaz ya que su propio ADN se sintetiza utilizando dUTP en lugar de dTTP. Se ha clonado la secuenciación del ADN de PBS2 que codifica el péptido inhibidor y lo han expresado en *E. coli* con una etiqueta de hexahistidina en el terminal C. Se ha clonado asimismo el gen de uracil glucosilasa de *E. coli* y se ha expresado con una hexahistidina en el terminal C. Se han utilizado estos preparados de proteínas para probar si un sistema de contaminación por arrastre se podría emplear con ellos. La figura 6 muestra un ejemplo de los experimentos realizados que validan dicho enfoque. En la figura 6, el número de copias elegidas de partida de la plantilla fue de 800 copias de ADN humano, cuando se utilicen. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: Tris 50 mM, pH 8,4, acetato de potasio 100 mM, acetato de magnesio 10 mM, DTT 2 mM, compuesto de PEG (Carbowax-20M) al 5%, ATP 3 mM, fosfocreatina 25 mM, 100 ng/µl de creatina cinasa, 600 ng/µl de gp32, 125 ng/µl de uvsX, 30 ng/µl de uvsY, dNTP 100 µM, cada oligonucleótido 300 nM (cebadores SRY8 y SRY9). Tiempo de reacción, 75 minutos. Volumen de reacción de 50 µl. Cuando se utilizó *E. coli* UNG se empleó a 150 ng/µl, y el inhibidor de UNG se utilizó a 140 ng/µl. La contaminación era la auténtica contaminación por arrastre presente para este amplicón en el equipo de manejo de líquidos de laboratorio. Las reacciones se establecieron con todos los componentes de ampliación, aparte de la polimerasa. Las reacciones 1-4 llevaban ADN genómico de plantilla, reacciones 5 y 6 contenían exclusivamente material contaminante. Las muestras se trataron durante 5 minutos con UNG en las muestras 2, 3, 4 y 6. En las muestras 2, 4 y 6 se añadió inhibidor de UNG después de 5 minutos. En todos los casos después del período de incubación de 5 minutos, con o sin UNG y con o sin adición posterior de inhibidor de UNG, se añadió polimerasa para iniciar la síntesis de ADN. En este experimento se demuestra lo siguiente: (1) que UNG de *E. coli* inhibirán las reacciones de ARP que contienen sustrato de dUTP, (2) que la inclusión conjunta del péptido inhibidor supera esta inhibición, (3) que los contaminantes que contienen dUTP

pueden suprimirse de amplicones generadores si se tratan en primer lugar con UNG de *E. coli* y luego con el inhibidor, pero que las plantillas auténticas son todavía eficaces. En las condiciones utilizadas se han apreciado algunas pruebas de una cierta disminución en el nivel de robustez/producto cuando UNG estaba presente en la reacción. Se anticipa sin embargo, que el sistema puede ser configurado de manera óptima.

Sondas fluorescentes en tiempo real para las reacciones de ARP

Muchas aplicaciones posibles del proceso de ARP en la detección de secuencias de ADN (o ARN) se beneficiarían de aplicarse en un formato en tiempo real. ARP ya se ha demostrado que es eficaz cuando se combina con colorantes que se unen al surco menor tal como SYBR-verde (solicitud PCT PCT/IB2005/001560 presentada el 11 de abril 2005). Sin embargo puede haber potenciales limitaciones del uso de estos indicadores generales de la acumulación de ADN para evaluar el comportamiento de reacción. En primer lugar, no hay capacidad para multiplexar reacciones de ampliación ya que los tintes no puede discriminar entre los diversos productos formados. En muchos ensayos clínicos, por ejemplo, sería necesario incluir un control interno de ampliación para excluir falsos negativos. En segundo lugar, las reacciones de ARP son similares a la mayoría de otros procesos de ampliación de ADN en la medida en que incluso cuando ninguna diana está presente en una muestra, algunas síntesis de ADN con el tiempo garantizar. Por consiguiente puede ser difícil o imposible discriminar entre las presencias de unas cuantas copias de ácido nucleico diana o ninguna copia de un ácido nucleico basándose en los métodos actuales de detección fluorescente.

En respuesta a estas cuestiones, se ha desarrollado un sistema de sonda de fluorescencia patentada para controlar las reacciones de ARP. Se investigó la utilización de la 5'-3' nucleasa asociada a las polimerasas de clase Pol I de *E. coli*. Esta nucleasa se utiliza en una metodología de sonda fluorescente para la RCP conocida como la 5' nucleasa o ensayo "Taqman". Se observó que tanto Pol I de *Bacillus subtilis* que conserva el dominio de 5'-3' nucleasa y la enzima Pol I de *E. coli* no apoyarían las reacciones del ARP. Se cree que esto se debe a que estas nucleasas son homólogos estructurales/funcionales de la familia de endonucleasas FEN1 FLAP y muy probablemente son endonucleasas de estructuras específicas (Kaiser *et al.*). Se supone que estas enzimas digieren progresivamente la cadena desplazada durante la síntesis con desplazamiento de cadena inhibiendo de este modo la ampliación de ADN.

Se ha centrado la atención en particular sobre las enzimas glucosilasa de *E. coli* y las AP endonucleasas implicadas en la reparación del ADN conocidas como fpg, Nth, Nfo, y más recientemente exonucleasa III de *E. coli*. Es importante destacar que estas enzimas sólo eliminarán las bases dañadas y/o cortarán los ejes centrales de ADN en posiciones en las que se han producido modificaciones de bases y, críticamente, en el contexto del ADN bicatenario. Todas estas enzimas son capaces de escindir dichas moléculas de ADN bicatenario apropiadas con alta especificidad en el entorno de la ARP (véase la solicitud). Se utilizaron sondas de prueba que contenían una base modificada dentro del cuerpo del oligonucleótido (8-oxoguanina, timina glicol o simulador de sitio abásico, respectivamente) y un grupo de bloqueo adicional de alargamiento distinto en el extremo 3' (proporcionado por una 3'-dR-biotina). A pesar de la esperanza obvia para todas estas enzimas, y potencialmente otras enzimas de reparación/ tratamiento, se focaliza el comportamiento de las enzimas Nfo de *E. coli* y exonucleasa III por las siguientes razones. En primer lugar, se observó que cuando se prueban las proteínas fpg, Nth, y Nfo el grado de tratamiento de la sonda con éxito era mayor para la sonda que contiene un resto de tetrahidrofurano (THF – simulador de sitio abásico), y se trataron con Nfo. En segundo lugar, debido a que Nfo y la exonucleasa III de *E. coli* funcionalmente similar, dividen el oligonucleótido en dos oligonucleótidos más pequeños separados por un solo hueco de nucleótidos, en el que el nuevo extremo 3' que se forma puede alargarse por una polimerasa que desplaza la cadena que puede iniciarse en las muescas. Esta propiedad dota al sistema de tratamiento THF/Nfo o THF/exonucleasa III de una gran cantidad de oportunidades de aplicación que van más allá de la aplicación del tratamiento de sondas fluorescentes. (Téngase en cuenta que también podrían emplearse otros simuladores de sitios abásicos o sitios abásicos verdaderos).

Un informe anterior ha ilustrado también un uso potencial de empleo de un resto de bloqueo abásico, o de otro tipo, en el contexto de un proceso de ampliación, con la intención preferida para eliminar el resto en el contexto de reacciones de RCP o LCR utilizando una nucleasa termoestable (patente US nº 5.792.607, mencionada en la presente memoria como la patente US nº 5.792.607). Sin embargo, el enfoque que se utiliza es distinto del de la patente US nº 5.792.607. En la patente US nº 5.792.607, un sitio abásico se describe como un miembro de una selección más amplia de grupos modificadores, que debe colocarse preferentemente en el extremo 3' del oligonucleótido de ampliación previsto, y diseñarse para que sirva como un grupo modificador de azúcar 3' reversible al evitar eficazmente el reconocimiento de sustrato o la catálisis por la polimerasa. La intención es reducir la propensión del sistema de ampliación a ampliar dianas no deseadas en el ADN de la muestra debido a la tendencia de las técnicas de RCP y RCL para formar, aunque con una frecuencia reducida, los híbridos con secuencias que comparten homología limitada con la región 3' de los cebadores de oligonucleótidos. Además se pretende, críticamente, en la patente US nº 5.792.607 que esta modificación que evita el reconocimiento de sustrato se corrija específicamente de una manera dependiente de la diana. Dicha actividad puede realizarse por la actividad de un agente tal como la endonucleasa IV, que puede 'pulir' grupos procedentes de un resto de azúcar 3'. Sin embargo, con toda claridad, en el proceso descrito en la presente memoria el resto THF no actúa como agente de modificación de bloqueo del alargamiento para el azúcar en 3' que impide que el híbrido oligonucleótido/plantilla inicial sea

reconocido como un sustrato auténtico. En efecto el resto THF, en lugar de estar situado en el extremo 3' de un oligonucleótido, está colocado dentro del cuerpo del oligonucleótido, alejado del sustrato diana de la polimerasa (es decir, la región del extremo 3' del cebador hibridado en el ADN plantilla). En la presente descripción, la motivación principal es evitar que el ruido proveniente de los artilugios del repliegue del cebador. Por lo tanto, en su lugar, en la presente memoria el procesamiento del resto THF por una actividad de endonucleasa conduce a la incisión del eje central de oligonucleótido en el contexto de una doble cadena auténtica en un caso distinto de "corrección" de la modificación que impide el reconocimiento de sustrato polimerasa. También se describen en la presente memoria modificaciones para bloqueo del alargamiento en el terminal 3', sin embargo, éstas no son las "modificaciones corregidas" en este caso, y no se eliminan necesariamente de los nucleótidos del terminal 3' como en la patente US nº 5.792.607. En cambio, en el caso descrito en la presente memoria se utilizan dos entidades separables, un grupo de bloqueo 3' no corregido, y un resto de tipo abásico situado en el centro que puede ser cortado por una endonucleasa AP para generar una estructura cortada y dos cebadores hijos hibridados independientes, sólo uno de los cuales es un sustrato de la polimerasa.

La figura 7 muestra los resultados de un experimento en el que se ha empleado una sonda de detección fluorescente para ensayar la acumulación de un amplicón específico en una reacción ARP. La figura 7A muestra una estructura esquemática de la sonda. La sonda tiene fluoróforo marcado con base interna y extintor (fluoresceína y quencher II oscuro profundo) que se incorporaron durante la síntesis utilizando fluoresceína-dT o DDQ2-dT amiditas disponibles en el mercado (Glen Research, Sterling, Virginia, EE.UU.).

Se insertaron restos de THF en una posición de nucleótido entre estas bases modificadas. La sonda se bloqueó por la presencia de un grupo 3'-DR-biotina. La figura 7B muestra la secuencia de la sonda que es:

5'-catgattgatgaataagctgcagc (dTfluoro) g (THF) t (dT-DDQ1) aaaggaactta-dRbiotin-3' (SEC. ID. nº 8)

La sonda es homóloga a una parte del locus SpoOB de *Bacillus subtilis* contenido dentro de un amplicón generado por los cebadores J1 y K2. El fluoróforo y el extintor se diseñaron para estar en restos T en la secuencia de modo que pudieran incorporarse directamente en amiditas disponibles en el mercado. La figura 7C muestra la ampliación y la cinética de escisión sondas controladas por aumento de fluorescencia. Las reacciones de ampliación se comprobaron con concentraciones variables de ADN genómico diana de *Bacillus subtilis*. Se comprobaron las reacciones en hielo y a continuación se incubaron en un lector de microplacas BIOTEK Flx800 con etapa de fijado en 38°C. Las condiciones de ampliación son las siguientes: El número de copias diana al principio fue el indicado. Condiciones de reacción: Tris 50 mM pH 7,9, acetato de potasio 100 mM, acetato de magnesio 12 mM, DTT 2 mM, compuesto PEG al 5% (Carbowax-20M), ATP 3 mM, fosfocreatina 25 mM, 100 ng/µl de creatina cinasa, 900 ng/µl de gp32, 120 ng/µl de uvsX, 30 ng/µl de uvsY, 180 ng/µl de Nfo, dNTP 100 µM, cebador de K2 450 nM, cebador J1 150 nM, sonda 100 nM. Tiempo de reacción, 60 minutos. Volumen de reacción de 20 µl.

La sonda de detección se diseñó para poseer un fluoróforo y un extintor separados por (a) menos de 10 bases (para garantizar un enfriamiento eficiente) y (b) un sitio escindible (resto de THF). En este caso, el amplicón primario se generó utilizando los cebadores J1 y K2 para ampliar un fragmento del locus SpoOB de *Bacillus subtilis*. Las reacciones de ARP se modificaron a partir de las condiciones habituales de los autores de la siguiente manera. En primer lugar se incluyó la sonda, cuya estructura general y la secuencia se muestra en la parte inferior de la figura. En segundo lugar los cebadores de ampliación influyeron en la concentración de modo que había un relativo exceso del cebador de ampliación oponiéndose a la sonda para que pudiera haber un exceso en estado estacionario de secuencias complementarias a la sonda. Por último la enzima Nfo se incluyó en la reacción. Las reacciones se realizaron en volúmenes de 20 microlitros en una placa convencional de 384 pocillos y la fluorescencia se controló utilizando filtros de excitación/detección de 485/525 en un lector de placas BIO-TEK Flx800. Se observó que hubo un aumento de fluorescencia en función de la plantilla. El tiempo en el que la acumulación comienza era función del número de copias, ya que era el nivel de fluorescencia total al final del período de control de la reacción en una hora.

En la figura 8 se repitió este experimento. La figura 8A muestra los datos de fluorescencia en bruto mientras que la figura 8B muestra señales de fluorescencia normalizadas. La señal de fluorescencia presente en el agua de referencia en un momento dado se restó de todas las otras señales de fluorescencia de la muestra. Todas las muestras se normalizaron entre sí ajustándolas a una referencia común basada en el período anterior al aumento de fluorescencia mensurable. En la figura 8C, el log de los datos de fluorescencia normalizados se representó gráficamente y en la figura 8D el tiempo del cruce umbral de la señal de fluorescencia (fijado a aproximadamente 2,6) se representó frente a número de copias inicial.

En este caso se ha mostrado el resultado de la normalización de las muestras frente a la señal en el agua de referencia, y a continuación, los resultados de representación del logaritmo de la señal de fluorescencia normalizada. Se ha fijado que una señal de fluorescencia de 2,5 o superior constituye una señal positiva. Téngase en cuenta que es fácil distinguir las muestras con pocas copias del agua en contraste con la situación observada normalmente cuando se utiliza SYBR-verde. El ligero aumento de fluorescencia en la muestra de agua es casi seguro debido a la ligera contaminación por arrastre asociada a este amplicón en concreto, que ha sido ampliamente manipulado en el laboratorio.

Con respecto a los extintores la presente descripción, debe apreciarse que un extintor no necesita ser un fluoróforo. Se puede utilizar un cromóforo no fluorescente que se solapa con la emisión del donante (extintor oscuro). En tal caso, la energía transferida se disipa en forma de calor.

5 Se conocen estintores oscuros de alta eficiencia, tal como Dark Quencher 1, Dark Quencher 2 y Black Hole Quencher 1 Hole y Black Hole Quencher 2 y están disponibles en el mercado (Biosearch Technologies, Inc., Novato, Calif.). Como se conoce en la técnica, la alta eficacia de enfriamiento y la falta de fluorescencia natural del extintor oscuro permite la unión de un fluoróforo y un extintor en un oligonucleótido y garantiza que dicho oligonucleótido no presenta fluorescencia cuando está en solución.

10 Los fluoróforos y extintores adecuados para su uso con los polinucleótidos de la presente descripción pueden ser determinados fácilmente por un experto en la materia (véase también, Tgayi *et al.*, *Nature Biotechnology*, 16:49-53 (1998); Marras *et al.*, *Genet. Anal: Biomolec. Eng.* 14:151-156 (1999)). Muchos fluoróforos y extintores están disponibles en el mercado, por ejemplo en *Molecular Probes* (Eugene, OR.) o *Biosearch Technologies, Inc.* (Novato, California). Los ejemplos de fluoróforos que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína y derivados de fluoresceína tales como FAM, VIC, y JOE, ácido 5-(2'-aminoetil) aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), cumarina y derivados de cumarina, amarillo Lucifer, NED, rojo Texas, tetrametilrodamina, tetracloro-6-carboxifluoresceína, 5-carboxirrodamina, colorantes de cianina y similares. Los extintores incluyen, pero no se limitan a, DABSYL, ácido 4'-(4-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL), 4-dimetilaminofenilazo-4'-maleimida (DABMI), tetrametilrodamina, carboxitetrametilrodamina (TAMRA), Black Hole Quencher, Dark Quencher 1 y Dark Quencher 2. Los métodos de acoplamiento de fluoróforos y extintores a los ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica.

