

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 354**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

B82Y 10/00 (2011.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2005 E 05741662 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 1759012**

54 Título: **Amplificación por recombinasa-polimerasa**

30 Prioridad:

01.06.2004 US 576148 P

01.06.2004 US 576162 P

01.09.2004 US 931916

26.10.2004 US 622291 P

02.12.2004 US 632746 P

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

14.10.2013

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.;
ARMES, NIALL, A. y
STEMPLE, DEREK, L.

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 425 354 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

Amplificación por recombinasa-polimerasa.

5 **Antecedentes de la invención**

La capacidad para amplificar ADN se encuentra en el centro de la investigación biológica y médica moderna. Esto es así porque la mayoría de las técnicas de biología molecular se basan en muestras que contienen muchas moléculas idénticas para aumentar la sensibilidad de un ensayo o para preparar suficiente material para un procesamiento adicional. Entre las diversas técnicas de amplificación de ácido nucleico, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la más común debido a su sensibilidad y eficacia en la amplificación de secuencias de ácido nucleico cortas.

Aunque la PCR es de gran utilidad, también está limitada de varias maneras. La primera limitación de la PCR es que se basa en múltiples ciclos de fusión térmica (desnaturalización) a altas temperaturas seguidos por hibridación y elongación a una temperatura reducida. Para maximizar la eficacia y minimizar el ruido, se requiere un complejo control de temperatura de múltiples reacciones. Esto necesita la utilización de un bloque de calentamiento/enfriamiento rápido controlable por termociclador fabricado de material exótico (por ejemplo, bloques de plata recubiertos con oro), o un mecanismo robótico para mover muestras entre zonas de temperatura controlada. Debido a la alta temperatura requerida para fundir el ADN en condiciones salinas fisiológicas, la tecnología de PCR requiere o bien la adición de polimerasa nueva por ciclo o bien la utilización de polimerasas termoestables. El enfoque de añadir polimerasa nueva no se ha automatizado y por tanto requiere mucho trabajo y es propenso a errores (por ejemplo, contaminación, caída de tubos, errores de etiquetado). Además, la necesidad de añadir enzimas y de mezclar cada reacción individualmente presenta graves inconvenientes que presentan una adaptación limitada de procedimientos de PCR con adición de enzimas a pequeña escala.

En comparación con procedimientos que implican la adición de polimerasa nueva, la utilización de polimerasas termoestables en PCR es el más comúnmente empleado. Este enfoque presenta el inconveniente de que las polimerasas termoestables se encuentran en un número limitado de organismos, y los mecanismos de replicación utilizados por organismos termófilos se entienden mal. El repertorio disponible de polimerasas termoestables está limitado a enzimas polimerasas de un único polipéptido que participan en la reparación de ADN, y/o síntesis de la cadena retrasada. Las polimerasas de reparación de ADN y/o cadena retrasada son malas opciones para la amplificación de ADN porque muestran una escasa capacidad de procesamiento (síntesis distributiva). En parte como consecuencia de la utilización de polimerasas de reparación y/o cadena retrasada (por ejemplo polimerasas Taq, Pfu, Vent), y debido a la formación de estructuras de ácido nucleico secundarias o terciarias inhibitoras tras la fusión térmica, los protocolos de PCR actuales no amplifican fácilmente secuencias de más de varios miles de pares de bases. La síntesis (y amplificación) fiable de moldes más largos se basará en polimerasas y complejos enzimáticos auxiliares que muestren colectivamente niveles muy superiores de capacidad de procesamiento, desplazamiento de cadena y resolución de estructuras secundarias, así como que limiten la formación de estructuras de ácido nucleico de orden superior inhibitoras que pueden formarse al enfriar ADN desnaturalizado por calor.

Una segunda limitación de la PCR es que se basa en hibridación en disolución entre oligonucleótidos (cebadores de PCR) y ADN de molde desnaturalizado (es decir, el ADN que va a amplificarse) en un entorno acuoso. Para ser eficaces, las reacciones de PCR se realizan en un tiempo corto porque las polimerasas termoestables presentan una actividad que disminuye rápidamente a las temperaturas de PCR. Además, para una hibridación eficaz en un tiempo corto, una característica crítica para un resultado rápido, es necesario realizar la PCR en un entorno con altas concentraciones de oligonucleótidos. La alta concentración de oligonucleótidos también garantiza la rápida interacción de secuencias diana con los oligonucleótidos en competición con la cadena complementaria desnaturalizada por calor que todavía está presente en disolución. Las altas concentraciones de cebadores oligonucleotídicos pueden provocar problemas, particularmente cuando el número de copias de la secuencia diana es bajo y está presente en una mezcla compleja de moléculas de ADN. Este sería el caso, por ejemplo, en una PCR de un genoma para determinar el polimorfismo genético en un locus.

Un problema con la utilización de altas concentraciones de oligonucleótidos es que potencia el grado de falso cebado en secuencias apareadas sólo parcialmente en la mezcla de ADN compleja. El falso cebado se refiere a la hibridación de un cebador con un ADN de molde en PCR incluso cuando la secuencia del cebador no es completamente complementaria al ácido nucleico de molde, lo cual puede conducir a una amplificación no específica de ácidos nucleicos. El ruido, debido al falso cebado, aumenta con la concentración de oligonucleótidos y la complejidad del ADN de partida total. Además, la posibilidad de falso cebado aumenta a medida que disminuye el número de copias de las secuencias diana. Cuando las condiciones para el falso cebado son favorables (es decir, alta concentración de oligonucleótidos, alta complejidad, bajo número de copias), secuencias amplificadas errantes pueden convertirse en un producto de reacción dominante. Por consiguiente, puede ser difícil identificar condiciones, y oligonucleótidos, para una amplificación limpia de secuencias diana a partir de un ADN de muestra sin un exceso de fondo de falso cebado. Por tanto una desventaja adicional de utilizar PCR es el limitado éxito para amplificar de manera limpia ADN diana poco frecuentes a partir de mezclas de secuencias complejas.

Una solución a los problemas de especificidad y al problema de fusión de molde que presenta la PCR es emplear procedimientos que se basen en las propiedades biológicas de la proteína recombinasa RecA bacteriana, o sus proteínas relacionadas procariotas y eucariotas. Estas proteínas recubren ADN monocatenario (ADNmc) para formar filamentos, que después barren ADN bicatenario (ADNbc) para detectar regiones de homología de secuencia. Cuando se localizan secuencias homólogas, la cadena de filamento de nucleoproteína invade el ADNbc creando un híbrido corto y una burbuja de cadena desplazada conocida como bucle D. El extremo 3' libre de la cadena de filamento en el bucle D puede extenderse mediante ADN polimerasas para sintetizar una nueva cadena complementaria. La cadena complementaria desplaza a la cadena originalmente apareada a medida que se elonga. Utilizando pares de oligonucleótidos de una manera similar a la utilizada en PCR debe ser posible amplificar secuencias de ADN diana de una manera análoga pero sin ningún requisito de fusión térmica (termociclado). Esto presenta la ventaja tanto de permitir la utilización de polimerasas termolábiles que anteriormente no podían utilizarse en PCR, como de aumentar la fidelidad y sensibilidad mediante barrido de molde e invasión de cadena en vez de hibridación.

Aunque la utilización de *RecA* y sus homólogos para la amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos se ha descrito anteriormente (patente US 5.223.414 concedida a Zarlring *et al.*, mencionada en la presente memoria "Zarlring"), el procedimiento y los resultados son limitados. El procedimiento de Zarlring presenta fallos críticos que limitan su capacidad para alcanzar una amplificación exponencial de ADN bicatenario. El fallo del procedimiento de Zarlring en alcanzar la amplificación exponencial puede deberse a su especificación de la utilización de ATPγS en vez de ATP. El procedimiento de Zarlring insta a utilizar ATPγS, en vez de ATP, en el ensamblaje de filamentos de nucleoproteína de *RecA* porque da como resultado una estructura de filamento de *RecA*/ADNmc más estable. Normalmente, los filamentos se ensamblan en el sentido de 5' a 3' y se desensamblarán espontáneamente en el mismo sentido de 5' a 3' a medida que *RecA* hidroliza ATP. Este procedimiento es dinámico porque el ensamblaje y el desensamblaje se producen al mismo tiempo y la cantidad de filamentos ensamblados está en equilibrio. Si se utiliza el análogo de ATP no hidrolizable, ATPγS, se inhiben la hidrólisis de ATPγS y el desensamblaje de 5' a 3' de los filamentos. La gran estabilidad de filamentos de *RecA*/ATPγS, tanto antes como después del intercambio de cadena, aunque es útil en el procedimiento de selección como diana (es decir, el procedimiento de Zarlring), es perjudicial y no resulta práctica para la amplificación de ADN.

En el procedimiento de Zarlring, la proteína *RecA* implicada en la invasión de cadena permanecerá asociada con la parte bicatenaria del material intercambiado tras el intercambio de cadena. Esta interacción se produce porque el dúplex recién formado está unido al sitio de alta afinidad de *RecA*. La cadena desplazada ocupa un sitio de baja afinidad diferente, a menos que esté unida a otra proteína de unión (SSB) a ADN monocatenario, tal como SSB de *E. coli*. Si se ha utilizado ATP para generar la estructura de intercambio, puede producirse desensamblaje de 5' a 3' espontáneo, aunque el complejo de intercambio puede ser bastante estable y puede requerir factores adicionales para estimular el desensamblaje dependiente de ATP. Independientemente de si es espontáneo o está estimulado, en presencia de ATPγS, se inhibe el desensamblaje de 5' a 3' del filamento de *RecA* (Paulus, B. F. y Bryant, F. R. (1997). *Biochemistry* 36, 7832-8; Rosselli, W. y Stasiak, A. (1990). *J Mol Biol* 216, 335-52; Shan, Q. *et al.*, (1997). *J Mol Biol* 265, 519-40).

Estos complejos de *RecA*/ADNbc son precisamente los sitios seleccionados como diana por los complejos *RecA*/cebador de ADNmc utilizados para iniciar rondas posteriores de invasión y síntesis. De hecho, con la *RecA* unida, el producto intermedio puede no estar accesible para polimerasa, y algunos de los ADNbc ya no pueden invadirse por los complejos de *RecA*/cebador de ADNmc y por tanto no pueden amplificarse a partir de este punto. Puede producirse síntesis adicional a partir de estos moldes si se inicia en el otro extremo del molde, que está libre de *RecA*, y esto puede conducir finalmente a un desplazamiento físico de la *RecA* unida. Sin embargo, no queda claro si muchas polimerasas pueden desplazar *RecA* de esta manera. Además, en vez de eso ahora el sitio de iniciación para esa ronda sintética estará "bloqueado". En una situación de este tipo, la amplificación sólo es lineal con el tiempo, y generará predominantemente productos de amplificación de ADN monocatenario.

Por tanto, el procedimiento de Zarlring descrito, en el mejor de los casos, es probable que genere poco más que pequeñas cantidades de copias de ADNmc a partir de cada molde. La amplificación lineal proporcionada posiblemente por el procedimiento de Zarlring sólo se producirá en presencia de SSB, ya que la cadena desplazada seguirá estando unida al segundo sitio de interacción en *RecA*, y no se liberará ADN monocatenario (Mazin, A. V. y Kowalczykowski, S. C. (1998). *EMBO J* 17, 1161-8). Esto explica probablemente por qué el procedimiento de Zarlring observó fragmentos con migración más rápida adicionales cuando incluyeron SSB. Estos fragmentos adicionales eran lo más probablemente fragmentos monocatenarios desplazados. Por tanto, en el procedimiento de Zarlring en el mejor de los casos sólo se producirá amplificación lineal de ADN monocatenario. Por tanto, existe la necesidad en la materia de un procedimiento de amplificación de ADN dependiente de recombinasa mejorado.

En la presente memoria se describen dos nuevas estrategias de amplificación que evitan cualquier requisito de fusión térmica de ADN o componentes termoestables. Estas estrategias también superan las deficiencias del procedimiento de Zarlring. Como con la estrategia de Zarlring, estos procedimientos se basan en las propiedades biológicas de la proteína *RecA* bacteriana, o sus proteínas relacionadas procariotas y eucariotas, en particular, la proteína UvsX de fago T4. Sin embargo, al contrario que el procedimiento de Zarlring, estos procedimientos están diseñados para alcanzar una amplificación exponencial de ADNbc. Alcanzan esto permitiendo una rápida

regeneración de secuencias que pueden seleccionarse como diana en el ácido nucleico diana en presencia de filamentos de recombinasa/ADN dinámicos, en vez de filamentos no dinámicos cargados con ATP- γ -S, y en un entorno que logra de manera concomitante mantener una alta actividad de recombinación. Además, y de manera crítica, aunque el concepto de elongación a partir de productos intermedios de recombinación se ha visitado anteriormente como concepto, y práctica limitada, tanto en el enfoque de Zarling, como también en el laboratorio de Alberts (Formosa y Alberts, 1996; Morrical y Alberts, 1990; Morrical, Wong y Alberts 1991) y en otras partes (Salinas, Jiang y Kodadek, 1995; More, Cherney, Ehrlich y Cassuto, 1997; solicitud de patente internacional WO 02/086167, Benkovic y Salinas), ninguna de las descripciones hasta la fecha enseña un procedimiento práctico que permita una amplificación exponencial de ADN, sensible, perfectamente específica, con una capacidad para la amplificación de hasta 10 a la potencia 12 veces. Esto es así porque establecer este entorno necesario que soporta alta actividad recombinasa/filamento, pero en presencia de grandes cantidades de las proteínas de unión a ADN monocatenario necesarias en un entorno *in vitro* ha resultado ser un desafío extremo, y este entorno depende completamente de una estricta combinación de componentes. Esto incluye, de la manera más crítica e inesperada, agentes de agrupamiento muy específicos que alteran el comportamiento del sistema *in vitro* de una manera notable y esencialmente impredecible. Esta alteración notable y ampliamente impredecible del comportamiento del sistema con agentes de ocupación de volumen específicos refleja supuestamente su capacidad para generar cinética de tipo fractal, efectos de separación de fases u otras propiedades adicionales en el sistema bioquímico. Identificando tales condiciones precisas para permitir una amplificación de ADN rápida y altamente geométrica, así como las condiciones para impulsar una actividad de recombinación dinámica y persistente alta *in vitro* para otras utilidades, la presente descripción permite una nueva generación de técnicas moleculares *in vitro*. El procedimiento de amplificación descrito realizado en estas condiciones que permiten la reproducibilidad se denomina amplificación por recombinasa-polimerasa (RPA). En la presente memoria se consideran procedimientos aún adicionales basados en este entorno de recombinación de alta actividad, persistente, pero dinámica, que es probable que se pongan en práctica en su debido momento. La presente descripción permite esta nueva generación de enfoques, y debe distinguirse de las circunstancias actuales en las que, a pesar de décadas de investigación, no ha aparecido ninguna otra aplicación ampliamente utilizada de recombinasas para tecnología *in vitro* aparte de un número muy limitado que dependen de la utilización de ATP- γ -S.

En la presente descripción se va más allá y se demuestra que pueden integrarse completamente reacciones de RPA con la detección dinámica de productos de reacción. Esto valida que las reacciones de RPA alcanzan dos criterios generales para el análisis en tiempo real. En primer lugar un sensor bioquímico, tal como colorante de detección tal como SYBR Green o una "tercera" sonda, es compatible con el entorno de reacción de RPA. Tal compatibilidad no es una suposición trivial ya que RPA emplea cantidades saturantes de proteínas de unión a ADN, que podrían interferir con el comportamiento de unión del colorante o la sonda. Al contrario, la unión de colorantes o sondas a ácidos nucleicos podría haber interferido con la actividad de las proteínas de unión a ADN. En segundo lugar, para emplearse en aplicaciones cuantitativas en tiempo real la RPA necesita demostrar una amplificación exponencial de ADN de ADN diana a lo largo de un intervalo significativo de cantidades de molde de partida, y poder mantener la amplificación exponencial hasta concentraciones fácilmente dentro del intervalo de detección del sistema sensor global.

También en la presente descripción se dan a conocer enfoques para controlar, y posiblemente sincronizar aspectos de, reacciones de RPA. En configuraciones actuales de RPA no hay separación temporal entre las fases de selección como diana de ADN y síntesis de ADN. Para RPA, es difícil garantizar que todas las reacciones en RPA se inicien exactamente en el mismo momento a menos que se suministre un reactivo de limitación de la velocidad a todas las muestras simultáneamente, o que se monten las reacciones a una temperatura no permisiva. Se sugieren enfoques mediante los cuales pueden iniciarse reacciones de RPA, y pueden regularse "rondas" individuales de actividad de cebado, limitando la invasión a ráfagas cortas bien separadas. Tales enfoques para limitar la actividad recombinasa a ráfagas limitadas cortas pueden mejorar la amplificación. Una manera de controlar la invasión de ADN en RPA puede ser regulando la concentración de ATP libre. En ausencia de suficiente ATP, o un exceso de ADP, se desensamblan los filamentos de recombinasa/ADN y se detiene la recombinación. ATP enjaulado no soporta la carga de recA, pero el material posteriormente desenjaulado sí [Butler BC, Hanchett RH, Rafailov H, MacDonald G (2002) Investigating Structural Changes Induced By Nucleotide Binding to RecA Using Difference FTIR. Biophys J 82(4): 2198-2210]. Por tanto la utilización de análogos de ATP enjaulados en reacciones de RPA, que pueden desprotegerse en pulsos de luz permitiendo así ráfagas de actividad recombinasa, debe ser un medio eficaz para controlar la fase de invasión de una reacción de RPA. Alternativamente puede controlarse cíclicamente la concentración de ATP mediante procedimientos alternativos tales como adición periódica de ATP a la reacción desde una fuente externa, o estableciendo un oscilador bioquímico que puede generar aumentos periódicos de ATP en la reacción.

En esta descripción se amplía el conocimiento sobre cómo alcanzar una carga de recombinasa/ADNmc ideal gracias al diseño de la secuencia en 5', y se amplía el repertorio de contextos en los que puede emplearse este entorno de recombinación dinámica estable clave además de las reacciones de amplificación de ADN. Se describe cómo puede utilizarse esta composición única para sustituir las etapas de hibridación clásicas en cualquier procedimiento que de lo contrario requeriría fusión térmica o química, u otro enfoque de selección como diana dúplex, en una variedad de aplicaciones moleculares. En particular la utilización de entornos de recombinación dinámica estable en presencia de oligonucleótidos sintéticos será útil en combinación con otros sistemas enzimáticos distintos de los sistemas de

polimerasa descritos anteriormente, debido a la ausencia de necesidad de fusión térmica o química, y la capacidad concomitante para emplear una gama más amplia de enzimas y evitar el equipo de ciclación térmica.

Sumario

5 La invención proporciona un procedimiento de amplificación por recombinasa-polimerasa de amplificación de ADN de una molécula de ácido nucleico diana bicatenario, que comprende una primera y una segunda cadena de ADN, que comprende las etapas siguientes

- 10 (a) poner en contacto un agente de recombinasa con un primer y un segundo cebador de ácido nucleico para formar un primer y un segundo cebador de nucleoproteína que comprende una región monocatenaria en su extremo 3';
- 15 (b) poner en contacto los cebadores de nucleoproteína primero y segundo con dicha molécula de ácido nucleico diana formando así una primera estructura bicatenaria en una primera porción de dicha primera cadena; y una segunda estructura bicatenaria en una segunda porción de dicha segunda cadena;
- 20 (c) extender el extremo 3' de dichos cebadores de nucleoproteína primero y segundo con una o más polimerasas y dNTP para generar un primer y un segundo ácido nucleico bicatenario y una primera y una segunda cadena desplazada de ácido nucleico; y
- (d) continuar la reacción mediante la repetición de (b) y (c) hasta que se alcanza un grado de amplificación deseado,

25 realizándose dicho procedimiento en las etapas (b) y (c) en presencia de un agente de agrupamiento de tal manera que el agente de agrupamiento estimula la amplificación,

en el que además dicho agente de agrupamiento

- 30 (i) se selecciona de entre el grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), dextrano, Ficoll, PEG1450, PEG3000, PEG8000, PEG10000, compuesto de PEG con un peso molecular de entre 15.000 y 20.000 Dalton y una combinación de los mismos; y/o
- 35 (ii) está presente a una concentración de entre el 1% y el 12% en volumen o en peso de la reacción.

Las referencias en la presente memoria a procedimientos de la invención también deben interpretarse como referencias a los procesos de la invención.

40 Se proporciona un procedimiento de amplificación de ADN, denominado RPA, que comprende las siguientes etapas. En primer lugar, se pone en contacto un agente de recombinasa con un primer y un segundo cebador de ácido nucleico para formar un primer y un segundo cebador de nucleoproteína. En segundo lugar, se ponen en contacto los cebadores de nucleoproteína primero y segundo con una secuencia diana bicatenaria para formar una primera estructura bicatenaria en una primera porción de dicha primera cadena y para formar una estructura bicatenaria en una segunda porción de dicha segunda cadena de modo que los extremos 3' de dicho primer cebador de ácido nucleico y dicho segundo cebador de ácido nucleico estén orientados uno hacia el otro en una molécula de ADN de molde dada. En tercer lugar, se extiende el extremo 3' de dichos cebadores de nucleoproteína primero y segundo mediante ADN polimerasas para generar ácidos nucleicos bicatenarios primero y segundo, y cadenas desplazadas de ácido nucleico primera y segunda. Finalmente, se repiten las etapas segunda y tercera hasta que se alcanza un grado de amplificación deseado.

50 La invención también proporciona un procedimiento de RPA anidadas. En una RPA anidada, se amplifica una primera región de ácido nucleico mediante RPA para formar una primera región amplificada. Después se amplifica una segunda región de ácido nucleico que está completamente dentro de la primera región amplificada utilizando RPA para formar una segunda región amplificada. Este procedimiento puede repetirse con tanta frecuencia como sea necesario. Por ejemplo, puede amplificarse una tercera región de ácido nucleico, que está completamente dentro de la segunda región, a partir de la segunda región amplificada mediante RPA. Además de una, dos y tres rondas de RPA comentadas anteriormente, la invención también contempla al menos 4, y preferentemente al menos 5 rondas de RPA anidadas.

60 La invención también permite procedimientos de detección de un genotipo utilizando RPA. Este procedimiento es útil para genotipar, para detectar un estado normal o patológico, una predisposición, o una ausencia de disposición a un estado patológico. Además, puede utilizarse RPA para detectar la presencia de un genoma, tal como por ejemplo, un genoma de un patógeno. En esta utilización, el procedimiento es útil para el diagnóstico y para la detección.

65 La presente descripción también detalla la naturaleza y las concentraciones de recombinasas, proteínas de unión monocatenarias, polimerasas y nucleótidos necesarios para establecer una reacción de amplificación eficaz. La

presente descripción proporciona además una reproducibilidad detallada sobre la naturaleza del ADN diana, la longitud y la composición de oligonucleótidos de selección como diana, y la longitud inter-oligonucleótido óptima para la amplificación en diversas condiciones. El procedimiento de la invención puede incluir componentes adicionales, o la utilización de componentes modificados, que contribuyen a establecer un sistema de amplificación por recombinación-polimerasa que es sensible, robusto y con propiedades de relación señal-ruido óptimas. En particular se demuestra la utilización de más de una especie de recombinasa, y se detalla la utilidad de análogos diseñados por ingeniería y modificados de las recombinasas recA de *E. coli* y uvsX de bacteriófago T4, de polimerasas incluyendo el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli*, polimerasa de Bst, polimerasa de Phi-29, Pol I de *Bacillus subtilis* (Bsu), así como proteínas de unión a ADN monocatenario de *E. coli* y T4 (la proteína gp32).

Se demuestra la utilidad de formas de gp32 con cooperatividad y/o propiedades de asimilación de cadena alteradas. También se muestra la utilización de proteína uvsY de T4, y lo más particularmente de agentes de agrupamiento molecular especialmente compuesto de PEG (también conocido como Carbowax 20M), para ayudar a establecer un entorno de reacción óptimo. Además la presente descripción detalla los efectos y la posible utilización de otras enzimas que participan en el metabolismo de ADN incluyendo topoisomerasas, helicasas y nucleasas, con el fin de mejorar el comportamiento de amplificación. La presente invención también incluye la utilización de condiciones optimizadas para una invasión/extensión repetida de un cebador dirigido a un molde superenrollado o lineal para generar una amplificación lineal, y la utilización de este procedimiento para la secuenciación de ADN. La presente invención también describe la utilización de una recombinasa en la detección de un producto amplificado específico de una reacción dirigiendo oligonucleótidos marcados de alguna manera a la especie de producto específico y midiendo un cambio en el aspecto o una propiedad de los reactivos como consecuencia.

La presente descripción también proporciona datos y enfoques para mejorar la implementación del procedimiento de RPA, de manera notable para aplicaciones de diagnóstico. El diseño cuidadoso de la longitud de oligonucleótidos, composición de bases y utilización de residuos de azúcar de la estructura principal modificados forman la base de estrategias para pruebas de alta sensibilidad y especificidad. También se dan a conocer enfoques para combinar oligonucleótidos con distintas actividades como filamentos de nucleoproteína para mejorar relaciones señal-ruido. También se dan a conocer procedimientos de detección de productos que evitan la electroforesis en gel, empleando en algunos casos "terceros" oligonucleótidos específicos. Se da a conocer la constitución de un liofilizado activo que puede almacenarse a temperatura ambiental durante al menos 10 días y conservar actividad de amplificación cuando se reconstituye sólo con muestra tamponada.

La presente descripción también proporciona habilitar datos para permitir la utilización de los procedimientos de RPA de la invención en aplicaciones cuantitativas en tiempo real. Se muestra que diluciones apropiadas de colorantes de unión a ácido nucleico fluorescentes, SYBR green o SYBR gold, son compatibles con reacciones de RPA y permiten la monitorización de la acumulación de productos. Los productos siguen acumulándose de una manera aparentemente exponencial durante un tiempo suficiente para permitir la cuantificación tras alcanzarse niveles de detección umbrales. Se muestra experimentalmente que utilizando este enfoque la RPA es cuantitativa a lo largo de al menos cuatro o cinco órdenes de magnitud de cantidad de molde de partida. Se logra la iniciación simultánea de muchas reacciones paralelas estableciendo mezclas de reacción en hielo y después cambiando simultáneamente las muestras a temperaturas de reacción (33-39°C). Alternativamente pueden iniciarse simultáneamente reacciones de RPA paralelas mediante otros medios, tales como desenjaulado de ATP impulsado por luz, o de cebadores oligonucleotídicos enjaulados. Se detallan otros enfoques de monitorización en tiempo real específicos de producto que pueden ser compatibles con el sistema de RPA. También se describe la composición global de un dispositivo de RPA en tiempo real compuesto por componentes de estado sólido de baja potencia lo que permitirá una implementación portátil económica en contextos tanto de laboratorio como no de laboratorio.

Se logra un procedimiento para controlar reacciones de RPA de la invención controlando la presencia de los cofactores de nucleósido trifosfato de soporte necesarios tales como ATP, a periodos limitados durante la reacción. Si se utilizan nucleótido trifosfatos químicamente enjaulados, pueden generarse pulsos de ATP libre mediante iluminación con una ráfaga definida de luz correspondiente a la longitud de onda de desenjaulado del grupo fotoprotector. La ATP liberada permitirá entonces la unión de proteínas recombinasa a ADN monocatenario (ADNmc), y la posterior búsqueda de homología y actividad de intercambio de cadena de los complejos de recombinasa-ADNmc. Alternativamente, puede añadirse periódicamente ATP a la reacción. A lo largo del tiempo, la concentración de ATP disminuirá como consecuencia de la hidrólisis, o bien hidrólisis de recombinasa o bien hidrólisis mediante otros componentes de reacción específicamente añadidos para hidrolizar el exceso de ATP, y ADP. Por consiguiente, tras un periodo de tiempo definido mediante las disminuciones en la concentración de ATP y/o un aumento en la concentración de ADP, las moléculas de recombinasa dejarán de funcionar y se disociarán del ADN. Pueden suministrarse pulsos de luz posteriores a la longitud de onda de desenjaulado para liberar ATP nuevo, o puede añadirse ATP nuevo para reiniciar la actividad recombinasa. De esta manera se permite una serie de periodos controlados de búsqueda de homología y de cebado de modo que puede realizarse en fases la iniciación de la elongación.

Como segundo procedimiento para controlar la fase de invasión de reacciones de RPA, se describe un enfoque para separar la actividad impulsada por un cebador del otro. Este procedimiento utiliza invasión mediada por recombinasa

en un sitio diana de cebador y la terminación de la síntesis a partir de ese cebador. Esto generará un ADN desplazado monocatenario, que entonces puede utilizarse como molde para un segundo cebador enfrentado que está modificado y por tanto no puede soportar la iniciación de la síntesis mediada por recombinasa. Esto evitará posiblemente conflictos que surjan mediante colisión de polimerasas.

5 Esta invención permite enfoques para evaluar la naturaleza polimórfica de productos amplificados sin necesidad de fraccionamiento por tamaños. Se permite que los productos de la reacción de amplificación formen híbridos dúplex con sondas inmovilizadas de carácter o bien inicialmente mono o bien bicatenario mediante la acción de recombinasas y/o proteínas de unión a ADN monocatenario y otras moléculas auxiliares. Se describen
10 procedimientos para desestabilizar híbridos imperfectos formados entre productos y sondas, que se producen en un entorno dinámico de acción recombinasa, y que soportan la actividad de una amplia variedad de componentes enzimáticos adicionales. Se detectan híbridos productores mediante uno de muchos enfoques convencionales utilizados para revelar la presencia o ausencia de una interacción molecular.

15 La presente descripción también describe la combinación de las condiciones *in vitro* determinadas que soportan un entorno de recombinación dinámica, persistente, estable, con otras actividades enzimáticas, permitiendo así que se produzca de manera continua la invasión de cadena y el apareamiento entre los ADNmc y dúplex y en presencia de otras enzimas metabólicas, especialmente las enzimas no termófilas que se necesitarían en enfoques convencionales, así como otros procedimientos que no son equivalentes, o alcanzables, en un sistema que emplea
20 fusión térmica o química. También se describen hallazgos que mejoran el diseño de oligonucleótidos para permitir una alta actividad en sistemas de recombinación dinámica estable gracias a incluir secuencias optimizadas dentro de, y particularmente en el extremo 5' de, secuencias deseadas.

Otras realizaciones, objetos, aspectos, características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 representa una representación esquemática de carga de RecA/cebador.

Las figuras 2A-2B representan un esquema de etapas sucesivas, mostradas en los paneles (A) y (B), de amplificación por recombinasa-polimerasa de la cadena adelantada (IsRPA).

35 Las figuras 3A-3D representan un esquema de etapas sucesivas, mostradas en los paneles (A), (B), (C), y (D), de amplificación por recombinasa-polimerasa de la cadena adelantada y retrasada.

La figura 4 representa un ejemplo de cebadores anidados elegidos para RPA anidada.

40 La figura 5 representa ejemplos de ácidos nucleicos de molde bicatenarios adecuados.

Las figuras 6A-6B representan en los paneles (A) y (b) las diversas orientaciones de los pares de cebadores de RPA en hibridación con el ácido nucleico diana.

45 Las figuras 7A-7C en los paneles (A), (B) y (C) representan una representación esquemática de una reacción de RPA en curso.

50 Las figuras 8A-8C representan (A) ejemplos de cebadores bicatenarios; (B) cebadores bicatenarios tras elongación y tras apareamiento del segundo miembro de un par de cebadores; (C) tras la elongación del segundo miembro de un par de cebadores con la cadena no invasora desplazada.

55 La figura 9 representa la investigación de la naturaleza de dianas de ADN bicatenario y oligonucleótidos de selección como diana. Experimentos utilizando o bien moldes superenrollados o bien ADN linealizados sugieren que recA cataliza la formación de productos intermedios que pueden soportar la elongación por polimerasa lo más fácilmente en ADN superenrollado o en los extremos de ADN linealizado. Se muestra el oligonucleótido Tester3bio (SEC ID n°: 66).

60 La figura 10 representa síntesis de activación inversa. La síntesis de activación inversa se produce cuando un oligonucleótido de selección como diana recubierto con recA que presenta una proyección en 5' invade un extremo de ADN dúplex en presencia de una polimerasa adecuada y dNTP. Esta nueva región de dúplex es estable para la posterior migración de ramificaciones y puede utilizarse como plataforma para otras actividades. También puede producirse activación directa, que es la elongación a partir del oligonucleótido invasor.

65 La figura 11 representa utilizaciones de síntesis de activación inversa. La síntesis de activación inversa puede ser útil porque genera una estructura resistente a la migración de ramificaciones que puede utilizarse para una aplicación distinta del cebado con oligonucleótidos normal. Aquí se muestran algunos ejemplos incluyendo la introducción de un sitio diana de enzima de formación de mellas, introducción de un promotor de ARN polimerasa, y

la generación lineal de fragmentos de ADNbc cortos mediante acontecimientos sucesivos de invasión/síntesis/escisión.

5 La figura 12 representa proteínas de unión monocatenarias que facilitan la invasión de recombinasa y la extensión de cebadores. Tanto SSB de *E. coli* como gp32 de T4 con una etiqueta de His N-terminal (gp32(N)) estimulan la invasión mediada por recA/elongación en un molde de ADN lineal.

10 La figura 13 representa el requisito de una longitud de oligonucleótido mínima o proyección para la invasión y elongación durante la selección como diana de extremos de moldes lineales. Cuando el oligonucleótido invasor se dirige a extremos de un molde linealizado se necesita una longitud de oligonucleótido mínima, o una proyección, para que se produzca la invasión/elongación.