25 Se ha aplicado con éxito un sistema de sonda fluorescente en el medio de reacción de ARP y se ha comprobado la estructura general de las sondas. Con este conocimiento debería ser fácil desarrollar sondas para detectar cualquier amplicón, y mediante selección juiciosa de fluoróforos alternativos, multiplexar más de una ampliación de una vez. Para demostrar esto, se ha desarrollado una prueba múltiple para el patógeno *S. aureus* resistente a antibióticos conocido en el Reino Unido como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, o SARM por sus siglas.

30 Detección de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

La SARM comprende una colección de cepas de *Staphylococcus aureus* que han desarrollado resistencia a los antibióticos por la integración de un casete de resistencia, la casete mecA, en una posición específica en el genoma de *S. aureus*. Mientras que el mismo sitio de integración genómica general se utiliza siempre, las uniones precisas del sitio de integración y la orientación de los casetes pueden variar. A pesar de esta variación, las cepas independientes pueden separarse en un número limitado de grupos generales con estructuras de integración representativas. Además de esta complejidad, surgen más dificultades debido a la existencia de polimorfismos de bases entre las cepas que pueden comprometer la eficacia de los cebadores y sondas de ampliación. El patógeno SARM representa por lo tanto una diana compleja porque para capturar más del 90% de las cepas que se encuentran comúnmente en las muestras clínicas en una sola prueba es necesario ajustar la detección de tres variaciones estructuralmente distintas del locus de integración de la casete con resistencia a mecA, y dar cuenta de algunos polimorfismos comunes. Además, es necesario que el amplicón extienda una sección de la casete de integración para garantizar que cualquiera de las secuencias mecA ampliadas están en el contexto del genoma de *S. aureus*, y no estaban presentes en una bacteria no relacionada.

45 Para configurar una prueba de ARP para más del 90% de las cepas de SARM comunes, se ha desarrollado una estrategia de diseño de cebadores que se ilustra en la figura 10. La figura 10 representa la detección en tiempo real de alelos de SARM en un medio de ensayo múltiple. La figura 10A es un esquema de principio de la sonda de ARP. La generación de la señal depende del corte de la sonda por Nfo específico bicatenario. La figura 10B representa una disposición de cebadores y sondas en relación con las dianas utilizadas en 2C-F y 3C. Un fragmento de RCP que fusionó una secuencia no relacionada a las secuencias diana scclIII y orfX y sirvió como patrón interno. La figura 10C presenta la señal de la sonda de las reacciones ARP utilizando el conjunto de cebadores orfX/scclIII. ADN de MRSMAIII en 10⁴ (negro, reacciones 1-3), 10³ (rojo, 4-6), 100 (amarillo, 7-9), 10 (verde, 10-12) o 2 copias (púrpura, 13-17) o agua (azul, 18-20) sirvió como plantilla. La figura 10D muestra un gráfico del tiempo inicial de la ampliación (definido a medida que pasa el umbral de 2,5) en las reacciones de 1-12 en 2C frente al logaritmo del número de copias de la plantilla pone de manifiesto una relación lineal. (E) Un enfoque de ARP múltiple permite la detección de alelos diferentes de SARM y de un control interno en la misma reacción. SARM I (verde), SARM II (azul oscuro), SARM III ADN (rojo) en 10 copias o SASM ADN en 10⁴ copias (azul, referencia negativa) o agua (amarillo, turquesa) sirvió como plantilla (por triplicado para cada condición de plantilla). (F) Detección de las 50 copias de ADN de patrón interno incluido en las reacciones en 2E. Una referencia negativa contenía agua (turquesa). Las reacciones ARP se realizaron de la manera siguiente: ARP en tiempo real se realizó en un lector de placas (BioTek F1x-800) en presencia de sondas con fluoróforo/extintor. Las reacciones se realizaron a 37°C durante 90 minutos. Las condiciones fueron Tris 50 mM (pH 7,9), acetato de potasio 100 mM, acetato de magnesio 14 mM, DTT 2 mM, Cabowax 20M al 5,5%, dNTP 200 µM, ATP 3 mM, fosfocreatina 50 mM, 100 ng/µl de creatina-cinasa, 20 ng/µl de Bsu. Las concentraciones de gp32/uxsX/uvvY (en ng/ul) fueron 900/120/30. Los cebadores se emplearon en sccl/II 265 nM, scclIII 265 nM, orfX 70 nM. Los volúmenes de reacción fueron de 20 µl.

Se emplearon tres sondas:

SATamra1 5'-tgtaattga acaagtgtac agagcatt (T) a (H) ga (q1) tatgctgga g-biotina-3' (SEC. ID. nº 9)

5 SATamra2 5'-tgtaattga gcaagtgtat agagcatt (T) a (H) ga (q2) tatgctgga g-biotina-3' (SEC. ID. nº 10)

BSF1c 5'-catgattgga tgaataagct gcagc (F) g (H) t (q3) aaaggaaact ta-biotina-3' (SEC. ID. nº 11)

10 Así, (T) es dT-TAMRA, (F) es dT-fluoresceína, (H) es THF, (q1) es dT-BHQ1, (q2) es dT-BHQ2, (q3) es dT-DDQ1. Las sondas se emplearon en SATamra1 60 nM (experimento SARMIII) o en SATamra1 45 nM, SATamra2 45 nM, BSF1c 60 nM (ensayo múltiple). No se utilizó a 200 ng/µl. La excitación/detección se realizó a 485/525 nm (SybrGreenI, BSF1c) o 530/575 nm (SATamra1/2). Las mediciones se tomaron cada 30 s o 45 s (experimento múltiple). Los datos de la sonda de fluorescencia se normalizaron frente a la referencia de agua y se ajustó la referencia de preamplificación. El logaritmo de la lectura se representó frente al tiempo de reacción.

15 En resumen, un único cebador se diseñó para reconocer el ADN genómico de *S. aureus* fuera de la región casete de integración, y se denominó orfX. Se diseñaron otros dos cebadores específicos para el casete mec, y uno de ellos (scc I/II) se puede utilizar para ampliar el locus de dos de las variantes de cepas, mientras que el segundo (scc III) amplió el locus de la tercera variante. Se utilizan dos sondas para los amplicones, que se diferencian en dos restos para dar cuenta de los polimorfismos comunes de un solo nucleótido. Ambas sondas de SARM utilizan TAMRA como fluoróforo. Por último, se incluye en la reacción un amplicón de referencia que comprende un segmento único de un fragmento de ADN genómico de *B. subtilis* no relacionado fusionado a los cebadores orfX y sccIII, y una tercera sonda se pueden utilizar para detectar este amplicón (BSF1c, y ésta es la misma sonda utilizada en los experimentos en la figura 7, contiene una fluoresceína y extintor I oscuro profundo). La figura 10 parte A ilustra una vez más la estrategia para el desarrollo de aumento de fluorescencia en la reacción por el tratamiento de sondas que forman híbridos con amplicones. En la parte C de detección de una plantilla de ADN genómico de SARM se demuestra en un amplio intervalo de concentración en un medio no multiplexado. Parte E muestra los resultados de un experimento en el que se detectaron por separado (aproximadamente) 10 copias de cada uno de los tres tipos de SARM utilizando una única mezcla maestra de reacción. En la parte F se muestra la señal generada por la secuencia de referencia en el canal de fluoresceína, y podemos ver que todas las muestras que contienen puntuación positiva del ADN de referencia.

35 Se incluyen en estos experimentos las reacciones de control que contienen concentraciones relativamente altas de (10^4 copias) de ADN de *S. aureus* no resistente. Satisfactoriamente, estas muestras no puntúan positivo lo que indica un requisito estricto tanto para secuencias de *S. aureus*, así como para la casete de gen mecA. Para garantizar que este ADN de referencia era funcional y que la concentración de la copia era tal como se indica, se utilizó el ADN en las reacciones de referencia que emplean una combinación del cebador orfX y un segundo cebador específico de *S. aureus* denominado sasm. En este caso se pueden emplear las mismas sondas ya que las sondas reconocen las secciones comunes del genoma de *S. aureus*. En la figura 11 se puede observar los resultados de un experimento realizado con estos cebadores específicos de cepas no resistentes, y ver cómo el ADN SASM de referencia es de hecho eficaz, y muestra la respuesta apropiada del análisis cuantitativo para copiar el número. La figura 11 representa la detección de ADN de SASM en una reacción ARP cuantitativa en tiempo real. Señal de la sonda de reacciones ARP que utilizan el conjunto de cebador orfX/SASM y sonda SATamra2. La figura 11A representa la medición de ADN de SASM en 10^4 (negro, reacciones 1-3), 10^3 (rojo, 4-6), 100 (amarillo, 7-9), 10 (verde, 10-12) o 2 copias (púrpura, 13-17) o ADN de SARM en 10^4 copias (gris, reacciones 18-20) o agua (azul, 21-23) sirvió como plantilla. Las condiciones de reacción fueron de Tris 50 mM (pH 7,9), acetato de potasio 100 mM, acetato de magnesio 14 mM, DTT 2 mM, dNTP 200 µM, ATP 3 mM, fosfocreatina 20 mM, 100 ng/µl de creatinasa, Carbowax20M al 5%, 900 ng/µl de gp32, 120 ng/µl de uvsX, 30 ng/µl de uvsY y 20 ng/µl de Bsu. Los oligonucleótidos se emplearon en sasm 500 nM, orfX 100 nM y SATamra2 60 nM. Mientras que la diana SASM se amplía incluso a concentraciones muy bajas, la referencia negativa (SARM) no genera una señal. La figura 11B representa un gráfico del inicio de la amplificación (definido como que pasa el umbral de 2,5) en las reacciones 1-12 frente al logaritmo del número de copias de plantilla pone de manifiesto una relación lineal.

55 Detección de rastros de ácidos nucleicos por asociación de cebadores después de la generación enzimática de un extremo 3' extensible

60 LA ARP es ideal para el desarrollo de las pruebas de ADN, en equipos portátiles o equipos ligeros. Sin embargo, dichas pruebas de ser posible emplearían aproximaciones económicas, fáciles de utilizar, para determinar si ha tenido lugar la amplificación. Se utiliza tradicionalmente electroforesis en gel para evaluar si un producto de un tamaño definido se ha acumulado. Alternativamente se pueden emplear sondas fluorescentes. En cualquier caso se requiere equipo informático significativo para llevar a cabo el análisis y esto impide que la prueba sea utilizada por usuarios finales que carecen de equipo apropiado.

65 Otros métodos pueden utilizarse para determinar si se ha producido o no la amplificación de ADN. Un método sin equipo informático conveniente consiste en llevar a cabo un ensayo de tipo sándwich en el que la presencia de un

amplificación se evalúa examinando si dos cebadores marcados específicos del gen han llegado a asociarse a un ADN bicatenario común. Esto se puede conseguir marcando un cebador de amplificación con un marcador, tal como la biotina, y un cebador opuesto con un segundo marcador, tal como FAM. Se pueden emplear varios métodos para determinar si los dos cebadores marcados están asociados. Por ejemplo, en un ensayo con la tira de flujo lateral convencional (véase por ejemplo el documento EP0810436A1), se emplean dos anticuerpos (u otro resto tal como estreptavidina que se une con alta afinidad a uno de los marcadores de oligonucleótidos). Un anticuerpo se inmovilizaría sobre una membrana de flujo en una línea o un punto. El otro está acoplado a partículas visibles, tales como el oro coloidal, partículas de látex, o similares. Cuando la muestra, en este caso una reacción de amplificación diluida o sin diluir, se aplica a una almohadilla de muestra en el que las partículas visibles acopladas al anticuerpo se depositan previamente, las partículas visibles llegan a asociarse de manera estable con uno de los oligonucleótidos marcados. Toda la muestra a continuación, se mueve por la acción capilar hasta la membrana y a medida que fluye el otro cebador marcado llega a estar 'atrapado' en el anticuerpo inmovilizado. Si los cebadores marcados no están asociados entre sí en una doble cadena a continuación, los anticuerpos 'atrapados' en la membrana no están asociados con las partículas visibles asociadas con el otro cebador. Si, sin embargo, están asociados como consecuencia de la amplificación a continuación las partículas visibles también quedan atrapadas en la línea o punto, y se acumula una señal visible. Otros enfoques para evaluar la asociación de los cebadores se pueden configurar.

Un problema con los ensayos sencillos de asociación, tales como los ensayos de tipo sándwich, es el requisito de que los cebadores no se asocien a menos que se produzca la auténtica amplificación de la diana deseada. Cualquier asociación no deseada dará lugar a una falsa señal positiva. Sin embargo, dicha situación de corte limpio no suele ser el caso con la mayoría de los métodos de amplificación, sobre todo cuando la diana no es abundante. Por ejemplo dímeros de cebadores, u otros artillugios, tienden a acumularse en cierta medida en el método de RCP, independientemente de la optimización. La ARP también adolece de la acumulación de artillugios relacionados con el cebador como se detalló anteriormente, y éstos es probable que interfieran con la combinación directa de ARP con dichas lecturas sencillas. De hecho, este problema general puede apoyar parte del motivo por el que los ensayos en sándwich no se han aplicado ampliamente en las pruebas de ADN de alta sensibilidad/especificidad disponibles en la actualidad. Esos sistemas de flujo lateral comercializados para evaluar la acumulación de producto de RCP tienen inconvenientes, requiriendo una etapa final de hibridación de un cebador de sonda adicional para el producto una vez se ha realizado la reacción a fin de evitar asociación conjunta aberrante de los cebadores mediante la síntesis de ADN (por ejemplo, la tira de prueba The Genline Chlamydia Direct de Milenia).

Se han configurado reacciones ARP para permitir una fácil evaluación de la amplificación auténtica de la diana mediante la adición directa a las tiras de flujo lateral, o potencialmente por otros procedimientos similares. Para alcanzar una distinción clara entre muestras positivas y negativas se ha empleado un cebador marcado que es dividido por las enzimas Nfo de *E. coli* o exonucleasa III para generar dos cebadores, uno de los cuales puede ser alargados. Esto se consigue mediante el bloqueo del extremo 3' del oligonucleótido, y la incorporación por separado de un resto o producto de THF empleando una 5'-O-dimetoxitritil-1',2'-didesoxirribosa-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita durante la síntesis de oligonucleótidos, denominada en la presente memoria "separador-D" disponible en Glen Research, Sterling, Virginia, EE.UU.) dentro del oligonucleótido para actuar como diana de división para la enzima. La dependencia en la formación de una doble cadena estable antes de que las enzimas Nfo o exonucleasa III corten o dividan el cebador garantiza que la asociación aberrante de este cebador con el otro cebador opuesto marcado no se produce, o es tan poco frecuente como para disminuir por debajo del umbral de detección.

La figura 9 muestra los datos del experimento en el que el ADN de una cepa de *S. aureus* resistente a la meticilina (cepa ESARM 16 que contiene la casete mec2), o de una cepa de referencia no resistente (SASM) se ha sometido a la amplificación en la presencia de 3 cebadores. Este experimento demuestra que es factible una estrategia de amplificación con una relación alta señal a ruido adecuada para ensayos de flujo lateral u otros esquemas de detección en sándwich sencillos. La figura 9A muestra un esquema de la disposición de los cebadores. El cebador más a la izquierda, y la sonda, reconocen secuencias presentes en el genoma de *S. aureus*, y asimismo presente en la cepa de referencia SASM de *S. aureus*, así como en la cepa SARM16 que contiene una inserción del casete mecII corriente abajo. El cebador de amplificación más a la derecha es específico para secuencias en la casete mecII y no se encuentra en el genoma de *S. aureus* no resistente. El cebador más a la derecha está marcado en 5' con un resto de biotina, mientras que la sonda está marcada con un resto 5'-FAM. La sonda se bloquea con 3' ddC, y contiene un resto de THF interno. En la figura 9B, las reacciones de amplificación se comprobaron en las siguientes condiciones: Tris 50 mM pH 7,9, acetato de potasio 100 nM, acetato de magnesio 14 mM, DTT, 2 mM compuesto de PEG al 5% (Carbowax-20M), ATP 3 mM, fosfocreatina 25 mM, 100 ng/μl de creatina cinasa, 600 ng/μl de gp32, 125 ng/μl de uvsX, 30 ng/μl de uvsY, 270 ng/μl de Nfo, dNTP 100 μM, cebador ORFX45b 100 nM, cebador sccll-35-2-bio 100 nM, sonda ORFXprobe2 50 nM. Tiempo de reacción, 60 minutos. Volumen de reacción de 30 μl. Temperatura de reacción 37°C. El número de copias fue de 1.000 copias de ADN SASM o 1000 copias de SARM16 ADN, o agua. Después de 60 minutos se diluyó 1 μl de la reacción con 5 μl de PBS/3% de Tween-20, y se aplicó a la almohadilla de muestra de una tira de prueba de flujo lateral comercial de Milenia utilizando 100 μl de PBS/3% de Tween-20 (producto de Milenia: Genline hybri-detect MGH1).

En este caso, 2 de los cebadores actúan como el par principal de cebadores de amplificación, y un tercero actúa como sonda. La sonda contiene un "grupo de bloqueo en 3'" y un resto de THF interno separado para actuar como una

diana para división, así como un marcador FAM en el extremo 5'. La sonda se opone a uno de los principales cebadores de ampliación que está marcado con un resto de biotina. Sólo si se acumula un amplicón auténtico la sonda formará híbridos estables que son cortados o divididos por Nfo, se alargan, y por lo tanto se asocian los 2 cebadores marcados. Se muestran los resultados de un experimento en el que las ampliaciones ARP demostradas de esta manera se realizaron en ADN de las cepas resistentes y no resistentes. Una pequeña cantidad de la reacción (1 µl) se mezcló a continuación con 5 µl de tampón de operación de flujo lateral (solución salina tamponada con fosfato con 3% de Tween-20) y se aplicó directamente a una tira de flujo lateral comercial (Milenia-Alemania). Después de unos 1-2 minutos se evaluó la señal en las tiras, y se tomó una fotografía. La prueba distingue claramente positivos de negativos.

Otras enzimas de tratamiento pueden emplearse en dichos métodos. En particular, las enzimas fgp de *E. coli*, Nth y exonucleasa III, los homólogos de otros tipos, las enzimas para reparación del emparejamiento incorrecto de bases tales como MutY, MutS y MutM de *E. coli*, MUG de *E. coli*, MUG humana, Ogg1 y las glucosilasas tipo Nei (Neil) de vertebrados. Cualquier combinación de las enzimas de reparación anteriores también puede emplearse. En particular, debe considerarse que Nfo de *E. coli* (endonucleasa IV), y exonucleasa III de *E. coli*, poseen actividades de la fosfodiesterasa y pueden procesar los extremos 3' no extensibles de productos cortados de otras glucosilasas/liasas a restos de 3'-hidroxilo extensibles.

La invención se describirá a continuación con detalle mediante ejemplos. Los ejemplos son ilustrativos de la invención y no pretenden limitarla de ninguna manera.

Ejemplo 1. Secuencias de ácido nucleico

Proteínas y ADN

Se ampliaron secuencias de codificación para uvsx, uvsy, gp32 Bsu y Nfo procedentes de ADN genómico (DSMZ, Alemania), se fusionaron a etiquetas con hexahistidina (terminal N para uvsY, Bsu y Nfo, terminal C para uvsX y gp32) y se clonaron en vectores de expresión adecuados. La sobreexpresión y la purificación se realizaron mediante protocolos normalizados utilizando resina de Níquel-NTA (Qiagen). Los alelos de *S. aureus* fueron ESARM-3 (SCCmec tipo I; SARM1), ESARM-16 (SARM2), ESARM-1 (SARM3) y SASM natural. Ver información de la secuencia adicional proporcionada a continuación.

Secuencias de cebadores

Locus ApoB humano (experimento SI de tamaños del producto):

Apo700 tggtaaacgg aagtctggca ggggtattct cg (SEC ID n°:12)

Apo800 caattgtgtg tgagatgtgg ggaagctgga at (SEC ID n°:13)

Apo900 gaggtggttc cattccctat gtcagcattt gc (SEC ID n°:14)

Apo1000 gggtttgaga gttgtgcatt tgcttgaaaa tc (SEC ID n°:15)

Locus humanos para marcadores de STR (experimento STR y experimento de tamaños de cebador, SI):

CSF1PO 5' gttgctaacc accctgtgtc tcagttttc tac (SEC ID n°:16)

CSF1PO 3' agactcttc acacaccact ggccatcttc agc (SEC ID n°:17)

D7S820 5' gaacactgt catagtttag aacgaactaa cg (SEC ID n°:18)

D7S820 3' gaattataac gattccatc ttatcctcat tgac (SEC ID n°:19)

D13S317 5' ttgctggaca tggatcaca gaagtctggg atg (SEC ID n°:20)

D13S317 3' ccataggcag cccaaaaaga cagacagaaa ga (SEC ID n°:21)

D16S539 5' aaacaaggc agatccaag ctcttctct tcc (SEC ID n°:22)

D16S539 5' ataccattta cgttgtgtg tgcattctga agc (SEC ID n°:23)

D18S51 5' ggtggacatg ttggcttctc tctgttcta ac (SEC ID n°:24)

D18S51 3' ggtggcacgt gcctgtatgc tcagctactt gc (SEC ID n°:25)

ES 2 420 831 T3

THO1 5' tacacagggc ttccggtgca ggtcacaggg a (SEC ID n°:26)

THO1 3' ccttcccagg ctctagcagc agctcatggtgg (SEC ID n°:27)

5 TPOX 5' actggcacag aacaggcact tagggaaccc (SEC ID n°:28).

TPOX 3' ggaggaactg ggaaccacac aggttaatta (SEC ID n°:29)

Locus ApoB, D18S51 y Sry humanos (experimento de tamaños de cebador, SI):

10 APOB500 atggtaaatt ctggtgtgga aaacctggat gg (SEC ID n°:30)

APO500-28 taaattctgg tgtggaaaac ctggatgg (SEC ID n°:31)

15 APO500-25 attctggtgt ggaaaacctg gatgg (SEC ID n°:32)

APOB300REV ctatccaaga ttgggctaaa cgtatgaaag ca (SEC ID n°:33)

APOB300REV-28 ccaagattgg gctaaacgta tgaagca (SEC ID n°:34)

20 APOB300REV-25 agattgggct aaactgatga aagca (SEC ID n°:35)

D18S51 5'-28 gacatgttg cttctctctg ttcttaac (SEC ID n°:36)

25 D18S51 5'-25 atgttgctt ctctctgttc ttaac (SEC ID n°:37)

D18S513'-28 gcacgtgcct gtagtctcag ctactgc (SEC ID n°:38)

D18S51 3'-25 cgtgcctgta gtctcagcta cttgc (SEC ID n°:39)

30 SRY3 aaagctgtaa ctctaagtat cagtgtgaaa c (SEC ID n°:40)

SRY3-28 gctgtaactc taagtatcag tgtgaaac (SEC ID n°:41)

35 SRY3-25 gtaactctaa gtatcagtg gaaac (SEC ID n°:42)

SRY4 gttgtccagt tgcacttcgc tgcagagtac c (SEC ID n°:43)

SRY4-28 gtccagttgc acttcgctgc agagtacc (SEC ID n°:44)

40 SRY4-25 cagttgcact tcgctgcaga gtacc (SEC ID n°:45)

Se utilizan ADN en esta descripción

45 **BsA1** ttgggcactt ggatatgatg gaactggcac (SEC ID n°:46)

BsA1-36 ttgggcactt ggatatgatg gaactggcac ggttgt (SEC ID n°:47)

BsA1-40 ttgggcactt ggatatgatg gaactggcac ggttgtgcg (SEC ID n°:48)

50 **BsA1-45** ttgggcactt ggatatgatg gaactggcac ggttgtgcg tccat (SEC ID n°:49)

BsB3 ccatcttcag agaacgctt aacagcaatc c (SEC ID n°:50)

55 **BsB3-36** cgccatcttc agagaacgct ttaacagcaa tccatt (SEC ID n°:51)

BsB3-40 cgccatcttc agagaacgct ttaacagcaa tccatttgc (SEC ID n°:52)

BsB3-45 cgccatcttc agagaacgct ttaacagcaa tccatttgc gccag (SEC ID n°:53)

60 **ApoB4** cagtgtatct ggaaagccta caggacacca aaa (SEC ID n°:54)

ApoB4-40 cagtgtatct ggaaagccta caggacacca aaataacctt (SEC ID n°:55)

65 **ApoB4-45** cagtgtatct ggaaagccta caggacacca aaataacctt aatca (SEC ID n°:56)

- Apo300** tgctttcata cgtttagccc aatcttgat ag (SEC ID n°:57)
- Apo300-40** tgctttcata cgtttagccc aatcttgat agaattgc (SEC ID n°:58)
- 5 **Apo300-45** tgctttcata cgtttagccc aatcttgat agaattgc tctgc (SEC ID n°:59)
- SRY8** ccagctgtgc aagagaatat tcccgctctc cg (SEC ID n°:60)
- SRY9** cctgtgtcc agttgcactt cgctgcagag t (SEC ID n°:61)
- 10 J1 acggcattaa caaacgaact gattcatctg cttgg (SEC ID n°:62)
- K2 ccttaatttc tccgagaact tcatattcaa gcgtc (SEC ID n°:63)
- 15 Sonda Nfol 5'-catgattgga tgaataagct gcagc-[dTfluorescein]-g-[tetrahydrofuranyl]-t-[dT-DDQ1]-aaaggaaact tadRbiotin-3' (SEC ID n°:64)
- ORFX45-b ccaagaattg aaccaacgca tgaccaagg gcaaagcgac tttgt (SEC ID n°:65)
- 20 ORFXprobe2 5'-(FAM) -CCACATCAAATGATGCGGGTTGTGTTAAT- [d-SPACER]-GAACAAGTGACAGAG-3'ddC (block) (SEC ID n°:66)
- SATamra1** 5'-tgtaattga acaagtgtac agagcatt-[dT tamra] a(THF)ga(BHQ1)tatgctgga g-Biotin-3' (SEC ID n°:67).
- 25 **SATamra2** 5'-tgtaattga gcaagtgtat agagcatt(dT tamra)a(THF)ga(BHQ2)tatgctgga g-Biotin-3' (SEC ID n°:68)
- BSFlc** 5'-catgattgga tgaataagct gcagc (F)g(H)t(q3) aaaggaaact ta-Biotin-3' (SEC ID n°:69)
- Secuencia de alelos de SASM y SARM y cebadores utilizados en la presente memoria:
- 30 Las secuencias diana de cebadores están en negrita/subrayado, la secuencia de unión de la sonda está en negrita/cursiva.
- Cebadores SARM/SAS. (experimento con *S. aureus*):
- 35 SCCI/II ctaaagcta gaacttgct tcactataag tattc (SEC ID n°:70)
- SCCIII ccaatatttc atatatgtaa ttctccaca tctca (SEC ID n°:71)
- 40 ORFX cccaagggca aagcgacttt gtattctgca ttggcggatc aaacg (SEC ID n°:72)
- MSSA ccaattgat agggcctaatt tcaactgtt agcta (SEC ID n°:73)
- 45 **sccll-35-2-bio**5'-bio-ctatgtcaaa aatcatgaac ctactactt atgat (SEC ID n°:74)
- Secuencia de SASM ADN:
- ttttagatat aaaccaattt gatagggcct aatttcaact gttagctact**
acttaagtta tatgcgcaat tatcgtgata tatcttatat attgaatgaa
cgtggattta atgtccacca tttaacaccc tccaaattat tatctctca
tacagaattt tttagtttta cttatgatac gcctctccac gcataatctt
aatgctcta tacacttgc caattaacac aaccgcac atttgatgtg
ggaatgtcat tttgctgaat gatagtgcgt agttactgcg ttgtaagacg
tccttgtgca ggccgtttga tccgccaatg acgaatacaa agtcgctttg
cccttgggtc atgcg (SEQ ID NO:75)

Secuencia de SARMI ADN:

tttagttgcagaaagaattttctcaagctagaactttgcttcactataagatttcagtata
 aagaatatttcgctattatttacttgaaatgaaagactgcgaggctaactatgtcaaaaat
 catgaacctcattacttatgataagcttctccacgcataaatcttaaatgctctatacacttg
 ctcaatttaacacaaccgcacatttgatgtgggaatgtcattttgctgaatgatagtgcg
 agttactgcggtgtaagacgtccttgctgcaggccgctttgatccgccaatgacgaatacaaa
 gctgctttgcccttgggtcatgcg (SEQ ID NO:76)

5

Secuencia de SARMII ADN

tttagttgcagaaagaattttctcaagctagaactttgcttcactataagatttcagtata
 aagaatatttcgctattatttacttgaaatgaaagactgcgaggctaactatgtcaaaaat
 catgaacctcattacttatgataagcttcttaaaaacataacagcaattcacataaacctca
 tatgttctgatacattcaaaatccctttatgaagcggtgaaaaaacgcacatttatgat
 atgcttctccacgcataaatcttaaatgctctgtacacttgttcaatttaacacaaccgcac
 atttgatgtgggaatgtcattttgctgaatgatagtgcgtagttactgcggtgtaagacgtc
 cttgtgcaggccgctttgatccgccaatgacgaatacaaaagtcgctttgcccttgggtcatg
 cg (SEQ ID NO:77)

10

Secuencia de SARMIII ADN

aaggataaatccaatatttcataatgtaattcctccacatctcattaaatttttaattat
 acacaacctaattttagttttatttatgatacgcttctccacgcataaatcttaaatgctct
 gtacacttgttcaatttaacacaaccgcacatttgatgtgggaatgtcattttgctgaatg
 atagtgcgtagttactgcggtgtaagacgtccttgctgcaggccgctttgatccgccaatgacg
 aatacaaaagtcgctttgcccttgggtcatgcg (SEQ ID NO:78)

15

Ejemplo 2. Cinética de una reacción ARP

20

En la figura 12A se muestra un diagrama esquemático del proceso de ARP. Los filamentos de recombinasa/cebador escanean el ADN plantilla para secuencias homólogas (rojo/azul). Después del intercambio de cadenas la cadena desplazada está unida por gp32 (verde), Bsu polimerasa (azul) amplía los cebadores. Los episodios de unión/ampliación repetidos de cebadores opuestos dan como resultado la ampliación exponencial de ADN.

25

La cinética de la formación de filamentos de recombinasa/cebador se presenta en la figura 12B. En presencia de ATP uvsX (gris) se une cooperativamente a los oligonucleótidos (rojo, parte superior). Tras la hidrólisis de ATP el complejo de nucleoproteína se desmonta (izquierda) y uvsX pueden ser sustituido por gp32 (verde, a la derecha). La presencia de uvsY y Carbowax20M desplaza el equilibrio a favor de la carga de recombinasa.

30

El resultado de una reacción típica de ARP se muestra en la figura 12C que es una PAGE de reacciones ARP que utiliza cebadores para marcadores STR. El ADN genómico de dos personas (1/2, padre/hijo) sirvió como plantilla. Ocasionalmente (D7S820, D16S539), se pueden observar cantidades de bajo nivel de formas diméricas del producto completo (asteriscos).

35

La capacidad para seguir la reacción ARP en tiempo real se muestra en la figura 12D. En la figura 12D, se hizo el seguimiento de una ARP en tiempo real utilizando cebadores para el locus SpoB de *B. subtilis* haciendo el seguimiento de la fluorescencia de una reacción. Se detecta la fluorescencia durante el intercalado de SybrGreenI en producto naciente. ADN de *B. subtilis* a 5×10^5 (negro), 5×10^4 (rojo), 5×10^3 (amarillo), 500 (verde) o 50 copias

(púrpura) o agua (azul) sirvieron como plantilla. El inicio de la ampliación depende linealmente del logaritmo del número de copias de plantilla de partida (véase el recuadro; tiempo (punto medio de la curva de crecimiento) frente a log [concentración de la plantilla]).

5 Ejemplo 3. Detección de amplicones del ARP utilizando tiras de flujo lateral

Se ha concebido un procedimiento de utilización de la tecnología de la tira de flujo lateral para la detección de amplicón de ARP. Este procedimiento utiliza anticuerpos específicos para inmovilizar y detectar los complejos que contienen dos marcadores antigénicos (figura 13A). En resumen, un ácido nucleico diana se amplía utilizando dos cebadores de oligonucleótidos diferentes, en el que cada cebador comprende un marcador o un antígeno diferente. Por lo tanto, todos los amplicones generados estarían unidos a dos marcadores o antígenos (es decir, un amplicón marcado dos veces).