15 La figura 14 representa uniones paranémicas y plectonémicas. Descripción esquemática de la formación de uniones paranémicas y plectonémicas mediante acontecimientos de recombinación que implican secuencias incrustadas en, o en los extremos de, ADN.

20 La figura 15 representa el efecto de agentes de agrupamiento. Los agentes de agrupamiento pueden alterar el comportamiento de la reacción. En presencia de polietilenglicoles, gp32(N) y recombinasa recA, pueden estimularse múltiples acontecimientos de invasión en moldes individuales sin el requisito de proyección en 5' en el oligonucleótido de selección como diana.

25 La figura 16 representa la amplificación dirigida a extremos utilizando RPA de la cadena adelantada. Amplificación de un ADN diana utilizando oligonucleótidos dirigidos a extremos, proteína RecA(C) y el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli*.

30 La figura 17 representa RPA de la cadena adelantada y límites de la capacidad de procesamiento de Klenow. La amplificación limitada de un fragmento de aproximadamente 300 pares de bases cuando sólo se utilizan 0,5 fmoles de molde de partida con la proteína RecA, gp32(N) y el fragmento de Klenow de *E. coli*. La fuerte acumulación de productos más cortos sugiere que la escasa capacidad de procesamiento de Klenow (10-50 nucleótidos) puede ser subyacente a la dependencia de la concentración de molde de la reacción.

35 La figura 18 representa la dependencia de la separación de cebadores de RPA. Hay una longitud inter-oligonucleótido óptima para la RPA cuando se utiliza el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli*. Se muestran las secuencias de molde (SEC ID n°: 67) y proyección de EcoRI (SEC ID n°: 68).

La figura 19 representa productos de RPA que son mayoritariamente bicatenarios. La reacción de RPA puede generar productos de ADN bicatenario tal como se demuestra mediante electroforesis en gel de agarosa y escisión por enzimas de restricción.

40 La figura 20 representa la actividad de un mutante de recA con truncamiento C-terminal. La proteína RecA mutante con una delección del péptido ácido C-terminal (recA(C)delta) puede fomentar el intercambio y la extensión de cadena en un ensayo de ejecución con molde lineal.

45 La figura 21 representa proteínas gp32 modificadas. Se muestra una representación esquemática de las proteínas gp32 de bacteriófago T4 utilizadas en este estudio y la posición de diversas modificaciones y mutaciones.

La figura 22 representa la actividad de proteína gp32. Proteínas gp32 modificadas muestran una variedad de actividades en ensayos de invasión lineal/ejecución.

50 La figura 23 representa la invasión y extensión utilizando uvsX. La proteína UvsX modificada con una etiqueta de His C-terminal (uvsX(C)), o una delección adicional del péptido ácido C-terminal, estimula la invasión/extensión en un ensayo de ejecución con molde lineal.

55 La figura 24 representa RPA utilizando uvsX(C). La recombinasa modificada uvsX(C) puede soportar la amplificación de ADN en presencia de gp32(N), el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli* y polietilenglicol (PEG).

La figura 25 representa gp32 de tipo natural frente a modificada. La versión modificada de gp32, gp32(C), es cualitativamente diferente de gp32 sin etiqueta de tipo natural.

60 La figura 26 representa la valoración de gp32 y el efecto de uvsY. La Valoración de gp32 revela un requisito de una cantidad mínima de gp32, y un requisito de proteína uvsY(N) cuando se emplea gp32 sin etiqueta.

65 La figura 27 representa factores que afectan al ruido y a la velocidad de reacción. Se muestra una representación esquemática de los factores que afectan al comportamiento de la reacción, particularmente el ruido y la velocidad de reacción. Se sugieren los efectos previstos y las interacciones de gp32, uvsX, UvsY y PEG, con la conclusión de que debe acertarse con un equilibrio óptimo entre la velocidad de reacción y el ruido.

La figura 28 representa efectos de PEG. PEG puede reducir la longitud promedio de productos de ejecución/invasión lineal en un experimento de ejecución lineal mediado por *uvsX* en presencia de *gp32(C)*.

5 La figura 29 representa la invasión dirigida a extremos de ADN. Se muestra un esquema que representa posibles desenlaces de acontecimientos de invasión dirigidos a extremos.

La figura 30 representa RPA en una muestra compleja. La amplificación de dianas de ADN específicas a partir de ADN genómico humano.

10 La figura 31 representa la sensibilidad de RPA. La sensibilidad de amplificación de dianas de ADN específicas a partir de ADN genómico humano.

15 La figura 32 representa la sensibilidad de RPA y artefactos independientes del molde. La sensibilidad de amplificación de dianas de ADN específicas a partir de ADN genómico humano, y la existencia de artefactos de cebadores independientes del molde que compiten.

20 La figura 33 representa cómo pueden surgir artefactos de cebadores. Se muestra una representación esquemática del posible mecanismo mediante el cual pueden surgir artefactos de cebadores.

La figura 34 representa la supresión de artefactos de cebadores. Se muestran de manera esquemática procedimientos para suprimir artefactos de cebadores.

25 La figura 35 representa la utilización de oligonucleótidos de horquilla para estimular el auto-cebado de cadenas desplazadas. Se muestra un diagrama esquemático de una amplificación utilizando oligonucleótidos de horquilla auto-complementarios de manera deliberada para estimular el auto-cebado de cadenas desplazadas.

30 La figura 36 representa condiciones que permiten una amplificación libre de ruido altamente eficaz a partir de fuentes de ADN complejo. La sensibilidad de amplificación de dianas de ADN específicas a partir de ADN genómico humano en condiciones optimizadas que reducen o eliminan los artefactos de cebadores.

La figura 37 representa una representación esquemática de un procedimiento de RPA tal como se muestra en (A), (B) y (C).

35 La figura 38 representa (A) marcadores de STR de dos individuos (1 y 2, padre e hijo) amplificados con pares de cebadores para siete marcadores independientes utilizando las condiciones de RPA C4; (B) valoración de componentes de reacción para determinar concentraciones que soportan la amplificación *in vitro*.

40 La figura 39 representa (A) límites de tamaño de reacciones de RPA; (B) eficacias de elongación a partir de secuencias incrustadas o en extremo; (C) sensibilidad de reacciones de RPA; (D) ADN humano del número de copias indicado amplificado con cebadores ApoB4 y Apo300 que genera un fragmento de 300 pb utilizando las condiciones C2; (E, F) ADN humano a partir de individuos individuales amplificado con cebadores D18S51 5' y 3'. Las condiciones empleadas fueron C2 en (E), y C4 en (F).

45 La figura 40 representa la especificidad de reacciones de RPA para: (A) cebadores BsA3 y BsB3, que amplifican un fragmento de 380 pb utilizando las condiciones C3. Un asterisco indica la posición del producto de reacción previsto, y una flecha indica la posición del ADN genómico; (B, C) oligonucleótidos Apo600bio y Apo300rev que generan un fragmento de 345 pb utilizando las condiciones C4; (D) mezclas de componentes de reacción ensamblados en ausencia de los componentes indicados, PEG y tampón. Se indican los cebadores utilizados. El ADN diana fue ADN genómico masculino humano a 150 copias/μl; (E) oligonucleótidos que seleccionan como diana tres loci independientes en ADN genómico humano incubado con pares de cebadores solapantes de 25, 28 ó 32 bases según se indica.

50 La figura 41; ruido de cebadores a un bajo número de copias de diana. Se muestran las consecuencias de reducir la densidad de copias de partida de una diana en una reacción de RPA típica.

La figura 42; selección de cebadores óptimos combinando una selección de cebadores directo e inverso candidatos y pruebas del desenlace a densidades de copias de partida muy bajas.

60 La figura 43; consideración teórica sobre cómo se inicia el ruido de cebadores.

La figura 44; estrategias de mejora de oligonucleótidos - resumen de tres esquemas generales.

65 La figura 45; consecuencias de la reducción de la longitud de cebadores - los cebadores cortos proporcionan menos producto, pero todavía pueden conservar actividad a menos de 30 residuos.

- La figura 46; los ácidos nucleicos bloqueados pueden funcionar en RPA y muestran diferencias significativas en la acumulación de producto, acumulación de ruido y requisito de concentración de polimerasa.
- 5 La figura 47; añadir tramos homopoliméricos en los extremos 5' de cebadores puede alterar la actividad de nucleoproteína.
- La figura 48; la betaína reduce los niveles de producto y de ruido.
- 10 La figura 49; estrategias de combinación en las que se combinan filamentos de nucleoproteínas con actividades diferenciales.
- La figura 50; formatos de detección que incorporan un "tercer" cebador para el enriquecimiento del producto.
- 15 La figura 51; captura de perlas I. Esquema de la estrategia experimental en la que una tercera sonda enriquece productos auténticos derivados de la diana.
- 20 La figura 52; captura de perlas II. Resultados experimentales que demuestran que un filamento de nucleoproteína con baja actividad inmovilizado sobre un soporte sólido puede participar como tercer cebador y separar amplicones diana de ruido de cebadores.
- La figura 53; la trehalosa estabiliza liofilizados para permitir que todos los componentes excepto la muestra tamponada permanezcan activos durante al menos 10 días a temperatura ambiente.
- 25 La figura 54; pueden incluirse los colorantes de unión al surco menor, SYBR green y SYBR gold, en reacciones de RPA y detectarán la acumulación de productos de reacción de ADN.
- La figura 55; utilizando el colorante SYBR green para la evaluación cuantitativa de ADN genómico de *Bacillus subtilis*, el número de copias puede volverse de más de cuatro órdenes de magnitud.
- 30 La figura 56; utilizando el colorante SYBR green para la evaluación cuantitativa de ADN genómico de *Bacillus subtilis*, el número de copias puede volverse de más de al menos cinco órdenes de magnitud.
- La figura 57; la RPA en tiempo real cuantitativa responde de manera excelente a la valoración de ADN genómico humano.
- 35 La figura 58; la presencia de burbujas monocatenarias en híbridos imperfectos de sonda:diana conduce a una alteración de dúplex global potenciada en un entorno de recombinación dinámica.
- 40 La figura 59; la hibridación de amplicones a una matriz de posibles sondas de polimorfismo de longitud en un entorno de recombinación dinámica conduce al enriquecimiento de híbridos de apareamiento perfecto o casi perfecto en comparación con la hibridación clásica, o entorno de recombinación no dinámica.
- La figura 60; la RPA de transcripción inversa (RT-RPA) en un único tubo muestra una alta sensibilidad sin optimización significativa.
- 45 La figura 61; puede incluirse dUTP en reacciones de RPA para sustituir total o parcialmente a dTTP proporcionando así un mecanismo para desarrollar un control de la contaminación cruzada eficaz.
- 50 La figura 62; una estrategia para controlar la contaminación cruzada en reacciones de RPA.
- La figura 63; formato de ensayo de RPA independiente para determinar la presencia de un ácido nucleico específico que comprende una bolsa de amplificación desechable y tira reactiva de flujo lateral para detectar la amplificación satisfactoria.
- 55 La figura 64; la compatibilidad de RPA con lisados en bruto de sangre humana indica la posibilidad de que puedan evitarse preparaciones de muestras sofisticadas para muchas muestras.
- La figura 65; utilidad del análisis de RPA en tiempo real en la optimización del entorno de reacción; concentraciones de sal y de PEG.
- 60 La figura 66; utilidad del análisis de RPA en tiempo real en la optimización del entorno de reacción; concentraciones de magnesio.
- 65 La figura 67; las secuencias de cebadores afectan al comportamiento de velocidad de amplificación - un análisis preliminar sugiere que los cebadores "rápidos" pueden estar asociados con un bajo contenido en G, y un alto contenido en C o C/T.

La figura 68; utilidad de análisis de RPA en tiempo real en la optimización del entorno de reacción; las secuencias en 5' heterólogas añadidas a oligonucleótidos influyen en el comportamiento de la reacción.

5 La figura 69; utilidad del análisis de RPA en tiempo real en la optimización del entorno de reacción; las secuencias en 5' heterólogas añadidas a oligonucleótidos influyen en el comportamiento de la reacción - no todas las secuencias en 5' ricas en pirimidina impulsan un comportamiento cinético excelente.

10 La figura 70; utilidad del análisis de RPA en tiempo real en la optimización del entorno de reacción; las secuencias en 5' heterólogas añadidas a oligonucleótidos influyen en el comportamiento de la reacción - no todas las secuencias en 5' ricas en pirimidina impulsan un comportamiento cinético excelente.

15 La figura 71; pueden emplearse las denominadas "terceras sondas" para monitorizar reacciones de RPA y aumentar la especificidad. Enzimas candidatas para procesar dúplex específicos que contienen la diana y la sonda.

La figura 72; pueden emplearse enzimas que reconocen características anómalas tales como distorsiones de la hélice y bases/sitios abásicos dañados para procesar híbridos de sonda/diana.

20 La figura 73; las sondas fluorescentes demuestran propiedades significativamente diferentes en el entorno de RPA en comparación con entornos convencionales utilizados en otras reacciones de amplificación.

La figura 74; una sonda que contiene un residuo de tetrahidrofuranilo se corta y se extiende de manera eficaz en un entorno de RPA que contiene diana amplificada, la enzima Nfo de *E. coli*, y polimerasa.

25 La figura 75, una sonda que contiene un residuo de tetrahidrofuranilo se corta y se extiende de manera eficaz, rápida y específica en un entorno de RPA que contiene diana amplificada, la enzima Nfo de *E. coli*, y polimerasa.

La figura 76, ejemplos de diseño de sondas para estudios de RPA en tiempo real utilizando la enzima Nfo de *E. coli*.

30 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona la amplificación por recombinasa-polimerasa (RPA) - un procedimiento para la amplificación de polímeros de ácido nucleico diana. También proporciona un entorno *in vitro* general en el que se mantiene una alta actividad recombinasa en un entorno de recombinación sumamente dinámica, soportado por ATP. Un beneficio de la RPA es que puede realizarse sin necesidad de fusión térmica de moldes bicatenarios. Por tanto, también se elimina la necesidad de termocicladores caros. La presente descripción describe dos estrategias relacionadas mediante las cuales puede configurarse la RPA para permitir una amplificación exponencial de polímeros de ácido nucleico diana.

40 A lo largo de esta memoria descriptiva, se mencionan diversas patentes, solicitudes de patente publicadas y referencias científicas para describir el estado y el contenido de la técnica.

Amplificación por recombinasa-polimerasa de la cadena adelantada (IsRPA)

45 En la amplificación por recombinasa-polimerasa de la cadena adelantada (IsRPA), se dirigen cebadores de ácido nucleico monocatenarios, o parcialmente monocatenarios, a secuencias homólogas bicatenarias, o parcialmente bicatenarias, utilizando agentes de recombinasa, lo que formará estructuras de bucle D. Los cebadores monocatenarios invasores, que son parte de los bucles D, se utilizan para iniciar reacciones de síntesis de polimerasa. Una única especie de cebador amplificará una secuencia de ácido nucleico diana a través de múltiples rondas de invasión bicatenaria seguida por síntesis. Si se utilizan dos cebadores opuestos, puede alcanzarse la amplificación de un fragmento (la secuencia diana). Se describe IsRPA resumidamente en las figuras 1 y 2.

50 La secuencia diana que van a amplificarse, en cualquiera de los procedimientos de la invención, es preferentemente un ADN bicatenario. Sin embargo, los procedimientos de la invención no se limitan a ADN bicatenario porque otras moléculas de ácido nucleico, tales como un ADN o ARN monocatenario, pueden convertirse en ADN bicatenario por un experto en la materia utilizando procedimientos conocidos. El ADN diana bicatenario adecuado puede ser un ADN genómico o un ADNc. Una RPA de la invención puede amplificar un ácido nucleico diana al menos 10 veces, preferentemente al menos 100 veces, más preferentemente al menos 1.000 veces, incluso más preferentemente al menos 10.000 veces, y lo más preferentemente al menos 1.000.000 veces.

60 La secuencia diana se amplifica con ayuda de agentes de recombinasa. Un agente de recombinasa es una enzima que puede recubrir ADN monocatenario (ADNmc) para formar filamentos, que entonces pueden barrer el ADN bicatenario (ADNbc) para detectar regiones de homología de secuencia. Cuando se localizan secuencias homólogas, la cadena de filamento de nucleoproteína (que comprende el agente de recombinasa) invade el ADNbc creando un híbrido corto y una burbuja de cadena desplazada conocida como bucle D. Los agentes de recombinasa adecuados incluyen la proteína RecA de *E. coli*, la proteína UvsX de T4, o cualquier proteína homóloga o complejo

65

de proteína de cualquier filo. Los homólogos de RecA eucariotas se denominan comúnmente Rad51 por el primer miembro de este grupo que se identificó. Pueden utilizarse otros agentes de recombinasa no homólogos en lugar de RecA, por ejemplo RecT o RecO. Los agentes de recombinasa requieren generalmente la presencia de ATP, ATPγS, u otros nucleósido trifosfatos y sus análogos. Se prefiere que los agentes de recombinasa se utilicen en un entorno de reacción en el que la regeneración de sitios de selección como pueda producirse poco después de una ronda de síntesis estimulada por bucle D. Los acontecimientos de recombinación completados que implican desensamblaje de recombinasa evitarán la detención de la amplificación o la amplificación lineal muy ineficaz de ADNmc provocada por la síntesis monocatenaria oscilante de un extremo al otro.

Naturalmente, cualquier derivado y análogo funcional del agente de recombinasa anterior también puede funcionar en sí mismo como agente de recombinasa y estos derivados y análogos también se contemplan para su utilización en procedimientos de la invención. Por ejemplo, puede utilizarse un péptido pequeño de recA, que se ha mostrado que conserva algunos aspectos de las propiedades de recombinación de recA. Este péptido comprende los residuos 193 a 212 de recA de *E. coli* y puede mediar el apareamiento de oligonucleótidos monocatenarios (Oleg N. Voloshin, Lijang Wang, R. Daniel Camerini-Otero, Homologous DNA pairing Promoted by a 20-amino Acid Peptide Derived from RecA. Science, vol. 272, 10 de mayo de 1996).

Dado que la utilización de ATPγS da como resultado la formación de complejos de agente de recombinasa/ADNbc estables que es probable que sean incompatibles con la amplificación eficaz, es preferible utilizar ATP y enzimas auxiliares para cargar y mantener los complejos de agente de recombinasa/cebador de ADNmc. Alternativamente, las limitaciones de la utilización de ATPγS pueden superarse mediante la utilización de componentes de reacción adicionales que pueden separar recA unida a ATPγS de complejos de intercambio. Este papel pueden desempeñarlo helicasas tales como el complejo RuvA/RuvB.

Los términos "polímero de ácido nucleico" o "ácidos nucleicos" tal como se utilizan en esta descripción pueden interpretarse de manera amplia e incluyen ADN y ARN así como otras moléculas de tipo ácido nucleico que se hibridan tales como aquellas con estructuras principales sustituidas, por ejemplo ácidos nucleicos peptídicos (ANP), ácidos nucleicos con estructura principal de morfolino, ácido nucleico bloqueado u otros ácidos nucleicos con azúcares y bases modificadas.

Estructuralmente similares a ARN, los monómeros de ANB son compuestos bicíclicos que llevan un grupo de unión metileno que conecta el oxígeno en 2' del anillo de azúcar del nucleótido con su carbono en 4'. Los polímeros de ANB siguen las reglas de apareamiento de bases convencionales, pero sus propiedades físicas hacen que sean adecuados para aplicaciones de distinción de apareamiento erróneo. Los ANB están disponibles de Exiqon (Dinamarca) o Proligo (USA, Colorado).

Una realización se refiere a un procedimiento de realización de RPA según la invención, que comprende dos etapas tal como sigue. En la primera etapa, se combinan los siguientes reactivos en una reacción: (1) al menos una recombinasa; (2) al menos una proteína de unión a ADN monocatenario; (3) al menos una ADN polimerasa; (4) dNTP o una mezcla de dNTP y ddNTP; (5) un agente de agrupamiento; (6) un tampón; (7) un agente reductor; (8) ATP o un análogo de ATP hidrolizable; (9) al menos una proteína de carga de recombinasa; (10) un primer cebador y opcionalmente un segundo cebador; y (11) una molécula de ácido nucleico diana. En la segunda etapa, se incuban los reactivos hasta que se alcanza un grado de amplificación deseado.

La recombinasa puede ser uvsX, recA o una combinación de ambas. La recombinasa también puede comprender una delección C-terminal de residuos ácidos para mejorar su actividad. Aunque puede utilizarse cualquier concentración de recombinasa dada a conocer en la memoria descriptiva, las concentraciones de recombinasa preferidas pueden estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,2-12 μM, 0,2-1 μM, 1-4 μM, 4-6 μM y 6-12 μM.

La proteína de unión a ADN monocatenario puede ser la SSB de *E. coli* o la gp32 de T4 o un derivado o una combinación de estas proteínas. El derivado de gp32 puede incluir, al menos, gp32(N), gp32(C), gp32(C)K3A, gp32(C)R4Q, gp32(C)R4T, gp32K3A, gp32R4Q, gp32R4T y una combinación de los mismos (véanse las figuras 13). La proteína de unión a ADN puede estar presente a una concentración de entre 1 μM y 30 μM.

La ADN polimerasa puede ser una polimerasa eucariota. Los ejemplos de polimerasas eucariotas incluyen pol-α, pol-β, pol-δ, pol-ε y derivados y combinaciones de las mismas. Los ejemplos de polimerasa procarionta incluyen fragmento de Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli*, ADN polimerasa gp43 de bacteriófago T4, fragmento grande de polimerasa I de *Bacillus stearothermophilus*, ADN polimerasa de Phi-29, ADN polimerasa de T7, Pol I de *Bacillus subtilis*, ADN polimerasa I de *E. coli*, ADN polimerasa II de *E. coli*, ADN polimerasa III de *E. coli*, ADN polimerasa IV de *E. coli*, ADN polimerasa V de *E. coli* y derivados y combinaciones de las mismas. En una realización preferida, la ADN polimerasa está a una concentración de entre 10.000 unidades/ml y 10 unidades/ml, tal como entre 5000 unidades/ml y 500 unidades/ml. En otra realización preferida, la ADN polimerasa carece de actividad exonucleasa 3'-5'. En aún otra realización preferida, la ADN polimerasa contiene propiedades de desplazamiento de cadena.

Se entiende que cualquiera de las proteínas mencionadas en los procedimientos de la invención también incluye su

derivado. Estas proteínas incluyen al menos las siguientes: recombinasas, polimerasa, proteína de carga de recombinasa, proteína de unión a ADN monocatenario, agentes auxiliares, agente estabilizante de filamentos de nucleoproteínas de RecA/ADNmc y similares. El derivado de estas proteínas incluye, al menos, una proteína de fusión que comprende una etiqueta en el extremo C-terminal, etiqueta en el extremo N-terminal, o etiqueta en los extremos C y N-terminales. Los ejemplos no limitativos de etiquetas de secuencia adecuadas incluyen 6 histidinas (6X-His; HHHHHH; SEC ID n°: 69), epítipo c-myc (EQKLISEEDL; SEC ID n°: 70), octapéptido FLAG® (DYKDDDDK; SEC ID n°: 71), proteína C (EDQVDPRLIDGK; SEC ID n°: 72), Tag-100 (EETARFQPGYRS; SEC ID n°: 73), epítipo V5 (GKPIPNPLLGLDST; SEC ID n°: 74), VSV-G (YTDIEMNRLGK; SEC ID n°: 75), Xpress (DLYDDDDK; SEC ID n°: 76) y hemaglutinina (YPYDVDPYA; SEC ID n°: 77). Los ejemplos no limitativos de etiquetas de proteína adecuadas incluyen β -galactosidasa, tiorredoxina, tiorredoxina con pequeña extensión de His, dominio de unión a IgG, dominio de unión a teína quitina, gen 10 de T7, glutatión-S-transferasa (GST), proteína verde fluorescente (GFP), y proteína de unión a maltosa (MBP). Los expertos en la materia entenderán que las etiquetas de secuencia y las etiquetas de proteína pueden utilizarse de manera intercambiable, por ejemplo, con fines de purificación y/o identificación. Por consiguiente, tal como se utilizan en la presente memoria, los términos "etiqueta de His" y "etiqueta de hexahistidina" abarcan todas las etiquetas de secuencia y etiquetas de proteína adecuadas tal como se conocen en la técnica y se indican en este párrafo.

Los dNTP incluyen, por ejemplo, dATP, dGTP, dCTP y dTTP. En RPA de la cadena adelantada y retrasada, también pueden incluirse ATP, GTP, CTP y UTP para la síntesis de cebadores de ARN. Además, pueden utilizarse dNTP (ddATP, ddTTP, ddGTP y ddCTP) para generar marcadores de peso molecular de fragmentos. El dNTP puede utilizarse a una concentración de entre 1 μ M y 200 μ M de cada especie de NTP. Puede utilizarse una mezcla de dNTP y ddNTP con concentraciones de ddNTP a de 1/100 a 1/1000 la del dNTP (de 1 μ M a 200 μ M).

Los agentes de agrupamiento utilizados en la RPA incluyen polietilenglicol (PEG), dextrano y Ficoll. El agente de agrupamiento puede estar a una concentración de entre el 1% y el 12% en volumen o del 1% al 12% en peso de la reacción. Aunque todos los PEG son útiles, los PEG preferidos incluyen PEG1450, PEG3000, PEG8000, PEG10000, compuesto de PEG con un peso molecular de 15.000 a 20.000 (también conocido como Carbowax 20M) y una combinación de los mismos.

La disolución de tampón en una RPA puede ser un tampón Tris-HCl, un tampón Tris-acetato, o una combinación de los mismos. Los tampones pueden estar presentes a una concentración de entre 10 y 100 mM. El pH tamponado puede ser de entre 6,5 y 9,0. El tampón puede contener además iones Mg (por ejemplo, en forma de acetato de Mg) a una concentración de entre 1 y 100 mM, prefiriéndose una concentración de entre 5 y 15 mM. Una concentración de Mg preferida es de 10 mM (concentración de Mg o concentración de acetato de Mg).

Los agentes reductores que van a utilizarse incluyen DTT. La concentración de DTT puede ser de entre 1 mM y 10 mM.

El ATP o análogo de ATP puede ser cualquiera de ATP, ATP- γ -S, ATP- β -S, ddATP o una combinación de los mismos. Una concentración de ATP o análogo de ATP preferida es de entre 1 y 10 mM.

La proteína de carga de recombinasa puede incluir, por ejemplo, uvsY de T4, recO de *E. coli*, recR de *E. coli* y derivados y combinaciones de estas proteínas. Una concentración preferida de estas proteínas es de entre 0,2 y 8 μ M.

Los cebadores utilizados pueden prepararse a partir de ADN, ARN, ANP, ANB, ácido nucleico con estructura principal de morfolino, ácido nucleico con estructura principal de fosfortiorato y una combinación de los mismos. Las combinaciones de los mismos en este caso se refieren a moléculas de ácido nucleico individuales que pueden contener una o más de una bases conectadas a una de más de otras bases. La concentración preferida de estas moléculas puede estar en el intervalo de entre 25 nM y 1000 nM. En una 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 nucleasa de 3' a 5'. En otra realización, los cebadores pueden contener un ácido nucleico bloqueado en su última base en 3' o su penúltima base en 3'. Por ejemplo, en un ácido nucleico de la secuencia 5'-AGT-3', la T es la última base en 3' y la G es la penúltima base en 3'. Los cebadores pueden presentar al menos 20 bases de longitud o al menos 30 bases de longitud. En una realización preferida, los cebadores presentan entre 20 y 50 bases de longitud. En otra realización preferida, los cebadores presentan entre 20 y 40 bases de longitud, tal como entre 30 y 40 bases de longitud.

Los cebadores pueden contener una secuencia en 5' adicional que no es complementaria al ácido nucleico diana. Esta secuencia en 5' puede contener, por ejemplo, un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción. Los cebadores pueden ser parcialmente bicatenarios con un extremo 3' monocatenario.

Además, cualquier ácido nucleico de cualquiera de los procedimientos de la invención puede estar marcado con un marcador detectable. Un marcador detectable incluye, por ejemplo, un fluorocromo, una enzima, un extintor de fluorescencia, un inhibidor enzimático, un marcador radiactivo y una combinación de los mismos.

El ácido nucleico diana puede ser monocatenario o bicatenario. Se conoce que los ácidos nucleicos monocatenarios

se convertirán en ácido nucleico bicatenario en los procedimientos de la invención. El ácido nucleico diana puede estar superenrollado o ser lineal. La secuencia que va a amplificarse (ácido nucleico diana) puede estar entre otras secuencias. La secuencia que va a amplificarse también puede estar en un extremo de un ácido nucleico lineal. En una realización, el ácido nucleico diana es lineal y no está conectado a ácidos nucleicos que no son diana. En otras palabras, cuando el ácido nucleico diana es lineal, puede estar en cualquiera de los siguientes formatos:

1. [ácido nucleico que no es diana]-[ácido nucleico diana]-[ácido nucleico que no es diana]
2. [ácido nucleico que no es diana]-[ácido nucleico diana]
3. [ácido nucleico diana]-[ácido nucleico que no es diana]
4. [ácido nucleico diana]

Debe indicarse que se pretende que la disposición anterior represente tanto ácidos nucleicos monocatenarios como ácidos nucleicos bicatenarios. "1" puede describirse como una molécula de ácido nucleico diana que es lineal con dos extremos y en la que ambos extremos están unidos a una molécula de ácido nucleico que no es diana. "2" puede describirse como una molécula de ácido nucleico diana que es lineal con dos extremos y en la que un extremo está unido a una molécula de ácido nucleico que no es diana. "3" puede describirse como una molécula de ácido nucleico diana que es una molécula de ácido nucleico lineal (sin ácido nucleico que no es diana).

En otra realización, el ácido nucleico diana puede ser un ácido nucleico monocatenario que se convierte en un ácido nucleico bicatenario mediante una polimerasa o un ácido nucleico bicatenario desnaturalizado mediante la acción de calor o tratamiento químico.

El ácido nucleico diana puede estar en cualquier concentración tal como inferior a 10.000 copias, inferior a 1000 copias, inferior a 100 copias, inferior a 10 copias o 1 copia en una reacción. El volumen de reacción puede ser de 5 µl, 10 µl, 20 µl, 30 µl, 50 µl, 75 µl, 100 µl, 300 µl, 1 ml, 3 ml, 10 ml, 30 ml, 50 ml o 100 ml.

La reacción puede incubarse entre 5 minutos y 16 horas, tal como entre 15 minutos y 3 horas o entre 30 minutos y 2 horas. La incubación puede realizarse hasta que se alcanza un grado de amplificación deseado. El grado de amplificación deseado puede ser una amplificación de 10 veces, 100 veces, 1000 veces, 10.000 veces, 100.000 veces o 1000000 veces. La temperatura de incubación puede ser de entre 20°C y 50°C, entre 20°C y 40°C, tal como entre 20°C y 30°C. Una ventaja de los procedimientos de la invención es que la temperatura no es crítica y no es absolutamente necesario un control preciso, aunque se prefiere. Por ejemplo, en un entorno en campo, es suficiente con mantener la RPA a temperatura ambiente, o cerca de la temperatura corporal (de 35°C a 38°C) colocando la muestra en un pliegue corporal. Además, la RPA puede realizarse sin fusión inducida por temperatura del ácido nucleico de molde.

En otra realización de la invención, la RPA comprende además agentes auxiliares. Estos agentes auxiliares incluyen helicasa, topoisomerasa, resolvasa y una combinación de los mismos que presentan actividades de desenrollamiento, relajación y resolución, respectivamente, sobre ADN. Los agentes auxiliares también pueden incluir RuvA, RuvB, RuvC, RecG, PriA, PriB, PriC, DnaT, DnaB, DnaC, DnaG, cargador de abrazadera de DnaX, complejo de núcleo de polimerasa, ADN ligasa y una abrazadera deslizante y una combinación de los mismos. La abrazadera deslizante puede ser abrazadera deslizante de dímero β de *E. coli*, la abrazadera deslizante PCNA eucariota, o la abrazadera deslizante gp45 de T4 y una combinación de los mismos. Los agentes auxiliares pueden incluir, además, complejo de holoenzima de ADN polimerasa III que consiste en abrazadera β, cargador de abrazadera de DnaX, y el complejo de núcleo de polimerasa. Estos últimos agentes auxiliares permitirán la realización de RPA de la cadena adelantada y retrasada.

En otra realización, la RPA puede realizarse en presencia de un agente estabilizante de filamentos de nucleoproteínas de RecA/ADNmc. Los ejemplos de tal estabilización incluyen RecR, RecO, RecF y una combinación de los mismos. Estos agentes estabilizantes pueden estar presentes a una concentración de entre 0,01 µM y 20 µM. Otros ejemplos de agentes estabilizantes incluyen la proteína uvsY de T4 que estabiliza complejos de nucleoproteínas de uvsX/ADNmc.

Otros componentes de RPA incluyen un sistema para la regeneración de ATP (convierte ADP en ATP). Tal sistema puede ser, por ejemplo, fosfocreatina y creatina cinasa.

La reacción de RPA también puede incluir un sistema para regenerar ADP a partir de AMP y para convertir pirofosfato en fosfato (pirofosfato).

En una realización preferida, la reacción de RPA tal como se indicó anteriormente se realiza completamente con componentes de *E. coli* utilizando recA, SSB, recO, recR y polimerasa de *E. coli*.

En otra realización preferida, la reacción de RPA se realiza con componentes de T4 utilizando uvsX, gp32, uvsY y polimerasa de T4.

En una realización preferida, la RPA puede realizarse combinando los siguientes reactivos: (1) una recombinasa

5 uvsX a una concentración de entre 0,2 y 12 μM ; (2) una proteína de unión a ADN monocatenario gp32 a una concentración entre 1 y 30 μM ; (3) un fragmento grande de ADN polimerasa I de *Bacillus subtilis* (polimerasa de Bsu) a una concentración de entre 500 y 5000 unidades por ml; (4) dNTP o una mezcla de dNTP y ddNTP a una concentración de entre 1-300 μM ; (5) polietilenglicol a una concentración de entre el 1% y el 12% en peso o en volumen; (6) tampón Tris-acetato a una concentración de entre 1 mM y 60 mM; (7) DTT a una concentración de entre 1 mM - 10 mM; (8) ATP a una concentración de entre 1 mM - 10 mM; (9) uvsY a una concentración de entre 0,2 μM - 8 μM ; (10) un primer cebador y opcionalmente un segundo cebador, en el que dichos cebadores están a una concentración de entre 50 nM y 1 μM ; y (11) una molécula de ácido nucleico diana de al menos una copia. Tras ensamblarse la reacción, se incuba hasta que se alcanza un grado de amplificación deseado. Esto es habitualmente dentro del plazo de 2 horas, preferentemente dentro del plazo de 1 hora, tal como, por ejemplo, en 50 minutos.

15 Una ventaja de la invención es que los reactivos para RPA, con la posible excepción del agente de agrupamiento y el tampón, pueden secarse por congelación (es decir, liofilizarse) antes de utilizarse. El reactivo liofilizado ofrece la ventaja de no requerir refrigeración para mantener la actividad. Por ejemplo, puede almacenarse un tubo de reactivos de RPA a temperatura ambiente. Esta ventaja es especialmente útil en condiciones en campo en las que el acceso a refrigeración es limitado.

20 En una realización, los reactivos de RPA pueden liofilizarse en el fondo de un tubo, o sobre una perla (u otro tipo de soporte sólido). Para realizar una reacción de RPA, se reconstituyen los reactivos en una disolución de tampón y con un reactivo de agrupamiento, o simplemente una disolución tamponada o agua, dependiendo de la composición de los reactivos liofilizados. Entonces se añade un ácido nucleico diana, o una muestra que se sospecha que contiene un ácido nucleico diana. El líquido de reconstitución también puede contener el ADN de muestra. Se incuba la reacción reconstituida durante un periodo de tiempo y se detecta el ácido nucleico amplificado, si está presente.

25 La detección puede realizarse utilizando cualquier procedimiento, tal como, por ejemplo, utilizando electroforesis sobre un gel de agarosa o PAGE seguido por tinción con bromuro de etidio.

30 En cualquiera de los procedimientos de la invención, los reactivos que pueden liofilizarse antes de utilizarse incluirán, al menos, la recombinasa, la proteína de unión a ADN monocatenario, la ADN polimerasa, los dNTP o la mezcla de dNTP y ddNTP, el agente reductor, el ATP o análogo de ATP, la proteína de carga de recombinasa, y el primer cebador y opcionalmente un segundo cebador o una combinación de cualquiera de ellos.

35 En una realización preferida, los reactivos se ensamblan combinando los reactivos de tal manera que cuando se constituyen presentarán las siguientes concentraciones: (1) una recombinasa uvsX a una concentración de entre 0,2 y 12 μM ; (2) una proteína de unión a ADN monocatenario gp32 a una concentración entre 1 y 30 μM ; (3) una ADN polimerasa gp43 de T4 o polimerasa de Bsu a una concentración de entre 500 y 5000 unidades por ml; (4) dNTP o una mezcla de dNTP y ddNTP a una concentración de entre 1-300 μM ; (5) DTT a una concentración de entre 1 mM - 10 mM; (6) ATP a una concentración de entre 1 mM - 10 mM; (7) uvsY a una concentración de entre 0,2 μM - 8 μM . Opcionalmente, pueden añadirse un primer cebador y opcionalmente un segundo cebador en los que su concentración será de entre 50 nM y 1 μM cuando se reconstituyen. Los reactivos se liofilizan antes de utilizarse. Pueden incluirse agentes estabilizantes tales como azúcar trehalosa en la mezcla liofilizada, por ejemplo a de 20 mM a 200 mM, y de la manera más óptima de 40 mM a 80 mM en la reacción reconstituida, con el fin de mejorar el rendimiento de liofilización y la vida útil de almacenamiento. Si se desea, los reactivos liofilizados pueden almacenarse durante 1 día, 1 semana, 1 mes o 1 año o más antes de utilizarse.

45 En la utilización, los reactivos se reconstituyen con tampón (a) tampón Tris-acetato a una concentración de entre 1 mM y 60 mM; y (b) polietilenglicol a una concentración de entre el 1% y el 12% en peso o en volumen, o (c) con agua. Si no se añadieron los cebadores antes de la liofilización, pueden añadirse en esta fase. Finalmente, se añade un ácido nucleico diana, o una muestra que se sospecha que contiene un ácido nucleico diana para comenzar la reacción. El ácido nucleico diana, o de muestra, puede estar contenido dentro del tampón de reconstitución como consecuencia de etapas de extracción o procesamiento anteriores. Se incuba la reacción hasta que se alcanza un grado de amplificación deseado.

55 Cualquiera de las condiciones de reacción de RPA comentadas en cualquier parte en esta memoria descriptiva pueden liofilizarse. Por ejemplo, los siguientes reactivos pueden ensamblarse combinando cada reactivo de tal manera que cuando se constituyen, presentarán las siguientes concentraciones: (1) recombinasa uvsX 100-200 ng/ μl ; (2) gp32 600 ng/ μl ; (3) polimerasa de Bsu o polimerasa de T4 20 ng/ μl ; (4) dNTP 200 μM ; (5) DTT 1 mM (6) ATP o un análogo de ATP 3 mM; (7) uvsY de 16 ng/ μl a 60 ng/ μl ; (8) de 50 nM a 300 nM de un primer cebador y de 50 nM a 300 nM de un segundo cebador; (9) acetato de potasio 80 mM; (10) acetato de magnesio 10 mM; (11) fosfocreatina 20 mM; (12) creatina cinasa de 50 ng/ μl a 100 ng/ μl . Los reactivos pueden liofilizarse en el fondo de un tubo o en un pocillo de un recipiente de múltiples pocillos. El reactivo puede secarse o fijarse sobre un soporte sólido móvil tal como una perla o una tira reactiva, o un pocillo.

65 En la utilización, el tubo con el reactivo puede reconstituirse con (1) tampón Tris-acetato a una concentración de entre 1 mM y 60 mM y polietilenglicol a una concentración de entre el 1% y el 12% en peso o en volumen. Si se secaron o se fijaron los reactivos sobre un soporte sólido móvil, puede dejarse caer el soporte en un tubo y

reconstituirse. Tal como se comentó anteriormente, los cebadores pueden secarse como parte del reactivo o añadirse tras la reconstitución. Finalmente, se añade un ácido nucleico diana, o una muestra que se sospecha que contiene un ácido nucleico diana, para comenzar la reacción. Se incuba la reacción hasta que se alcanza un grado de amplificación deseado.

5 Como otro ejemplo, pueden ensamblarse los siguientes reactivos combinando cada reactivo de tal manera que cuando se constituyen presentarán las siguientes concentraciones: (1) recombinasa uvsX 100-200 ng/μl; (2) gp32 300-1000 ng/μl; (3) polimerasa de Bsu o polimerasa de T4 10-50 ng/μl; (4) dNTP 50-500 μM; (5) DTT de 0,1 a 10 mM; (6) ATP o un análogo de ATP 3 mM; (7) uvsY de 16 ng/μl a 60 ng/μl; (8) de 50 nM a 1000 nM de un primer cebador y de 50 nM a 1000 nM de un segundo cebador; (9) acetato de potasio de 40 mM a 160 mM; (10) acetato de magnesio de 5 mM a 20 mM; (11) fosfocreatina de 10 mM a 40 mM; (12) creatina cinasa de 50 ng/μl a 200 ng/μl. Se liofilizan y se almacenan estos reactivos. En la utilización, se reconstituyen los reactivos con tampón Tris-acetato a una concentración de entre 1 mM y 60 mM y polietilenglicol a una concentración de entre el 1% y el 12% en peso o en volumen. Los cebadores, el punto 8 anterior, pueden omitirse antes de la liofilización y añadirse tras la reconstitución. Para iniciar la RPA, se añade un ácido nucleico diana, o una muestra que se sospecha que contiene un ácido nucleico diana. Se incuba la reacción hasta que se alcanza un grado de amplificación deseado.

También se describe en la presente memoria un kit para realizar la RPA. El kit puede comprender cualquiera de los reactivos comentados anteriormente para RPA en las concentraciones descritas anteriormente. Los reactivos del kit pueden estar liofilizados. Por ejemplo, el kit puede contener (1) recombinasa uvsX 100-200 ng/μl; (2) gp32 de 300 ng/μl a 1000 ng/μl; (3) polimerasa de Bsu o polimerasa de T4 de 10 ng/μl a 50 ng/μl; (4) dNTP de 50 μM a 500 μM; (5) DTT de 0,1 a 10 mM; (6) ATP o un análogo de ATP de 1 mM a 5 mM; (7) uvsY de 16 ng/μl a 60 ng/μl; (8) de 50 nM a 1000 nM de un primer cebador y de 50 nM a 1000 nM de un segundo cebador (opcional); (9) acetato de potasio de 40 mM a 160 mM; (10) acetato de magnesio de 5 mM a 20 mM; (11) fosfocreatina de 10 mM a 40 mM; (12) creatina cinasa de 50 ng/μl a 200 ng/μl.

En una realización preferida, se realiza la RPA con varias enzimas auxiliares que pueden fomentar un desensamblaje eficaz de complejos de agente de recombinasa/ADNbc tras la iniciación de la síntesis de ADN. Estas enzimas auxiliares incluyen aquellas que pueden estimular el desensamblaje de 3' a 5' y aquellas que pueden soportar el desensamblaje de 5' a 3'.

Las enzimas auxiliares incluyen varias polimerasas que pueden desplazar RecA en el sentido de 3' a 5' y pueden estimular el desensamblaje de 3' a 5' de complejos de agente de recombinasa/ADNbc (Pham *et al.*, 2001). Estas ADN polimerasas incluyen Pol V de *E. coli* y polimerasas homólogas de otras especies. Normalmente en la vida de *E. coli*, se produce desplazamiento de RecA en el sentido de 3' a 5' como parte de la síntesis dirigida a lesiones de SOS en sintonía con SSB, abrazaderas deslizantes y ADN polimerasa. La polimerasa esencial para esta actividad en *E. coli* es Pol V, un miembro de la superfamilia recientemente descubierta de polimerasas que incluye UmuC, DinB, Rad30 y Rev1, cuya función *in vivo* es copiar moldes de lesión de ADN. De manera crítica para la RPA, el desensamblaje de 3' a 5' *in vitro* de filamentos de RecA no puede catalizarse por Pol I, Pol III o Pol IV solas. Sólo Pol V, en sintonía con SSB, presenta actividad de desensamblaje de RecA/ADNbc de 3' a 5' independiente de ATP medible. En efecto, Pol V empuja y retira RecA de ADN en un sentido de 3' a 5' por delante de la polimerasa (Pham *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2000). La inclusión de Pol V o un homólogo funcional puede mejorar la eficacia de amplificación.

Otras enzimas auxiliares incluyen una clase de enzimas denominadas helicasas que pueden utilizarse para fomentar el desensamblaje de RecA a partir de ADNbc. Estas fomentan el desensamblaje en los sentidos tanto de 5' a 3' como de 3' a 5'. Las helicasas son componentes esenciales del procedimiento de recombinación *in vivo* y funcionan para mover los puntos de ramificación de productos intermedios de recombinación de un lugar a otro, para separar cadenas, y para desensamblar y reciclar componentes unidos a ADN. Tras haberse producido la primera ronda de invasión/síntesis en RPA, dos nuevos dúplex de ADN se "marcan" por la presencia de RecA unida sobre el sitio al que deben unirse los cebadores para rondas de síntesis adicionales. En una situación de este tipo el ADNbc tiende a ocupar el sitio de alta afinidad en RecA, u homólogos, hasta que se desplaza activamente, o bien mediante disociación dependiente de hidrólisis de ATP en el sentido de 5' a 3', lo cual puede ser limitante, o bien mediante disociación de 3' a 5' mediante algún otro procedimiento activo. Un complejo de helicasa ideal para estimular el desensamblaje de RecA a partir de productos intermedios consiste en las proteínas RuvA y RuvB de *E. coli*. El complejo RuvAB fomenta la migración de ramificaciones, y disocia la proteína RecA, permitiendo que RecA se recicle (Adams *et al.*, 1994). Normalmente, el complejo RuvAB se dirige a productos intermedios de recombinación, particularmente estructuras de tipo unión de Holliday. A medida que avanza el complejo RuvAB rodea el ADN y retira RecA a la fuerza del ADN en una translocación impulsada por ATP (Cromie y Leach, 2000; Eggleston y West, 2000). Esta actividad de disociación de RecA se ha demostrado utilizando ADNbc superenrollado unido a RecA, que ni siquiera presenta uniones de Holliday (Adams *et al.*, PNAS 1994). El complejo RuvAB puede reconocer estructuras ramificadas dentro del ADN recubierto con RecA. La incorporación de RuvAB en la mezcla de RPA fomentará la disociación de RecA a partir de ADNbc tras el intercambio de cadena y el desplazamiento, permitiendo la síntesis renovada del molde duplicado a partir del mismo sitio. Adicionalmente, el complejo RuvAB puede actuar en sintonía con RuvC, que finalmente corta y resuelve las uniones de Holliday. Añadiendo RuvC a mezcla de la reacción de RPA, pueden resolverse estructuras complicadas tales como uniones de Holliday formadas en sitios de invasión. La

actividad resolvasa, tal como la proporcionada por RuvC, es particularmente importante cuando los oligonucleótidos de selección como diana son parcialmente bicatenarios. En tales situaciones la migración de ramificaciones inversa puede generar uniones de Holliday, que entonces pueden resolverse mediante el complejo RuvABC, para generar productos de amplificación separados limpios.

Todavía otras enzimas auxiliares incluyen la proteína RecG de *E. coli*. RecG puede estimular el desensamblaje de estructuras ramificadas. *In vivo*, esta proteína funciona para invertir horquillas de replicación en sitios de daño de ADN desenrollando las cadenas tanto adelantada como retrasada impulsando la horquilla de replicación de vuelta para generar una unión de 4 vías (Cox *et al.*, 2000; Dillingham y Kowalczykowski, 2001; Singleton *et al.*, 2001). *In vivo*, tales uniones funcionan como sustratos para cambio de cadena para permitir superar la lesión. *In vitro*, RecG se unirá a bucles D, y conducirá a una disminución de las estructuras de bucle D impulsando la migración de ramificaciones inversa. RecG prefiere una unión con elementos bicatenarios a ambos lados, por tanto oligonucleótidos de selección como diana parcialmente bicatenarios, homólogos al sitio de selección como diana en regiones tanto monocatenarias como bicatenarias, serán ideales. Esto estimulará la migración de ramificaciones inversa y la formación de una unión de Holliday, que puede resolverse mediante el complejo RuvABC. *In vivo*, RecG y RuvAB pueden competir para proporcionar diferentes desenlaces de recombinación dado que la migración de ramificaciones se verá impulsada en ambas direcciones (McGlynn y Lloyd, 1999; McGlynn *et al.*, 2000). En ambos casos, las proteínas seleccionan como diana ADN de unión recubierto con RecA, y lo desensamblan de una manera activa.

Otras enzimas auxiliares útiles en una mezcla de reacción de RPA son aquellas que permiten una generación continua de filamentos de nucleoproteína de RecA en presencia de ATP y SSB. Con el fin de permitir la retirada de RecA en los momentos apropiados, se prefiere utilizar ATP en vez de ATPyS en una reacción de RPA. Desafortunadamente los filamentos de RecA/ADNmc formados con ATP se despolimerizan espontáneamente en el sentido de 5' a 3', y en presencia de SSB, tal como se requiere en este caso, la nueva polimerización no se producirá a tasas significativas. La solución a este problema es la utilización de las proteínas RecO, RecR, y posiblemente RecF. Alternativamente la proteína uvsY puede emplearse para estabilizar los filamentos de nucleoproteínas de uvsX de T4 de una manera similar. En presencia de SSB y ATP, los filamentos de RecA/ADNmc se disocian (Bork *et al.*, 2001; Webb *et al.*, 1995; Webb *et al.*, 1997; Webb *et al.*, 1999). Si se incubaba RecA/ADNmc en presencia de proteínas RecO y RecR, esta disociación no se produce. De hecho, la proteína RecR permanece asociada con el filamento y estabiliza la estructura de manera indefinida. Aunque se una ADNmc a SSB, en presencia de RecR y RecO, pueden volver a ensamblarse filamentos de RecA desplazando SSB. En el sistema de fago T4 se atribuyen propiedades similares a la proteína uvsY. Por tanto es posible evitar la utilización de ATPyS, si es necesario, utilizando ATP en presencia de RecO y RecR para mantener la integridad de filamentos de RecA/ADNmc, o uvsY para mantener la integridad de filamentos de uvsX/ADNmc. La proteína RecF interacciona con el sistema de RecO y RecR de una manera aparentemente opuesta. RecF compete con RecR tendiendo a impulsar el desensamblaje de filamentos *in vitro*. Es probable que los tres componentes *in vivo* funcionen juntos para controlar la generación de estructuras invasoras, al tiempo que limitan el grado de recubrimiento con RecA del ADNmc. En otra realización preferida, se incluye RecF en reacciones de RPA a una concentración apropiada para repetir la dinámica de los procedimientos *in vivo*. Además, RecF puede facilitar la disociación de productos intermedios recubiertos con RecA tras producirse la invasión.

Tal como se describe, la utilización de ATP en vez de ATPyS, y/o la utilización de polimerasas de desplazamiento y helicasas (por ejemplo el complejo RuvA/RuvB), RecO, RecR y RecF, o alternativamente la recombinasa uvsX de T4 con la proteína uvsY, debe permitir la amplificación exponencial de ADN bicatenario impulsando la regeneración continua de sitios de selección como diana. Sin embargo, este procedimiento sigue siendo sensible a diferencias en la velocidad de iniciación que pueden producirse en los dos sitios de selección como diana opuestos. Tales diferencias pueden conducir a una disminución de la eficacia de amplificación, y a la producción de algo de ADN monocatenario. El procedimiento de PCR evita en gran medida estas complicaciones porque la ciclación de temperatura conduce a la síntesis coordinada desde ambos lados. En otra realización, puede inducirse una situación análoga a la condición de PCR que acaba de describirse utilizando mutantes sensibles a la temperatura (ts) de RecA que no son funcionales a 42°C, pero que funcionan a temperaturas inferiores en el intervalo de 25 a 37°C (Alexseyev *et al.*, 1996; Hickson *et al.*, 1981). En este caso, la síntesis desde cualquier extremo puede sincronizarse reduciendo periódicamente hasta la temperatura permisiva y después aumentando la reacción hasta una temperatura no permisiva para la función de la proteína RecA mutante, pero permisiva para otros componentes. Realizando la RPA con mutantes tsRecA en combinación con la ciclación de temperaturas de reacción, puede controlarse el número de moléculas de ADN producidas. Aunque esto requerirá algún mecanismo para proporcionar la ciclación de temperatura, las temperaturas están muy por debajo de las que requeriría la utilización de proteínas derivadas de organismos termófilos. De hecho, un sencillo dispositivo de ciclación de temperatura de baja potencia portátil o químico puede ser suficiente para controlar tales ciclos de reacción.

La RPA, como todos los demás procedimientos de amplificación de ácido nucleico actuales, emplea polimerasas para generar copias de moléculas de ácido nucleico de molde. Una necesidad de la mayoría de las ácido nucleico polimerasas es que la incorporación requiere un resto 3'-hidroxilo libre en el azúcar terminal de un tramo corto de ácido nucleico bicatenario adyacente al sitio de nueva síntesis. Este tramo de ácido nucleico bicatenario se forma normalmente en un molde mediante una secuencia complementaria corta, denominada cebador, que sirve como

sitio de iniciación para la reacción de síntesis por polimerasa. En algunos casos, puede utilizarse una modificación en 3', tal como un sulfhidrilo, para cebar la reacción de síntesis. El ácido nucleico cebador, que experimenta apareamiento de bases con el molde y se extiende por la polimerasa, puede ser ARN o ADN. *In vivo*, durante la replicación de ADN genómico, se sintetizan *de novo* secuencias de cebadores de ARN sobre ADN de molde mediante enzimas primasas. Normalmente, para reacciones *in vitro* el cebador se suministra como un ADN monocatenario (o ADN o ARN modificado) corto, con frecuencia sintetizado químicamente, y habitualmente se denomina cebador oligonucleotídico. El cebador es con frecuencia de una secuencia específica, aunque también pueden utilizarse cebadores al azar. El cebador se dirige a secuencias complementarias gracias a su capacidad de apareamiento de bases específico. La formación de híbridos entre el cebador oligonucleotídico y el ácido nucleico diana se forman normalmente mediante incubación de los dos en disolución en condiciones de sal, pH, y temperatura que permiten el apareamiento espontáneo.

En el caso de la PCR el cebador oligonucleotídico está habitualmente en un gran exceso por dos motivos principales. En primer lugar, la alta concentración impulsará un apareamiento rápido. En segundo lugar, a medida que avanza la reacción a través de rondas de fusión, apareamiento y extensión, el cebador se consume y se vuelve limitante. Con frecuencia los ácidos nucleicos dirigidos a PCR son inicialmente de carácter bicatenario, y si no es así, se vuelven bicatenarios tras el primer ciclo sintético. Tales moléculas bicatenarias no pueden aparearse con nuevos oligonucleótidos en las condiciones de temperatura y disolvente apropiadas para la actividad catalítica y la estabilidad de la mayoría de las proteínas procariotas y eucariotas. Por consiguiente, con el fin de permitir ciclos de amplificación, en primer lugar deben separarse el molde original y las cadenas recién sintetizadas antes de que pueda producirse de nuevo el apareamiento. En la práctica esto se alcanza mediante fusión térmica. Para la PCR, se requieren temperaturas de al menos 80°C para la fusión térmica de la mayoría de las moléculas de ácido nucleico bicatenario con longitudes superiores a 100 pares de bases. En la mayoría de los protocolos de PCR se aplica una temperatura de 90 a 100°C para fundir el ADN. Tales temperaturas sólo permiten utilizar enzimas termoestables poco frecuentes. Estas polimerasas se derivan normalmente de procariotas termófilos.

La ventaja de la RPA es que permite la formación de tramos cortos de ácidos nucleicos bicatenarios que llevan un 3'-OH libre para la extensión a partir de moldes bicatenarios sin fusión térmica. Esto se logra utilizando la proteína RecA de *E. coli* (o una proteína relacionada con RecA de otro filo incluyendo la proteína UvsX de T4). En presencia de ATP, dATP, ddATP, UTP, ATPyS y posiblemente otros tipos de nucleósido trifosfatos y sus análogos, RecA o uvsX formarán un filamento de nucleoproteína alrededor de ADN monocatenario. Entonces este filamento barrerá ADN bicatenario. Cuando se localizan secuencias homólogas la recombinasa catalizará una reacción de invasión de cadena y el apareamiento del oligonucleótido con la cadena homóloga del ADN diana. La cadena de apareamiento original se desplaza por la invasión de cadena dejando una burbuja de ADN monocatenario en la región.

La proteína RecA puede obtenerse de fuentes comerciales. Alternativamente puede purificarse según protocolos convencionales, por ejemplo (Cox *et al.*, 1981; Kuramitsu *et al.*, 1981). Se han purificado homólogos de RecA a partir de organismos termófilos incluyendo *Thermococcus kodakaraensis* (Rashid *et al.*, 2001), *Thermotoga maritima* (Wetmur *et al.*, 1994), *Aquifex pyrophilus* (Wetmur *et al.*, 1994), *Pyrococcus furiosus* (Komori *et al.*, 2000), *Thermus aquaticus* (Wetmur *et al.*, 1994), *Pyrobaculum islandicum* (Spies *et al.*, 2000) y *Thermus thermophilus* (Kato y Kuramitsu, 1993). También se ha purificado RecA a partir de otros procariotas, por ejemplo, *Salmonella typhimurium* (Pierre y Paoletti, 1983), *Bacillus subtilis* (Lovett y Roberts, 1985), *Streptococcus pneumoniae* (Steffen y Bryant, 2000), *Bacteroides fragilis* (Goodman *et al.*, 1987), *Proteus mirabilis* (West *et al.*, 1983), *Rhizobium meliloti* (Better y Helinski, 1983), *Pseudomonas aeruginosa* (Kurumizaka *et al.*, 1994), de eucariotas, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* (Heyer y Kolodner, 1989), *Ustilago maydis* (Bennett y Holloman, 2001), incluyendo vertebrados, por ejemplo, Rad51 humana (Baumann *et al.*, 1997) y *Xenopus laevis* (Maeshima *et al.*, 1996), así como plantas incluyendo brócoli (Tissier *et al.*, 1995). También se muestra en la presente memoria que pueden purificarse recA de *E. coli*, y proteína UvsX de T4, a partir de cultivos de sobreexpresión utilizando una etiqueta de hexahistidina en el extremo C-terminal, y seguir siendo biológicamente activo. Esto es de gran utilidad para la producción de proteína recombinante.

Por motivos de claridad de la descripción, el procedimiento de amplificación por recombinasa-polimerasa de la cadena adelantada (IsRPA) puede dividirse en cuatro fases.

1) Selección como diana de secuencia

Se inicia la RPA seleccionando como diana secuencias utilizando oligonucleótidos sintéticos recubiertos con RecA, o un homólogo funcional tal como la proteína UvsX de T4. Con el fin de permitir la amplificación exponencial se emplearán dos de tales oligonucleótidos sintéticos de tal manera que sus extremos 3' libres estén orientados uno hacia el otro. Los filamentos de nucleoproteínas que comprenden estos oligonucleótidos y proteína recombinasa identificarán dianas en ADN complejo de manera rápida y específica. Una vez seleccionada como diana la proteína recombinasa cataliza el intercambio de cadena de tal manera que se forman estructuras de bucle D. Puede ser necesario utilizar ATP en vez de ATPyS en el procedimiento para una amplificación eficaz. Si se utiliza ATP, moléculas RecO, RecR y/o RecF pueden resultar esenciales para una amplificación eficaz, o proteína uvsY si se emplea recombinasa uvsX.

2) Iniciación de la síntesis de ADN

Las ADN polimerasas detectarán y se unirán al híbrido entre los oligonucleótidos invasores y el ADN de molde e iniciarán la síntesis de ADN a partir del 3'-hidroxilo libre expuesto en el híbrido. La exposición de este 3'-hidroxilo, y la posterior síntesis de ADN, requerirá probablemente el desensamblaje de proteína recombinasa a partir del híbrido bicatenario formado mediante intercambio de cadena. Para alcanzar este desensamblaje probablemente será necesario emplear ATP, que puede soportar el desensamblaje espontáneo de recombinasa a partir de complejos de invasión. Adicionalmente, puede estimularse/potenciarse el desensamblaje mediante la utilización de otras proteínas contenidas dentro de la mezcla de reacción tales como RuvA, RuvB, RuvC, recG, otras helicasas, u otros componentes estimulantes, que pueden actuar para separar recombinasa a partir del producto de intercambio de cadena.

3) Síntesis de ADN por desplazamiento de cadena y separación de replicón.

A medida que las ADN polimerasas sintetizan copias complementarias de ADN de molde utilizando los 3'-hidroxilos libres de oligonucleótidos invasores, o sus productos parcialmente extendidos, las polimerasas desplazan ADN monocatenarios, que pueden estar recubiertos con proteínas de unión monocatenarias (SSB) incluidas en la reacción. En una configuración ideal, la invasión de oligonucleótidos en ambos extremos de la secuencia de ácido nucleico diana se producirá en marcos temporales similares, de tal manera que las dos polimerasas en el mismo ácido nucleico de molde avanzarán inicialmente una hacia la otra. Cuando estos complejos en extensión se encuentran, el molde original debe separarse simplemente, y las polimerasas continuarán sintetizando sin necesidad de desplazamiento de cadena, copiando ahora el molde de ADNmc unido a SSB. Debido al impedimento estérico, las polimerasas pueden disociarse temporalmente del molde cuando las polimerasas se encuentran para permitir la separación de las dos cadenas de molde.

4) Terminación de la síntesis y nueva invasión.

Una vez separadas las cadenas de molde, las polimerasas pueden completar la extensión hasta el extremo del molde (o más allá de la secuencia que actúa como segundo sitio de selección como diana enfrentado si el molde inicial es más largo que el producto deseado). Para permitir la amplificación exponencial es necesario seleccionar como diana nuevos productos y replicarlos de una manera similar a los moldes originales, es decir a partir de ambos extremos seleccionados como diana. El sitio seleccionado como diana recién sintetizado estará libremente disponible para filamentos de recombinasa/oligonucleótido de selección como diana. El sitio inicialmente utilizado para cebar la síntesis también debe haberse liberado como consecuencia de la utilización de condiciones en la reacción que favorecen el desensamblaje de recombinasa a partir de productos de intercambio de cadena. Con la condición de que la nueva invasión en este sitio posterior se produzca en menos tiempo del que necesita la polimerasa para sintetizar más allá del segundo sitio de selección como diana, cebarse en ese segundo sitio, y volver al primer sitio, entonces ADN monocatenario no será el producto principal y se producirá amplificación exponencial. Disponer de múltiples complejos sintéticos funcionando en el mismo molde hace surgir la posibilidad de que puedan alcanzarse tiempos de amplificación muy cortos.

Amplificación por recombinasa-polimerasa (RPA) utilizando síntesis de la cadena adelantada y retrasada simultánea

En la descripción de (RPA de la cadena adelantada) IsRPA se detalla un sistema de múltiples componentes con la capacidad para regenerar secuencias de selección como diana permitiendo así la amplificación exponencial de ADN bicatenario. Al contrario que el procedimiento de Zarlring, la IsRPA evita la producción lineal de ADN monocatenario. Hay otro enfoque para solucionar este problema que evita completamente la posibilidad de productos monocatenarios y un requisito de iniciación en extremos simultánea. Este procedimiento implica necesariamente una mezcla de reacción más compleja. No obstante, en la actualidad se entienden bien todos componentes requeridos y deben ser susceptibles de ensamblarse en un único sistema. Este sistema repetirá acontecimientos que se producen durante el ciclo de replicación normal de células para permitir la síntesis de la cadena adelantada y retrasada acoplada. Este procedimiento, RPA de la cadena adelantada/retrasada, se describe resumidamente en las figuras 1 y 3.

Durante la replicación normal *in vivo*, el ADN bicatenario se separa simultáneamente en 2 cadenas y ambas se copian para dar 2 nuevas moléculas de ADN bicatenario mediante una maquinaria de replicación. Esta "maquinaria" acopla la síntesis de la cadena adelantada de 5' a 3' convencional con síntesis de la cadena retrasada, en la que se sintetizan cebadores de ARN cortos sobre ácidos nucleicos de molde mediante enzimas primasas. Durante la síntesis de la cadena retrasada, se producen fragmentos de ADN cortos, denominados fragmentos de Okazaki, que se ligan entre sí para formar cadenas retrasadas contiguas. Esta síntesis de la cadena adelantada/cadena retrasada simultánea es responsable de la duplicación de todo el genoma de organismos procariontes y eucariotes por igual. Los componentes esenciales de este sistema se han identificado y caracterizado bioquímicamente. Los componentes pueden ensamblarse *in vitro* para alcanzar una amplificación más eficaz que lo que es posible utilizando sólo síntesis de la cadena adelantada.

Los componentes esenciales de la "maquinaria" de replicación están ahora bien caracterizados para *E. coli* y

algunos otros organismos tales como el fago T4. Esta maquinaria comprende la holoenzima Pol III (Glover y McHenry, 2001; Kelman y O'Donnell, 1995) y el primosoma (Benkovic *et al.*, 2001; Marians, 1999). La holoenzima Pol III está constituida por diez componentes polipeptídicos. Cada holoenzima contiene dos estructuras de núcleo orientadas de manera asimétrica, consistiendo cada una en una polimerasa (subunidad α) y dos componentes de núcleo adicionales, la subunidad ϵ , que presenta actividad exonucleasa de 3' a 5', y la subunidad θ . Además del complejo de núcleo, otro conjunto de polipéptidos proporciona a la holoenzima capacidad de procesamiento y síntesis de la cadena adelantada retrasada acoplada. La abrazadera deslizante de dímero β rodea el ADN de molde fijando el complejo al molde con una afinidad extremadamente alta. La abrazadera deslizante se carga sobre el ADN por el cargador de abrazadera de DnaX que comprende las subunidades polipeptídicas $T_2\gamma\delta\delta'\chi\psi$.

Por motivos de claridad de la descripción, el procedimiento de RPA puede dividirse en cuatro fases. En realidad, todas las fases se producen simultáneamente en una única reacción.