Para detectar la presencia de los amplicones marcados dos veces, las muestras sospechosas de contener los amplicones se acopló una almohadilla empapada en partículas visibles (oro) a un anticuerpo que reconoce uno de los dos marcadores (en este caso, el marcador es un antígeno) (figura 13C). Los complejos entonces se desplazan en una corriente de tampón a través de la membrana y un anticuerpo inmovilizado adicional captura el segundo antígeno (Id.). Si los antígenos están unidos en una doble cadena de ADN, una línea de color aparece en un lugar definido en la tira. En una variación del sistema de detección de sonda los autores produjeron dichos complejos de doble antígeno por acoplamiento de biotina y oligonucleótidos que llevan FAM en amplicones de ARP (figura 3B). El cebador biotinilado en 5' y su homólogo opuesto garantizan la ampliación eficiente de una diana para la unión de la sonda. La sonda, incluyendo un marcador 5'-FAM, un THF interno y un grupo de bloqueo en 3', se rompe por Nfo durante la unión, creando un sustrato 3'OH para el alargamiento por Bsu. La ampliación de la sonda restante estabiliza su interacción con la cadena marcada con biotina y produce un amplicón que contiene tanto, biotina como FAM. El bloque de THF/3' evita la producción de biotina/FAM que contiene artilugios de cebadores, a medida que el tratamiento de dobles cadenas auténticas por Nfo añade una etapa crítica de corrección. Después de la aplicación de la muestra a la tira de flujo lateral los amplicones con biotina/FAM crearán una señal visible en la línea de detección FAM, mientras que las reacciones de ARP que no pueden generar un complejo conjugado no. Se utilizó un método múltiple similar al empleado en la figura 10E para detectar 10 copias de cada uno de los tres alelos de SARM y distinguirlos de SASM (figura 3C).

Numerosas aplicaciones de investigación y clínicas podría beneficiarse del empleo de ARP y los diversos métodos de detección descritos en la presente memoria. Por ejemplo, ARP ofrece un avance significativo para el desarrollo de dispositivos que no son de laboratorio. Cuando se integra con instrumentos manuales o sistemas de detección de ADN sin equipo, ARP permitirá un sistema de ensayo fácil de utilizar para una variedad de patógenos, así como kits de campo para otras aplicaciones.

Materiales y procedimientos

40 Proteínas y ADN

Se ampliaron secuencias de codificación para *uvsx*, *uvsy*, *gp32* Bsu y Nfo procedentes de ADN genómico (DSMZ, Alemania), se fusionaron a etiquetas de hexahistidina (terminal N para *uvsy*, Bsu y Nfo, terminal C para *uvsx* y *gp32*) y se clonaron en vectores de expresión adecuados. La sobreexpresión y purificación se realizó mediante protocolos normalizados utilizando resina de Níquel-NTA (Qiagen).

Se purificó ADN humano procedente de la sangre (kit de purificación Wizard-Genomic, Promega), el ADN de *B. subtilis* era de la ATCC (EE.UU.), los ADN de *S. aureus* fueron una donación de Jodi Lindsay. Los alelos de *S. aureus* fueron ESARM-3 (SCC*mec* tipo I; SARM I), ESARM-16 (SARM II), ESARM-1 (SARM III) y SASM natural (12). Véase información complementaria para las secuencias.

Condiciones de ARP

Las reacciones se realizaron a 37°C durante 60 min o como se indica. Las condiciones estándar fueron Tris 50 mM (pH 8,4), acetato de potasio 80 mM, acetato de magnesio 10 mM, DTT 2 mM, Carbowax20M al 5%, dNTP 200 µM, ATP 3 mM, fosfocreatina 20 mM, 100 ng/µl de creatina-cinasa, 20 ng/µl de Bsu. Por el contrario, se realizaron ampliaciones de SARM en Tris 50 mM (pH 7,9), acetato de potasio 100 mM, acetato de magnesio 14 mM; en el experimento múltiple Carbowax20M estaba al 5,5%. Las concentraciones de *gp32/uvsx/uvsy* (en ng/µl) fueron 600/200/60 (experimentos con STR), 600/120/30 (experimento con *B. subtilis*) o 900/120/30 (experimentos con SARM). Los cebadores se emplearon a 300 nM cada uno, excepto en la ampliación de SARM, donde se han utilizado *scclIII* 500 nM, *orfX* 100 nM (experimento con SARM III) o *scclII* 265 nM, *scclIII* 265 nM, *orfX* 70 nM (ensayo múltiple) o *BioscclII* 240 nM, de *Bio-scclIII* 240 nM, *orfX* 120 nM (de experimento con tira de flujo lateral). Los volúmenes de reacción fueron de 20 µl, excepto para el experimento STR (40 µl) y el experimento con *B. subtilis* (50 µl).

Seguimiento en tiempo real

Se realizó ARP en tiempo real en un lector de placas (BioTek Flx-800) en presencia de SybrGreenI (1:50000, Molecular Probes) o sondas de fluoróforo/extintor (Eurogentec). Se emplearon tres sondas:

5 SATamra1 5'-tgtaattgaacaagtgtagagcatt(T)a(H)ga(q1)tatgctggag-Biotin-3'

SATamra2 5'-tgtaattgagcaagtgtagagcatt(T)a(H)ga(q2)tatgctggag-Biotin-3'

BSF1c 5'-catgattggatgaataagctgcagc(F)g(H)t(q3)aaaggaaactta-Biotin-3'

10 Aquí (T) es dT-TAMRA, (F) es dT-fluoresceína, (H) es THF, (q1) es dT-BHQ1, (q2) es dT-BHQ2, (Q3) es dT-DDQ1. Las sondas se emplearon en SATamra1 60 nM (experimento con SARMIII) o en SATamra1 45 nM, SATamra2 45 nM, BSF1c 60 nM (ensayo múltiple). No se utilizó a 200 ng/μl. La excitación/detección fue a 485/525 nm (SybrGreenI, BSF1c) o 530/575 nm (SATamra1/2). Las mediciones se tomaron cada 30 segundos o 45 segundos (experimento múltiple). Los datos de la sonda de fluorescencia se normalizaron frente al control de agua y se ajustó la referencia de la ampliación. El logaritmo de la lectura se representó frente al tiempo de reacción.

Detección con tira de flujo lateral

20 Para los experimentos con la tira de flujo lateral se utilizaron dos sondas a 75 nM cada una:

Lfs1 5'FAM-ccacatcaaatgatgctgggtgtgtaata(H)gaacaagtgtagag-ddC-3'

Lfs2 5'FAM-ccacatcaaatgatgctgggtgtgtaata(H)gagcaagtgtagag-ddC-3'

25 Se utilizaron como cebadores formas biotinilados en 5' de scclII y scclIII. Para cada reacción (20 μl) se diluyó 1 μl con 5 μl tampón de ejecución (PBS/3% de Tween) y se aplicó directamente a tiras HybriDetect (Milenia) según las instrucciones del fabricante.

30 El resultado de la detección de la tira de flujo lateral se muestra en la figura 13C. Las reacciones contenían (de izquierda a derecha) 10 copias de SARMIII, 10 copias de SARMII, 10 copias de SARMI o 10000 copias de SASM (referencia negativa) como plantilla. Se generan señales positivas en las 3 primeras reacciones (punta de flecha).

Ejemplo 4. Análisis de las condiciones óptimas para la ARP

35 Condiciones para la ARP

La ARP se basa en la creación de un medio de reacción que apoya la formación de complejos de recombinasa-oligonucleótidos. Dado que el proceso también depende de ATP (Formosa *et al.*, 1986), requiere un sistema de regeneración de energía para la actividad continuada. En este experimento, se valoraron los componentes clave de la mezcla de reacción de ARP para determinar su influencia en el rendimiento de la ampliación. Los resultados se muestran en la figura 14. La figura 14 muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida de las reacciones de ARP utilizando cebadores para el locus Sry humano. Las reacciones se realizaron a 37°C durante 120 min y contenían los cebadores sry3 y sry4 a 300 nM, Tris 50 mM (pH 8,4), acetato de potasio 80 mM, acetato de magnesio 10 mM, DTT 2 mM, ATP 3 mM, dNTPs 200 mM, fosfocreatina 20 mM, 100 ng/μl de creatina-cinasa, Carbowax20M al 5%, 600 ng/μl de gp32, 200 ng/μl de uvsX, 60 ng/μl de uvsY y 20 ng/μl de Bsu, excepto cuando un componente dado estaba bajo investigación. Se determinaron las cantidades óptimas de (figura 14 A) gp32, (figura 14 B) uvsY, (figura 14 C) uvsX, (figura 14 D) Carbowax20M, (figura 14 E) ATP y (figura 14F) Bsu para la ampliación eficaz de esta diana específica. (G)-ADP-@-S y (H) ATP-@-S inhiben las reacciones. 1500 copias/μl del ADN del cromosoma Y humano sirvió como plantilla en reacciones de 30 μl (por muestra se cargó en el gel el equivalente de un volumen de 10 μl de reacción).

Se ha comprobado que ARP funciona sólidamente durante un intervalo relativamente amplio de concentraciones de reactivos. Se ha descubierto, sin embargo, que las condiciones óptimas de reacción variaban entre los diferentes pares de cebadores y por lo tanto tenían que definirse de forma individual.

Requisitos del cebador

Se utilizó ARP para la ampliación de una amplia gama de dianas. Si bien el diseño de cebadores no puso de manifiesto limitaciones en la propia composición de la secuencia, se han de cumplir determinados parámetros para que un oligonucleótido sea adecuado para la ARP. Se investigaron estos parámetros en los experimentos mostrados en la figura 15. La figura 15 muestra la electroforesis en gel de agarosa de reacciones de ARP utilizando cebadores para el locus de apolipoproteína B humana. El cebador ApoB4 se combinó con cebadores opuestos capaces de generar productos de los tamaños indicados. Las reacciones se realizaron a 37°C durante 120 min y las condiciones utilizadas fueron Tris 50 mM (pH 8,4), acetato de potasio 80 mM, acetato de magnesio 10 mM, DTT 2 mM, ATP 3 mM, dNTP 200 μM, fosfocreatina 20 mM, 100 ng/μl de creatina-cinasa, Carbowax20M al 5%, 600 ng/μl de gp32, 125

5 ng/μl de uvsX, 25 ng/μl de uvsY y 20 ng/μl de Bsu. Se utilizaron 450 copias de ADN humano como plantilla en 30 μl de reacciones (por muestra el equivalente de un volumen de 10 μl de reacción se cargó en el gel). Debe considerarse que se produjo alguna duplicación de productos mediada por la horquilla, convirtiendo algunos de los 300 pb del amplicón en 2× y 3× unidad de longitud (*). La ARP no pudo producir amplicones de 1500 pb o más. Este experimento demuestra que el tamaño del amplicón en las condiciones empleadas está limitado a aproximadamente 1 kb.

10 Se muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida de reacciones ARP utilizando cebadores para los tres locus independientes en el ADN genómico humano (apolipoproteína B, STR D18S51, Sry). Los cebadores fueron 25, 28, o > 31 bases, tal como se indica. Las reacciones se realizaron a 37°C durante 120 min. Las condiciones utilizadas fueron Tris/Cl 50 mM, pH 8,4, acetato de potasio 80 mM, acetato de magnesio 10 mM, DTT 2 mM, ATP 3 mM, dNTP 200 μM, fosfocreatina 20 mM, 100 ng/μl de creatina cinasa, Carbowax20M al 5%, 600 ng/μl de gp32, 200 ng/μl de uvsX, 60 ng/μl de uvsY y 20 ng/μl de Bsu polimerasa. 3000 copias de la diana sirvieron como plantilla en reacciones de 30 μl (por muestra se cargó en el gel el equivalente de un volumen de reacción de 10 μl). El hallazgo de que se requiere una longitud de cebador de más de 28 bases para soportar el ARP está de acuerdo con los informes que 15 investigaron la actividad de hidrólisis de ATP de filamentos de uvsX-oligonucleótido en diferentes tamaños de oligonucleótidos (Véase, Huletsky *et al.*, 2004).

20 La longitud mínima de un cebador resultó ser de aproximadamente 30 nucleótidos (figura 16). Se observó variabilidad en el rendimiento de oligonucleótidos que difieren en las secuencias, pero son similares en longitud y posición relativa a sus homólogos. Las normas que rigen la influencia de la secuencia de nucleótidos sobre la calidad de un cebador de ARP determinado se están investigando actualmente

25 ADN de referencia

El ADN natural de *S. aureus* (SASM) (véase, Enright *et al.*, 2002; Huletsky *et al.*, 2004) que actúa como referencia negativa en el experimento mostrado en 2C actúa como plantilla para la ARP cuando se combina con el par cebador orfX/mssa (figura 16).

REFERENCIAS

- Amasino R.M., Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glycol. *Anal Biochem*, Volume 152, Issue 2, 304-7, Feb 1, 1986
- Armes N.A. and Stemple D.L., Recombinase Polymerase Amplification, US patent application number 10/371641.
- Benedict R.C. and Kowalczykowski S.C. Increase in the DNA strand assimilation activity of recA protein by removal of the C terminus and structure-function studies of the resulting protein fragment. *J. Biol. Chem.* 1988 Oct 25;263(30):15513-20
- Chan E.W., Dale P.J., Greco I.L., Rose J.G., O'Connor T.E., *Biochim Biophys Acta*, Volume 606, Issue 2, 353-61, Feb 29, 1980
- Edwards, A., Hammond, H. A., Jin, L., Caskey, C. T. & Chakraborty, R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 12, 241-53 (1992).
- Eggler A.L., Lusetti S.L., Cox M.M. The C terminus of the Escherichia coli RecA protein modulates the DNA binding competition with single-stranded DNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* 2003 May 2;278(18):16389-96
- Ellouze C., Takahashi M., Wittung P., Mortensen K., Schnarr M., Norden B. *Eur. J. Biochem.* 1995 Oct 15;233(2):579-83
- Enright, M. C. et al. The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7687-92 (2002).
- Formosa T. and Alberts B.M. Purification and characterization of the T4 bacteriophage uvsX protein. *J. Biol. Chem.* 1986 May 5;261(13):6107-18
- Giedroc D.P., Gin H.W., Khan R., King G.C., Chen K. Zn(II) coordination domain mutants of T4 gp32 protein. *Biochemistry.* 1992 Jan 28;31(3):765-74
- Giedroc D.P., Keating K.M., Williams K.R., and Coleman J.E. The function of zinc in gene 32 protein from T4. *Biochemistry* 1987 Aug 25;26(17):5251-9
- Hammond, H. A., Jin, L., Zhong, Y., Caskey, C. T. & Chakraborty, R. Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. *Am J Hum Genet* 55, 175-89(1994).
- Harris, L. D. & Griffith, J. D. Formation of D loops by the UvsX protein of T4 bacteriophage: a comparison of the reaction catalyzed in the presence or absence of gene 32 protein. *Biochemistry* 27, 6954-9 (1988).
- Harris, L. D. & Griffith, J. D. UvsY protein of bacteriophage T4 is an accessory protein for in vitro catalysis of strand exchange. *J Mol Biol* 206, 19- 27 (1989).
- Huletsky, A. et al. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillinresistant Staphylococcus aureus directly from specimens containing a mixture of staphylococci. *J Clin Microbiol* 42, 1875-84 (2004).
- Ischenko AA, Saparbaev MK. Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage. *Nature* 2002 Jan 10;415(6868):183-7
- Kaiser MW, Lyamicheva N, Ma W, Miller C, Neri B, Fors L, Lyamichev VI. A comparison of eubacterial and archaeal structure-specific 5'-exonucleases. *J Biol Chem.* 1999 Jul 23;274(30):21387-94.
- Kuil ME, van der Oord CJ, Vlaanderen CA, van Haeringen B, van Grondelle R. A refined calculation of the solution dimensions of the complex between gene 32 protein and single stranded DNA based on estimates of the bending persistence length. *J Biomol Struct Dyn.* 1990 Feb;7(4):943-57
- Lavery P.E. and Kowalczykowski S.C., *J. Biol. Chem.*, Vol. 267, Issue 13, 9307-14, May 5, 1992
- Lerman L.S., A transition to a Compact Form of DNA in Polymer Solutions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971 Apr;68(8):1886-1890.
- Levin, J. D., Johnson, A. W. & Demple, B. Homogeneous Escherichia coli endonuclease IV. Characterization of an enzyme that recognizes oxidative damage in DNA. *J Biol Chem* 263, 8066-71 (1988).

- Lusetti S.L., Shaw J.J., Cox M.M. Magnesium ion-dependent activation of the RecA protein involves the C terminus. *J. Biol. Chem.* 2003 May 2;278(18):16389-96
- 5 Malkov V.A. and Camerini-Otero R.D. Photocross-links between single-stranded DNA and Escherichia coli RecA protein map to loops L1 (amino acid residues 157-164) and L2 (amino acid residues 195-209). *J. Biol. Chem.* 1995 Dec 15, Volume 270, Issue 50, 30230-3
- Minton A.P. The Influence of Macromolecular Crowding and Macromolecular Confinement on Biochemical Reactions in Physiological Media. *J. Biol. Chem.*, Vol. 276, Issue 14, 10577-10580, April 6, 2001
- 10 Morrison, T. B., Weis, J. J. & Wittwer, C. T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24, 954-8, 960, 962 (1998).
- 15 Nadler S.G., Roberts W.J., Shamooy Y., Williams K.R. A novel function for Zinc(II) in a nucleic acid-binding protein. Contribution of Zinc(II) toward the cooperativity of bacteriophage T4 gp32 protein binding. *J. Biol. Chem.* 1990 Jun 25;265(18):10389-94
- Naimushin A.N., Quach M., Fujimoto B.S., Schurr J.M. Effect of polyethylene glycol on the supercoiling free energy of DNA. *Biopolymers.* 2001, Volume 58, Issue 2, 204-17.
- 20 Okazaki, T. & Kornberg, A. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. Xv.Purification and Properties of a Polymerase from Bacillus Subtilis. *J Biol Chem* 239, 259-68 (1964).
- 25 Qiu H. and Giedroc D.P. Effects of substitution of proposed Zn(II) ligand His81 or His64 in phage gp32 protein:spectroscopic evidence for a novel zinc coordination complex. *Biochemistry* 1994 Jul 5;33(26):8139-48
- Rivas G., Ferrone F., Herzfeld J. Life in a crowded world - Workshop on the Biological Implications of Macromolecular Crowding. *EMBO reports* 5, 1, 23-27 (2004) doi:10.1038/sj.embor.7400056 Published online: 19 December 2003.
- 30 Savva,R. ana Pearl,L.H Cloning and expression of the uracil-DNA glycosylases inhibitor (UGI) from bacteriophage PBS-1 and crystallization of a uracil-DNA glycosylase-UGI complex, *Proteins* 22 (3), 287-289 (1995).
- Scheerhagen MA, Kuil ME, van Grondelle R, Blok J. Hydrodynamic studies of a DNA-protein complex. Dimensions of the complex of single-stranded 145 base DNA with gene 32 protein of phage T4 deduced from quasi-elastic light scattering. *FEBS Lett.* 1985 May 20;184(2):221-5
- 35 Shibata, T., Cunningham, R. P., DasGupta, C. & Radding, C. M. Homologous pairing in genetic recombination: complexes of recA protein and DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 5100-4 (1979).
- 40 Story R.M., Bishop D.K., Kleckner N., Steitz, T.A. Structural relationship of bacterial RecA proteins to recombination proteins from bacteriophage T4 and yeast. *Science.* 1993 Mar 26, 259(5103):1892-6
- 45 Takeshita, M., Chang, C. N., Johnson, F., Will, S. & Grollman, A. P. Oligodeoxynucleotides containing synthetic abasic sites. Model substrates for DNA polymerases and apurinic/apyrimidinic endonucleases. *J Biol Chem* 262, 10171-9 (1987).
- Voloshin O.N., Wang L., Camerini-Otero R.D. Homologous DNA pairing Promoted by a 20-Amino Acid Peptide Derived from RecA. *Science* 10 May 1996. Vol 272 Number 5263, pages 868-872
- 50 Voloshin O.N., Wang L., Camerini-Otero R.D. The homologous pairing domain of RecA also mediates the allosteric regulation of DNA binding and ATP hydrolysis: a remarkable concentration of functional residues. *J. Mol. Biol.* 2000 Nov 10;303(5):709-20
- 55 Walker J.E., Saraste M., Runswick M., and Gay N.J. 1982 *EMBO J.* Volume 1. Pages 945-51
- Wang Z, Mosbaugh DW. Uracil-DNA glycosylase inhibitor of bacteriophage PBS2: cloning and effects of expression of the inhibitor gene in Escherichia coli. *J Bacteriol.* 1988 Mar;170(3):1082-91.
- 60 Yang S, VanLoock MS, Yu X, Egelman EH. Comparison of bacteriophage T4 UvsX and human Rad51 filaments suggests that recA-like polymerase may have evolved independently. *J Mol Biol.* 2001 Oct 5;312(5):999-1009
- Yonesaki, T., Ryo, Y., Minagawa, T. & Takahashi, H. Purification and some of the functions of the products of bacteriophage T4 recombination genes, uvsX and uvsY. *Eur J Biochem* 148, 127-34 (1985).
- 65 Zarlring, D.A., Sena E.P., Green C.J., US patent 5,223,414 filed May 7, 1990

Zimmerman SB and Harrison B. Macromolecular crowding increases binding of DNA polymerase to DNA: an adaptive effect. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987 Apr;84(7):1871-5.

Zinchenko A.A. and Yoshikawa, K. *Biophysical Journal*. June 2005.

5

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de ARP de ampliación de ADN de una molécula de ácido nucleico diana que comprende una primera y una segunda cadena de ADN, que comprende las etapas siguientes:
- 5 (a) poner en contacto un agente de recombinasa con un primer y un segundo cebadores de ácido nucleico y un tercer cebador bloqueado en extensión comprendiendo dicho cebador bloqueado en extensión uno o más restos internos no complementarios o modificados para formar unos primer, segundo y tercer cebadores de nucleoproteínas;
- 10 (b) poner en contacto los primer y segundo cebadores de nucleoproteínas con dicho ácido nucleico diana bicatenario formando de este modo una primera estructura bicatenaria entre dicho primer cebador de nucleoproteínas y dicha primera cadena de ADN en una primera parte de dicha primera cadena y una segunda estructura bicatenaria entre dicho segundo cebador de nucleoproteínas y dicha segunda cadena de ADN en una
- 15 segunda porción de dicha segunda cadena de manera que los extremos 3' de dicho primer cebador de nucleoproteínas y de dicho segundo cebador de nucleoproteínas están orientados uno hacia el otro en la misma molécula de ácido nucleico diana con una tercera porción de ácido nucleico diana entre dichos extremos 3';
- 20 (c) extender el extremo 3' de dichos primer cebador de nucleoproteínas y segundo cebador de nucleoproteínas con una o más polimerasas y los dNTP para generar un primer ácido nucleico diana ampliado con una región interna que comprende la tercera porción de ácido nucleico;
- 25 (d) poner en contacto dicho ácido nucleico diana ampliado con dicho tercer cebador de nucleoproteínas para formar una tercera estructura bicatenaria en la tercera porción de dicho ácido nucleico diana ampliado en presencia de una nucleasa; en el que dicha nucleasa escinde específicamente dicho resto interno no complementario o modificado sólo después de la formación de dicha tercera estructura bicatenaria para formar un tercer cebador bloqueado en extensión en 3' y un tercer cebador en 5';
- 30 (e) extender el extremo 3' de dicho tercer cebador en 5' con una o más polimerasas y dNTP para generar un segundo ácido nucleico bicatenario ampliado que comprende dicho primer cebador de ácido nucleico y dicho tercer cebador en 5';
- 35 (f) continuar la reacción mediante la repetición de (b) a (e) hasta que se alcance un grado deseado del segundo ácido nucleico bicatenario ampliado.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la primera estructura bicatenaria forma parte de un primer bucle D y en el que dicha segunda estructura bicatenaria forma parte de un segundo bucle D.
- 40 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha nucleasa es una ADN glucosilasa o AP endonucleasa.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho resto interno modificado es un resto de uracilo o de inosina.
- 45 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la nucleasa reconoce el resto de uracilo o de inosina y escinde dicho tercer cebador bloqueado en extensión en el resto de uracilo o de inosina.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la nucleasa reconoce un error de emparejamiento de bases entre la base no complementaria de dicho tercer cebador bloqueado en extensión y dicho ácido nucleico diana y escinde dicho tercer cebador bloqueado en extensión en dicha base no complementaria.
- 50 7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha nucleasa se selecciona del grupo que consiste en fpg, Nth, MutY, MutS, MutM, MUG de *E. coli*, MUG humana, Ogg1 humana, glucosilasas tipo Nei (Neil) de vertebrados, uracil glucosilasa, hipoxantina-ADN glucosilasa y sus análogos funcionales.
- 55 8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha nucleasa es Nfo de *E. coli* o exonucleasa III de *E. coli* y en el que el resto modificado es un resto de tetrahidrofurano o enlazador de carbono.
9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la base interna modificada se selecciona de entre el grupo que consiste en 8-oxoguanina, timina glicol y simulador de sitio abásico.
- 60 10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el simulador de sitio abásico es un resto de tetrahidrofurano o espaciador D.
- 65 11. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho tercer cebador bloqueado en extensión comprende un resto en 3' bloqueado que es resistente a la ampliación por la ADN polimerasa.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que el resto en 3' bloqueado comprende un resto bloqueador que evita la extensión del cebador por la polimerasa.
- 5 13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que el resto bloqueador está unido al sitio 3' o 2' del azúcar del resto en 3'.
14. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que el resto bloqueador es un marcador detectable.
- 10 15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que dicho marcador detectable se selecciona de entre el grupo que consiste en un fluoróforo, una enzima, un extintor, un inhibidor de enzimas, un marcador radiactivo, un miembro de un par de unión y una combinación de los mismos.
16. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que el resto en 3' bloqueado es un didesoxinucleótido.
- 15 17. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho primer cebador de ácido nucleico comprende un primer marcador detectable y dicho tercer cebador bloqueado en extensión comprende un segundo marcador detectable.
- 20 18. Procedimiento según la reivindicación 17, en el que dichos primer y segundo marcadores detectables son diferentes y la producción de dicho segundo ácido nucleico bicatenario ampliado se controla detectando la presencia de los primer y segundo marcadores detectables en una sola molécula de ADN bicatenario.
- 25 19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que la producción de dicho segundo ácido nucleico ampliado bicatenario se detecta por un ensayo de tipo sándwich en el que un primer anticuerpo se une a dicho primer marcador detectable y un segundo anticuerpo se une a dicho segundo marcador detectable.
- 30 20. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el tercer cebador bloqueado en extensión comprende además uno o más marcadores detectables.
- 35 21. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que dicho procedimiento comprende además la etapa de controlar el avance de la reacción de ARP detectando dicho marcador detectable en el tercer cebador bloqueado en extensión.
- 40 22. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que dicho marcador detectable se selecciona de entre el grupo que consiste en un fluoróforo, una enzima, un extintor, un inhibidor de enzimas, un marcador radiactivo, un miembro de un par de unión y una combinación de los mismos.
- 45 23. Procedimiento según la reivindicación 22, en el que el fluoróforo está unido al tercer cebador bloqueado en extensión por un resto de fluoróforo-dT amidita.
- 50 24. Procedimiento según la reivindicación 22, en el que el extintor está unido al tercer cebador bloqueado en extensión por un resto de extintor-dT amidita.
- 55 25. Procedimiento según la reivindicación 22, en el que dicho tercer cebador bloqueado en extensión comprende un fluoróforo y un extintor.
- 60 26. Procedimiento según la reivindicación 25, en el que dichos fluoróforo y extintor están separados por entre 0 a 2 bases, 0 a 5 bases, 0 a 8 bases o 0 a 10 bases.
- 65 27. Procedimiento según la reivindicación 25, en el que dichos fluoróforo y extintor están separados por una distancia mayor cuando el cebador bloqueado en extensión se deshibrida que cuando el cebador bloqueado en extensión se hibrida con el ácido nucleico diana.
28. Procedimiento según la reivindicación 25, en el que el fluoróforo o el extintor está unido al resto interno no complementario o modificado y en el que el fluoróforo y el extintor están separados después de la escisión de la base interna modificada por la nucleasa.
29. Procedimiento según la reivindicación 25, en el que el fluoróforo se selecciona de entre el grupo de fluoresceína, FAM y TAMRA.
30. Procedimiento según la reivindicación 25, en el que el extintor es un extintor oscuro.
31. Procedimiento según la reivindicación 30, en el que dicho extintor oscuro se selecciona del grupo que consiste en Dark Quencher 1, Dark Quencher 2, Black Hole Quencher 1 y Black Hole Quencher 2.
32. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el primer cebador, el segundo cebador o el tercer cebador bloqueado en extensión es de 12 a 30 restos de longitud, de 12 a 40 restos de longitud o de 12 a 60 restos de

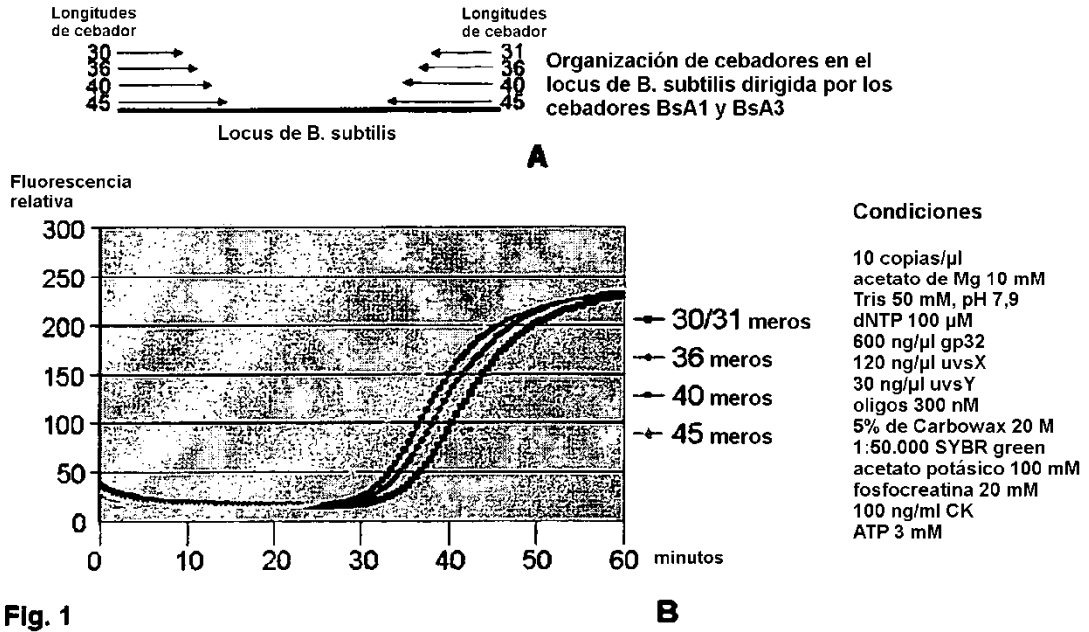
longitud.