1) Selección como diana de secuencia

Se inicia la RPA seleccionando como diana secuencias utilizando oligonucleótidos sintéticos recubiertos con RecA, o uvsX de T4, o un homólogo funcional. Tales filamentos de nucleoproteínas identificarán dianas en ADN complejo de manera rápida y específica. Una vez seleccionado como diana, la proteína RecA o uvsX cataliza el intercambio de cadena de tal manera que se forma una estructura de bucle D. Puede ser necesario utilizar ATP en vez de ATP γ S en el procedimiento para una amplificación eficaz. Sin embargo, la asociación de síntesis de la cadena adelantada y retrasada puede evitar el requisito de una separación de recombinasa muy rápida tras la iniciación de la síntesis. Si se utiliza ATP, puede ser necesario emplear RecO, RecR y RecF con recombinasa recA bacteriana, o proteínas uvsY de T4 pueden resultar esenciales para una amplificación eficaz con proteína UvsX de T4.

2) Ensamblaje de primosoma

Pueden ensamblarse primosomas en bucles D. Normalmente, en *E. coli*, se forman estructuras de bucle D mediante RecA como parte del mecanismo para rescatar ADN dañado *in vivo*, o durante otras formas de recombinación. El propósito de la acción combinada de intercambio de cadena mediado por RecA y ensamblaje de primosoma es generar una horquilla de replicación. Una horquilla de replicación es la estructura de nucleoproteína que comprende las cadenas de ADN de molde separadas y el replisoma. El replisoma consiste en el complejo de holoenzima polimerasa, el primosoma, y otros componentes necesarios para replicar simultáneamente ambas cadenas de ADN de molde. Los primosomas proporcionan las funciones tanto de desenrollamiento de ADN como de cebado de fragmentos de Okazaki requeridas para la progresión de la horquilla de replicación. Se produce un ensamblaje de primosoma similar en productos intermedios de recombinación en el fago T4 dirigido por las proteínas gp59 y gp41.

Se ha estudiado intensamente el ensamblaje del primosoma mediante análisis genético y bioquímico en *E. coli*. El conjunto mínimo de polipéptidos requeridos para este procedimiento se conoce bien y existe como componentes purificados. Las proteínas de ensamblaje de primosoma son PriA, PriB, PriC, DnaT, DnaC, DnaB y DnaG. Se ha mostrado que estas proteínas son suficientes para ensamblar un complejo de primosoma en ADN de bacteriófago Φ X174 *in vitro* (Kornberg y Baker, 1992; Marians, 1992). PriA se une al sitio de ensamblaje de primosoma (PAS) en el cromosoma de Φ X174. Después PriB, DnaT y PriC se unen secuencialmente al complejo PriA-ADN. PriB parece estabilizar a PriA en el PAS y facilitar la unión de DnaT (Liu *et al.*, 1996). PriC sólo se requiere parcialmente para la reacción de ensamblaje completa. La omisión de PriC de la reacción reducirá el cebado de 3 a 4 veces (Ng y Marians, 1996a; Ng y Marians, 1996b). La función de PriC en la bacteria es genéticamente redundante a la de PriB. Entonces, DnaC carga DnaB en el complejo de una manera dependiente de ATP. Este complejo PriABC-DnaBT es competente para translocarse a lo largo del cromosoma. La DnaG primasa puede interactuar transitoriamente con el complejo para sintetizar cebadores de ARN.

Durante la replicación en *E. coli*, DnaB y DnaG funcionan como helicasa y primasa respectivamente. Estos dos componentes se requieren continuamente en asociación con la holoenzima Pol III para sintetizar cebadores para los fragmentos de Okazaki. Por tanto, DnaB y DnaG son los componentes de núcleo del primosoma móvil asociados con la horquilla de replicación. Los otros componentes de primosoma descritos son esenciales para el ensamblaje del primosoma sobre ADN, y para asociarse a una polimerasa dimérica. Las proteínas de ensamblaje de primosoma se requieren para volver a establecer horquillas de replicación en productos intermedios de recombinación formados mediante RecA e intercambio de cadena. PriA puede iniciar el ensamblaje de un replisoma, competente para la síntesis de ADN, en productos intermedios de recombinación. Es posible seleccionar como diana bucles D *in vitro* con una mezcla de PriA, PriB y DnaT, que entonces son competentes para incorporar DnaB y DnaC. Una vez formado un primosoma en el bucle D, todo lo que queda para iniciar la replicación es cargar un complejo de holoenzima en el sitio. Alternativamente en el sistema del fago T4 la proteína cargadora de helicasa gp59 recluta y ensambla la helicasa replicativa gp41 en estructuras de bucle D.

3) Ensamblaje de horquilla e iniciación de la síntesis de ADN

Las horquillas de replicación se ensamblarán en el sitio de ensamblaje de primosoma. En *E. coli* la presencia de un extremo 3' libre en la cadena invasora del bucle D estimula al complejo de cargador de abrazadera de DnaX

detallado anteriormente para ensamblar un dímero β en este sitio para actuar como abrazadera deslizante. La holoenzima y 2 unidades de núcleo se unen entre sí mediante la subunidad τ de armazón. La subunidad τ también presenta superficies de interacción para el dímero β , para el cargador de abrazadera, y para el componente de helicasa DnaB del primosoma. Estas múltiples interacciones son necesarias para coordinar la síntesis de las cadenas tanto adelantada como retrasada utilizando los dos complejos de polimerasa de núcleo unidos de manera asimétrica. En el fago T4 las proteínas gp59/41 con las proteínas uvsY y gp32, y con otros componentes, coordinan el ensamblaje de la abrazadera deslizante gp45 ayudadas por las proteínas gp44 y gp62 que inician el ensamblaje de replisoma.

En *E. coli* la primasa primosómica, DnaG, sintetiza un cebador de ARN corto sobre el molde de ADN de cadena retrasada desenrollado. En presencia de la holoenzima, el cargador de abrazadera reconoce el dúplex ARN/ADN y carga una segunda abrazadera de dímero β sobre este sitio. La presencia de un primosoma activo y la interacción de la subunidad τ con DnaB son críticos para garantizar la síntesis de cadena adelantada/retrasada simultánea. Sin esta interacción la polimerasa se alejará del sitio de primosoma sin acoplamiento.

Ahora se ensambla una horquilla de replicación. Ahora se producirá simultáneamente la síntesis de la cadena tanto adelantada como retrasada, y la helicasa DnaB separará las cadenas de molde por delante de la holoenzima entrante. El núcleo de holoenzima de la cadena retrasada generará fragmentos de Okazaki de 1 a 2 kilobases de longitud. Una vez que la polimerasa de la cadena retrasada se encuentra con el cebador de ARN anterior, se disocia de la abrazadera β y se inicia la síntesis a partir de una abrazadera recién ensamblada cargada en la proximidad de la parte delantera de la cadena adelantada. Volverá a utilizarse el mismo núcleo de holoenzima de la cadena retrasada ya que está físicamente anclado al núcleo de la cadena adelantada.

Hay una interacción dinámica entre las abrazaderas de dímero β , las subunidades de núcleo y los y cargadores de abrazadera. Sus afinidades pueden cambiar dependiendo de las circunstancias físicas. El dímero β que se ha "abandonado" en el extremo de los fragmentos de Okazaki puede reciclarse mediante retirada activa por cargadores de abrazadera, o puede estar presente un exceso de subunidad δ .

Los cebadores de ARN en los extremos de fragmentos de Okazaki se retiran mediante la actividad exonucleasa de 5' a 3' de la ADN polimerasa I. Entonces, la ADN ligasa une los fragmentos de Okazaki entre sí formando una cadena retrasada continua.

4) Encuentro de horquillas y terminación

En la RPA, la replicación se inicia en dos sitios distantes y las horquillas de replicación están orientadas una hacia la otra. A medida que las horquillas de replicación convergen las dos cadenas de molde originales se disociarán una de otra a medida que se separan completamente tanto detrás como delante de cada horquilla. Entonces, el núcleo de la cadena adelantada de cada horquilla completará la síntesis, se procesarán los cebadores de ARN restantes, y los productos finales serán dos moléculas bicatenarias. Puede esperarse razonablemente amplificar los ADN del orden de varias megabases (Mb) mediante un enfoque de este tipo. En esta descripción, una megabase también abarca mega-pares de bases. Basándose en la velocidad de síntesis conocida de la holoenzima Pol III, puede esperarse que las horquillas de replicación avancen a una velocidad de aproximadamente 1 Mb / 1000 segundos, es decir, aproximadamente de 15 a 20 minutos por ciclo para un fragmento de 1 Mb.

La consideración final es el mecanismo mediante el cual se alcanzará una rápida amplificación exponencial de ADN. La clave para este procedimiento será permitir la nueva invasión eficaz de sitios de selección como diana mediante la utilización de mezclas de helicasas, resolvasas y las proteínas RecO, RecR y RecF. En condiciones apropiadas la nueva invasión y el ensamblaje de primosoma deben ser posibles poco después de haberse alejado una holoenzima del sitio de ensamblaje de horquilla. Las invasiones continuas no deben presentar ningún problema ya que el ADN simplemente se ramifica en muchos puntos. Cada ramificación se resolverá de manera natural a medida que se encuentra con la horquilla entrante. En estas condiciones puede ser posible alcanzar una enorme amplificación en tiempos similares al tiempo empleado para replicar el ADN una única vez. Sin embargo, puede ser crítico limitar las concentraciones de oligonucleótidos de selección como diana para evitar el agotamiento de nucleótidos antes de la terminación de la síntesis.

Además del complejo de holoenzima, la maquinaria de replicación emplea otro complejo conocido como primosoma, que sintetiza la cadena retrasada y mueve la horquilla de replicación hacia delante. El complejo de primosoma comprende una helicasa codificada por DnaB y una primasa codificada por DnaG. Finalmente, además de las proteínas de la holoenzima y del primosoma, la replicación requiere la actividad de proteína de unión (SSB) a ADN monocatenario, ADN polimerasa I de *E. coli* y ADN ligasa. Estos dos últimos componentes se requieren para procesar fragmentos de Okazaki.

RPA anidada

En otra realización, puede realizarse la amplificación RPA en un procedimiento denominado "RPA anidada" en la presente memoria. Una dificultad en la detección de secuencias poco frecuentes es que puede haber una alta razón

de secuencia que no es no diana con respecto a diana. La capacidad de una RPA para distinguir entre ADN diana y que no es diana y amplificar sólo las secuencias diana es un aspecto clave de la sensibilidad mejorada. La distinción entre diana y no diana es un reflejo de la especificidad de los cebadores y de las condiciones de reacción. Cuanto más específica es una reacción mayor es la cantidad relativa de la secuencia diana específica que se produce y más fácil de detectar es ese producto. Un aumento de la especificidad también puede aumentar, por tanto, la sensibilidad.

La necesidad de sensibilidad y especificidad mejoradas puede tratarse utilizando RPA anidada. La RPA anidada implica una primera RPA de una primera región de ADN. Después se diluye la mezcla de reacción, por ejemplo, en 10, 20, 30, 40, 50, 75 ó 100 veces o más para reducir la concentración del primer par de cebadores, y se introduce un segundo par de cebadores en la mezcla de reacción y se repite la RPA. Según una realización de la invención, el segundo par de cebadores está diseñado para ser interno con respecto al primer par de cebadores para amplificar una subsecuencia del primer producto de RPA. El procedimiento aumenta la amplificación específica, es decir, reduce los productos de amplificación de fondo no específicos y por tanto aumenta la sensibilidad. Tales productos de amplificación no específicos, aunque surgen gracias a una homología parcial casual con los cebadores flanqueantes, es poco probable que también presenten homología suficiente con los cebadores anidados como para continuar amplificándose. La detección y especificidad de RPA pueden mejorarse adicionalmente marcando uno o ambos del segundo par de cebadores de tal manera que sólo se detectan cebadores amplificados con uno o ambos del segundo par de cebadores.

La RPA anidada no está limitada a la utilización de dos conjuntos de cebadores. Naturalmente, pueden utilizarse más conjuntos de cebadores para aumentar la especificidad o la sensibilidad. Por tanto, pueden utilizarse tres, cuatro o cinco pares de cebadores. Además, los diferentes conjuntos de cebadores, como otra realización de la invención, pueden compartir cebadores comunes tal como se ilustra en la figura 4.

En la figura 4, los conjuntos de cebadores están diseñados para utilizarse secuencialmente. Por ejemplo, se realiza una primera RPA con el conjunto de cebadores 1, se realiza una segunda RPA utilizando el producto amplificado de la primera RPA con un conjunto de cebadores 2, se realiza una tercera RPA utilizando el producto amplificado de la segunda RPA con un conjunto de cebadores 3, se realiza una cuarta RPA utilizando la secuencia amplificada de la tercera RPA con un conjunto de cebadores 4, y finalmente, se realiza una quinta RPA utilizando el producto amplificado de la cuarta RPA con un conjunto de cebadores 5. En este caso, los conjuntos de cebadores 1, 2 y 3, comparten un cebador común, el cebador (a). Los cebadores 3, 4 y 5 comparten un cebador común, el cebador (b).

La RPA anidada puede realizarse utilizando cualquiera de los dos procedimientos de RPA descritos así como una combinación de los dos procedimientos en cualquier orden particular. Es decir, la RPA puede realizarse únicamente mediante RPA de la cadena adelantada, únicamente mediante RPA de la cadena adelantada y retrasada, o una combinación de RPA de la cadena adelantada y RPA de la cadena adelantada y retrasada en cualquier orden particular.

Un beneficio de cualquiera de los procedimientos de RPA de la invención es el tamaño del producto amplificado. Mientras que los procedimientos de amplificación actuales tales como PCR están limitados a un límite superior de aproximadamente 10 Kb, los procedimientos de RPA pueden amplificar regiones de ácidos nucleicos de hasta cientos de megabases. Para la RPA de la cadena adelantada/retrasada, los tamaños de una secuencia diana que va a amplificarse pueden ser de cientos de megabases, tales como, por ejemplo, menos de 500 megabases, menos de 300 megabases, menos de 100 megabases, menos de 70 megabases, menos de 50 megabases, menos de 25 megabases, menos de 10 megabases, menos de 5 megabases, menos de 2 megabases, menos de una megabase, menos de 500 kb, menos de 200 kb, menos de 100 kb, menos de 50 kb, menos de 25 kb, o menos de 10 kb, menos de 5 kb, menos de 2 kb, menos de 1 kb. Para la IsRPA, los tamaños de una secuencia diana pueden estar en el intervalo de megabases tales como, menos de 5 megabases, menos de 2 megabases, menos de una megabase, menos de 500 kb, menos de 200 kb, menos de 100 kb, menos de 50 kb, menos de 25 kb, o menos de 10 kb, menos de 5 kb, menos de 2 kb, menos de 1 kb.

Consideraciones generales para reconstituir y permitir reacciones de amplificación mediadas por recombinasa

Tanto la IsRPA como la RPA de la cadena adelantada/retrasada se basan en la utilización similar de proteínas recombinasas para seleccionar como diana cebadores oligonucleotídicos, sin embargo se diferencian en el modo en el que se forman los nuevos dúplex hijos durante la amplificación. En RPA de la cadena adelantada/retrasada se establece una horquilla de replicación completa que sintetiza simultáneamente las cadenas adelantada y retrasada de modo que están formándose simultáneamente dos nuevos dúplex. En la RPA de la cadena adelantada (IsRPA), sólo se produce síntesis de la cadena adelantada de manera que la síntesis genera un dúplex y un ADN monocatenario desplazado como productos.

En la RPA, la síntesis de ADN iniciada tras el intercambio de cadena se logra mediante una polimerasa. Durante la extensión de la cadena recién sintetizada la polimerasa debe poder desplazar la cadena saliente, o bien sola o bien en combinación con una helicasa que puede mediar el desplazamiento de cadena saliente. La extensión del cebador invasor da finalmente como resultado la liberación de la cadena saliente como ADN monocatenario. Para garantizar

que se produce amplificación geométrica, y que la reacción produce una gran mayoría de ADN bicatenario, es necesario que este ADN monocatenario desplazado sirva como molde para la síntesis de ADN desde el sentido opuesto. Esto es una consideración básica para la amplificación utilizando IsRPA. Otras dos consideraciones básicas son la especie de polimerasa utilizada, y la existencia de un sistema de recombinasa dinámico, estable, que funcione eficazmente en presencia niveles saturantes de proteínas de unión monocatenarias. Estas consideraciones son importantes tanto para la RPA de la cadena adelantada/retrasada como para la IsRPA.

A) Garantizar la generación de ADN bicatenario a partir de la cadena desplazada

La generación de la segunda cadena de ADN en IsRPA puede lograrse de una de varias maneras:

1) El ADN monocatenario desplazado puede simplemente hibridarse con la cadena complementaria que se ha desplazado a partir de la invasión y extensión de un segundo oligonucleótido de selección como diana "enfrentado". Alternativamente el ADN monocatenario desplazado puede hibridarse directamente con el segundo oligonucleótido "enfrentado". Tales acontecimientos de hibridación pueden producirse espontáneamente, o pueden estar mediados por las actividades de asimilación de cadena de proteínas de unión a ADN tales como recombinasas o proteínas de unión a ADN monocatenario. Tras la hibridación una polimerasa se extenderá desde el extremo 3' libre para generar un producto bicatenario. Obsérvese que para que esto se produzca eficazmente el entorno de reacción debe permitir la hibridación de ADN monocatenarios complementarios, una situación que no siempre es compatible con los demás aspectos de la reacción de RPA. En algunas circunstancias puede utilizarse un oligonucleótido de hibridación con una estructura principal modificada, que no puede interactuar con la mayoría de las proteínas de unión a ADN.

2) Si la síntesis por desplazamiento de cadena comienza simultáneamente desde cebadores oligonucleotídicos opuestos en el mismo molde entonces los dos complejos de replicación convergentes se encontrarán finalmente en algún punto en el centro del molde. Con la condición de que estos complejos convergentes puedan rebasarse el uno al otro, las cadenas de molde se separarán y cada complejo completará la replicación copiando un molde monocatenario en lugar de un molde bicatenario sin necesidad adicional de desplazamiento de cadena.

3) Si la cadena saliente presenta la capacidad de formar una horquilla, entonces puede producirse la síntesis de la segunda cadena mediante auto-cebado. Esta actividad dará como resultado un dúplex con enlace covalente con una horquilla en un extremo, que puede convertirse en una diana para reacciones de invasión/extensión adicionales. Esta situación no es ideal para muchas aplicaciones, ya que generará productos con longitudes y estructuras variables. Sin embargo, esto puede ser aceptable para ensayos de detección, tales como algunas pruebas de diagnóstico. Además puede ser posible diseñar por ingeniería cebadores de tal manera que tras las primeras rondas de invasión/extensión la mayoría de las cadenas salientes pueden realizar el auto-cebado. Este modo de formación de ADN dúplex puede ser muy eficaz.

Cuál de estos tres procedimientos generales domina en una reacción de IsRPA dependerá de muchos factores. Los factores más importantes son la distancia que separa los dos cebadores oligonucleotídicos en la diana, la velocidad de invasión, y la secuencia de los oligonucleótidos y el molde.

En el segundo formato general de RPA, RPA de la cadena adelantada/retrasada, la generación de ADN monocatenario sustancial se evita estableciendo una horquilla de replicación completa en el sitio de invasión. Una horquilla de replicación completa permite la copia simultánea de las cadenas tanto adelantada como retrasada (lo que sería equivalente a la cadena saliente). La RPA de la cadena adelantada/retrasada es elegante al evitar la generación de ADN monocatenario, sin embargo se requiere un número mayor de proteínas distintas para generar horquillas de replicación completas. No obstante, la mayoría de los aspectos de optimización para reacciones de RPA se aplican tanto a IsRPA como a RPA de la cadena adelantada/retrasada.

B) Elección de la polimerasa, o sistema de polimerasa/helicasa

El procedimiento de IsRPA es similar en algunos aspectos a la PCR. Ambos procedimientos utilizan pares de cebadores oligonucleotídicos orientados con extremos 3' dirigidos uno hacia el otro en el ADN diana y ambos procedimientos alcanzan la amplificación geométrica mediante la utilización de productos de reacción como dianas para rondas posteriores de síntesis de ADN. Sin embargo, hay diferencias fundamentales en las configuraciones de la reacción. Por ejemplo, en la RPA el ADN diana es bicatenario antes de la síntesis, mientras que en la PCR es monocatenario tras la separación térmica de cadenas. En la RPA, la síntesis de ADN debe utilizar necesariamente ADN polimerasas o complejos de polimerasa que pueden realizar el desplazamiento de cadena. Además, debido a que las cadenas parcialmente copiadas están físicamente asociadas con cadena desplazada a lo largo del molde, hay un riesgo de que si la polimerasa se disocia temporalmente del molde el extremo 3' de la nueva cadena, y finalmente toda la nueva cadena, se perderá por la acción de migración de ramificaciones u otro fenómeno conocido como migración de burbujas. Esto sugiere que de manera ideal se utilizarán polimerasas procesivas para reacciones de RPA. También es importante considerar que si los complejos de replicación convergentes no pueden rebasarse fácilmente el uno al otro sin disociación de polimerasa entonces algunas polimerasas procesivas pueden inhibir la reacción de RPA en algunos moldes. En resumen, la elección ideal de polimerasa dependerá del formato preciso y del objetivo de la reacción de RPA particular, en particular el tamaño del producto que va a amplificarse.

C) Establecimiento de una actividad recombinasa activa persistente estable en un entorno de ruido suprimido

Una tercera consideración es cómo establecer una actividad recombinasa estable, pero dinámica, al tiempo que se silencia el ruido generado por el apareamiento de cebadores aberrantes observado a bajas temperaturas. Esto significa establecer un entorno de reacción que equilibra varios requisitos aparentemente incompatibles. Para una RPA eficaz, las proteínas recombinasas deben permanecer activas mientras están ensambladas en filamentos de oligonucleótido/recombinasa que barren para detectar ADN bicatenarios diana. Estos complejos también deben desensamblarse tras completar intercambios de cadena para permitir la síntesis de ADN. Esto debe suceder en un entorno rico en proteínas de ADN monocatenario. Estas proteínas se necesitan para estimular la recombinación y la síntesis de ADN mientras se impide un comportamiento de oligonucleótidos aberrante mediante fusión de estructuras secundarias. Fundamentalmente, las recombinasas y las proteínas de unión monocatenarias están en competición por la unión a oligonucleótido. Aunque las proteínas de unión monocatenarias son necesarias para permitir un desplazamiento de cadena eficaz durante la síntesis, suprimen la actividad de recombinación porque presentan una afinidad superior para ADN monocatenario y se unen con más cooperatividad que las recombinasas.

El establecimiento de un entorno de reacción de recombinasa/replicación funcional requiere cofactores de nucleótidos. RecA, y otras recombinasas, requieren cofactores de nucleótidos, tales como ATP, para ensamblar filamentos sobre ADN monocatenario, realizar búsquedas de homología, y completar el intercambio de cadena. Se ha supuesto que análogos no hidrolizables tales como ATP- γ -S serían incompatibles con RPA porque la estabilidad extremadamente alta del producto intermedio de ADN tricatenario/recA formado en presencia de con ATP- γ -S impediría la nueva invasión en dianas de cebadores y por tanto impediría una amplificación eficaz. Pueden incluso impedir cualquier acceso útil de polimerasa al producto intermedio de recombinación. Intentos iniciales de amplificar ADN utilizando recA de *E. coli* (Zarling *et al*) estuvieron probablemente limitados por el ATP- γ -S en las reacciones descritas.

El requisito de ATP en la reacción y el hecho de que los complejos de recombinasa estarán formándose y desensamblándose dinámicamente introducen complejidades adicionales, principalmente debido a interacciones complejas y competición entre componentes de reacción clave. En particular proteínas de unión monocatenarias, tales como las proteínas de unión monocatenarias de *E. coli*, tales como SSB de *E. coli* o proteína gp32 de fago T4, son necesarias para estimular la recombinación mediante recA y homólogos, debido tanto a su capacidad para recoger la cadena saliente, como para fundir estructuras secundarias para dar ADN monocatenarios potenciando así la carga de recombinasa. En RPA es probable que las proteínas de unión monocatenarias estimulen adicionalmente la síntesis de ADN uniéndose y estabilizando la cadena de ADN desplazada, impidiendo una migración de ramificaciones indeseable.

A pesar del claro requisito de proteínas de unión monocatenarias, estas proteínas presentan generalmente una afinidad considerablemente superior por ADN monocatenario que recombinasas tales como recA, o uvsX, y pueden inhibir la nucleación de filamentos de recombinasa/ADN. Además, dado que los filamentos formados en presencia de ATP experimentan un desensamblaje dependiente de extremos (Bork, Cox y Inman *J Biol Chem.* 7 de diciembre de 2001; 276(49):45740-3), es probable que tales filamentos se saturen rápidamente con proteínas de unión monocatenarias y se inactiven poco después de la iniciación de la reacción. Por tanto, para una RPA eficaz, las condiciones que impiden la inactivación de los componentes de reacción son clave en establecer una amplificación robusta.

Se ha previsto una composición de reacción posiblemente estable utilizando proteína RecA de *E. coli* en presencia de ATP y la proteína de unión SSB monocatenaria de *E. coli*, o la proteína UvsX de T4 en presencia de gp32. Se sugiere que la presencia de proteínas recO, recR y posiblemente recF (Bork, Cox y Inman *EMBO J.* 17 de diciembre de 2001; 20(24):7313-22) puede conducir a un entorno en el que se estabilizan filamentos de recA previamente cargados, y en el que recA puede nuclearse satisfactoriamente en oligonucleótidos unidos a SSB. Se ha descrito un sistema de carga de recombinasa similar en otros organismos incluyendo el sistema de recombinación/replicación/replicación del bacteriófago T4. La recombinasa uvsX de T4 puede cargarse en ADN monocatenario recubierto con la proteína de unión gp32 a ADN monocatenario de T4 mediante la acción de un tercer componente, la proteína uvsY (Morrical y Alberts *J Biol Chem.* 5 de septiembre de 1990; 265(25):15096-103). De manera interesante, un papel principal de este sistema de recombinación *in vivo* es permitir la síntesis de ADN dependiente de la recombinación ensamblando componentes de replicación en productos intermedios de recombinación tales como bucles D (Formosa y Alberts *Cell.* 5 de diciembre de 1986; 47(5):793-806). Este procedimiento es similar a lo que debe suceder en RPA impulsada a partir de bucles D preparados mediante la invasión de oligonucleótidos sintéticos. Además de interacciones entre los tres componentes uvsX, uvsY y gp32, también hay interacciones entre estos componentes y la maquinaria de replicación tal como la polimerasa, cargador de abrazadera, primasa/helicasa, y helicasa dda (Reddy, Weitzel y Von Hippel, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 de abril de 1993; 90(8):3211-5., Hacker y Alberts, *J Biol Chem.* 15 de octubre de 1992; 267(29):20674-81). Tomados en conjunto, estos hechos sugieren que los componentes de la maquinaria de recombinación/replicación de T4 quizás sean incluso más ideales para RPA que los equivalentes de *E. coli*.

Además de la utilización de proteínas de carga de recombinasa, tales como recO y recR, o uvsY, hay otras maneras

de crear un equilibrio apropiado entre la actividad recombinasa y la actividad de proteínas de unión a ADN monocatenario. El comportamiento de unión a ADN y/o cooperatividad de recombinasas y proteínas de unión a ADN monocatenario puede modularse mediante mutación. Además, recombinasas de diferentes fuentes presentan propiedades distintas (Egglar, Lusetti y Cox, *J Biol Chem.* 2 de mayo de 2003; 278(18):16389-96. Epub 20 de febrero de 2003, Villemain *et al.*, *J Biol Chem.* 6 de octubre de 2000; 275(40): 31496-504). Esto sugiere que puede explorarse una gama de actividades recombinasa y de proteína de unión a ADN monocatenario. La utilización de proteínas mutadas o proteínas de diferentes especies, en un conjunto de experimentos de optimización, puede conducir a la identificación de una razón óptima de las actividades en competencia de recombinasa y de unión monocatenaria. En última instancia, las actividades se equilibrarán de tal manera que la asociación/disociación de ADN para las dos especies de unión a ADN permita suficiente actividad recombinasa junto con suficiente actividad de fusión de ADN de la proteína de unión a ADN monocatenario para que también realice sus funciones necesarias. Además, la reducción del ruido debido a cebado erróneo puede lograrse mediante la optimización de parámetros tales como diseño de secuencias de oligonucleótidos, tampón de reacción, la utilización de oligonucleótidos parcialmente modificados, la utilización de oligonucleótidos parcialmente en dúplex o la adición de otros componentes de reacción específicos detallados a continuación.

Aquí se proporcionan los resultados de experimentos que validan el procedimiento de RPA. En particular, se proporcionan una descripción y una demostración de composiciones de reacción que pueden soportar la amplificación de ADN. Se demuestra que pueden utilizarse oligonucleótidos sintéticos relativamente cortos para seleccionar como diana secuencias específicas y soportar la iniciación de la síntesis de ADN. Se describen los requisitos para tipos particulares y concentraciones de determinadas recombinasas, proteínas de unión monocatenarias, ATP, y concentraciones de oligonucleótidos. Se describen además la optimización y la modulación del entorno de reacción, que soporta un sistema de recombinación activa y dinámica con un comportamiento de velocidad deseado, mediante la inclusión de agentes de agrupamiento (tales como polietilenglicoles), factores de carga de recombinasa y/o proteínas mutadas con actividades bioquímicas alteradas. Se establece que en presencia de al menos polimerasas distributivas (por ejemplo el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*), hay mejoras sustanciales en la eficacia de la amplificación cuando se optimiza la distancia entre los sitios de cebado de amplificación. Se establece que debe emplearse un equilibrio entre la actividad exonucleasa de la polimerasa y los agentes de protección de oligonucleótidos para evitar la degradación no específica de cebadores oligonucleotídicos. Se muestra que la amplificación de secuencias incrustadas dentro de sustratos de ADN lineal (o relajado) es relativamente ineficaz (al menos con polimerasas muy distributivas tales como Klenow), mientras que las reacciones de amplificación dirigidas hacia los extremos de sustratos de ADN lineal son lo más eficaces. Se proporcionan procedimientos para preparar ADN diana para amplificarse más eficazmente en una reacción de IsRPA, incluyendo los procedimientos de digestión con enzimas de restricción o fusión térmica o química. También se proporcionan evidencias de que la naturaleza de la proteína de unión monocatenaria es crítica para establecer reacciones de RPA eficaces, y se proporciona un fundamento para esto. Además se sugieren mejoras y enfoques nuevos para reducir el ruido y optimizar las reacciones de amplificación realizadas a temperaturas relativamente bajas, o ambientales, mediante la utilización de oligonucleótidos parcialmente bicatenarios, u oligonucleótido que carecen completa o parcialmente de una estructura principal de fosfato. También se proporcionan evidencias de que otras enzimas y proteínas implicadas en el metabolismo del ADN pueden influir sobre reacciones de RPA, y algunas pueden estar configuradas para mejorar la eficacia y especificidad de la reacción. Estas incluyen topoisomerasas, que pueden relajar productos intermedios de recombinación / replicación y puede ayudar a seleccionar como diana secuencias incrustadas, así como helicasas tales como helicasa dda de T4 o gp41 de T4 que pueden mejorar la eficacia de iniciación y elongación de la polimerasa, particularmente si se utilizan polimerasas que no producen desplazamiento de cadena. Finalmente se muestra que las helicasas priA y ruvA/B presentan actividades que pueden utilizarse para optimizar la eficacia de la amplificación.

Selección de reactivos de RPA y parámetros de reacción

Los detalles de RPA de la cadena adelantada, RPA de la cadena adelantada y retrasada, y RPA anidada se indicaron anteriormente. Esta sección describirá la selección de reactivos y parámetros para cualquiera de los tres procedimientos comentados anteriormente.

Un beneficio de la RPA es que el producto amplificado de RPA es ADN bicatenario que puede utilizarse para otros procedimientos de biología molecular. Por tanto, puede combinarse la RPA con otros procedimientos en biología molecular. Por ejemplo, el material de partida para la RPA puede ser un fragmento amplificado por PCR. Alternativamente, el producto de una RPA puede utilizarse para PCR.

Si es necesario, pueden purificarse los productos de RPA en cualquiera de los procedimientos de la invención. Por ejemplo, en el procedimiento de RPA anidada, puede purificarse el producto amplificado tras cada etapa de RPA antes de una etapa de RPA posterior. En la técnica se conocen procedimientos de purificación de ácidos nucleicos e incluyen, al menos, extracción con fenol, precipitación de ácido nucleico (por ejemplo, con sal y etanol), cromatografía en columna (por ejemplo, exclusión molecular, columna iónica, columna de afinidad y similares) o cualquier combinación de estas técnicas.

Tal como se comentó, los cebadores utilizados en RPA pueden ser "bicatenarios" o "pueden formar estructuras

bicatenarias". Estos términos se refieren a moléculas de ADN que existen en un estado bicatenario en una disolución de reacción tal como una disolución de reacción de RPA o una disolución de reacción de PCR. La composición de una disolución PCR se conoce. La composición de una reacción de RPA se indica en esta sección de descripción detallada y en los ejemplos.

5 Los cebadores pueden presentar una región monocatenaria para la hibridación con el ADN diana en presencia de un agente de recombinasa. La región monocatenaria puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 10 bases, de aproximadamente 15 bases, de aproximadamente 20 bases, de aproximadamente 25 bases, de aproximadamente 30 bases, de aproximadamente 40 bases y de aproximadamente 50 bases. Pueden utilizarse regiones incluso más
10 largas tales como de aproximadamente 75 bases, de aproximadamente 100 bases, de aproximadamente 150 bases o más, pero esto no es necesario. La elección de regiones monocatenarias dependerá de la complejidad del ácido nucleico de partida de modo que por ejemplo un genoma humano puede requerir un cebador más largo mientras que un plásmido puede requerir un cebador mucho más corto.