- 5 33. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento se lleva a cabo a una temperatura de entre 14°C y 21°C, 21°C y 25°C, 25°C y 30°C, 30°C y 37°C o 40°C y 43°C.
34. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento amplía por lo menos la tercera parte de dicho ácido nucleico diana por lo menos 10^7 veces.
- 10 35. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento se lleva a cabo en presencia de 1% a 12% de PEG, de tal manera que PEG estimula la ampliación.
36. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que dicho procedimiento se lleva a cabo en presencia de 6% a 8% de PEG, de tal manera que PEG estimula la ampliación.
- 15 37. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho dNTP comprende dUTP y en el que dicho procedimiento de ARP se lleva a cabo en presencia de uracil glucosilasa durante un primer periodo de menos de 20 minutos y en el que dicho procedimiento se lleva a cabo en presencia de inhibidor de uracil glucosilasa después de dicho primer periodo.
- 20 38. Procedimiento según la reivindicación 37, en el que dicho procedimiento se realiza sin inactivación a base de temperatura de dicha uracil glucosilasa.
39. Procedimiento según la reivindicación 37, en el que dicho inhibidor de uracil glucosilasa es el inhibidor de uracil glucosilasa de fagos de *Bacillus subtilis* PBS1 o el inhibidor de uracil glucosilasa de fagos de *Bacillus subtilis* PBS2.
- 25 40. Procedimiento de ARP múltiple, que comprende las etapas de realizar más de un procedimiento de ARP en uno o más ácidos nucleicos diana bicatenarios en una reacción en el que cada procedimiento comprende las etapas siguientes:
- 30 (a) poner en contacto un agente recombinasa con un primer y un segundo cebador de ácido nucleico y un tercer cebador bloqueado en extensión comprendiendo dicho cebador bloqueado en extensión uno o más restos internos no complementarios o modificados para formar un primero, un segundo y un tercer cebador de nucleoproteína;
- 35 (b) poner en contacto los primer y segundo cebadores de nucleoproteína con dicho ácido nucleico diana bicatenario formando de este modo una primera estructura bicatenaria entre dicho primer cebador de nucleoproteína y dicha primera cadena de ADN en una primera porción de dicha primera cadena y una segunda estructura bicatenaria entre dicho segundo cebador de nucleoproteína y dicha segunda cadena de ADN en una segunda porción de dicha segunda cadena de tal manera que los extremos 3' de dicho primer cebador de nucleoproteína y dicho segundo cebador de nucleoproteína están orientados uno hacia el otro en la misma molécula de ácido nucleico diana con una tercera porción de ácido nucleico diana entre dichos extremos 3';
- 40 (c) extender el extremo 3' de dichos primer cebador de nucleoproteína y segundo cebador de nucleoproteína con uno o más polimerasas y dNTP para generar un primer ácido nucleico diana ampliado con una región interna que comprende la tercera porción del ácido nucleico;
- 45 (d) poner en contacto dicho ácido nucleico diana ampliado con dicho tercer cebador de nucleoproteína para formar una tercera estructura bicatenaria en la tercera porción de dicho ácido nucleico diana ampliado en presencia de una nucleasa, en el que dicha nucleasa escinde específicamente dicho resto interno no complementario o modificado sólo después de la formación de dicha tercera estructura bicatenaria para formar un tercer cebador bloqueado en extensión en 3' y un tercer cebador en 5';
- 50 (e) extender el extremo 3' de dicho tercer cebador en 5' con uno o más polimerasas y dNTP para generar un segundo ácido nucleico bicatenario ampliado que comprende dicho primer cebador de ácido nucleico y dicho tercer cebador en 5';
- 55 (f) continuar la reacción mediante la repetición de (b) a (e) hasta que se alcanza un grado deseado del segundo ácido nucleico bicatenario ampliado;
- 60 en el que cada procedimiento de ARP se lleva a cabo con una combinación diferente de dichos primer y segundo cebadores de ácido nucleico y en el que cada procedimiento se realiza con el mismo tercer cebador bloqueado en extensión.
- 65 41. Procedimiento según la reivindicación 40, en el que dichos más de un procedimientos de ARP comprenden por lo menos 2 procedimientos de ARP separados, por lo menos 4 procedimientos de ARP separados, por lo menos 5 procedimientos de ARP separados, por lo menos 7 procedimientos de ARP separados o por lo menos 10

procedimientos de ARP separados.

- 5 42. Procedimiento según la reivindicación 40, en el que dicho resto interno modificado es un resto de uracilo o de inosina.
43. Procedimiento según la reivindicación 40, que comprende además la etapa de detectar la formación de dicho segundo ácido nucleico ampliado bicatenario para determinar la ampliación acumulada de cualquiera de dichos más de un procedimiento de RPA.
- 10 44. Procedimiento según la reivindicación 40, en el que el primer cebador de ácido nucleico de cada procedimiento de RPA se marca con el mismo primer marcador detectable, en el que dicho tercer cebador bloqueado en extensión se marca con un segundo marcador detectable, y en el que dicha etapa de detección comprende detectar un ácido nucleico bicatenario que comprende tanto dicho primer marcador detectable como dicho segundo marcador detectable.
- 15 45. Procedimiento según la reivindicación 44, en el que la producción de dicho segundo ácido nucleico bicatenario ampliado se detecta por un ensayo de tipo sándwich en el que un primer anticuerpo se une a dicho primer marcador detectable y un segundo anticuerpo se une a dicho segundo marcador detectable.
- 20 46. Procedimiento según la reivindicación 40, en el que dicha nucleasa es una ADN glucosilasa o una AP endonucleasa.
47. Procedimiento según la reivindicación 40, en el que la nucleasa reconoce un error de emparejamiento de bases entre la base no complementaria de dicho tercer cebador bloqueado en extensión y dicho ácido nucleico diana, y escinde dicho tercer cebador bloqueado en extensión en dicha base no complementaria.
- 25 48. Procedimiento según la reivindicación 40, en el que dicha nucleasa se selecciona de entre el grupo que consiste en fpg, Nth, MutY, MutS, MutM, MUG de *E. coli*, MUG humana, Ogg1 humana, glucosilasas de tipo Nei (Neil) de vertebrados, uracil glucosilasa, hipoxantina-ADN glucosilasa, y sus análogos funcionales.
- 30 49. Procedimiento según la reivindicación 40, en el que dicha nucleasa es Nfo de *E. coli* o exonucleasa III de *E. coli* y en el que el resto modificado es un resto de tetrahidrofurano o de enlazador de carbono.
50. Procedimiento según la reivindicación 40, en el que la base interna modificada se selecciona de entre el grupo que consiste en 8-oxoguanina, timina glicol o un simulador de sitio abásico.
- 35 51. Procedimiento según la reivindicación 50, en el que el simulador de sitio abásico es un resto de tetrahidrofurano o espaciador D.
- 40 52. Procedimiento según la reivindicación 40, en el que dicho tercer cebador bloqueado en extensión comprende un resto bloqueado en 3' que es resistente a la extensión por la ADN polimerasa.
53. Procedimiento según la reivindicación 52, en el que el resto bloqueado en 3' comprende un resto bloqueador que evita la extensión del cebador por la polimerasa.
- 45 54. Procedimiento según la reivindicación 52, en el que el resto bloqueador está unido al sitio 3' o 2' del resto de azúcar en 3'.
- 50 55. Procedimiento según la reivindicación 54, en el que el resto bloqueado en 3' es un didesoxinucleótido.

Las “velocidades” del cebador pueden aumentarse por alargamiento en 3’ – pruebas de cebadores en estudio BsA1 y BsB3 que se dirigen al ADN genómico de *B. subtilis*



La ampliación del amplicón de *Bacillus* a temperatura ambiente solamente opera con cebadores alargados en 3' de 45 restos de longitud

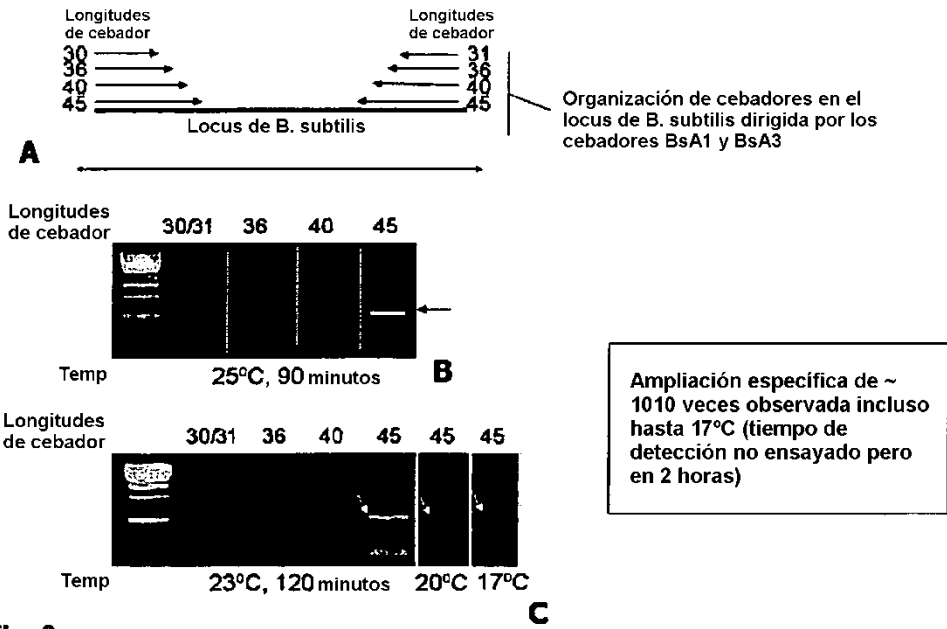


Fig. 2

ARP a baja temperatura demuestra cinética más lenta – PEG puede optimizarse

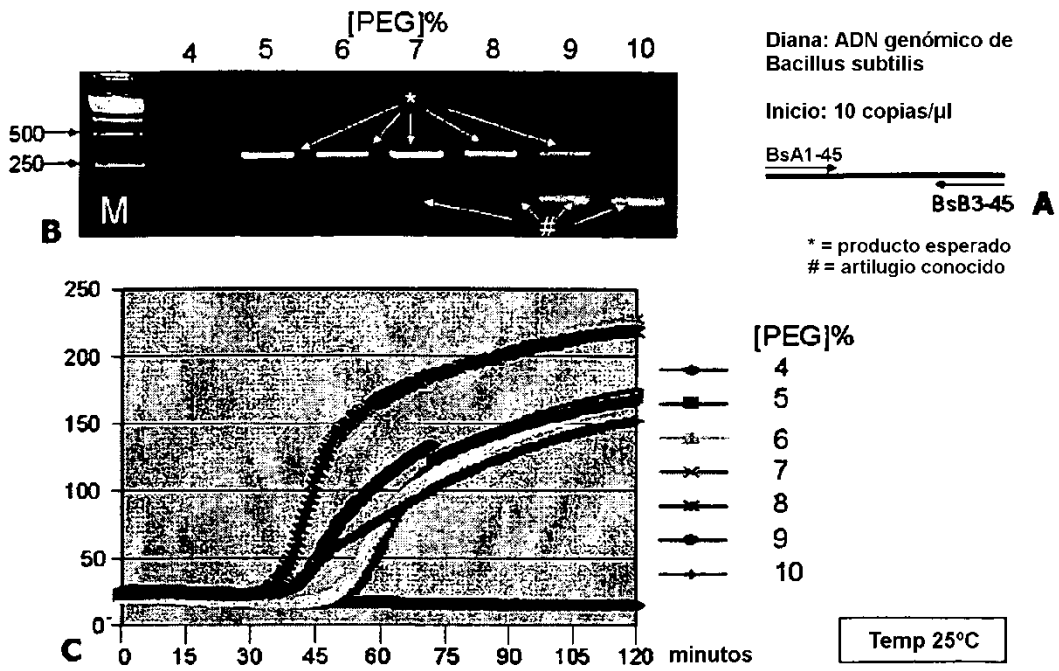


Fig. 3

Algunos cebadores no restringen la velocidad incluso a longitudes más cortas

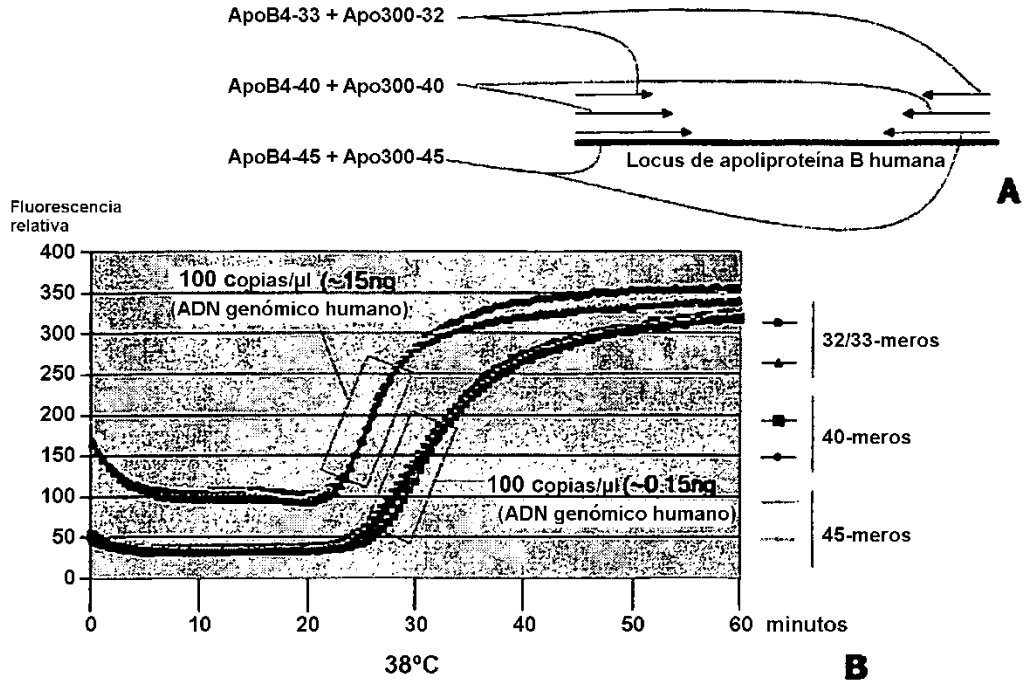


Fig. 4

Los cebadores Apo300 y ApoB4 de apolipoproteína B son cebadores “rápidos” aún cuando no se alarguen en 3' y operen a temperatura ambiente (25°C)

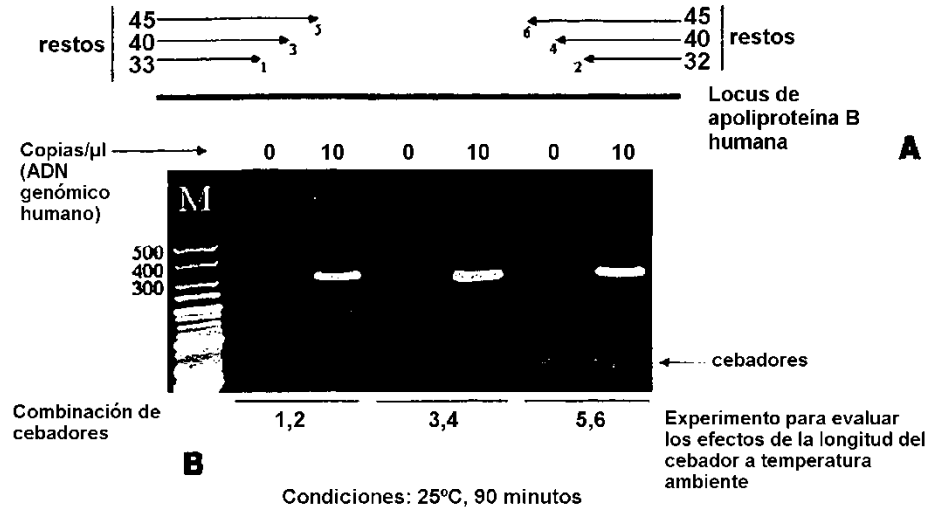
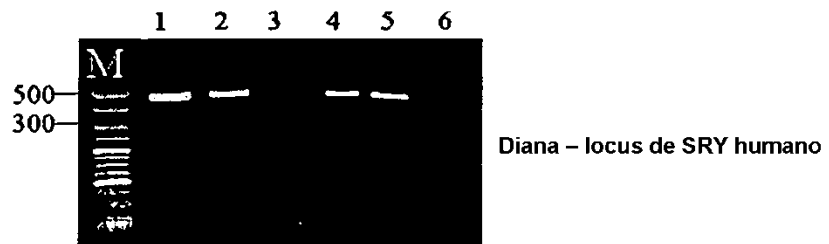


Fig. 5

**Control de contaminación por arrastre
utilizando inhibidor de UNG de E- coli y UNG**

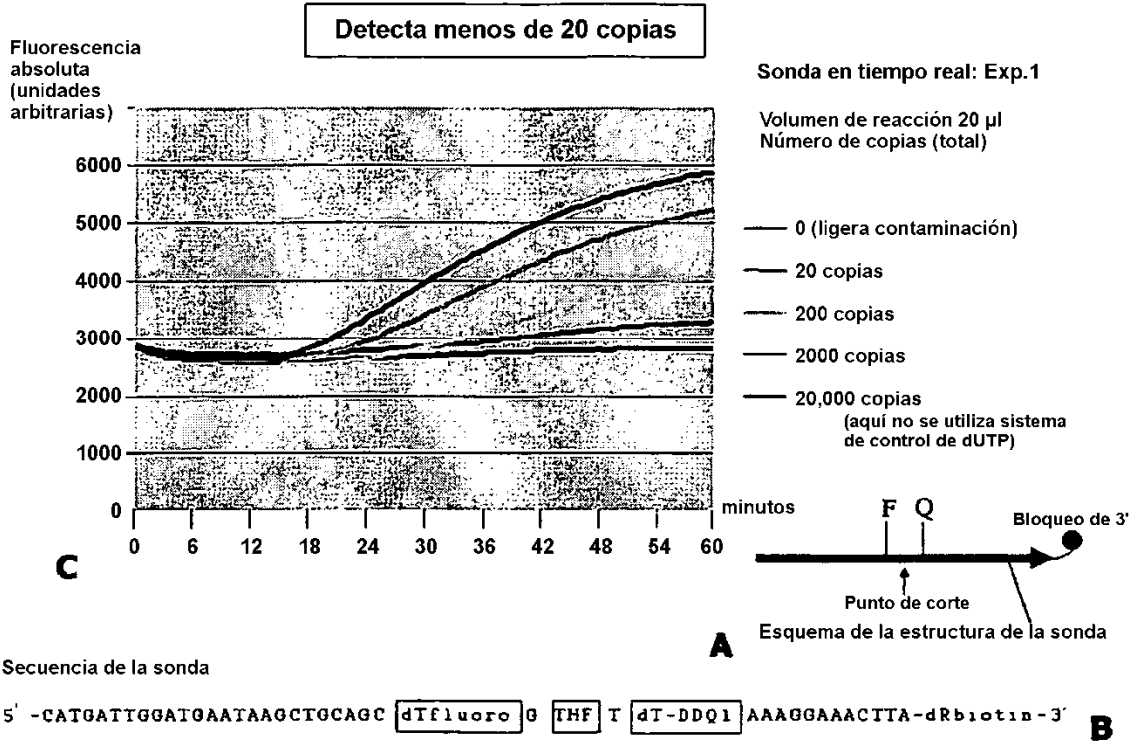


1. Plantilla
2. Plantilla + UNG (5 minutos) + inhibidor de UNG (después de 5 minutos)
3. Plantilla + ADN contaminante (que contiene dUTP) + UNG
4. Plantilla + ADN contaminante (que contiene dUTP) + UNG (5 min.) + inhibidor de UNG
5. ADN contaminante (que contiene dUTP)
6. ADN contaminante (que contiene dUTP) + UNG (5 min.) + inhibidor de UNG

Fig. 6

Fig. 7

Desarrollo de un tercer sistema de detección de sondas



Desarrollo de un tercer sistema de detección de sondas

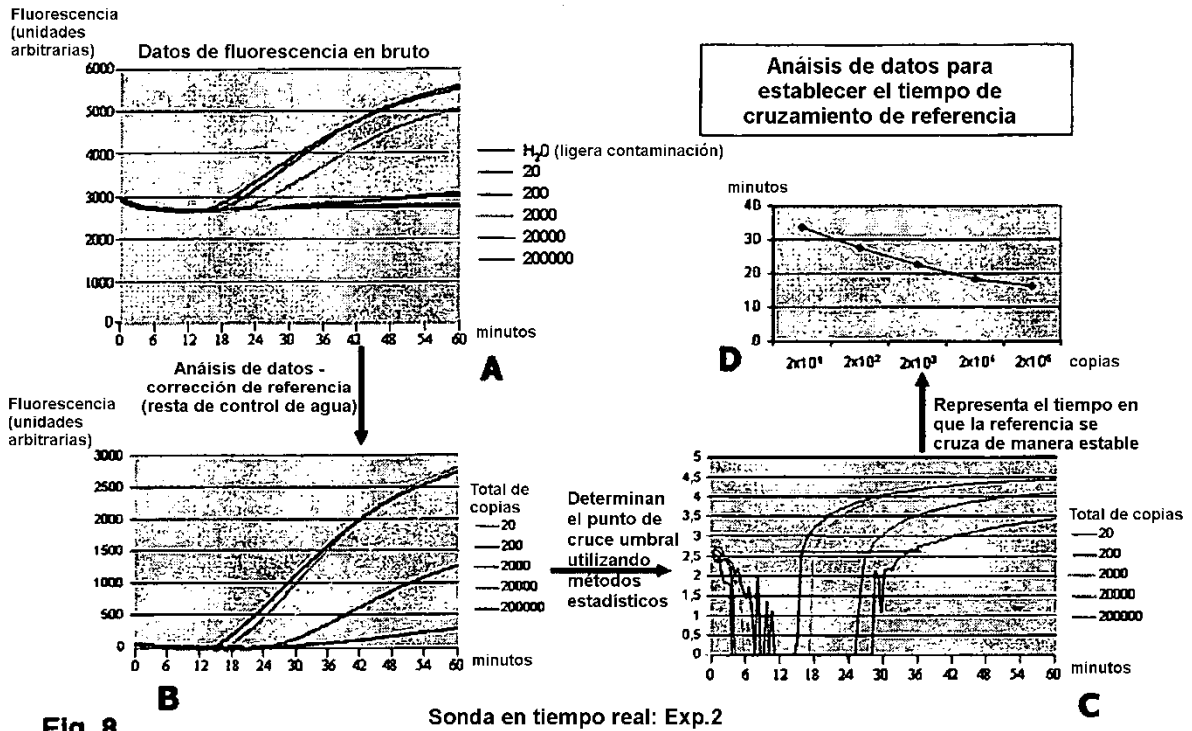
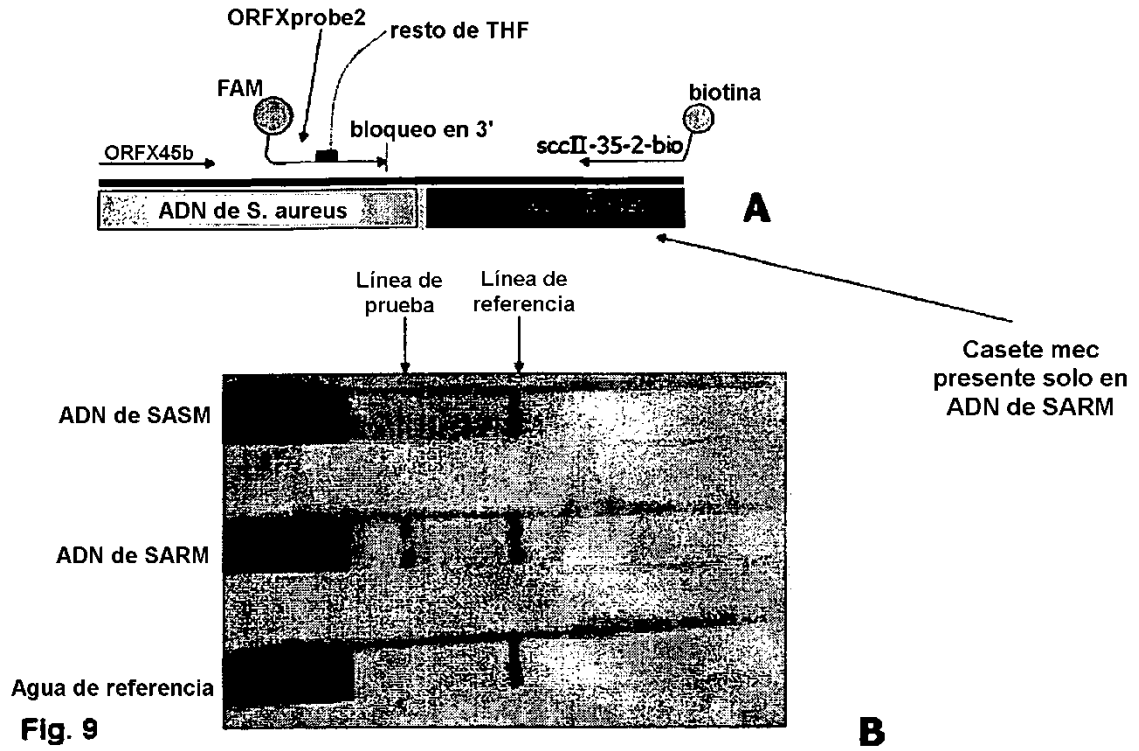


Fig. 8

Sonda en tiempo real: Exp.2

Utilización de cebadores bloqueados de manera reversible para conseguir relaciones señal:ruido altas para ensayos de tipo sándwich