15 Las dos cadenas de ácido nucleico en un ADN bicatenario no necesitan ser completamente complementarias. Por ejemplo, la región bicatenaria de un ADN bicatenario puede diferenciarse en hasta el 1% de la secuencia. Es decir, la secuencia de dos cadenas de ácido nucleico puede diferenciarse en una base de cien bases y todavía existirá en un estado bicatenario en disolución. Se contemplan ácidos nucleicos con una diferencia del 1% en su secuencia complementaria como ADN bicatenario para los fines de esta descripción.

20 Además, el ácido nucleico diana (es decir, el ácido nucleico que va a amplificarse mediante los procedimientos de RPA de la invención) puede ser parcialmente bicatenario y parcialmente monocatenario. Por ejemplo, ácido nucleico en cualquiera de las configuraciones de la figura 5 será adecuado como ácido nucleico diana de la invención. Tal como se comentó, el ácido nucleico diana puede ser ARN. Puede convertirse ARN en ADNc bicatenario utilizando
25 procedimientos conocidos y el ADNc bicatenario puede utilizarse como ácido nucleico diana. Tal como se muestra en la figura 5, el ácido nucleico de molde puede presentar cualquier combinación de extremos seleccionada de proyección en 3', proyección en 5' o extremos romos.

30 El procedimiento de lsRPA según el procedimiento de RPA de la invención comprende al menos las siguientes etapas. En primer lugar, se pone un agente de recombinasa en contacto con dos cebadores de ácido nucleico (denominados en la presente memoria un primer y un segundo cebador) para formar dos cebadores de nucleoproteína (denominados en la presente memoria un primer cebador de nucleoproteína y un segundo cebador de nucleoproteína).

35 En segundo lugar, se ponen los cebadores de nucleoproteína primero y segundo en contacto con el ácido nucleico de molde para formar una estructura bicatenaria en una primera porción de la primera cadena y una segunda estructura bicatenaria en una segunda porción de la segunda cadena. Los dos cebadores se diseñan de modo que cuando se hibridan, están dirigidos uno hacia el otro tal como se ilustra en la figura 6A. Alternativamente, el cebador 1 y el cebador 2 pueden hibridarse con ácidos nucleicos diana diferentes tal como se ilustra en la figura 6B.

40 En tercer lugar, se extienden los cebadores de nucleoproteína en sus extremos 3' para generar un primer y un segundo ácido nucleico bicatenario (figura 7A). Cuando los cebadores se hibridan con ácidos nucleicos diana diferentes, la elongación de los cebadores generará cadenas desplazadas (figura 7B). En este caso, las dos cadenas desplazadas que resultan de la elongación de cebadores pueden hibridarse y formar un nuevo ácido
45 nucleico de molde bicatenario (figura 7C).

Se repiten las etapas dos y tres hasta que se alcanza el grado de amplificación deseado. El procedimiento es un procedimiento dinámico porque se permite que la hibridación de cebadores con el ácido nucleico diana y la elongación procedan de manera continua. Una ventaja de esta invención es que la amplificación se realiza de
50 manera continua sin necesidad de ciclación de temperatura o adición de enzimas tras la iniciación de la reacción.

En una realización, se repiten las etapas dos y tres al menos 5 veces. Preferentemente, se repiten al menos 10 veces. Más preferentemente, se repiten al menos 20 veces, tal como al menos 30 veces. Lo más preferentemente, se repiten las dos etapas al menos 50 veces. Para múltiples repeticiones de la etapa de amplificación (por ejemplo,
55 etapas 2 y 3) una RPA de la invención se inicia preferentemente con una razón de cebador con respecto a ácido nucleico diana de al menos 100 con respecto a 1, preferentemente de al menos 300 con respecto a 1, y lo más preferentemente de al menos 1000 con respecto a 1. Es decir, hay al menos 100, 300 ó 1000 copias del cebador por copia de un ácido nucleico diana.

60 En una etapa opcional, tras una ronda de amplificación suficiente, pueden añadirse componentes adicionales a la reacción tras un periodo de tiempo para potenciar la eficacia de amplificación global. En una realización, los componentes adicionales pueden ser uno o más de los siguientes: agentes de recombinasa, uno o más cebadores, polimerasa, y uno o más de los agentes adicionales (comentados en una sección separada a continuación).

65 En una realización preferida, se utiliza una pequeña fracción de una primera reacción de RPA como suministro de ADN de molde para rondas posteriores o amplificación RPA. En este procedimiento, se realiza una primera reacción

de amplificación RPA con un ácido nucleico diana. Tras la primera reacción de RPA, se utiliza una pequeña fracción de la reacción total como sustituto del ácido nucleico diana para una ronda posterior de reacción de RPA. La fracción puede ser, por ejemplo, menos de aproximadamente el 10% de la primera reacción. Preferentemente, la fracción puede ser menos de aproximadamente el 5% de la primera reacción. Más preferentemente, la fracción puede ser menos del 2% de la primera reacción. Lo más preferentemente, la fracción puede ser menos del 1% de la reacción inicial.

El cebador utilizado en RPA es preferentemente ADN aunque ANP y ARN también son adecuados para su utilización como cebadores. Se indica que de hecho, en la replicación de ADN, las ADN polimerasas elongan ADN genómico a partir de cebadores de ARN.

Oligonucleótidos sintéticos pueden servir como cebador de ADN y pueden utilizarse como sustratos para la formación de filamentos de nucleoproteínas con RecA o sus homólogos. Secuencias de tan sólo 15 nucleótidos pueden seleccionar como diana ADN bicatenario (Hsieh *et al.*, 1992). Tales oligonucleótidos pueden sintetizarse según química de fosforamidato convencional, o de otro modo. En algunos casos pueden ser deseables y funcionales bases modificadas y/o químicas de estructura principal de grupo de unión. Adicionalmente pueden modificarse los oligonucleótidos en sus extremos, o bien 5' o bien 3', con grupos que sirven para diversos fines, por ejemplo, grupos fluorescentes, extintores, grupos protectores (de bloqueo) (reversibles o no), etiquetas magnéticas, proteínas, etc. En algunos casos pueden utilizarse oligonucleótidos monocatenarios para la invasión de cadena, en otros pueden utilizarse ácidos nucleicos sólo parcialmente monocatenarios, estando el tramo en 5' de secuencia de un ácido nucleico invasor ya hibridado con un oligonucleótido.

En otra realización de la invención, los cebadores pueden comprender una región en 5' que no es homóloga al ácido nucleico diana. Debe indicarse que los procedimientos de la invención deben ser funcionales aunque los cebadores no sean completamente complementarios al ácido nucleico diana. Los cebadores pueden no ser complementarios por presentar secuencias adicionales en su extremo 5'. Estas secuencias adicionales pueden ser, por ejemplo, la secuencia para un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción o la secuencia que es complementaria a un cebador de secuenciación. El sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción puede ser útil para la escisión posterior de la secuencia amplificada. También se contempla la utilización de endonucleasa de restricción que escinde ácido nucleico fuera del sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción. La secuencia que es complementaria para un cebador de secuenciación puede permitir una secuenciación de ADN rápida del producto amplificado utilizando cebadores disponibles comercialmente o aparato de secuenciación disponible comercialmente.

La formación de filamentos de nucleoproteínas puede realizarse mediante incubación del cebador (oligonucleótidos) con proteína RecA o sus homólogos en presencia de ATP, y proteínas auxiliares tales como RecO, RecR y RecF, o uvsY en el caso de proteínas de T4. Cuando se incuba a 37°C en tampón de RecA (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, ATP 2 mM, DTT 2 mM y albúmina sérica bovina 100 µg/ml), RecA formará filamentos helicoidales sobre ADNmc con 6 protómeros por giro. El ADN está ubicado dentro del interior de la hélice de proteína. En presencia de ADNbc, el filamento de nucleoproteína de RecA/ADNmc puede barrer ADN a velocidades de al menos 10⁷ pb por hora. El modo de barrido no queda claro, pero es a una velocidad (>10³ pb por segundo) que puede implicar sólo algunos pares de bases iniciales a los que puede accederse fácilmente a lo largo de una cara del surco mayor. La unión satisfactoria puede dar como resultado una transición a un producto intermedio de triple hélice, que entonces va seguido por invasión y desplazamiento de cadena para formar un bucle D. Tales moléculas unidas pueden formarse en condiciones similares a las descritas anteriormente para la formación de filamentos helicoidales, y por tanto en presencia de ADNmc, el ADNbc homólogo, RecA, ATP, proteínas auxiliares y condiciones de tampón y temperatura adecuadas, se formarán moléculas unidas de manera espontánea. Si se utiliza ATP el ensamblaje es reversible y alcanzará un equilibrio, pero los filamentos de RecA/ADNmc pueden estabilizarse, incluso en presencia de SSB, mediante las proteínas auxiliares RecO y RecR. Alternativamente la proteína UvsX de T4 puede estabilizarse en presencia de proteína uvsY. En el caso de proteínas termoestables la temperatura de incubación puede ser superior. Si se requiere un suministro renovable de ATP puede incluirse en la reacción un sistema de regeneración de ATP convencional.

Las ADN polimerasas pueden utilizar el 3'-hidroxilo libre de la cadena invasora para catalizar la síntesis de ADN mediante incorporación de nuevos nucleótidos. Varias polimerasas pueden utilizar el 3'-hidroxilo de la cadena invasora para catalizar la síntesis y simultáneamente desplazar la otra cadena a medida que se produce la síntesis. Por ejemplo puede utilizarse polimerasa II o III de *E. coli* para extender bucles D invadidos (Morel *et al.*, 1997). Además, puede utilizarse polimerasa V de *E. coli*, normalmente utilizada en mutaciones dirigidas a lesiones de SOS en *E. coli* (Pham *et al.*, 2001). Todas estas polimerasas pueden volverse altamente procesivas mediante sus interacciones y cooperación con la abrazadera de dímero β, así como proteína de unión a ADN monocatenario (SSB) y otros componentes. También pueden utilizarse otras polimerasas de procariotas, virus y eucariotas para extender la cadena invasora.

En otra realización, el cebador puede ser parcialmente bicatenario, parcialmente monocatenario y con al menos una proyección en 3' monocatenaria. En esta realización, el cebador puede comprender una cadena invasora y una cadena no invasora tal como se muestra en la figura 8A. En este caso, tras hibridarse la cadena invasora con el

ADN diana y elongarse, sirve como ácido nucleico diana para un segundo cebador tal como se muestra en la figura 8B. La elongación del segundo cebador desplazará la cadena no invasora tal como se muestra en la figura 8C. En esta realización, a medida que se amplifica el ácido nucleico diana, se desplaza la cadena no invasora del cebador 1. Si tanto el cebador uno como el cebador dos son cebadores parcialmente bicatenarios, entonces las cadenas no invasoras tanto del cebador uno como del cebador dos se acumularán en disolución a medida que se amplifica el ácido nucleico diana.

En una realización, al menos dos de los cebadores en una reacción de RPA son parcialmente bicatenarios y parcialmente monocatenarios, generados cada uno mediante la hibridación de una cadena invasora y una cadena oligonucleotídica no invasora, que presenta secuencias suficientemente complementarias que forman una región bicatenaria. Preferentemente, las dos cadenas oligonucleotídicas son suficientemente complementarias a lo largo de la región relevante que pueden formar una estructura bicatenaria en condiciones de reacción de RPA.

En una realización de la invención, los cebadores, incluyendo cebadores monocatenarios y parcialmente bicatenarios, se marcan con un marcador detectable. Debe indicarse que un extintor de fluorescencia también se considera un marcador detectable. Por ejemplo, puede ponerse el extintor de fluorescencia en contacto con un colorante fluorescente y se detecta la cantidad de extinción. El marcador detectable debe ser tal que no interfiere con una reacción de elongación. Cuando el cebador es parcialmente bicatenario con una cadena invasora y una cadena no invasora, el marcador detectable debe estar unido de tal manera que no interferirá con la reacción de elongación de la cadena invasora. La cadena no invasora de un cebador parcialmente bicatenario no se elonga de modo que no hay limitaciones en cuanto al marcaje de la cadena no invasora siendo la única excepción que el marcador en la cadena no invasora no debe interferir con la reacción de elongación de la cadena invasora. Los cebadores marcados ofrecen la ventaja de una detección más rápida del producto amplificado. Además, la detección de marcador no incorporado, es decir, oligonucleótidos marcados que no se han extendido, permitirá la monitorización del estado de la reacción.

Monitorizar una reacción de RPA puede implicar, por ejemplo, retirar una fracción de una reacción de RPA, aislar la fracción no incorporada y detectar el cebador no incorporado. Dado que el tamaño de un cebador no incorporado puede ser de menos de 50 pb, menos de 40 pb, menos de 30 pb o menos de 25 pb, y el tamaño del producto amplificado puede ser de más de 1 Kb, más de 2 Kb, más de 5 Kb o más de 10 Kb, hay una gran diferencia de tamaño entre el cebador incorporado y no incorporado. El aislamiento de cebador no incorporado puede realizarse rápidamente utilizando cromatografía de exclusión molecular tal como, por ejemplo, una columna de centrifugación. Si se marca un cebador, puede realizarse un procedimiento de monitorización que comprende una columna de centrifugación y una medición (por ejemplo, fluorescencia o radioactividad) en menos de un minuto. Otra alternativa para separar cebadores elongados de cebadores no elongados implica la utilización de PAGE. Por ejemplo, el cebador elongado puede separarse del cebador no elongado mediante electroforesis en gel en menos de 5 minutos. Aún otra alternativa para separar cebadores elongados implica la utilización de oligonucleótidos inmovilizados. Por ejemplo pueden utilizarse oligonucleótidos homólogos a secuencias encontradas únicamente dentro de la secuencia de ADN amplificada para capturar ácidos nucleicos producidos específicamente mediante elongación de cebador. Estos oligonucleótidos de captura pueden inmovilizarse sobre un chip u otro sustrato. La captura de los oligonucleótidos elongados por los oligonucleótidos de captura puede realizarse mediante procedimientos mediados por proteína RecA, o mediante hibridaciones en disolución tradicionales si es necesario.

En otra realización de la invención, puede marcarse un cebador bicatenario de tal manera que puede detectarse la separación de las dos cadenas del cebador. Tal como se comentó anteriormente, tras múltiples rondas de elongación, la cadena invasora y las cadenas no invasoras de un cebador parcialmente bicatenario se separan. Tras esta separación, la cadena no invasora no participa en la reacción de RPA. Esta característica puede utilizarse para detectar y monitorizar una reacción de RPA de varias maneras.

En esta solicitud, el marcador detectable puede ser un marcador fluorescente o una enzima y el extintor de marcador (también denominado inhibidor de marcador) puede ser un extintor de fluorescencia o un inhibidor enzimático. En estos casos, el marcador se detecta mediante inhibición enzimática o de fluorescencia. La detectabilidad del marcador será la fluorescencia si se utiliza un marcador fluorescente o la actividad enzimática si se utiliza una enzima.

En el primer procedimiento, la cadena invasora puede marcarse con un marcador y la cadena no invasora puede marcarse con un extintor de marcador detectable. El marcador, en la proximidad del extintor de marcador (inhibidor de marcador) en el cebador parcialmente bicatenario no será altamente detectable. Tras la RPA, la cadena invasora se separará de la cadena no invasora y, por tanto, el marcador y el extintor de marcador se separarán. La separación hará que el marcador sea más detectable. Por tanto, midiendo los aumentos en la cantidad de marcador detectable pueden monitorizarse reacciones de RPA.

El segundo procedimiento es similar al primer procedimiento excepto porque la cadena invasora se modifica con un extintor de marcador mientras que la cadena no invasora se modifica con un marcador. Entonces se permite que avance la RPA separándose el resultado (igual que el procedimiento 1) del marcador del extintor de marcador. Por tanto, aumentará la detectabilidad global del marcador.

El tercer procedimiento implica marcar la cadena no invasora de un cebador bicatenario con un marcador. Además, la cadena no invasora de un segundo cebador bicatenario se marca con un extintor de marcador. Las dos cadenas no invasoras se diseñan para ser complementarias entre sí. En esta configuración, la reacción de RPA es inicialmente fluorescente. A medida que avanza la reacción de RPA, las dos cadenas no invasoras se desplazan en disolución y se hibridan entre sí porque están diseñadas para ser complementarias. A medida que se hibridan, el marcador y el extintor de marcador se ponen en estrecha proximidad entre sí y se disminuye a fluorescencia de la reacción. El avance de la reacción de RPA puede medirse monitorizando la disminución en la detectabilidad del marcador.

En un cuarto procedimiento, se marcan las cadenas no invasoras de unos cebadores bicatenarios primero y segundo con un primer marcador y un segundo marcador. Las dos cadenas no invasoras también se diseñan para ser complementarias entre sí. Como en el tercer procedimiento, tras la RPA, las dos cadenas no invasoras se hibridan entre sí y la proximidad de los dos marcadores será un reflejo del avance de la reacción de RPA. La proximidad de los dos marcadores puede determinarse, por ejemplo, mediante observación directa o mediante aislamiento de las cadenas no invasoras. Tal como se comentó anteriormente, el aislamiento de cebadores y otros ácidos nucleicos pequeños puede lograrse mediante columnas de exclusión molecular (incluyendo columnas de centrifugación) o mediante electroforesis en gel.

En otra realización de la invención, la cadena no invasora de uno o ambos de los cebadores es homóloga a una segunda región de ácido nucleico de tal manera que el cebador puede hibridarse con, y cebar la síntesis de, ADN en la segunda región de ácido nucleico. Utilizando este procedimiento, puede iniciarse una segunda reacción de RPA utilizando la cadena no invasora del cebador de una primera RPA. Puede monitorizarse el producto de la segunda RPA para determinar el avance de la primera RPA.

En aún otra realización de la invención, la cadena no invasora se detecta mediante un biosensor específico para la secuencia de la cadena no invasora. Por ejemplo, el biosensor puede ser una superficie con una secuencia de ácido nucleico complementaria a la cadena no invasora. El biosensor puede monitorizar una característica que resulta de la unión de la cadena no invasora. La característica puede ser un marcador detectable.

Los marcadores detectables adecuados para cualquiera de los procedimientos de la invención incluyen enzimas, sustratos enzimáticos, coenzimas, inhibidores enzimáticos, marcadores fluorescentes, cromóforos, marcadores luminiscentes, radioisótopos (incluyendo radionucleótidos), y un miembro de una pareja de unión. Ejemplos más específicos incluyen fluoresceína, ficobiliproteína, tetraetil-rodamina, y beta-gal. Las parejas de unión pueden incluir biotina/avidina, biotina/estreptavidina, antígeno/anticuerpo, ligando/receptor, y análogos y mutantes de las parejas de unión.

El agente de recombinasa de la invención puede ser RecA, uvsX, RadA, RadB, Rad 51 o un análogo funcional u homólogos de estas proteínas. Si se desea, la recombinasa puede ser un agente de recombinasa sensible a la temperatura (denominado en la presente memoria "ts"). Si se utiliza una recombinasa ts, la reacción de RPA puede iniciarse a una temperatura (la temperatura permisiva) y terminarse a otra temperatura (la temperatura no permisiva). Las combinaciones de temperaturas permisivas pueden ser, por ejemplo, 25°C/30°C, 30°C/37°C, 37°C/42°C y similares. En una realización preferida, la proteína ts es reversible. La actividad de una proteína ts reversible se recupera cuando se cambia de la temperatura no permisiva a la temperatura permisiva.

En una realización preferida, la RPA se realiza en presencia de ATP, un análogo de ATP hidrolizable, u otro nucleósido trifosfato. El análogo de ATP puede ser, por ejemplo, dATP, ddATP, u otro análogo de nucleósido trifosfato tal como UTP.

Otros reactivos útiles que pueden añadirse a una reacción de RPA incluyen nucleótido trifosfatos (es decir, dNTP tales como dATP, dTTP, dCTP, dGTP y derivados y análogos de los mismos) y una ADN polimerasa. Otros reactivos útiles para RPA de la cadena adelantada/retrasada incluyen NTP (ATP, GTP, CTP, UTP y derivados y análogos de los mismos). Una ventaja de la reacción de RPA es que no hay ningún límite en el tipo de polimerasa utilizada. Por ejemplo, pueden utilizarse polimerasas tanto eucariotas como procariotas. Las polimerasas procariotas incluyen, al menos, pol I de *E. coli*, pol II de *E. coli*, pol III de *E. coli*, pol IV de *E. coli* y pol V de *E. coli*. Las polimerasas eucariotas incluyen, por ejemplo, complejos de polimerasa de múltiples proteínas seleccionados del grupo que consiste en pol- α , pol- β , pol- δ y pol- ϵ .

En otra realización de la invención, el procedimiento de RPA se realiza en presencia de un componente auxiliar para mejorar la capacidad de procesamiento o fidelidad de la polimerasa. Pueden utilizarse componentes auxiliares tanto eucariotas como procariotas. Preferentemente, el componente auxiliar es una proteína auxiliar de *E. coli*. Las proteínas auxiliares útiles incluyen proteína de unión monocatenaria, helicasa, topoisomerasa y resolvasa. Otras proteínas auxiliares útiles incluyen una abrazadera deslizante seleccionada del grupo que consiste en una abrazadera deslizante de dímero β de *E. coli*, una abrazadera deslizante de PCNA eucariota y una abrazadera deslizante gp45 de T4. Otros componentes auxiliares incluyen un complejo de holoenzima de ADN polimerasa III que consiste en la abrazadera β , cargador de abrazadera DnaX y el complejo de núcleo de polimerasa. Todavía

otros componentes auxiliares incluyen RuvA, RuvB, RuvC y RecG. Las propiedades proporcionadas por la utilización de componentes adicionales permitirán probablemente la amplificación de ADN grandes que anteriormente no se seleccionaban satisfactoriamente como diana mediante procedimientos actuales tales como PCR.

5 En otra realización, la RPA se realiza en presencia de agentes utilizados para estabilizar filamentos de nucleoproteínas de recombinasa/ADNmc. Por ejemplo, el agente puede ser RecR, RecO, RecF, o una combinación de estas proteínas, o proteína uvsY de T4 si se utilizan componentes de T4. También pueden emplearse agentes de agrupamiento molecular para modular interacciones bioquímicas de una manera favorable. Otros agentes útiles incluyen PriA, PriB, DnaT, DnaB, DnaC y DnaG.

10 Un beneficio de la presente invención es que la reacción de RPA puede realizarse a temperaturas reducidas en comparación con una reacción de PCR. Por ejemplo, el procedimiento de RPA puede realizarse a entre 20°C y 50°C. Preferentemente, el procedimiento de RPA se realiza a menos de 45°C. Más preferentemente, el procedimiento de RPA puede realizarse a menos de 40°C. Incluso más preferentemente, el procedimiento de RPA puede realizarse a menos de 35°C. Lo más preferentemente, el procedimiento de RPA puede realizarse a menos de 30°C. Uno de los motivos por los que el procedimiento de RPA puede realizarse a estas temperaturas reducidas es porque la RPA puede realizarse sin fusión inducida por temperatura del ácido nucleico de molde. Además, al contrario que la PCR, no se requiere un control de temperatura absoluto y la temperatura puede fluctuar sin afectar de manera adversa a la RPA. Por ejemplo, la cantidad de fluctuación puede estar en cualquier punto dentro de las temperaturas especificadas anteriormente. La temperatura necesaria para fundir el ADN bicatenario también contribuye a una inactivación enzimática prematura, una desventaja ausente en los procedimientos dados a conocer.

25 La RPA puede realizarse para someter a prueba para detectar la presencia o ausencia de un genotipo. El genotipo sometido a prueba puede estar asociado con una enfermedad o una predisposición a una enfermedad. Alternativamente, el genotipo puede estar asociado con un fenotipo normal o un fenotipo que confiere una resistencia especial a una enfermedad. El genotipo tal como se dio a conocer anteriormente puede ser cualquier variante genética convencional tal como una mutación puntual, una delección, una inserción, una inversión, una mutación del marco de lectura, un acontecimiento de cruce, o la presencia o ausencia de múltiples copias de una secuencia genética (por ejemplo, la presencia de minicromosomas).

30 Un procedimiento de detección de un genotipo es detectar la distancia entre un par de cebadores en una reacción de RPA. La distancia entre un par de cebadores se ve reflejada por el tamaño de la secuencia amplificada. En ese procedimiento, los dos cebadores se seleccionan de tal manera que abarcan una región diana tal como, por ejemplo, un gen. Entonces se realiza la RPA utilizando el par de cebadores y se analiza el producto de RPA. El análisis puede implicar determinar el tamaño o la secuencia del producto amplificado. Se conocen los procedimientos de determinación del tamaño de una secuencia de ADN, incluyendo al menos técnicas tales como geles de agarosa, geles de PAGE, espectrometría de masas, geles de campo pulsado, chips génicos, sedimentación con sacarosa y similares. Hay muchos procedimientos de secuenciación de ADN y sus variantes, tales como la secuenciación de Sanger que utiliza terminación con dideoxi y electroforesis en gel desnaturizante (Sanger, F., Nichlen, S. y Coulson, A. R. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 5463-5467 (1977)), secuenciación de Maxam-Gilber que utiliza escisión química y electroforesis en gel desnaturizante (Maxam, A. M. y Gilbert, W. Proc Natl Acad Sci USA 74, 560-564 (1977)), detección por pirosecuenciación de pirofosfato (PPi) liberado durante la reacción de ADN polimerasa (Ronaghi, M., Uhlen, M. y Nyren, P. Science 281, 363, 365 (1998)), y secuenciación mediante hibridación (SBH) utilizado oligonucleótidos (Lysov, I., Florent'ev, V. L., Khorlin, A.A., Khrapko, K. R. y Shik, V. V. Dokl Akad Nauk SSSR 303, 1508-1511 (1988); Bains W. y Smith G. C. J. Theor. Biol 135, 303-307(1988); Drnanac, R., Labat, I., Brukner, I. y Crkvenjakov, R. Genomics 4, 114-128 (1989); Khrapko, K. R., Lysov, Y., Khorlyn, A. A., Shick, V. V., Florentiev, V. L. y Mirzabekov, A. D. FEBS Lett 256. 118-122 (1989); Pevzner P. A. J Biomol Struct Dyn 7, 63-73 (1989); Southern, E. M., Maskos, U. y Elder, J. K. Genomics 13, 1008-1017 (1992)).

50 Un procedimiento de detección de un genotipo es utilizar cebadores que son específicos para un genotipo particular. Por ejemplo, puede diseñarse un cebador para amplificar de manera eficaz un genotipo pero amplificar de manera ineficaz o no amplificar en absoluto otro genotipo. En una realización, el cebador puede comprender una secuencia en 3' que es complementaria a un genotipo (por ejemplo, un genotipo de enfermedad genética) pero no a otro genotipo (por ejemplo, un genotipo normal).

55 El genotipo que va a determinarse puede ser indicativo de una enfermedad tal como, por ejemplo, la presencia de un oncogén activado; la presencia del gen para la enfermedad de Huntington o la ausencia de un anti-oncogén.

60 Las bases en 3' de los cebadores son especialmente importantes en la determinación de la especificidad y eficacia de una reacción de RPA. Puede diseñarse un cebador de modo que la base en 3' es complementaria a un genotipo y no es complementaria a otro genotipo. Esto permitirá una RPA eficaz de un genotipo y una RPA ineficaz (si la hay) del segundo genotipo. Se indica que el procedimiento es eficaz si sólo un cebador del par de cebadores puede diferenciar entre diferentes fenotipos (por presentar diferentes eficacias de amplificación). En una realización preferida, ambos cebadores en una reacción de RPA pueden diferenciar entre diferentes genotipos. En este ejemplo anterior, los cebadores son complementarios a un genotipo y no son complementarios a un segundo genotipo por una base en su extremo 3'. En una realización preferida, el cebador no es complementario al segundo genotipo por

al menos una base en su extremo 3'. Preferentemente, el cebador no es complementario al segundo genotipo por al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 bases en su extremo 3'. Lo más preferentemente, el cebador completamente no es complementario al o no puede hibridarse con el segundo genotipo mientras que puede hibridarse con el primer genotipo.

5 En algunos de los procedimientos comentados, la presencia o ausencia de un producto amplificado proporciona la indicación de la presencia o ausencia de un genotipo. En estos casos, la reacción de RPA puede monitorizarse mediante los procedimientos comentados a lo largo de la memoria descriptiva.

10 En una realización preferida, una reacción de RPA para genotipar amplificará una secuencia independientemente del genotipo del paciente. Sin embargo, el genotipo de un paciente alterará una característica de la secuencia amplificada. Por ejemplo, la secuencia amplificada puede presentar un tamaño diferente, o secuenciar para un genotipo en vez de para otro genotipo. De esta manera, la reacción de RPA contendrá un control interno para indicar que la reacción de amplificación se realizó satisfactoriamente. Naturalmente, también se contempla un procedimiento de RPA, que incluye uno o más pares de cebadores adicionales como controles para la realización de la reacción de RPA.

15 En otra realización, puede utilizarse una reacción de RPA para determinar la presencia o ausencia de una molécula de ácido nucleico. La molécula de ácido nucleico puede ser de cualquier organismo. Por ejemplo, puede determinarse la composición microbiana de una muestra utilizando una batería de reacciones de RPA dirigidas al ácido nucleico de diferentes microbios. La RPA es especialmente útil para la detección de microbios. En una realización, los patógenos se seleccionan de virus, bacterias, parásitos y hongos. En realizaciones adicionales, los patógenos son virus seleccionados de influenza, rubeola, varicela Zoster, hepatitis A, hepatitis B, otros virus de la hepatitis, herpes simple, polio, viruela, virus de inmunodeficiencia humano, vaccinia, rabia, Epstein Barr, retrovirus y rinovirus. En otra realización, los patógenos son bacterias seleccionadas de *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella*, *Chlamydia* y *Streptococcus*. En aún una realización adicional, los patógenos son parásitos seleccionados de *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma gondii* y *Onchocerca*. Sin embargo, no se pretende que se limite la presente invención a los géneros y/o especies específicos indicados anteriormente.

20 Se presentan datos que ayudan a definir condiciones de reacción que permiten una amplificación eficaz de ADN mediante RPA.

Proteína de unión a ADN monocatenario

25 Se requieren proteínas de unión a ADN monocatenario para reacciones de RPA. Estas proteínas se unen a ADN monocatenario, funden la estructura secundaria, facilitan el desplazamiento de cadena saliente y suprimen la migración de ramificaciones. En RPA se requiere su actividad durante diversas fases distintas. Se han investigado las actividades de dos proteínas de unión a ADN monocatenario, SSB de *E. coli* y gp32 de bacteriófagos T4. La gp32 de T4 ha demostrado ser la más útil disponible. Además se han generado varias formas distintas de esta proteína incluyendo etiquetas peptídicas de hexahistidina (His) en los extremos N o C-terminales, así como investigando diversas mutaciones puntuales descritas anteriormente. En la figura 21 se representan esquemáticamente actividades de variantes de gp32.

Formas variantes de gp32

30 La proteína gp32 de T4 presenta varias características que presentan utilidad potencial para reacciones de RPA. En primer lugar, la gp32 presenta un sitio de unión a ADN relativamente pequeño (8-10 nucleótidos), presenta propiedades de unión similares en un amplio intervalo de concentraciones de sal, y presenta una alta cooperatividad (ilimitada) entre monómeros (Scheerhagen *et al.*, J Biomol Struct Dyn. Abril de 1986; 3(5):887-98; Kuil *et al.*, Biophys Chem. Diciembre de 1988; 32(2-3):211-27). En cambio, la proteína SSB de *E. coli* presenta varios modos de unión a ADN distintos que varían con la concentración de sal, todos los cuales presentan sitios de unión a ADN relativamente grandes (32, 56 ó 65 nucleótidos) (Ferrari *et al.*, J Mol Biol. 11 de febrero de 1994; 236(1):106-23) y hay un comportamiento de cooperatividad complejo (Lohman y Ferrari, Annu Rev Biochem. 1994; 63:527-70). Dado que el tamaño inicial de la cadena saliente es pequeño cuando se emplean oligonucleótidos sintéticos, se razona que las propiedades de la proteína gp32 serán óptimas para RPA. Se expresó y se purificó gp32 que presentaba una etiqueta de His N-terminal (gp32(N)). En experimentos iniciales se encontró que gp32(N) funcionaba al menos tan bien como la proteína SSB de *E. coli*, incluso cuando se combinó en un sistema heterólogo con la recombinasa recA de *E. coli* (figura 12). Esto fue un resultado sorprendente ya que se notifica que gp32 presenta una cooperatividad extremadamente alta entre subunidades monoméricas y parecía poco probable que recA pudiera competir eficazmente por la unión a oligonucleótido en su presencia. Sin embargo, cuando se comparó el comportamiento de gp32(N) con gp32 sin etiqueta, se descubrió que las dos proteínas no se comportaban de manera equivalente. Como la etiqueta de His N-terminal está directamente adyacente al dominio "B" de la proteína gp32, que se requiere para la cooperatividad entre monómeros, se razonó que gp32(N) debe presentar cooperatividad atenuada. Por tanto, se generó una proteína gp32 que presentaba una etiqueta de His C-terminal (gp32(C)), así como formas de mutantes puntuales de gp32(C) según mutantes previamente publicados que presentaban un cambio de lisina por alanina en la posición 3 (K3 a A), o una arginina o bien por glutamina (R4 a Q)

o bien por treonina en la posición 4 (R4 a T) (figura 21). Estas tres proteínas mutantes puntuales mostraron progresivamente menos cooperatividad (figura 22) (Villemain, *et al.* J Biol Chem. 6 de octubre de 2000; 275(40):31496-504). Se sometió a prueba la capacidad de estas proteínas a dos concentraciones diferentes para soportar reacciones de invasión / extensión con un molde linealizado en combinación con la proteína UvsX de bacteriófago T4 y el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli* (figura 22). En primer lugar se observó que gp32(C) proporciona mucho menos producto que otras variantes de gp32 a cualquier concentración (figura 22 en comparación con gp32(N)) y que los productos eran casi exclusivamente de longitud completa, al contrario que gp32(N). Cuando se comparan estos resultados con los obtenidos con las series alélicas de mutantes puntuales se observa que la proteína gp32(N) se parece lo más estrechamente al perfil obtenido con gp32(C) R4 a T, que se ha notificado que presenta una cooperatividad significativamente atenuada. Esto sugiere que la etiqueta de His N-terminal de gp32(N) interfiere con la función del dominio B de una manera similar a las mutaciones puntuales.

Hay varias otras observaciones relevantes. En primer lugar, las proteínas que se cree que demuestran la mayor cooperatividad, es decir gp32(C) > gp32(C)K3A, parecen producir menos producto. En segundo lugar, para gp32(C) y gp32(C)K3A, se genera más producto amplificado cuando se utiliza menos proteína de unión monocatenaria, al contrario que gp32(N) y gp32(C) R4T que generan más producto en ensayos de ejecución cuando se utiliza más proteínas. Tomadas en conjunto, estas observaciones sugieren una explicación. Si la especie de gp32 es progresivamente más cooperativa entonces formará progresivamente filamentos más estables en los oligonucleótidos y harán progresivamente más difícil cargar la recombinasa. Por consiguiente, cuando se emplean las especies de gp32 más cooperativas hay una limitación significativa sobre la disponibilidad de filamentos cargados con recombinasa. Si se aumenta la concentración de gp32, se suprime adicionalmente la carga de recombinasa mediante actividad de unión a ADN monocatenario de gp32. De manera que concuerda con esto, a medida que disminuye progresivamente la cooperatividad de gp32, la cantidad de producto amplificado aumenta. Esto concuerda con un aumento sustancial en la formación de filamentos recubiertos con recombinasa. Ya que es menos probable que monómeros de gp32 relativamente no cooperativos recubran los oligonucleótidos y permiten que en su lugar siembre la recombinasa uvsX. Se observa que en el caso de gp32(N) y gp32(C)R4T, se genera más producto con un aumento de gp32(N) o gp32(C)R4T en ensayos de ejecución de ADN. Esto contrasta con los resultados utilizando las variantes de gp32 más cooperativas. Una posibilidad es que durante y tras la reacción de intercambio de cadena se requiere gp32 para estabilizar los productos intermedios de recombinación y síntesis. Esto puede suceder porque la cooperatividad de gp32 está tan atenuada que puede que ya no participe en esos aspectos de la reacción, o porque la valoración de la recombinasa es mayor que la de la gp32 y detiene la reacción. Los resultados opuestos de ensayos de amplificación frente a ejecución sugieren que la cantidad óptima de cooperatividad puede ser inferior a la que presentan la mayoría de las variantes de gp32 cooperativas. Por tanto para RPA, las variantes de gp32 mutadas, con cooperatividad atenuada, pueden ser las más apropiadas ya que permitirán niveles superiores de carga de recombinasa. Sin embargo, la atenuación de la cooperatividad de gp32 debe equilibrarse contra el ruido generado por acontecimientos de cebado erróneo tal como pueden encontrarse en entornos con menos actividad de gp32.

Finalmente, hay una diferencia sustancial en la cantidad de producto generado en RPA utilizando 7,5 µg frente a 15 µg de gp32(C)K3A. El nivel de 7,5 µg se parece más estrechamente a los resultados con mutantes cooperativos de manera más débil. Lo más probablemente, en algunos casos durante el transcurso de la reacción, que se mantuvo a 37°C durante 2 horas, la cantidad de producto de ejecución monocatenario aumenta hasta el punto de que la gp32 ya no satura eficazmente el ADN monocatenario en la reacción. En una situación de este tipo, pueden suceder dos cosas. En primer lugar, habrá un rápido aumento en el número de filamentos de búsqueda de homología conduciendo a un aumento significativo de la tasa en la invasión. Después, la ausencia de gp32 para estabilizar las cadenas salientes conducirá a muchas extensiones parciales por no estabilizarse Klenow, y posiblemente a una mayor tasa de migración de burbujas separando la nueva cadena del molde. Por tanto, muchas más cadenas sintetizadas no alcanzarán la longitud completa.

Un modelo de la función de gp32 en reacciones de invasión/extensión múltiple

Se indicó anteriormente que en un sistema heterólogo que implica recA y gp32(N), se requería polietilenglicol para permitir más de un ciclo de invasión y extensión a partir de un molde dado. Aquí se describe un modelo para racionalizar estas observaciones y explicar por qué seleccionar como diana extremos de ADN múltiples veces requiere tipos específicos de proteína de unión a ADN monocatenario. Queda claro que se requiere actividad de gp32 para estabilizar la cadena saliente durante el procedimiento de intercambio de cadena. Si no se produce, entonces a medida que la recombinasa se desensambla la cadena saliente vuelve a hibridarse con su cadena complementaria y desplaza al oligonucleótido invasor. Tras el intercambio de cadena la cadena saliente puede existir en uno de dos estados, que posiblemente suponen diferentes exigencias sobre la proteína de unión a ADN monocatenario. Estos dos estados surgen como consecuencia de la relación entre el ADN de búsqueda monocatenario y el ADN diana dúplex. Si el acontecimiento de recombinación puede extenderse a un extremo de un ADN dúplex lineal, y es posible retirar completamente la cadena saliente de su complemento en un extremo, entonces la cadena saliente no se ve limitada en un extremo. En este estado no limitado el nuevo dúplex que implica la cadena de ADN entrante y su complemento puede volver a enrollarse para formar ADN en forma B. Esto es necesario porque durante la reacción de apareamiento los ADN diana están sub-enrollados por la actividad del filamento de recombinasa invasor. Las cadenas salientes no limitadas pueden unirse fácilmente a proteínas de unión

a ADN monocatenario, lo cual impedirá que se produzca la migración de ramificaciones y permitirá retirar la cadena invasora.

Alternativamente si el acontecimiento de recombinación no se extiende hasta el extremo del dúplex diana, tal como sucederá si se selecciona como diana una secuencia incrustada, entonces la cadena saliente está topológicamente limitada porque está físicamente unida a la cadena complementaria en el sentido de 5' y en el sentido de 3' de la región recombinante. Tales productos intermedios son altamente inestables porque el dúplex recién formado no puede volver a enrollarse sin hacer que la cadena saliente también se enrolle alrededor del mismo. Y dado que la cadena saliente está limitada en ambos extremos, esto es energéticamente inestable, y el nuevo híbrido se encuentra bajo una considerable limitación. Por consiguiente, un aplica una exigencia muy superior sobre la actividad de proteínas de unión a ADN monocatenario en este contexto porque hay un impulso sustancial para expulsar la cadena entrante y volver a enrollar el dúplex original (figura 6).

En los esfuerzos por establecer condiciones eficaces para invasión de cadena y extensión repetidas de dianas de ADN lineales se ha observado que sólo los oligonucleótidos dirigidos a los extremos de secuencias lineales se extienden fácilmente hasta la longitud de molde completa, al menos cuando se utiliza una polimerasa distributiva tal como el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I de *E. Coli*. Se ha encontrado que en determinadas condiciones, por ejemplo cuando se utiliza recA con gp32(N) o SSB de *E. coli*, sólo puede producirse fácilmente una ronda de invasión y extensión con cada molde diana. Estas observaciones pueden entenderse considerando el desenlace de acontecimientos de invasión que se producen en varias circunstancias diferentes que conducen o bien a cadenas salientes completamente liberadas (uniones plectonémicas) o bien a productos intermedios topológicamente limitados (uniones paranémicas). Finalmente, se han identificado algunas otras condiciones que son permisivas para múltiples rondas de invasión y extensión a partir de un único molde, una situación adecuada de manera ideal para la reacción de RPA. Se propone un modelo basado en los propios datos para consolidar estas observaciones, y forma una estructura alrededor de la cual puede diseñarse la optimización de la reacción de RPA. Este modelo tiene en cuenta el comportamiento de proteína gp32 en diferentes entornos de reacción y justifica los comportamientos de gp32 con los efectos de otros componentes de reacción (figura 29).

El modelo describe esquemáticamente la naturaleza y el desenlace de acontecimientos de recombinación entre el extremo de un dúplex diana y un oligonucleótido invasor que presenta inicialmente una proyección en 5' con respecto a la diana. Esta situación tipifica la circunstancia experimental que se ha estudiado. A pesar de esta situación inicial, todos menos el ciclo inicial implican los oligonucleótidos invasores que presentan sus extremos 5' alineados con los extremos 5' del ADN diana dúplex. Esto es así porque la cadena complementaria de ADN diana presenta un extremo 3' que puede extenderse durante la primera ronda para copiar la región de proyección del cebador invasor, lo que se denomina síntesis de activación inversa. Experimentos realizados con la proteína gp32(N) (en ausencia de PEG) sugieren que una vez que la diana está alineada en el extremo 5' con el oligonucleótido, es decir tras la primera ronda, entonces los ciclos de invasión / extensión posteriores son muy ineficaces o no se producen en absoluto. Experimentos iniciales sólo mostraron una cantidad aproximadamente equimolar de producto de ejecución con respecto a molde de partida. ¿Cómo sucede esto?

Se cree que este bloque de nueva invasión / extensión surge porque los oligonucleótidos invasores se recubren completamente mediante recombinasa con poca frecuencia. Por tanto el intercambio completo al extremo alineado en 5' de una diana también se producirá con muy poca frecuencia y por consiguiente las cadenas salientes permanecerán en un estado limitado (figura 13). El intercambio es inicialmente incompleto y el producto intermedio es inestable debido a la incapacidad para permitir que el nuevo dúplex se relaje para formar una hélice de ADN B en presencia de la cadena saliente topológicamente limitada. Tales productos intermedios inestables presentarán una tendencia a volver a enrollar el dúplex original y expulsar la cadena invasora a medida que se desensambla la recombinasa.

Sin embargo, se encontró que si se incluye un agente de agrupamiento tal como polietilenglicol en presencia de gp32(N), se produce una invasión / extensión posterior. Una posibilidad es que en estas condiciones los productos intermedios inestables se estabilizan temporalmente mediante gp32(N), de manera que puede producirse la elongación. Es posible que el polietilenglicol actúe para rescatar parcialmente la escasa cooperatividad de la gp32(N) comprometida permitiendo que establezca estos productos intermedios de lo contrario inestables. Esta conclusión se soporta tanto por los presentes datos que muestran que gp32 con etiqueta de his en el extremo N-terminal está cooperativamente atenuada, y la capacidad conocida de agentes de agrupamiento para potenciar la eficacia de interacciones entre moléculas, compensando así parcialmente la interacción más escasa entre monómeros. Inicialmente se creyó que este experimento podía explicarse mejor sugiriendo que los filamentos de recA eran más abundantes en presencia de PEG, tal como se notificó anteriormente en otra parte (Lavery PE, Kowalczykowski SC. *J Biol Chem.* 5 de mayo de 1992; 267(13):9307-14), sin embargo se piensa que esto no explica adecuadamente el cambio observado de una única ronda de invasión final a múltiples rondas productivas de invasión / extensión.

La diferencia entre la estimulación por PEG de múltiples ejecuciones de longitud completa en dianas dirigidas al extremo frente a la actividad mucho peor en dianas realmente incrustadas (figura 15) sugiere que la estabilización temporal de un producto intermedio, tal como se sugirió anteriormente, no es suficiente por sí sola para generar una

elongación sustancial. Si fuera así, para ensayos de ejecución en dianas incrustadas debería funcionar igual de bien que en la nueva invasión en dianas dirigidas al extremo, pero no es así (figura 15). Alternativamente la diferencia entre eficacias puede explicarse suponiendo que gp32 estabiliza temporalmente un producto intermedio en el que la extensión en 5' del oligonucleótido entrante no está apareada sino libre, y posiblemente incluso recubierta con gp32 dependiendo de la longitud. Con la condición de que este segmento no cambiado no esté recubierto con gp32, o que la gp32 pueda disociarse fácilmente, tal como será el caso sin cooperatividad, entonces la parte más en 5' del oligonucleótido puede aparearse mediante migración de ramificaciones rápida (figura 29, situación 1). De hecho hay una diferencia entre secuencias realmente incrustadas y nueva invasión en extremos de ADN (figura 15). Para dianas incrustadas, la migración de ramificaciones secundaria que conduce a la liberación no limitada de la cadena saliente no puede producirse nunca porque los extremos están demasiado alejados.

Por tanto, se concluye que el pequeño tamaño de unión a ADN, y la alta cooperatividad entre subunidades permite proteínas gp32 permite reacciones de invasión y extensión múltiple estabilizando las estructuras de unión paranémica limitadas durante un tiempo suficiente. Hay diversos desenlaces posibles (figura 29). O bien la última sección pequeña de oligonucleótido en el extremo 5' que no se intercambié inicialmente se hibrida mediante un acontecimiento de migración de ramificaciones, o bien el desensamblaje de gp32 en la cadena saliente permite que se pierda el oligonucleótido invasor / de extensión mediante migración de ramificaciones. Alternativamente, la carga de recombinasa sobre la cadena saliente y la nueva invasión expulsan la cadena entrante (migración de burbujas). Si se produce hibridación mediante migración de ramificaciones, entonces surge una estructura no limitada que puede estabilizarse fácilmente y extenderse. Si se produce o bien desensamblaje de gp32 o bien migración de burbujas, entonces hay un riesgo sustancial de que se pierda la nueva cadena en extensión antes de que se extienda completamente. Si se utiliza una proteína de unión a ADN monocatenario con un sitio de unión grande, como SSB de *E. coli*, o una con una escasa cooperatividad, como gp32(N), en ausencia de PEG, entonces no se produce ninguna estabilización temporal y el oligonucleótido invasor se expulsa sin haberse extendido.

Por consiguiente, basándose en este modelo, y las conclusiones anteriores sobre la frecuencia de filamentos cargados con recombinasa en presencia de diversas formas de gp32, se concluye que debe acertarse con un equilibrio entre las actividades de recombinasas y moléculas de gp32 que cumpla mejor los diversos requisitos de las reacciones de amplificación. Pueden resumirse las necesidades y los efectos de proteínas de unión a ADN monocatenario en diferentes fases de la reacción de RPA de la siguiente manera.

Fase 1

Las proteínas de unión a ADN monocatenario ayudan a preparar ADN monocatenarios para la carga de recombinasa fundiendo la estructura secundaria de modo que puede producirse sistemáticamente la carga de recombinasa. Por tanto la actividad de fusión de proteínas de unión a ADN monocatenario es deseable y también desempeña una función en el silenciamiento del apareamiento no específico de cebadores. Sin embargo, a pesar de esto, niveles excesivos de proteína y una cooperatividad excesiva pueden reducir significativamente el número de filamentos cargados con recombinasa disponibles para la invasión.

Fase 2

Las proteínas de unión a ADN monocatenario recogen la cadena saliente e impiden la expulsión espontánea del oligonucleótido entrante a medida que se desensambla la recombinasa. La inestabilidad de uniones paranémicas significa que las invasiones que se producen en secuencias incrustadas, incluyendo el caso en que los extremos de oligonucleótidos están alineados con los extremos del dúplex (como sucederá durante la mayoría de los ciclos de una amplificación), significa que puede requerirse actividad cooperativa significativa para muchas situaciones. En general esta fase de la reacción se beneficiará de un exceso de proteínas de unión a ADN monocatenario altamente cooperativas.

Fase 3

Las proteínas de unión a ADN monocatenario se unen a la cadena desplazada que se forma durante la síntesis de ADN. Como en la fase 2, esta cadena desplazada puede no estar limitada, o estar topológicamente limitada, y estas dos circunstancias aplican diferentes exigencias sobre la proteína de unión a ADN monocatenario.

Fase 4

En determinada configuración de la reacción de RPA la cadena saliente monocatenaria desplazada debe hibridarse con un oligonucleótido de pareja para permitir la posterior generación de un nuevo dúplex. Muchas proteínas de unión a ADN monocatenario impiden que se apareen cadenas complementarias, sin embargo la proteína gp32 de T4 ayuda al nuevo apareamiento de ADN complementario. Por tanto la proteína gp32 de bacteriófago T4 es una proteína ideal para esta fase.

Longitud de oligonucleótidos:

Hay pocas evidencias publicadas para respaldar con qué eficacia puede utilizarse recA, u otras recombinasas, con los cebadores oligonucleotídicos sintéticos relativamente cortos utilizados para RPA. Tampoco queda claro si puede generarse un entorno de reacción estable en el que tales oligonucleótidos de ADN cortos permanezcan activamente cargados con recombinasa. La mayoría de los estudios realizados con recA utilizan sustratos comparativamente grandes tales como formas monocatenarias y bicatenarias del genoma de bacteriófago M13 (muchos miles de residuos) como ADN donadores y aceptores. Los ensayos experimentales para determinar la actividad recombinasa consisten con frecuencia en la formación de acontecimientos de recombinación intermedios, o completados, medidos mediante migración electroforética o microscopía electrónica (Harris LD, Griffith J. J Biol Chem. 5 de julio de 1987; 262(19):9285-92). Se han descrito algunos experimentos utilizando oligonucleótidos cortos. Se ha mostrado que secuencias de tan sólo 15 nucleótidos ensamblan complejos de búsqueda de homología funcionales con recA en presencia del análogo de cofactor no hidrolizable ATP- γ -S, pero las investigaciones que combinan oligonucleótidos cortos y ATP son ambiguas (Hsieh P, Camerini- Otero CS, Camerini-Otero RD. Proc Natl Acad Sci U S A. 15 de julio de 1992; 89(14):6492-6). La función de búsqueda de homología de las recombinasas no es necesariamente suficiente para completar el intercambio de cadena y liberarse del complejo de invasión para permitir el acceso por otras proteínas metabolizantes de ADN tales como polimerasas. De hecho, estudios han mostrado que recA muestra transiciones entre una baja velocidad de hidrólisis de ATP (un indicador útil de actividad recombinasa funcional y actividad de unión a ADN combinadas) y una alta velocidad de hidrólisis a longitudes de oligonucleótidos sustancialmente superiores a los 15 nucleótidos requeridos para la búsqueda. Además el tipo de cofactor nucleotídico parece influir sobre la longitud a la que se producen tales transiciones de hidrólisis (Katz FS, Bryant FR. Biochemistry. 18 de septiembre de 2001; 40(37):11082-9). También se ha mostrado que la recombinasa uvsX de bacteriófago T4 muestra propiedades variables sobre oligonucleótidos cortos, y muestra algo de sensibilidad frente a la composición de bases (Formosa T, Alberts BM. J Biol Chem. 5 de mayo de 1986; 261(13):6107-18). A pesar de esto, tanto uvsX como recA pueden realizar acontecimientos de recombinación con sustratos monocatenarios de aproximadamente 30 pares de bases o más en presencia de nucleótidos hidrolizables tales como ATP, lo que sugiere que la utilización de tales oligonucleótidos de selección como diana sintéticos cortos es razonable (Salinas F, Jiang H, Kodadek T. J Biol Chem. 10 de mayo de 1995; 270(10):5181-6; Formosa T, Alberts BM. J Biol Chem. 5 de mayo de 1986; 261(13):6107-18).

Un oligonucleótido que lleva 33 residuos de homología con el extremo de una diana de ADN linealizado puede formar un producto intermedio de apareamiento que puede someterse a elongación mediante el fragmento de Klenow de *E. coli* (figura 9). Este experimento y otros demuestran que longitudes de homología de tan sólo 33 nucleótidos son suficientes para dirigir filamentos de recombinasa/ADNmc a dianas apropiadas en presencia de ATP y para permitir un intercambio de cadena completo. Se encuentran resultados similares cuando se utiliza la proteína UvsX de bacteriófago T4.

Además de un requisito para una longitud de oligonucleótidos mínima, puede haber una pérdida progresiva de eficacia de invasión / extensión si el oligonucleótido se extiende significativamente más allá de la longitud mínima requerida para la recombinación, al menos cuando se utilizan polimerasas distributivas. Una posibilidad se encuentra en la naturaleza de los filamentos de recombinasa/ADNmc. Los filamentos recubiertos con recombinasas presentan límites en 5' variables para su recubrimiento, ya que las recombinasas se siembran al azar y después extienden el filamento en un sentido 5'-3', habrá una distribución de extensiones en 5' de recubrimiento. Si se recubren menos de aproximadamente 25-30 nucleótidos, entonces puede producirse poca recombinación porque no hay suficiente filamento de nucleoproteína para el intercambio de cadena. Si se recubren más de estos, es posiblemente beneficioso desde el punto de vista de la recombinación, pero si se añaden más de 10-20 residuos más allá de la longitud mínima requerida para el intercambio, hay posibilidad de que progresivamente más filamentos activos presentarán recombinasa de una longitud de ADN suficiente para permitir el intercambio, pero conservarán ADN no recubierto en 5' suficiente para la unión de gp32, lo que mediante unión cooperativa del extremo 5' puede inhibir la fase de migración de ramificaciones e impedir que se elimine la limitación de la cadena saliente. De manera que concuerda con esta noción, se observa que la estimulación de múltiples acontecimientos de invasión era menos evidente con el cebador oligonucleotídico más largo Tester1 bio en comparación con Tester3 bio (figura 15). La única diferencia entre estos oligonucleótidos es que el primero presenta 25 nucleótidos de proyección adicionales más allá de los 33 residuos iniciales de homología, mientras que el segundo tan sólo presenta 15 residuos adicionales. Independientemente de la explicación, esta observación experimental presenta argumentos de que puede existir una longitud máxima óptima.

Hay otros motivos para sospechar que oligonucleótidos más cortos serán mejores para una RPA eficaz. A las temperaturas relativamente bajas utilizadas en reacciones de RPA hay un aumento sustancial en las estructuras secundarias estables de oligonucleótidos así como una mayor probabilidad de hibridación inapropiada entre pares de cebadores. A pesar de un exceso global de proteínas de unión a ADN monocatenario, la naturaleza dinámica de la reacción sugerida por la inestabilidad de filamentos de nucleoproteínas formados con recombinasas en presencia de ATP significa que es probable que haya un ciclo constante de proteínas acopladas y no acopladas a oligonucleótidos, y una concentración en estado estacionario de oligonucleótidos no recubiertos, desprotegidos. Por consiguiente, la utilización de oligonucleótidos cortos debe reducir la probabilidad de interacciones intra e intermoleculares indeseables.

Los datos indican que la longitud óptima de oligonucleótido se encuentra entre 30 nucleótidos y 50 nucleótidos, y

que los oligonucleótidos progresivamente más grandes pueden reducir la velocidad de invasión / extensión. Sin embargo, puede ser deseable extender la longitud del oligonucleótido para adaptarse a una región de dúplex en la región 3' o 5' del oligonucleótido de búsqueda. Por tanto, en un aspecto de los procedimientos de la invención, la longitud de cebador preferida es de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 50 bases. Los ejemplos de tamaños de cebadores que se ajustarán a al menos uno de estos criterios incluyen cebadores de entre 30 y 45 bases, entre 30 y 40 bases, entre 30 y 35 bases, entre 35 y 40 bases, entre 40 y 45 bases y entre 45 y 50 bases. Aunque se prefieren los tamaños de cebador a los que se hizo referencia anteriormente, también es posible y se considera una recombinasa y/o proteína de unión monocatenaria con una longitud de cebador óptima de menos de 30 bases.

Composición de oligonucleótidos, secuencia y carácter monocatenario/dúplex:

1) Composición y secuencia:

El software para diseñar oligonucleótidos para su utilización en reacciones de síntesis de ADN *in vitro* está bien establecido, particularmente para la utilización en PCR. Las consideraciones para el procedimiento de RPA son similares e incluyen la optimización de la temperatura de fusión del oligonucleótido, evitar la formación de horquilla dentro de un oligonucleótido y la selección contra la complementariedad con otros oligonucleótidos presentes en una reacción dada. Dado que la RPA se realiza a temperaturas relativamente bajas, tales consideraciones son posiblemente más importantes. Se ha observado la acumulación de productos de cebador extendidos en reacciones de RPA, que aparentemente son independientes del molde y dependen de la combinación de cebadores utilizada. Los tamaños de los productos aberrantes generados sugieren que son dímeros de cebador, o la consecuencia de auto-cebado de un único oligonucleótido. Estos artefactos de cebadores indeseables se conocen para otros procedimientos tales como PCR. Por tanto es importante diseñar pares de cebadores oligonucleotídicos para evitar reacciones secundarias indeseables. Se ha observado que los oligonucleótidos que pueden formar horquillas pueden auto-cebarse de manera errónea en una reacción de RPA.

Además de optimizar el diseño de la secuencia de oligonucleótidos, hay enfoques adicionales para reducir o eliminar la formación de dímeros de cebador. Se ha observado que puede reducirse significativamente el ruido de reacción utilizando polimerasas que carecen de actividad exonucleasa 3'-5'. Esto sugiere que el cebado erróneo puede resultar de oligonucleótidos que se han acortado por la actividad exonucleasa 3'-5' de polimerasas. Por consiguiente, la actividad de corrección de exonucleasa 3'-5', pirofosforilisis, o cualquier otra actividad de corrección similar, puede ser una fuente de ruido. Además de utilizar polimerasas que carecen de actividad exonucleasa y la eliminación de pirofosfato con pirofosfatasa, la utilización de oligonucleótidos sintéticos con una estructura principal no hidrolizable en el último y/o el penúltimo enlace puede ser beneficiosa para reducir el ruido de reacción. Pueden seleccionarse estructuras principales alternativas de la gama considerable de químicas disponibles tales como fosfortiorato, morfolino, ácido nucleico bloqueado o ácido nucleico peptídico.

2) Carácter monocatenario/dúplex:

También puede conseguirse impedir la extensión aberrante de extremos 3' de oligonucleótidos diseñando, e incluyendo, oligonucleótidos competidores cortos que pueden competir eficazmente por la formación de híbridos con la región 3' de los oligonucleótidos de selección como diana. Un enfoque de este tipo puede configurarse de diversas maneras.

1) Puede emplearse un oligonucleótido independiente corto que comprende un complemento perfecto para los residuos más en 3' del oligonucleótido de selección como diana. Este oligonucleótido será lo suficientemente largo como para que a la temperatura de reacción sea probable que forme un híbrido con el oligonucleótido de selección como diana de manera moderadamente eficaz. Esto puede ser de entre 6 y 15 residuos de longitud. El oligonucleótido corto no será extensible por presentar un grupo bloqueante en su extremo 3'-terminal, tal como un dideoxi-azúcar, u otro grupo bloqueante en 3'. Este oligonucleótido también puede requerir un enlace distinto de fosfato en el último y/o penúltimo enlace de la estructura principal para impedir la eliminación de bases en el sentido 3'-5' mediante actividades de corrección. Aunque una gran proporción de oligonucleótidos de selección como diana no recubiertos con proteína pueden formar dúplex con este oligonucleótido corto, esto no debe reducir significativamente la velocidad y la eficacia de la reacción de RPA. En primer lugar, dado que a la baja temperatura de reacción de RPA es probable que haya un equilibrio entre oligonucleótidos hibridados y no hibridados, siempre habrá una reserva de oligonucleótidos de selección como diana fundidos libres disponible. Dado que el oligonucleótido es un mejor competidor que otras secuencias al azar en la reacción, se favorecerá frente a otras interacciones transitorias. En segundo lugar, proteínas de unión a ADN monocatenario tales como recA, uvsX, gp32, y SSB de *E. coli*, tienden a fundir ADN dúplex y por tanto, aunque los híbridos sean relativamente estables a la temperatura de reacción cuando no hay proteínas unidas, cuando se unen a la parte monocatenaria del oligonucleótido y se extienden de manera cooperativa hasta la región de dúplex es probable que potencien esta fusión, por tanto el estado de dúplex tenderá a existir únicamente en oligonucleótidos desnudos. Finalmente, las recombinasas presentan la capacidad de extender el intercambio de cadena iniciado entre una región de ADN monocatenario y una diana dúplex en regiones en las que ambos ADN son dúplex. Esto parece ser una actividad de migración de ramificaciones dependiente de ATP. Tomadas en conjunto, estas consideraciones sugieren que la

región de dúplex corta no debe reducir significativamente la velocidad de la reacción de RPA, sino en vez de eso actuar para suprimir la formación de dímero de cebador u otros artefactos generados a partir de oligonucleótidos no recubiertos con proteína por ser un mejor competidor para la unión a la región en 3' región del cebador de selección como diana que otras secuencias oligonucleotídicas disponibles en la reacción. Si se utilizan polimerasas deficientes para exonucleasa, puede resultar óptimo diseñar este oligonucleótido para hacer que su base más en 5' se aparee con el penúltimo, en vez del último, nucleótido en 3', ya que muchas polimerasas tienden a añadir una base adicional a un extremo perfectamente romo.

2) En un segundo enfoque, el oligonucleótido de selección como diana presenta una proyección en 5' que no está presente en el ADN diana inicial, y esta proyección es el complemento inverso preciso de la secuencia en el extremo 3' del mismo oligonucleótido de selección como diana, quizás sólo con la base más en 3' no apareada (figura 35, parte D). La longitud de este oligonucleótido complementario debe ser relativamente corta, pero lo bastante larga como para ser un competidor mucho mejor que otras secuencias oligonucleotídicas presentes en la reacción. Por ejemplo entre 6 y 10 nucleótidos puede ser óptimo. Tal como se describió para el primer enfoque es probable que esta disposición conduzca a que cualquier oligonucleótido no recubierto forme estructuras de horquilla consigo mismo de manera mucho más eficaz que con otras secuencias. Dado que el diseño colocará la base en 3', o la penúltima base en 3', del oligonucleótido en un entorno de apareamiento de bases perfecto, pero en el extremo 5' del oligonucleótido de selección como diana, no puede extenderse, aparte de la adición del residuo individual con frecuencia catalizado por muchas polimerasas si el extremo es romo. En este contexto puede ser adecuado dejar la actividad de corrección de polimerasas intacta. Tales oligonucleótidos de formación de horquilla pueden suprimir la actividad errónea de oligonucleótidos desnudos sin impedir la actividad de filamentos cargados con proteína.

Sin embargo hay algunas consideraciones importantes para adoptar este enfoque. En primer lugar, si se inicia la carga de recombinasa directamente en el oligonucleótido desnudo parcialmente en dúplex sin fusión inicial de la sección de dúplex, la recombinasa puede no extenderse tan próxima al extremo 5' del oligonucleótido de selección como diana como sería óptimo. En segundo lugar, a medida que la reacción de amplificación continúa más allá de la primera ronda habrá un desplazamiento activo de productos generados a partir de rondas de síntesis anteriores y si se produce un desplazamiento completo entonces el propio extremo 3' de una cadena desplazada, que es complementario a secuencias inmediatamente adyacentes, puede formar una horquilla y experimentar auto-cebado rápido. Tal acontecimiento de auto-cebado rápido dará como resultado la síntesis de ADN y la formación de un ADN bicatenario nuevo con ambas cadenas unidas por una horquilla en un extremo. Esto puede ser un sustrato para rondas de invasión / síntesis adicionales y dar como resultado la formación de productos de tipo dímero, y posiblemente productos más complejos (véase la figura 35). Se anticipa que esta situación puede ser perfectamente aceptable para pruebas de diagnóstico. Ya que todas las secuencias amplificadas dependen de la presencia de ADN diana auténtico, y contendrán las secuencias inter-oligonucleotídicas únicas, y dado que el acontecimiento de auto-cebado puede diseñarse por ingeniería para funcionar eficazmente, entonces esto puede demostrar ser un formato ideal para ensayos de diagnóstico. Ya se ha experimentado la generación de fragmento de ADN amplificado mayor que la longitud unitaria aparentemente generado a partir de dianas específicas y se sospecha que este mecanismo puede funcionar en ausencia de un diseño de oligonucleótidos específicos. Se ha descrito una actividad similar aunque en este caso la actividad se inició de una manera totalmente diferente utilizando un único ADN monocatenario muy grande (Morriscal SW, Wong ML, Alberts BM. J Biol Chem. 25 de julio de 1991; 266(21):14031-8).

3) En un enfoque final se emplearán oligonucleótidos cortos separados con extremos 3' bloqueados tal como se describió en el enfoque 1. Sin embargo, en este caso se diseña por ingeniería un enlace entre el extremo 5' del oligonucleótido de selección como diana y el extremo 5' o 3' del oligonucleótido competidor corto (figura 35, partes B y C). Este enfoque es similar al enfoque 1, excepto porque anclando el oligonucleótido competidor en estrecha proximidad del oligonucleótido de selección como diana se garantiza una competición eficaz de este oligonucleótido con cualquier otra secuencia en la reacción.