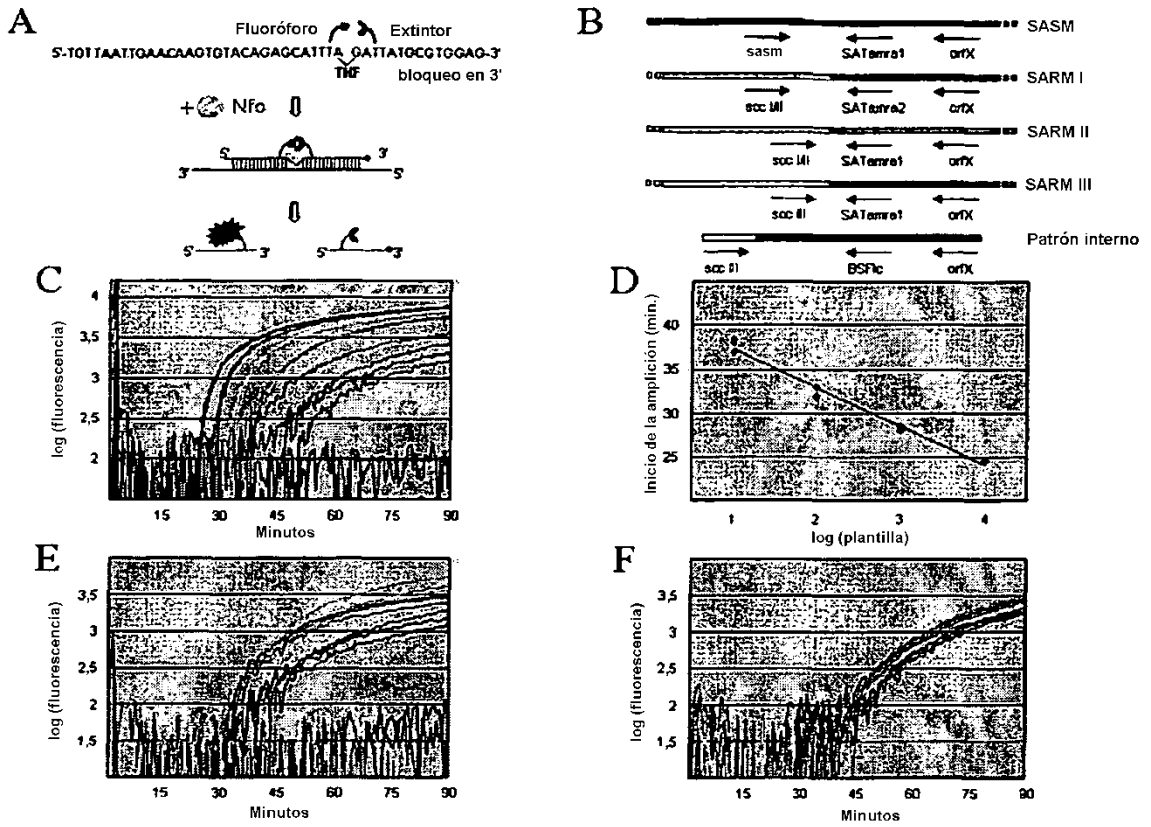


Figura 10

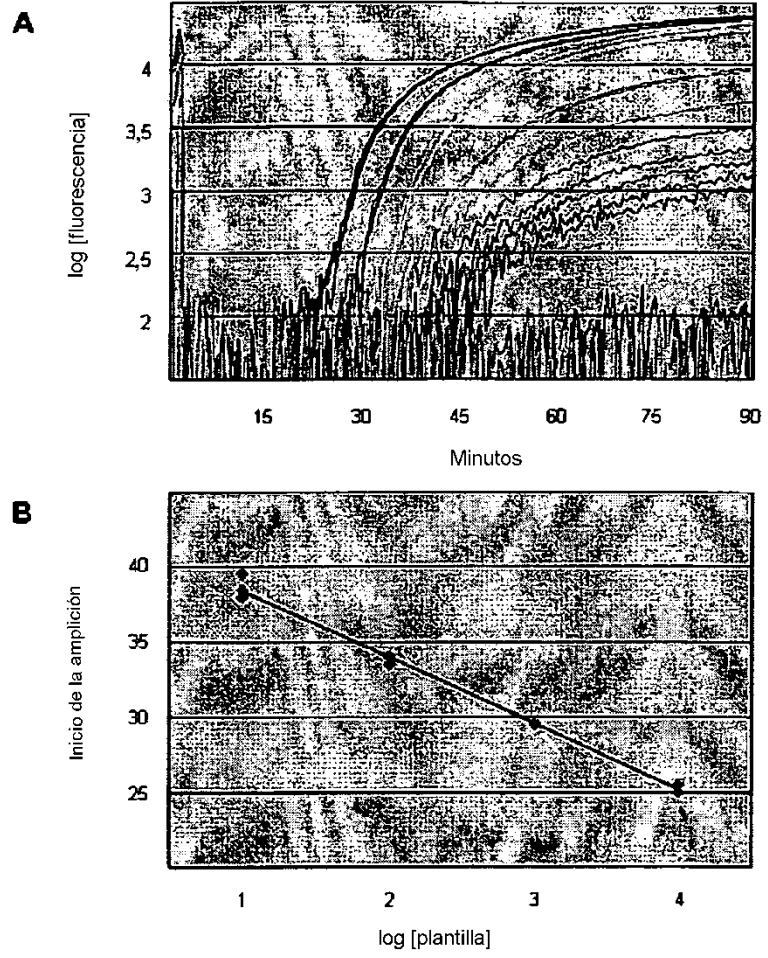


Figura 11

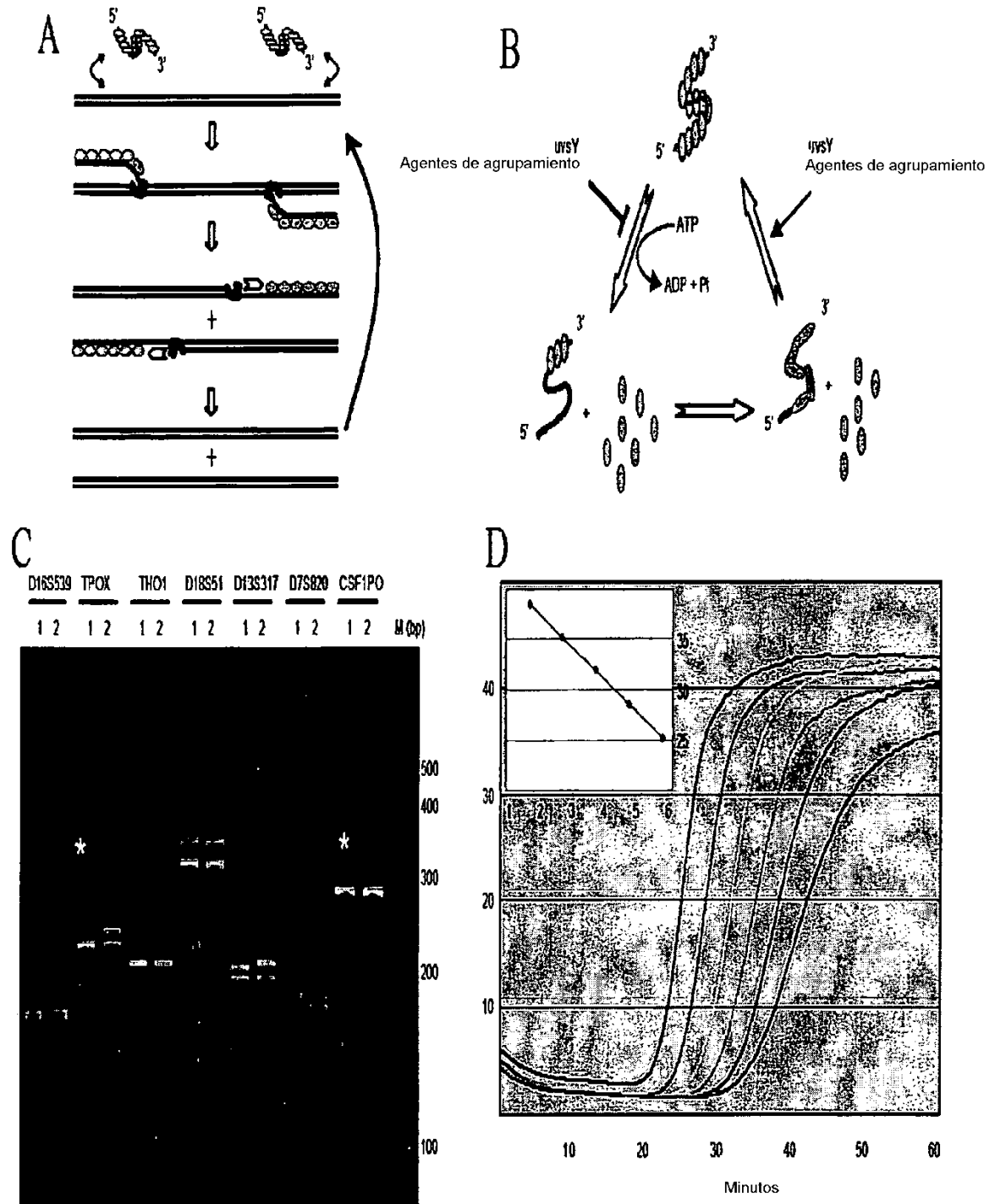


Figura 12

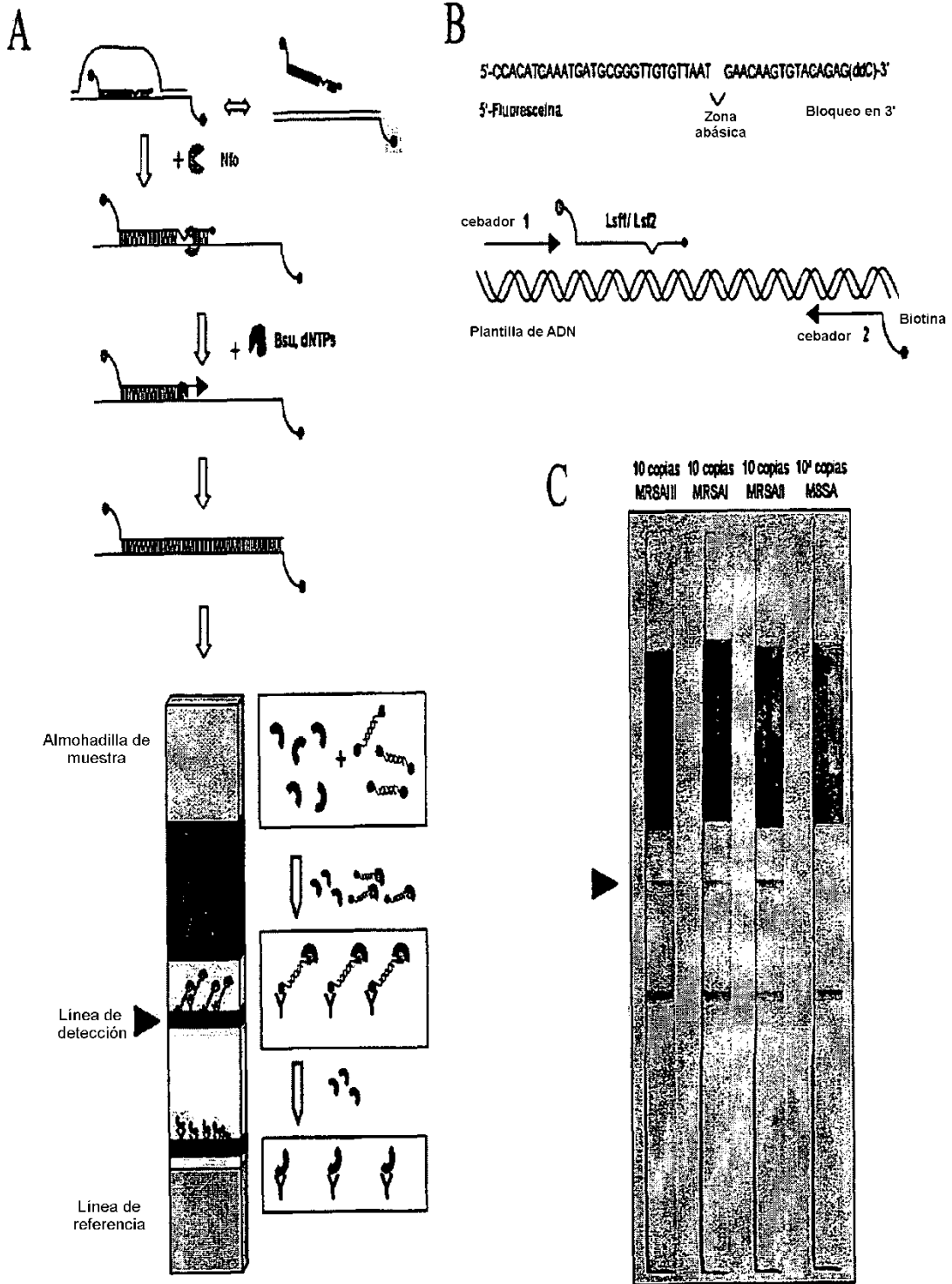


Figura 13

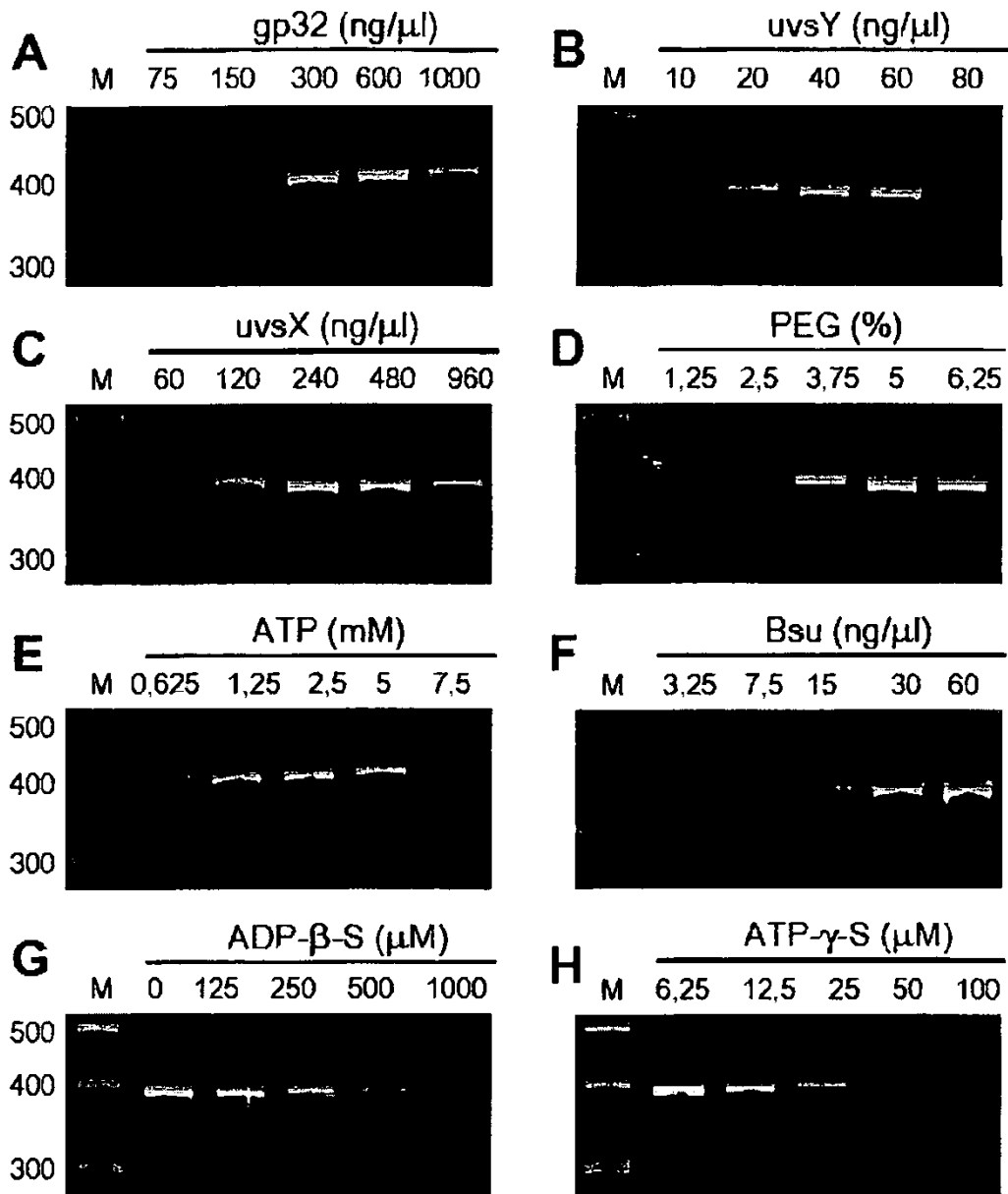


Figura 14

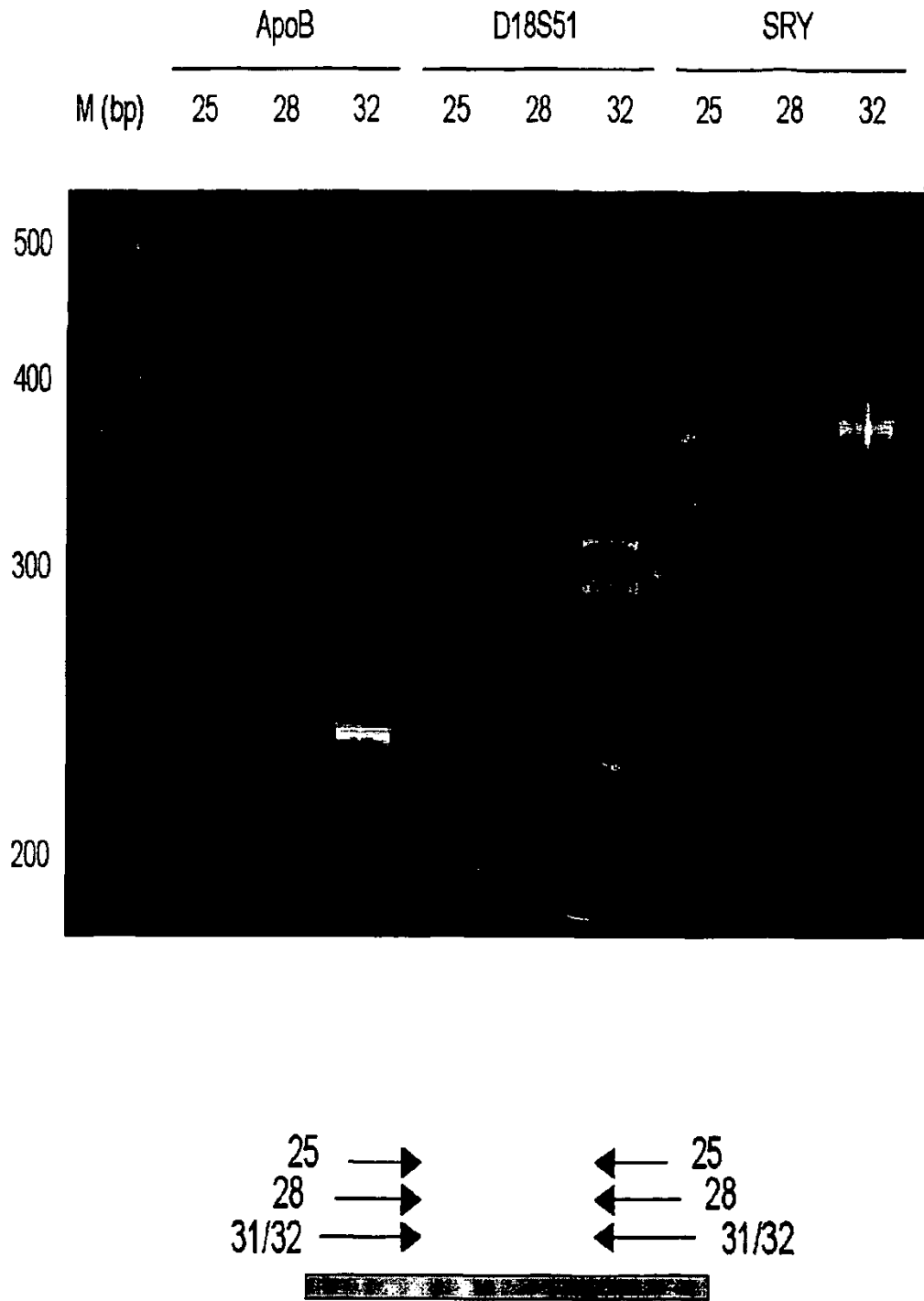


Figura 15

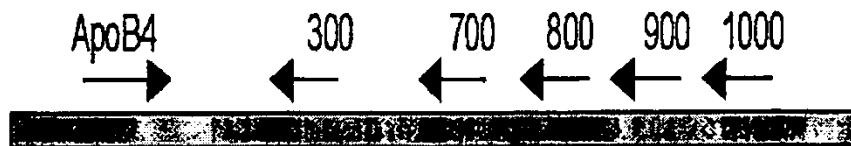
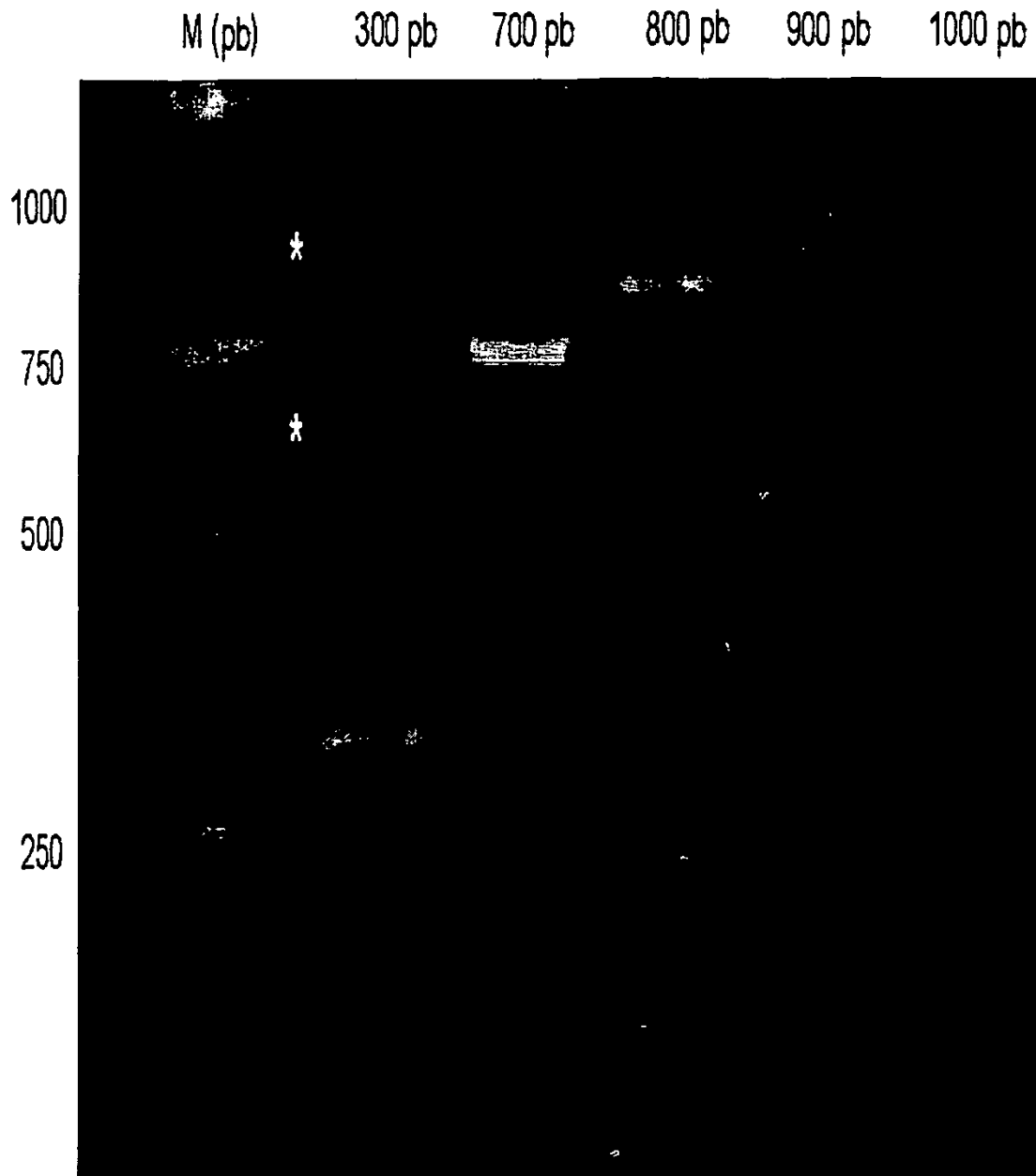


Figura 16