Elección de la polimerasa:

Hay muchas ADN polimerasas que pueden utilizarse para RPA. Sin embargo, hay varios criterios que deben considerarse cuando se diseña el formato de RPA óptimo para una aplicación dada. Se han identificado varias polimerasas diferentes con actividad en reacciones de RPA, y se ha deducido qué propiedades confieren ventajas específicas para diferentes circunstancias. Una conclusión excitante es que pueden utilizarse eficazmente polimerasas de sistemas heterólogos. A continuación se comentan las actividades de polimerasas más relevantes para RPA.

Capacidad de procesamiento de polimerasa

La capacidad de procesamiento de polimerasa se mide como el número típico de acontecimientos de incorporación catalizados en cada interacción individual con un molde de ADN. Muchas de las enzimas polimerasas utilizadas en aplicaciones de biología molecular no son altamente procesivas, con frecuencia porque son análogos funcionales de la ADN polimerasa I de *E. coli* cuyo papel principal es la reparación de ADN y el procesamiento de fragmentos de Okazaki. La capacidad de procesamiento es una consideración más crítica para RPA que para PCR. Dado que la

RPA utiliza un molde bicatenario, las polimerasas distributivas producirán cadenas parcialmente copiadas que presentan una unión, que pueden expulsarse mediante migración de ramificaciones. Además, se dispone de evidencias para sugerir que puede producirse migración de burbujas en una variedad de configuraciones de RPA. En la migración de burbujas las cadenas originales del ADN de molde vuelven a hibridarse poco después del complejo de replicación conduciendo a la expulsión de la cadena recién sintetizada, que se libera como un ADN monocatenario en vez de la cadena saliente del acontecimiento de recombinación original. Esta nueva hibridación se ha descrito anteriormente en el sistema de recombinación/síntesis de ADN de T4 y se piensa que implica el recubrimiento de la cadena saliente con la recombinasa uvsX y la nueva invasión posterior. Alternativamente, en presencia de proteína de unión a ADN monocatenario no cooperativa, pueden perderse monómeros progresivamente de un extremo de la cadena saliente y pueden conducir a la migración de ramificaciones progresiva discurriendo en un sentido 5'-3', persiguiendo al complejo de replicación.

Por tanto si la polimerasa se disocia prematuramente del molde, migración de burbujas o migración de ramificaciones puede dar como resultado que la cadena recién sintetizada se separe del molde como una cadena individual incompleta. Esto puede ser catastrófico para reacciones de RPA, porque si tales productos truncados son demasiado cortos para formar híbridos productivos con productos similares generados desde el lado opuesto, estos productos cortos indeseados se acumularán de manera lineal. La proteína de unión a ADN monocatenario gp32 de T4 puede aliviar la migración de ramificaciones indeseable. Sin embargo la RPA impulsa, cuando es posible, la utilización de polimerasas relativamente procesivas, o complejos de polimerasa, para amplificar eficazmente fragmentos de ADN más grandes. Se sabe que varias polimerasas sencillas ahora utilizadas comúnmente tales como ADN polimerasa de Phi-29, ADN polimerasa de Bst y ADN polimerasa de T7 en complejo con tiorredoxina son procesivas. Sin embargo no todas las clases conocidas de polimerasas relativamente procesivas pueden presentar las propiedades adicionales combinadas adecuadas para la RPA; hasta ahora la polimerasa de Phi-29 no ha demostrado poder soportar ampliificaciones RPA geométricas, posiblemente debido a la incapacidad para cargarse eficazmente sobre los productos intermedios de recombinación. La ADN polimerasa de T7 carece de actividad de desplazamiento de cadena suficiente como para ser eficaz. En cambio se supuso que las enzimas Pol I relacionadas de los bacilos, tales como Pol I de *Bacillus subtilis* (Bsu), demostrarían probablemente características óptimas gracias a compartir con la polimerasa de Bst una capacidad de procesamiento relativa y un estado negativo para exonucleasa, pero conservando perfiles de solubilidad y actividad óptimos a temperaturas en el intervalo de 30-37°C. Adicionalmente, pueden utilizarse complejos de replicación de múltiples subunidades que incorporan abrazaderas deslizantes, tal como el del bacteriófago T4, *E. coli*, y otros, sin embargo ensamblar todos estos componentes en reacciones *in vitro* eficaces que mantengan las propiedades cinéticas y de relación señal:ruido excelentes de reacciones de RPA actuales sigue siendo un desafío. Se purificó la polimerasa I a partir de *B. subtilis*, que está relacionada con la polimerasa de Bst. Esta polimerasa se produce en exceso y se purifica fácilmente a partir de *E. coli* con una etiqueta de hexhistidina N-terminal, y parece presentar atributos bioquímicos ideales para RPA.

Finalmente, hay algunas situaciones en las que una polimerasa distributiva puede ser más apropiada para RPA. Dado que en muchas configuraciones la síntesis de ADN se inicia a partir de extremos opuestos y complejos de replicación se mueven uno hacia el otro, existe la posibilidad de una colisión entre complejos dando como resultado una detención en la que ninguno avanza adicionalmente. Esto requiere o bien que una polimerasa se disocie temporalmente del molde, o bien que las polimerasas utilizadas puedan rebasarse una a la otra eficazmente sin disociación. En consecuencia de los requisitos variables para una polimerasa ideal para RPA, se sugiere que las evidencias experimentales serán la mejor guía, y hasta la fecha esto implica que las enzimas de la clase de Pol I de eubacterias, en particular de bacilos, muestran actualmente las mejores propiedades.

Actividad exonucleasa 3'-5' presente asociada con la ADN polimerasa:

Muchas ADN polimerasas presentan actividad exonucleasa 3'-5', y algunas también presentan actividad exonucleasa 5'-3', lo cual es probablemente indeseable en RPA ya que da como resultado la digestión de una cadena de ADN progresivamente a medida que avanza la polimerasa, en vez de desplazamiento. La exonucleasa 3'-5' presenta posibles ventajas así como sus desventajas evidentes. Por un lado la actividad exonucleasa 3'-5' aumenta la fidelidad de la reacción de replicación, y también puede impedir la detención de las polimerasas en puntos de incorporación errónea. La amplificación de alta fidelidad es deseable para muchas aplicaciones de ADN. La actividad exonucleasa 3'-5' también puede ser apropiada para la amplificación de fragmentos de ADN más grandes en los que la detención debida a la incorporación errónea puede inhibir una amplificación eficaz.

A pesar de estas claras ventajas de la actividad exonucleasa 3'-5' hay algunas desventajas. Se ha observado que los oligonucleótidos libres pueden someterse a una degradación dependiente de extremos cuando se emplean polimerasas que presentan exonucleasa 3'-5'. Esto puede suprimirse en gran medida utilizando cantidades saturantes de proteína gp32 relativamente cooperativa con algunas polimerasas tales como el fragmento de Klenow, pero con enzimas que presentan exonucleasas agresivas tales como ADN polimerasa de T4 o ADN polimerasa de Phi-29, gp32 parece ser insuficiente y los oligonucleótidos parecen degradarse completamente. Estos datos presentan argumentos de que es ventajoso al menos limitar en cierto grado la eficacia de una actividad exonucleasa en la reacción.

Se ha encontrado que la actividad exonucleasa 3'-5' de algunas polimerasas puede contribuir sustancialmente al

ruido en la reacción. A las temperaturas relativamente bajas utilizadas en reacciones de RPA hay una tendencia significativa para que moléculas de ADN monocatenario no recubierto formen híbridos inapropiados, con baja complementariedad, con otros ADN en la reacción. Tales híbridos cebarán la elongación de ADN polimerasas. Para que se produzca la extensión la última o las dos últimas bases deben aparearse correctamente con su complemento. Aunque segmentos que se complementan escasamente dentro de, o entre, oligonucleótidos pueden formar híbridos débiles a bajas temperaturas, estos se combinarán con poca frecuencia con un buen apareamiento de híbridos justo en el extremo 3'. Independientemente, en presencia de una actividad exonucleasa 3'-5', las bases más en 3' no apareadas se escindirán hasta que se forme un extremo 3' correctamente apareado, tal como sucede normalmente cuando se inserta una base incorrecta por la polimerasa. Los datos sugieren que cadenas parcialmente extendidas que se han desplazado mediante migración de ramificaciones o migración de burbujas pueden plegarse de nuevo sobre sí mismas dejando un extremo 3' no apareado, que se corta fomentando así una elongación por polimerasa inapropiada. Por tanto, hay buenos motivos para limitar o eliminar las actividades exonucleasa de las polimerasas utilizadas en RPA. Hay otros procedimientos para inhibir la degradación de oligonucleótidos que también pueden utilizarse.

Acceso a extremos 3'

El producto intermedio de recombinación formado tras la invasión debe ser accesible para la ADN polimerasa. La estructura cerca del extremo 3' del oligonucleótido de selección como diana no es equivalente al extremo 3' de un oligonucleótido hibridado con ADN de lo contrario monocatenario, que es la situación en PCR. En vez de eso, la cadena saliente, que se hibrida inmediatamente, o en poco tiempo, con la cadena de molde en el sentido de 3' del extremo 3' del oligonucleótido invasor puede bloquear la carga de polimerasa. Además, el hecho de si la cadena saliente está limitada o no limitada puede afectar a la capacidad de determinadas polimerasas para cargarse satisfactoriamente. Debe tratarse experimentalmente si una polimerasa particular puede funcionar eficazmente en estas situaciones. Se encuentra que el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli*, así como la ADN polimerasa de Bst purificada a partir de *Bacillus stearothermophilus*, pueden cargarse sobre y extender tales productos intermedios de recombinación. Las helicasas tales como la helicasa dda de T4 y la helicasa gp41 de T4 también pueden funcionar para procesar productos intermedios de recombinación y separar el molde y las cadenas salientes en el sentido de 3' del acontecimiento de intercambio permitiendo utilizar otras polimerasas, pero estas helicasas también pueden interferir con otros aspectos de RPA (véase a continuación). Finalmente, puede ser beneficioso utilizar mezclas de polimerasas, que actúan sinérgicamente en la reacción de RPA, por ejemplo una polimerasa eficaz para acceder a los extremos 3' de productos intermedios de recombinación, y la otra que presenta actividad sintética de desplazamiento de cadena, procesiva.

Interacciones de componentes cooperativos

Se ha demostrado que pueden combinarse eficazmente componentes enzimáticos de sistemas heterólogos entre sí en diversos formatos de RPA. Por ejemplo, el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli*, la ADN polimerasa de Bst de *Bacillus stearothermophilus*, y el fragmento grande de polimerasa I de *Bacillus subtilis*, pueden extender productos recombinación generados con la recombinasa uvsX de bacteriófago T4 en presencia de la proteína gp32 de bacteriófago T4. Esto sugiere que la clase de polimerasas similar a Pol I de *E. coli* son generalmente eficaces en reacciones de RPA, y esto puede reflejar sus propiedades distintivas como enzimas de desplazamiento de cadena, en combinación con acceso a productos intermedios de recombinación necesarios para sus actividades de reparación. Además, no queda claro que la elongación de productos intermedios de recombinación pueda medirse fácilmente por polimerasas a partir de grupos de estructuras ampliamente diferentes. A pesar de indicaciones iniciales a partir de productos intermedios de recombinación dirigida a extremos estabilizados mediante síntesis de activación inversa, no se ha podido impulsar reacciones de RPA utilizando polimerasa de Phi-29, y esto puede reflejar que esta enzima no puede cargarse fácilmente sobre productos intermedios de recombinación. Puede haber efectos sinérgicos adicionales cuando se emplean juntas proteínas del mismo organismo. Por ejemplo se sabe que hay interacciones físicas entre los componentes del bacteriófago T4 tales como uvsY y uvsX, así como gp32. Esto puede extenderse a otros componentes, por ejemplo la polimerasa de T4 interacciona funcionalmente con la helicasa gp41, y físicamente con gp32 (Formosa y Alberts PNAS 80, 2442-2446, 1983). Sin embargo, a pesar del aparente atractivo de utilizar componentes del mismo organismo para potenciar la eficacia de RPA, se ha encontrado que una helicasa empleada para la síntesis de ADN procesiva mediante polimerasa de T4 no puede combinarse fácilmente con el entorno de RPA eficaz tal como se establece aquí. Experimentos iniciales sugirieron que la inclusión de helicasa dda de T4 podía alterar el recubrimiento de oligonucleótidos en el entorno de RPA y conducir a un ruido de cebadores excesivo que impide reacciones de RPA sensibles. Esto concuerda con un informe publicado anterior [insertar referencia JBC. 25 de mayo de 1991; 266(15):9712-8 Inhibition of protein-mediated homologous pairing by a DNA helicase. Kodadek T].

Resolución de colisiones complejos de replicación

En algunos formatos de RPA, tal como cuando se desea un producto de ADN grande, una polimerasa procesiva será la elección óptima. Sin embargo, en estas condiciones hay una probabilidad significativa de que complejos de replicación convergerán entre sí en el mismo molde. Hay un riesgo de que los complejos de replicación quedarán bloqueados en confrontación directa de modo que ninguno pueda pasar. Lo más útil en esta situación son las

polimerasas que tanto son procesivas como pueden resolver colisiones tal como se ha demostrado para la ADN polimerasa de Phi29 (Elias-Amanz M, Salas M. EMBO J. 15 de septiembre de 1997; 16 (18):5775-83). Alternativamente un equilibrio fino pero crítico de un nivel ideal de capacidad de procesamiento para permitir ejecuciones replicativas únicas combinado con una capacidad distributiva para disociarse con bastante frecuencia puede resolver esta cuestión.

Recombinasas

Se han sometido a ensayo tanto proteína RecA de *E. coli* como proteína UvsX de bacteriófago T4 en experimentos de RPA. Ambas de estas proteínas comparten algo de homología de secuencia de proteína limitada y se cree que han evolucionado a partir de un progenitor común. Estudios cristalográficos y con microscopio electrónico de filamentos de nucleoproteínas de estas proteínas, que muestran una estructura de filamentos conservada, en cuanto al paso de las hélices formadas en estados unidos tanto a ATP como a ADP, sugieren una notable similitud en el mecanismo de acción. Además, todos los procariotas presentan proteínas altamente homólogas a recA, lo que sugiere que las actividades principales de las recombinasas se han conservado a lo largo de la evolución. Por tanto, lo que se aprende de una recombinasa puede aplicarse a, o sustituirse por, otra.

Sin embargo, además de sus similitudes, hay diferencias entre recA y uvsX relevantes para la RPA y dado que se utilizan componentes adicionales de la maquinaria de recombinación/replicación en reacciones de RPA, las interacciones proteína-proteína específicas de organismo pueden presentar un efecto significativo sobre la eficacia de la reacción. La velocidad de hidrólisis de nucleótidos de uvsX es 10-20 veces superior a la de recA, lo que sugiere que puede realizar reacciones de recombinación a una velocidad acelerada (Formosa T, Alberts BM. J Biol Chem. 5 de mayo de 1986; 261(13):6107-18.). Una velocidad de hidrólisis aumentada puede ser beneficiosa para reacciones de RPA de varias maneras.

- 1) Una renovación más dinámica de uvsX sobre oligonucleótidos puede aumentar la regeneración global de filamentos de nucleoproteínas conduciendo a una cobertura con recombinasa casi completa del extremo más en 5' de oligonucleótidos invasores.
- 2) Una terminación y desensamblaje más rápidos de recombinasa de acontecimientos de recombinación satisfactorios permitirá un acceso de polimerasa más eficaz.
- 3) Una recombinasa más activa producirá un filamento de nucleoproteína más flexible.

Otra diferencia principal entre uvsX y recA es que uvsX hidroliza ATP para dar ADP más fosfato, y para dar AMP más pirofosfato, mientras que recA y otras recombinasas no lo hacen (Formosa T, Alberts BM. J Biol Chem. 5 de mayo de 1986; 261(13):6107-18). Se desconoce la significación biológica de esta diferencia pero la actividad puede afectar a la eficacia de RPA. Por ejemplo, el paso de filamentos de nucleoproteínas formados con ATP y ADP es diferente y la hidrólisis de ATP para dar ADP está asociada con una flexibilidad de filamentos global. Puede suceder que uvsX unida a AMP pueda adoptar un paso diferente y presente una flexibilidad diferenciada.

La recombinasa uvsX de bacteriófago T4 estimula un modo de desplazamiento de ADN tras la síntesis conocido como migración de burbujas. En la migración de burbujas uvsX se ensambla sobre la cadena saliente y media una nueva invasión de la cadena saliente desplazando así la cadena recién sintetizada. Este modo puede presentar significación biológica dado que al desplazar la cadena recién sintetizada, la longitud de la región con limitación topológica se ve limitada. Este procedimiento no se ha descrito para recA, aunque puede ocurrir. No obstante, diversos aspectos de la migración de burbujas sugieren diferencias reales entre uvsX y recA. Por ejemplo, el modelo de migración de burbujas sugiere que es posible que ADN unido a uvsX se extienda hasta el extremo del ADN invasor o parcialmente extendido, pero que esta estructura todavía esté accesible por polimerasas para la elongación (Formosa T, Alberts BM. Cell. 5 de diciembre de 1986; 47(5):793-806). Ciertamente esto no se ha observado para recA, y en cualquier caso hay evidencias que pueden indicar lo contrario (Xu L, Mariani KJ. J Biol Chem. 19 de abril de 2002; 277(16): 14321-8). No queda claro cómo de similares son los filamentos de uvsX y recA en cuanto a sus respectivas capacidades para fomentar la carga de polimerasa en los extremos 3' con o sin disociación de recombinasa. Se han encontrado diferencias entre uvsX(C) y recA(C) que concuerdan con la noción de que sus diferencias presentan un efecto sobre la eficacia de RPA. Al contrario que los hallazgos con recA, uvsX puede mediar múltiples invasiones en una diana de estructura de extremo incluso cuando se utiliza gp32 con etiqueta en el extremo N-terminal en ausencia de polietilenglicol (figura 23). Por tanto uvsX puede ser más óptima para su utilización en RPA.

La recombinasa uvsX de bacteriófago T4 presenta una interacción bien caracterizada con su pareja, la proteína uvsY de carga. A pesar de los informes que sugieren que recO y recR de *E. coli* pueden ser análogos funcionales de uvsY, no se ha observado ninguna mejora significativa para reacciones de RPA. Esto puede deberse a problemas con las preparaciones de proteínas, o deberse a la utilización del heterólogo gp32 en vez de SSB de *E. coli*.

Finalmente es probable que uvsX se comporte mejor con gp32, que se encuentra que es una proteína de unión a ADN monocatenario óptima, porque han evolucionado para funcionar en sintonía y pueden presentar interacciones

relevantes. De hecho *uvsX* y otros componentes de la maquinaria de replicación dependiente de la recombinación del bacteriófago T4, tales como la helicasa *dda*, presentan interacciones proteína-proteína conocidas que pueden ser útiles para establecer una reacción de RPA óptima (Hacker KJ, Alberts BM. J Biol Chem. 15 de octubre de 1992; 267(29):20674-81).

A pesar de las aparentes ventajas de *uvsX* para RPA, hay características de *recA* de *E. coli* que pueden ser útiles. Se ha notificado que los filamentos de nucleoproteínas de *recA* son más estables, lo cual puede ser de utilidad en algunas circunstancias. La velocidad de hidrólisis de ATP inferior aplica menos limitación sobre el establecimiento de un sistema de regeneración de ATP duradero, y la ausencia de generación de AMP y pirofosfato elimina la necesidad de regenerar y limpiar estos productos secundarios. También puede darse el caso de que otros homólogos de *recA* presenten actividades que son óptimas para RPA.

Establecimiento de un sistema de recombinación dinámica:

Para hacer que la RPA sea robusta, es crítico configurar la reacción para proporcionar un número suficiente de filamentos de recombinasa/ADN de búsqueda de homología, recubiertos, activos. Además, tras completarse la búsqueda de homología, los filamentos deben desensamblarse eficazmente, o procesarse de otro modo, para permitir cargar ADN polimerasa y otros componentes. También es esencial que esté presente una cantidad suficiente de proteína de unión a ADN monocatenario tanto para facilitar la fusión de oligonucleótidos como para recoger cadenas salientes desplazadas. Y finalmente, la RPA robusta requerirá síntesis de ADN con desplazamiento de cadena procesiva. De manera subyacente a estos requisitos hay una competición entre la recombinasa y la proteína de unión a ADN monocatenario.

Se conoce ampliamente que los filamentos de ADN cargados con recombinasa son inestables en presencia de proteínas de unión a ADN monocatenario. Acoplado con el hallazgo de que la hidrólisis de cofactor de nucleótidos no se requiere estrictamente para la búsqueda de homología, condujo a la utilización de análogos nucleotídicos no hidrolizables de nucleótidos tales como ATP- γ -S, para cargar *recA* sobre filamentos y producir complejos de búsqueda de homología estables. Se ha descrito un procedimiento de amplificación mediado por *recA* utilizando ATP- γ -S (Zarling, *et al.*), sin embargo, no se ha utilizado ampliamente. Anteriormente se identificó un fallo en el procedimiento, que ahora puede observarse en los resultados experimentales. El procedimiento de Zarling, *et al.* fracasa probablemente porque los filamentos cargados con recombinasa necesitan ser dinámicos y poder desensamblarse así como realizar otros acontecimientos dependientes de la hidrólisis de ATP para completar el intercambio de cadena y permitir la carga de ADN polimerasa y otros componentes en el extremo 3' del oligonucleótido invasor. La utilización de ATP- γ -S, así como otras modificaciones tales como eliminar secuencias ácidas del extremo C-terminal de recombinasas, conduce a una afinidad alta general constante por ADN que probablemente impide el intercambio de cadena y la disociación del complejo de invasión. Por tanto los filamentos de *recA* cargados con ATP- γ -S quedan eficazmente bloqueados sobre el sitio de diana en el acontecimiento de recombinación durante un tiempo anómalamente largo. Por consiguiente los análogos nucleotídicos no hidrolizables generalmente no son permisivos para la replicación y amplificación mediadas por recombinasa. En vez de eso, debe emplearse ATP, u otros nucleótidos hidrolizables que puedan soportar la carga de recombinasa. En ATP las recombinasas están constantemente asociándose con y disociándose del oligonucleótido y están en competición con proteínas de unión a ADN monocatenario. Se ha tratado el problema que plantea esta competición de dos maneras generales; en primer lugar, incluyendo una proteína de carga de recombinasa específica para *uvsX*, la proteína *uvsY*, y en segundo lugar modulando el comportamiento cooperativo de *gp32*, y las recombinasas *uvsX* y *recA*, mediante mutación y/o inclusión de agentes de agrupamiento. Sin embargo, es posible que puedan incluirse cantidades limitadas de análogos no hidrolizables tales como ATP- γ -S, o de análogos no fosforilables tales como ADP- β -S, para modular la actividad de carga/descarga global de la recombinasa.

Componentes adicionales de reacción

Varios componentes de reacción específicos presentan una influencia significativa sobre la eficacia de la reacción de RPA.

Polietilenglicol

Los polietilenglicoles (PEG) presentan un profundo efecto sobre la recombinación/síntesis de ADN. En primer lugar, se encuentra que los PEG influyen sobre el número de ciclos de invasión/extensión múltiple que se producen, por ejemplo cuando se combina *recA* con *gp32* (N). También se ha encontrado que los PEG estimulan reacciones de amplificación configuradas de varias maneras diferentes (figura 15, ejemplo 3). También se sabe que en algunas configuraciones los PEG alteran la distribución de longitud de los productos formados (figura 28). En resumen los polietilenglicoles, y supuestamente otros agentes de agrupamiento similares, pueden afectar a la cooperatividad de *gp32* y recombinasas, afectan a la capacidad de procesamiento de la polimerasa y afectan a la velocidad de hibridación y al comportamiento de oligonucleótidos en disolución. Pueden impregnar entornos de tipo célula mediante reparto en fases de los reactivos, y/o provocando el desarrollo de cinética de tipo fractal. Además la longitud de cadena del polietilenglicol parece ser crítica. Se encuentra que, de los sometidos a prueba, los PEG con un peso molecular promedio de 1450 y 15-20.000 ("compuesto" de PEG) producen los mejores resultados. Los PEG

que ayudan a la función de gp32, particularmente variantes de gp32 con cooperatividad atenuada, se han descrito anteriormente. También es probable que PEG aumente la estabilidad de filamentos cargados con recombinasa y la persistencia aumentada puede aumentar la eficacia de RPA. De la manera más importante ha sido completamente imposible establecer condiciones de amplificación que puedan amplificar a partir de cantidades traza de muestra hasta niveles detectables sin emplear polietilenglicoles (de manera escasa con PEG 1450, de manera muy eficaz con compuesto de PEG). Supuestamente otros agentes también pueden estimular reacciones de RPA, sin embargo este efecto no fue evidente en experimentos preliminares con poli(alcohol vinílico). Por tanto características específicas de polietilenglicoles, y más particularmente variantes específicas de PEG, pueden ser esenciales.

Resulta un misterio de qué manera el compuesto de PEG (Carbowax 20M) alcanza tal efecto estimulante significativo. Modelos cinéticos de la manera en la que la exclusión de volumen puede afectar a las velocidades de reacción aplicarán un énfasis significativo sobre los pesos moleculares de los sustratos y las enzimas que están estudiándose en comparación con el componente de agrupamiento. Sin embargo el siguiente agente más eficaz que se sometió a prueba, PEG 1450, también fue el más pequeño y la estimulación mediante polietilenglicoles intermedios entre PEG1450 y compuesto de PEG fueron menos eficaces. Por consiguiente, se sospecha que las propiedades adicionales fueron menos eficaces. Por consiguiente, se sospecha que las propiedades adicionales a simplemente la longitud de cadena promedio son críticas para los efectos de estos agentes. Por ejemplo pueden producirse transiciones de fase específicas a temperaturas variables para diferentes PEG. También se sabe que los grupos alcohol de los PEG pueden conducir a interacciones adicionales, tales como con proteínas, o influir sobre el entorno iónico. Se indica (datos no mostrados) que la adición de compuesto de PEG al 5% (aunque desarrollaba un pH inferior a 7,0 durante el almacenamiento a temperatura ambiente) a disoluciones tamponadas con Tris utilizadas en RPA provoca un aumento repentino de pH.

Como consecuencia actualmente no hay ninguna manera estándar para determinar qué agentes de exclusión de volumen presentarán las propiedades correctas para estimular entornos de recombinación dinámica de alto nivel, y RPA en particular, excepto mediante validación experimental.

Componentes del sistema de regeneración de ATP

Un sistema de regeneración de ATP es crucial para permitir reacciones de recombinación persistentes ya que las recombinasas presentan una velocidad extremadamente alta de hidrólisis de ATP cuando se unen a ácidos nucleicos. En particular, la proteína UvsX presenta una velocidad de hidrólisis de 10-20 veces superior a la de recA y puede consumir 200 moléculas de ATP por minuto por monómero. Hay varios sistemas disponibles y se ha utilizado de manera rutinaria el sistema de creatina cinasa/fosfocreatina. Cuando se emplea uvsX el AMP que se produce debe convertirse en ATP. Se ha utilizado miocinasa de pollo, que convierte una molécula de AMP y una de ATP en dos moléculas de ADP. Entonces se convierte ADP en ATP utilizando el sistema de creatina cinasa/fosfocreatina. La escasa regeneración de ATP reducirá la velocidad de reacción y probablemente detendrá la reacción antes de que se acumulen niveles detectables de producto.

Pirofosfatasa

El pirofosfato (PPi) se acumula durante la síntesis de ADN y cuando se emplea uvsX, ya que hidroliza ATP para dar AMP + PPi. La acumulación de PPi en la reacción puede presentar varias consecuencias perjudiciales. Una acumulación de pirofosfato significativa permitirá una velocidad inaceptable de pirofosforilisis, mediante lo cual la reacción sintética de una polimerasa se impulsa en sentido inverso y elimina los nucleótidos más en 3' de moldes de dúplex. Esto puede conducir a niveles inaceptables de ruido de cebadores, o a niveles potenciados de auto-cebado indeseado de cadenas salientes, porque las actividades de corrección de la polimerasa tienden a cortar extremos 3' hasta que se revela una región de dúplex adecuada para permitir una elongación rápida. Adicionalmente, la acumulación de pirofosfatasa conducirá a la inhibición de la recombinasa, y a una ralentización de la reacción sintética de polimerasa.

Relación señal:ruido mejorada mediante diseño de reacciones de RPA

La RPA presenta una alta sensibilidad y especificidad. Sin embargo muestras que no contienen diana en absoluto con frecuencia generan productos derivados sólo de los cebadores. Tales fenómenos no son poco comunes en otros procedimientos. Por ejemplo el procedimiento de PCR generará en última instancia productos no específicos tales como los denominados "dímeros de cebador". La RPA es algo propensa a tales artefactos relacionados con el cebador porque no hay ningún control del ciclo que permita que amplicones pequeños alcancen muchas duplicaciones dentro del periodo de la incubación. La electroforesis de productos de reacción permite una fácil separación de la señal y del ruido, sin embargo en productos de diagnóstico no de laboratorio sencillos deben aplicarse otros enfoques. Aquí se dan a conocer enfoques para hacer que tales pruebas de diagnóstico distintas de gel funcionen con una relación señal-ruido adecuada, y para llevar a cabo fácilmente la detección. También se da a conocer la composición de un liofilizado de reacción que puede almacenarse durante muchos días a temperaturas ambientales, un prerrequisito para su utilización fácil no en laboratorio.

Relaciones señal-ruido en el sistema de RPA

Los sistemas de amplificación de ADN generalmente se enfrentan con el hecho de que puede producirse amplificación de ADN que no se inicia a partir de la diana auténtica. Este “ruido”, particularmente aparente en condiciones de bajo contenido en diana, puede imponer restricciones sobre la sensibilidad permitida, y los procedimientos para evaluar la amplificación. Aunque las configuraciones de RPA iniciales ofrecen una sensibilidad exquisita, se cree que nuevas propiedades del sistema basado en recombinasa se prestan a enfoques anteriormente no considerados para mejorar la especificidad, y para desarrollar un esquema de detección de producto nuevo.

Las reacciones de amplificación RPA, tales como PCR, se establecen generalmente combinando dos oligonucleótidos, que flanquean al ADN diana deseado. Se producen acontecimientos de duplicación y, como en la PCR, resulta la amplificación exponencial de ADN, permitiendo una amplificación de hasta 10^{12} veces para fragmentos de ~150-400 pb.

Cuando se someten a prueba cebadores de 30-35 residuos y aceptables para algoritmos de diseño convencional, una proporción significativa amplifican la diana con alta sensibilidad y especificidad (figura 41). Por ejemplo, tales “buenos” cebadores pueden amplificar satisfactoriamente dianas a partir de concentraciones de diana de partida de 2-3 copias por microlitro para generar niveles significativos del amplicón correcto. Sin embargo, por debajo de esta densidad de copias incluso los buenos cebadores tienden a generar ruido (manchas, desarrollo escalonado y/o tinción de pocillo), tal como se somete a ensayo mediante electroforesis en gel de todos los productos de reacción (véase la figura 41), estos productos aparentemente de origen puramente de cebador (aunque es probable que esté presente ADN de *E. coli* contaminante y en teoría puede especificar amplicones falsos altamente ineficaces).

En algunos casos el ADN diana puede no ser particularmente poco frecuente, por ejemplo si se desea determinar un perfil de SNP limitado de un individuo humano y puede obtenerse fácilmente una muestra de sangre moderada. Por otro lado, algunas pruebas para detectar patógenos pueden necesitar detectar tan sólo unas pocas copias para presentar gran utilidad práctica, y en particular distinguir esta situación claramente de una ausencia completa de diana.

Los esfuerzos por determinar el nivel y la naturaleza de ruido generado en experimentos con número de copias muy bajo, o sin número de copias, así como otros experimentos que investigan la longitud y composición del cebador, han revelado varias observaciones clave, que se cree que ayudarán al desarrollo de sistemas de diagnóstico portátiles altamente sensibles ideales utilizando RPA.

En primer lugar, se ha encontrado que oligonucleótidos de menos de aproximadamente 30 residuos son menos eficaces en RPA, y se vuelven notablemente menos “ruidosos”, sin generar ningún ruido visible en absoluto cuando se reducen hasta 25-26 (véanse las figuras 45 y 52). No obstante, oligonucleótidos más cortos todavía pueden realizar, al menos, elongación basada en hibridación (véase la figura 52), y su “actividad” en acontecimientos de RPA (mediada por recombinasa) no es probablemente nula, disminuyendo en vez de eso progresivamente con el acortamiento (figura 45). Esto permite cierto grado de ajuste de la actividad/ruido.

En segundo lugar, se observa que los cebadores que son idénticos excepto por un pequeño número adicional de residuos en la extensión en 5' muestran una variabilidad significativa en el ruido (incluso cuando presentan >30 residuos), lo que implica que la naturaleza exacta de la(s) base(s) más en 5' desempeña un papel significativo en el mecanismo y la probabilidad del ruido (véanse las figuras 42, 45 y 47).

En tercer lugar, los cebadores que presentan un azúcar de ácido nucleico bloqueado (ANB) en el extremo más en 3' reducen/eliminan el ruido tal como se determina mediante electroforesis en gel. También reducen la cantidad de producto ligeramente si sólo se emplea uno, y significativamente si se utilizan ambos a concentraciones de polimerasa “convencionales”, pero permanecen completamente activos si se aumenta la concentración de polimerasa, y a concentraciones de polimerasa elevadas el ruido todavía aparece suprimido.

Finalmente el ruido a baja concentración de diana parece derivarse principal/únicamente de cebadores, no del ADN de muestra, y por tanto este ruido se denomina “gimnasia de cebador”. Esto queda claro a partir de experimentos en los que se reduce el ADN de muestra a cero. Por consiguiente, es posible centrar la atención en los mecanismos limitados mediante los cuales los cebadores pueden interactuar consigo mismos y entre ellos mismos para hallar soluciones a este problema. En la siguiente sección se comenta en detalle cómo puede surgir el ruido. Una conclusión importante de este análisis es que reducir la actividad de recombinación/cebado de filamentos de nucleoproteínas puede presentar un impacto más intenso sobre la generación de ruido de cebadores que la generación de amplicón auténtico.

Análisis sobre cómo puede originarse el ruido de cebadores

Al contrario que la PCR, u otros procedimientos que implican hibridación convencional, el hecho de que la RPA se basa en la formación de filamentos de nucleoproteínas extendidos que experimentan hidrólisis de ATP como complejos de búsqueda de homología activos probablemente afecta a los parámetros que determinan la actividad de oligonucleótidos de maneras no encontradas anteriormente para reacciones de amplificación *in vitro*. Se sugiere que

la rápida disminución de la actividad de oligonucleótidos por debajo de 30 residuos descrita anteriormente refleja una ralentización de la velocidad de recombinación, y que lo más probablemente esto equivale a observaciones realizadas en otras partes sobre la dependencia de la longitud de la hidrólisis de ATP para la recombinasa recA de *E. coli* (Bianco PR y Weinstock GM). En particular se mostró que la longitud y la composición de secuencias cortas influyó sobre la hidrólisis de ATP. Se requieren aproximadamente 30 residuos o más para una hidrólisis de ATP máxima (moles de ATP por mol de recA unida a ADN) cuando se une recA a oligonucleótidos sintéticos, mostrando secuencias más cortas disminuciones notables en la velocidad de hidrólisis hasta que estaba ausente a aproximadamente 15 residuos. Se asocia la observación del bajo comportamiento de amplificación con datos anteriores sobre la con hidrólisis de ATP porque hay un fundamento claro para pensar que la actividad de recombinación de nucleoproteínas se verá influida por la velocidad de hidrólisis de ATP. En un sentido los oligonucleótidos más lentos que se han observado son los unidos a ATP- γ -S no hidrolizable en los que la velocidad de intercambio completado (formación de uniones pleconómicas resueltas) es casi nula (Riddles PW y Lehman IR). También se ha demostrado que ATP- γ -S envenena eficazmente las reacciones de RPA (Piepenburg *et al.*). Se sugiere que altas velocidades de hidrólisis de ATP en un filamento de nucleoproteína forman la base para la actividad de cebadores "rápidos", y las bajas velocidades cebadores "lentos", que se diferencian principalmente en el número promedio de acontecimientos de recombinación completos completados en una unidad de tiempo. Interpretado de manera sencilla, se requiere hidrólisis de ATP para la actividad dinámica de filamentos. Los oligonucleótidos de menos de 30 residuos se vuelven más estables y menos dinámicos, pareciéndose finalmente al estado bloqueado generado cuando se emplea ATP- γ -S, y no pueden completar el intercambio (los oligonucleótidos "lentos" pueden localizar secuencias igual de fácilmente, pero no pueden desensamblarse fácilmente para permitir la terminación y el acceso de polimerasa).

Una posible diferencia en la dependencia de la actividad de filamentos de nucleoproteínas para producto auténtico y ruido

Para entender por qué podría haber alguna ventaja seleccionando oligonucleótidos "más lentos" menos activos, se necesita explorar cómo puede surgir el ruido de "gimnasia" de cebador. ¿Por qué podría un oligonucleótido acertado reducir el ruido más rápido que la señal específica? Al contrario que la fase de amplificación geométrica observada para productos tanto de diana auténtica como de ruido, la fase de formación inicial de dianas ruidosas a partir de cebadores de partida es probablemente más compleja, y supuestamente es bastante lenta. En la figura 43 se han detallado 2 mecanismos generales mediante los cuales cebadores individuales pueden convertirse en estructuras con la capacidad de amplificación geométrica. Ambas estrategias esquematizadas ilustran la formación de amplicones a partir de una única especie de cebador. En ambos casos la primera etapa implica el auto-cebado del oligonucleótido mediante la formación de una horquilla corta en el extremo 3'. En la estrategia 1 la horquilla resultante no se amplificará fácilmente en la fase geométrica debido a apareamientos erróneos significativos. En vez de eso, para convertirse en amplicones de fase geométrica necesitarán avanzar a través de una etapa más parecida a la descrita en la estrategia 2. En este caso el acontecimiento de auto-cebado va seguido por un segundo que implica el complemento inverso del extremo 5' del oligonucleótido original. Hay varias observaciones sencillas a partir de tal modelización. La primera es que deben producirse 2 tipos de acontecimientos; debe haber una elongación desde el extremo 3' de un oligonucleótido, y después una segunda horquilla en 3' similar y extensión que implica al complemento inverso del extremo 5' del oligonucleótido original. Obsérvese que la naturaleza muy poco frecuente e inestable de los primeros acontecimientos que preceden a la fase geométrica van a ser los más inhibidos si la mayoría de los oligonucleótidos están recubiertos o bien con una SSB o bien con recombinasa, que presentan actividades de fusión de ADN cuando se unen a ADNmc. Al contrario, los filamentos de recombinasa dinámicos que se desensamblan espontáneamente crean intervalos temporales en los que la totalidad, o partes, de un oligonucleótido no están recubiertas. Esta etapa muy limitadora de la velocidad será por tanto probablemente sensible a la velocidad de hidrólisis de ATP del cebador, la capacidad dinámica, y por extrapolación la longitud de oligonucleótido. Por consiguiente, acortar oligonucleótidos puede ser particularmente eficaz y eliminar ruido, lo suficientemente como para justificar que se muestre una velocidad de amplificación de diana auténtica con el fin de alcanzarlo.

Estos amplicones de fase geométrica finales son repeticiones invertidas. Esto significa que una invasión/elongación que se origina desde un lado desplazará una cadena que se pliega inmediatamente de nuevo sobre sí misma para formar una horquilla larga. Esta molécula debe seleccionarse como diana mediante acción recombinasa con el fin de convertirse de nuevo en una similar a la original, mientras que las dianas auténticas pueden emplear adicionalmente hibridación en disolución. Esto impone una necesidad adicional para los artefactos de cebadores sobre la invasión basada en recombinasa para alcanzar una amplificación geométrica, y por consiguiente se suprimirán probablemente más rápido mediante una velocidad de recombinación menor. Además, la presencia de repeticiones internas significa que es probable que surjan rápidamente versiones mayores y más diversas de estos amplicones, y esto concuerda con el fenotipo común de una mancha, o desarrollo escalonado, que discurre casi completamente hacia la parte superior del gel.

Una tercera observación es que el tiempo empleado para duplicar una especie dada de ADN durante la amplificación exponencial será una combinación de la velocidad de recombinación y el tiempo empleado para sintetizar el molde mediante polimerasa. Dado que los productos de ruido de cebadores (al menos inicialmente) son muy pequeños, el tiempo empleado para la síntesis de ADN es muy pequeño y por tanto la limitación de la velocidad

principal puede ser la velocidad de recombinación. Por tanto reduciendo la velocidad de recombinación de nucleoproteínas afectará, aunque ralentiza la amplificación en general, más fuertemente a los amplicones cortos que a los largos, beneficiando por tanto generalmente a los amplicones auténticos.

- 5 Se extraen las observaciones anteriores para diseñar maneras de combinar cebadores de diferente longitud, composición y concentración, para proporcionar reacciones altamente sensibles y específicas.

Diseño de oligonucleótidos primario:

- 10 Las cuatro observaciones descritas anteriormente se prestan a algunos principios de diseño de oligonucleótidos sencillos.

Longitud de oligonucleótido

- 15 La longitud de cebador óptima puede ser de aproximadamente 30 residuos y en algunos casos unos pocos residuos menos proporcionarán una excelente relación señal-ruido. A medida que disminuye la longitud de cebador promedio, la generación de ruido disminuye y parece estar completamente ausente cuando se emplean 26-28 meros (figura 45). Aunque la amplificación de la diana también disminuye, se sospecha que el ruido disminuye más rápidamente que la señal. En el análisis anterior sobre cómo puede surgir el ruido, se concluye que hay varios motivos por los que el ruido de cebadores puede verse más afectado por una disminución de la velocidad de recombinación que los amplicones correctos.
- 20

Optimización de la secuencia más en 5'

- 25 Comparando la actividad de oligonucleótidos que presentan secuencias idénticas excepto por la extensión de los residuos más en 5' se ha observado que se observa una variación significativa en el ruido de oligonucleótidos (véanse las figuras 42, 45, 47). Una posibilidad es que esto refleja estrictamente los efectos de la variación de la longitud sobre la actividad de nucleoproteínas tal como se describió anteriormente. Sin embargo, esto puede no ser el único motivo si los cebadores que están comparándose presentan todos 30 residuos o más. Por ejemplo en la
- 30 figura 42, los oligonucleótidos NEST-1 y J1 son idénticos excepto porque J1 contiene varios residuos en 5' adicionales. En vez de presentar más ruido, este oligonucleótido es menos ruidoso, al tiempo que se amplifica muy bien. Basándose en este y en otros casos, se proponen otros dos mecanismos probables. En primer lugar, que para que un oligonucleótido pueda amplificarse exponencialmente puede requerirse un acontecimiento de cebado mediante el complemento inverso de las secuencias más en 5', este acontecimiento depende de manera crítica de la
- 35 secuencia exacta de bases en el extremo 5'. Esto significa que variar las bases más en 5' puede conducir a una variación significativa en la generación de ruido. En segundo lugar, que la composición de bases incluso de las secuencias en 5', incluso cuando el oligonucleótido presenta más de 30 bases, puede afectar a la actividad de recombinación de cebadores. Las evidencias para soportar esto proceden de un experimento en el que se añadieron etiquetas en 5' que consistían en tramos homopoliméricos a cebadores, y las consecuencias observadas. La figura
- 40 47 muestra un experimento en el que se añadió una serie de residuos C, o residuos G, a los oligonucleótidos J1 y K2, y posteriormente se estableció una reacción de amplificación que contenía todos los posibles oligonucleótidos modificados y no modificados solos, o en las posibles combinaciones. Sorprendentemente, estos oligonucleótidos, que ya se determinó que eran muy sensibles y específicos, no se mejoraron mediante la adición de estos tramos homopoliméricos particulares. En vez de eso, se observó que si se añadía una serie de citosinas al extremo 5' esto
- 45 conducía a un aumento de la producción de productos no específicos cuando se incubaba solo, mientras que un tamo de guanosinas presentaba el efecto inverso, haciendo que los oligonucleótidos fueran muy silenciosos cuando se dejaban solos. Además, aparte de la combinación de los oligonucleótidos no modificados originales, el único par que generó de manera aparentemente satisfactoria un producto correcto fue la combinación de los 2 oligonucleótidos con cola de citosina (es decir, los oligonucleótidos más ruidosos). Una explicación que puede
- 50 justificar estas observaciones es que un tramo de citosinas en el extremo 5' hace que el filamento de nucleoproteína consecuente sea más activo, mientras que las guanosinas lo hacen menos activo. En resumen, la composición de oligonucleótidos, como la longitud, puede afectar al comportamiento de velocidad, y secuencias en el extremo 5' adicionales y no relacionadas pueden presentar una influencia significativa con respecto a esto. Pueden encontrarse cebadores óptimos mediante un enfoque racional en el diseño de secuencias en 5'. Pueden intentarse varias bases
- 55 más en 5' diferentes, y seleccionarse las mejores para emplearlas. Además, es probable que puedan colocarse etiquetas en el extremo 5' cuya secuencia no está relacionada con la diana, pero que confieren resistencia frente al cebado de horquilla de recuperación rápida a partir del complemento inverso. La determinación de secuencias óptimas que funcionan con muchos oligonucleótidos puede ser posible. La medición de la velocidad de hidrólisis de ATP de oligonucleótidos en presencia de componentes de reacción también puede demostrar utilidad en el diseño
- 60 de pares de cebadores óptimos, y permitir crear mezclas de cebadores que comparten todos un comportamiento de velocidad de amplificación idéntico. Como la longitud, estas observaciones y mejoras no serán evidentes en otros sistemas porque dependen de características específicas de un sistema de amplificación impulsado por recombinasa y de la bioquímica subyacente.

- 65 Ácido nucleico bloqueado, ribosa u otras modificaciones de azúcares

Los ácidos nucleicos bloqueados (ANB) son nucleótidos en los que se ha diseñado por ingeniería un enlace entre los carbonos 2' y 4' del anillo de azúcar de la ribosa. Se han utilizado satisfactoriamente oligonucleótidos que contienen tales azúcares, lo más notablemente en la posición completamente en 3', en ensayos de PCR, y se ha mostrado que mejoran significativamente la distinción de apareamiento de bases en 3' correcto (véase Vester B. y Wengel J.). Se anticipó que residuos de ANB podían tolerarse por el sistema de RPA con la condición de que no estuvieran presentes en demasiadas posiciones dentro de los oligonucleótidos. Dado que se sabe que aumentan la especificidad en ampliificaciones por PCR, también pueden mejorar la relación señal-ruido en el sistema de RPA.

Experimentos anteriores que emplearon enlaces fosforotiorato en las posiciones más en 3' demostraron no poder funcionar apropiadamente en RPA, y fueron notablemente más ruidosos (datos no mostrados). Se interpretó esto como un reflejo de que tanto uvsX como gp32, que interaccionan con la estructura principal de azúcar-fosfato, no se unirán a estas estructuras principales conduciendo a un comportamiento de reacción gravemente anómalo. Sin embargo la unión de gp32 depende menos del azúcar tal como se demuestra por su capacidad para unirse a ARN así como a ADN (aunque con una cooperatividad inferior alterada) (Kowalczykowski SC, *et al.*). Por tanto se anticipa que los azúcares de ANB, que conservan un grupo fosfato normal, pueden seguir siendo funcionales con gp32.

Se han realizado experimentos en los que se han utilizado oligonucleótidos que presentan un azúcar de ácido nucleico bloqueado en la posición más en 3' en reacciones de amplificación. Se ha realizado una comparación entre reacciones con oligonucleótidos idénticos con y sin la modificación de azúcar, y reacciones que implicaban un oligonucleótido modificado y uno no modificado. Basándose en el experimento parece que RPA puede amplificar ADN cuando uno o ambos oligonucleótidos presentan un residuo de ácido nucleico bloqueado en la posición en 3'. De manera notable, la presencia de un nucleótido de ANB en el extremo 3' redujo significativamente la acumulación de producto a una concentración de polimerasa "convencional", y aparentemente eliminó el ruido asociado. El ruido muy bajo, y producto reducido, pueden surgir debido a una frecuencia de recombinación satisfactoria inferior, desprendimiento de polimerasa reducido, o una combinación. Sea cual sea el motivo, es razonable basándose en los hallazgos de que utilizar ácidos nucleicos bloqueados en uno o ambos cebadores reducirá significativamente o eliminará el ruido, al tiempo que se conserva una velocidad de amplificación aceptable para el producto auténtico. Se encuentra que los niveles de producto pueden volver a altos niveles si se aumenta varias veces la concentración de polimerasa (desde aproximadamente 30-40 ng/μl hasta 150 ng/μl), pero que los niveles de ruido no aumentan en una tasa equivalente.

De manera similar otros residuos modificados con azúcar pueden presentar un comportamiento de señal-ruido mejorado cuando están presentes a cierta frecuencia en los oligonucleótidos. Por ejemplo ribosa, modificaciones con 2'-O-metilo, azúcares acíclicos, o de otro tipo pueden resultar de utilidad.

Enfoques que mejoran la relación señal:ruido combinando filamentos de nucleoproteínas con actividades diferenciales

La capacidad para controlar la velocidad de recombinación y/o elongación a partir de cebadores basándose en su longitud, composición y distribución de bases, y utilización de azúcares modificados (o posiblemente otras modificaciones de la estructura principal) sugiere mecanismos para diseñar reacciones de amplificación con propiedades de señal:ruido óptimas. Hay dos maneras generales en las que se consideran que se emplean estrategias de combinación de oligonucleótidos de manera beneficiosa. En primer lugar, hay estrategias en las que se produce anidamiento en un único tubo, y en segundo lugar está el empleo de un oligonucleótido no ruidoso apareado con un oligonucleótido más convencional de tal manera que se forman fácilmente amplicones auténticos, pero los amplicones ruidosos sólo implican oligonucleótidos individuales.

Anidamiento en un único tubo

El anidamiento es el procedimiento mediante el cual se ha permitido una mejora de la sensibilidad y relación señal-ruido llevando a cabo una primera amplificación con un par de cebadores externo, y después realizando una segunda amplificación con un par de cebadores interno. En su contexto más familiar este enfoque se ha empleado junto con el procedimiento de PCR. En principio la primera ronda amplifica la diana más eficazmente que el ADN al azar, de tal manera que tras la primera amplificación, aunque no fuera lo insuficientemente limpia como para proporcionar un amplicón claro frente al fondo, todavía es lo bastante enriquecida relativamente que una segunda amplificación con cebadores internos para los primeros proporcionará fácilmente un resultado muy claro y limpio. En la práctica esto se basa normalmente en realizar una amplificación, después retirar una porción pequeña a un nuevo tubo, y realizar una segunda amplificación con cebadores "anidados" internos.

Aunque el concepto de anidamiento se analiza en otra parte, los resultados sugieren un enfoque de anidamiento alternativo atractivo en el que todos los cebadores participantes se combinan en una única reacción. El fundamento es que el par de oligonucleótidos interno y externo son activos de manera diferencial en cuanto a la velocidad de recombinación y/o elongación, y están presentes a una concentración diferente. Por ejemplo el par externo puede estar configurado para presentar una velocidad de recombinación/elongación rápida, y el par interno una velocidad de recombinación/elongación más lenta. Además, el par externo estará presente a una concentración menor (pero todavía una concentración lo suficientemente alta como para una actividad aceptable) y el par interno estará

presente a una concentración alta. ¿Qué sucederá entonces? De manera aislada, el par interno se amplificará de manera limpia pero bastante lenta de modo que puede no alcanzar un grado de amplificación aceptable dentro de un marco temporal deseable. En cambio, de manera aislada el par externo se amplificará rápidamente, aunque con algo de ruido de cebadores, pero se detendrá a una concentración bastante baja debido al agotamiento. Sin embargo, en combinación estos dos comportamientos posiblemente se complementarán adecuadamente. En la práctica, los pares de cebadores externos serán generalmente rápidos, de más de 30 residuos de longitud, no modificados en el extremo 3', y posiblemente contendrán residuos en 5' adicionales que fomentan la "rapidez". Los cebadores serán más lentos, tal como se confiere posiblemente haciendo que sean más cortos, modificando el extremo 3' con ANB o de otro modo, añadiendo secuencias de ralentización en el extremo 5', etcétera.

Pares de nucleoproteínas no ruidosas/ruidosas

Los datos experimental que se han obtenido sugieren que gran parte de las manchas o los desarrollos escalonados derivados de los cebadores contienen secuencias de sólo una especie de cebador (véase la figura 46). Si es cierto, este hecho por sí solo sugiere un enfoque sencillo para distinguir la señal del ruido determinando simplemente si los dos cebadores utilizados en la reacción están físicamente asociados en los productos o no. En este caso se sugiere que esto puede mejorarse adicionalmente combinando oligonucleótidos muy silenciosos con oligonucleótidos más rápidos (más ruidosos). Los oligonucleótidos silenciosos, por ejemplo oligonucleótido corto, todavía pueden funcionar eficazmente si están presentes con unos más ruidosos con la condición de que puedan funcionar en reacciones de hibridación (véase la figura 52). Sin embargo si sólo participan en la amplificación mediante hibridación normal cuya cinética es muy diferente de la amplificación con ruido fomentada por recombinasa, pueden permanecer sin implicarse en el ruido en el que participa el oligonucleótido más rápido solo.

Tercer cebador y protocolos de detección

La posibilidad de que los cebadores puedan realizar principalmente gimnasia sola, tal como se mencionó anteriormente, sugiere enfoques sencillos para determinar si se ha producido eficazmente amplificación o no. Un formato de detección sencillo distinto de gel empleará un oligonucleótido marcado con un colorante o una enzima, u otro grupo fácilmente detectable, y el otro marcado con un grupo inmovilizable, por ejemplo biotina (véase la figura 50, parte 1). Por tanto, antes, durante o después de la fase de reacción principal se inmovilizará el oligonucleótido inmovilizable en una superficie, y al final de la reacción se lavará esta superficie con un tampón apropiado. Si el otro cebador marcado se asocia conjuntamente con el cebador inmovilizable, lo que puede determinarse fácilmente, entonces se ha producido la amplificación del producto.

Más allá de esto, se imaginan maneras adicionales en las que pueden generarse niveles adicionales de rigurosidad sobre la amplificación de producto auténtico. Un enfoque adicional sencillo implica un "tercer" cebador que funciona para capturar sobre una superficie amplicones en fase líquida. Se impedirá que este cebador genere ruido por sí mismo o bien diseñándolo mediante ingeniería como silencioso (por ejemplo un oligonucleótido corto tal como se describió anteriormente) o bien añadiéndolo al sistema únicamente en una fase tardía de la reacción. Este tercer cebador puede seleccionar como diana nuevas secuencias internas, pero también puede inmovilizar las dianas mediante síntesis "de activación inversa" tal como se describe en otra parte para evitar la migración de ramificaciones de alteración (figura 50, partes 2 y 3).

Liofilización de la reacción de RPA

Con el fin de configurar pruebas forenses y de diagnóstico no de laboratorio, o cerca del paciente, será necesario proporcionar reactivos estables en condiciones ambientales. Una manera evidente de lograr esto es liofilizando las reacciones, omitiendo sólo el ADN de muestra, y posiblemente cualquier otro componente que sea estable por separado y pueda añadirse con la muestra tal como tampón utilizado para disolver el ácido nucleico de muestra.

Aunque la liofilización es un procedimiento bien establecido no hay ninguna garantía de que todos los componentes de un sistema de reacción se liofilizarán conjuntamente de manera satisfactoria y se reconstituirán en las mismas condiciones. Se ha intentado liofilizar reacciones de RPA con y sin diversos de los componentes de reacción finales. La figura 53 muestra que se ha logrado liofilizar satisfactoriamente reacciones de RPA que contienen todo excepto el ADN de muestra y algún componente de tampón (que puede almacenarse de manera estable a temperaturas ambientales y utilizarse para reconstituir ADN de muestra). El azúcar disacárido, trehalosa, muestra que se requieren en estos experimentos para estabilizar el liofilizado, permitiendo un almacenamiento a temperatura ambiente durante al menos 10 días.

Análisis cinéticos en tiempo real de reacciones de RPA

La capacidad de realizar análisis cinéticos de reacciones de amplificación de ADN proporciona una enorme utilidad en comparación con análisis puramente de punto final de reacciones similares. En primer lugar, esto permite la determinación del número de copias de ADN, o ARN, presentes en una muestra y presenta muchas utilidades en aplicaciones de pruebas de investigación, clínicas y medioambientales. Además de aplicaciones de cuantificación sencillas, la detección de producto de reacción dinámica ofrece excelentes soluciones a otros problemas, tales como

permitir la distinción de alelos polimórficos de un único nucleótido gracias a la cinética de acumulación alterada, y un mecanismo para evaluar la presencia frente a la ausencia de dianas en un formato no basado en gel.

5 La RPA ofrece una excelente alternativa a la PCR para amplificar dianas de ADN específicas, pero eliminando la ciclación térmica, la RPA requiere instrumentación menos cara y es más fácil de implementar en entornos no de laboratorio.

10 Actualmente, el análisis en tiempo real de acumulación de ADN se emplea lo más ampliamente en combinación con la PCR. La PCR muestra amplificación exponencial de ADN hasta varios ciclos tras alcanzar un umbral de detección de producto y puede implementarse utilizando óptica relativamente económica cuando se utilizan diversos sensores basados en fluorescencia. Por consiguiente, evaluar el número de ciclos que una muestra dada cruza el umbral de detectabilidad, en combinación con resultados equivalentes a partir de muestras de control, permite asignar el número de copias presentes en muestras anónimas. Se han descrito varios enfoques de sensores, y muchos se emplean en la actualidad. Pueden emplearse colorantes de unión al surco menor fluorescentes que desarrollan una fuerte fluorescencia una vez unidos a ADN. Los ejemplos de tales colorantes incluyen SYBR gold y SYBR green (Wittwer *et al.* [1]). Otros enfoques adicionales se han implementado satisfactoriamente, y estos se aprovechan de añadir especificidad de diana a la detección permitiendo una mayor sensibilidad y especificidad, particularmente a niveles de diana bajos en la muestra inicial. Un formato sencillo comprende dos cebadores oligonucleotídicos que reconocen secuencias internas adyacentes del amplicón, cada una marcada con un fluoróforo. Si la diana está presente, los dos fluoróforos se sitúan cerca y se produce transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), que puede detectarse con filtros de excitación y emisión adecuados (Wittwer *et al.* 1997 [2]). Otros sistemas preferidos emplean sondas que combinan la presencia tanto de un fluoróforo como de un extintor. Para algunos procedimientos la hibridación con el amplicón diana provoca la separación de extintor y fluoróforo asociado a horquilla y por tanto un aumento en la fluorescencia. En otro procedimiento la hibridación de la sonda se evalúa mediante la acción de una polimerasa entrante que presenta una exonucleasa de 5'-3' que ataca a la sonda y conduce a una separación permanente del fluoróforo y del extintor (denominadas sondas "Taqman") [Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM., Real time quantitative PCR. *Genome Res.* (1996) 6:98b-94]. La implementación de estos y otros enfoques está ampliamente documentada.

30 Durante las reacciones de PCR pueden identificarse varias fases diferenciadas y temporalmente independientes. Todo el ADN es monocatenario a la alta temperatura (por ejemplo 94°C) utilizada para fundir todas las cadenas de ADN. Posteriormente, pueden aparearse cebadores de amplificación a una segunda temperatura baja, tal como de 50-65°C. Finalmente, se realiza la elongación de cebadores para generar productos principalmente bicatenarios, normalmente, a 70-75°C. Debido a la naturaleza cíclica controlada de la PCR se desea y es necesario evaluar el nivel acumulado de ADN en puntos distintos específicos en el ciclo. Esto puede producirse al final de la fase de síntesis. Alternativamente puede ser deseable medir la fluorescencia en algún otro punto, y a otra (cuarta) temperatura dependiendo del enfoque empleado.

40 Al contrario que la PCR, las reacciones de RPA están principalmente configuradas para funcionar a una única temperatura. Las configuraciones de RPA actuales no están divididas en fases y por tanto una variedad completa de "fases" de reacción estarán simultáneamente presentes en una muestra (la división en fases puede alcanzarse en teoría mediante enfoques, por ejemplo, tales como desenjaulado controlado de ATP). Como consecuencia de esta ausencia de división en fases en cualquier momento dado es probable que haya una mezcla de ADN bicatenario, ADN monocatenario (tal como cadenas desplazadas, así como oligonucleótidos) y productos intermedios de naturaleza heterogénea (tal como productos intermedios de tríplex y/o complejos de búsqueda de homología). A pesar de la heterogenicidad de la mezcla de reacción generalmente se dará el caso de que los niveles en estado estacionario de ADN bicatenario, y posiblemente de ADN monocatenario, aumentarán durante la reacción a medida que se acumula producto. Basándose en esto parece razonable que pueden emplearse fácilmente enfoques sencillos para medir la acumulación de producto.

50 En este caso se describen cantidades de colorantes SYBR green y SYBR gold que son compatibles con RPA y permiten una detección en tiempo real de productos de reacción en acumulación. También se da el caso de que protocolos de monitorización específicos de secuencia serán compatibles con RPA. Tales enfoques incluirán el empleo de dos oligonucleótidos marcados de manera fluorescente, que al hibridarse experimentan transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, o la utilización de sondas marcadas de manera doble tales como las que se extinguen hasta que la hibridación da como resultado alteraciones en FRET, o se separan mediante actividad nucleasa asociada. Se proporcionan evidencias de que el enfoque de "Taqman" que se basa en la denominada actividad exonucleasa de 5'-3' de determinadas polimerasas no puede utilizarse en reacciones de RPA, ya que estas nucleasas son realmente endonucleasas de FLAP específicas de la estructura que inhiben reacciones de RPA. Además determinados enfoques, tales como balizas moleculares, en los que propiedades de formación de horquillas naturales de la sonda son esenciales, pueden ser menos satisfactorias en la RPA debido a la probabilidad de que la sonda esté en un estado fundido en las presentes de proteínas de unión a ADN monocatenario y recombinasas.

65 La figura 54 muestra los resultados de experimentos para determinar si tinciones con SYBR gold y SYBR green son compatibles con RPA. Se realizó un experimento inicial con SYBR gold, en el que se realizaron diversas diluciones del colorante SYBR gold a partir de la disolución madre suministrada (descrita como disolución madre 10.000x de

Molecular Probes en DMSO), utilizando cebadores para amplificar un fragmento del locus de apolipoproteína B humana (figura 1 A, B). La reacción se inhibe claramente si la concentración final es de 1x (1:10.000 de la disolución madre) o de 0,4x (1:25.000 de la disolución madre), pero no se observó significativamente a 0,2x (1:50.000 de la disolución madre). Entonces se empleó esta concentración de 0,2x como la mayor concentración en una serie de diluciones en reacciones de 50 microlitros establecidas con los mismos dos cebadores específicos de ser humano, a dos concentraciones de diana (bajas) de ADN genómico humano total (densidad de copias de partida de 2 ó 20 copias por microlitro) (figura 54 C). Se ensambló una mezcla maestra en hielo y se traspasaron alícuotas a pocillos en una microplaca de 96 pocillos enfriada hasta temperatura helada. Una vez mezclada, se transfirió la placa a un lector de microplacas de fluorescencia con una fase fijada a 37°C. Se fijó el lector para tomar lecturas de fluorescencia a una excitación a 485 nm, una emisión a 528 nm, a intervalos de 1 minuto a lo largo de un periodo de 1 hora. En la misma ejecución se diluyó colorante SYBR green en la misma medida (D) y se sometió a ensayo de manera simultánea en muestras similares. Este experimento reveló varios factores clave relevantes para configurar reacciones de RPA en tiempo real con SYBR gold o SYBR green. En primer lugar, la comparación directa de tiempos de detección dentro del experimento con SYBR gold muestra que aparentemente diluciones de incluso 1:50.000 veces ralentizan la reacción con respecto a diluciones superiores. De hecho, 1:100.000 ó 1:80.000 proporcionaron cinética de reacción significativamente más rápida, y por tanto parecerá una mejor cantidad de SYBR gold para utilizar que 1:50.000, que pareció aceptable mediante análisis de punto final inicial. Sin embargo, las señales de fluorescencia máxima relativa obtenidas con las mayores diluciones fueron significativamente más bajas que con las menores, sugiriendo que el colorante estaba volviéndose limitante. Además, incluso a la mayor dilución de SYBR gold se detectaron aumentos de fluorescencia con respecto al fondo más tarde que en las muestras en el experimento con SYBR green, y las señales de fluorescencia global para todas las concentraciones de SYBR gold fueron mucho menores que para SYBR green. En cambio, las muestras de SYBR green se detectaron en todos los casos antes que los experimentos con SYBR gold. En conclusión, se sugiere que aunque ambos colorantes pueden implementarse en RPA en tiempo real, SYBR green parece ser el más robusto para análisis convencionales. Parece funcionar bien a diluciones finales de entre 1:50.000 y 1:100.000, pero las muestras más concentradas (1:50.000) proporcionaron una fluorescencia global superior y una fase exponencial detectable más larga lo que sugiere que la dilución de 1:50.000 era la mejor en estos experimentos. También se sometió a ensayo satisfactoriamente con concentraciones de SYBR green superiores, pero hay alguna indicación de que eventualmente puede producirse inhibición. Se sugiere que entre 1:50.000 y 1:25.000 está la concentración de SYBR green óptima para ensayos de RPA en tiempo real dinámica.

La figura 55 muestra un ejemplo de dos experimentos para determinar la capacidad del sistema para distinguir entre diferentes números de copias de una diana de ADN (presente en ADN genómico de *B. subtilis*). Estaba presente un número de partida de moléculas de molde de 500.000, 50.000, 5.000, 500, 50 o cero copias de ADN de *B. subtilis* en las diversas muestras y se realizó la amplificación con cebadores BsJ1 y BsK2 específicos de locus SpoOB de *B. subtilis*. En muchos experimentos independientes el sistema generó satisfactoriamente perfiles similares al experimento representativo mostrado en la figura 56. Obsérvese que la separación entre las curvas de la fase exponencial es similar entre diluciones de número de copias de 10 veces tal como se requiere para un sistema cuantitativo. Se concluye que la RPA es cuantitativa a lo largo de al menos 4 órdenes de magnitud de número de molde de partida, pero pueden ser posibles resultados cuantitativos a lo largo de un intervalo mayor. Obsérvese que en la figura 55C, el segundo experimento de valoración de *B. subtilis*, la mayor concentración de diana se estabilizó de manera inesperadamente temprana. Experimentos posteriores indican que esto puede surgir esporádicamente como consecuencia de los niveles relativamente bajos de gp32 y uvsX empleados en estos experimentos en comparación con experimentos posteriores con aproximadamente el doble de los niveles (figura 56).

También se investigó de manera similar la capacidad del sistema de RPA con SYBR green para monitorizar un intervalo de copias de molde de partida de ADN humano amplificando con varias diluciones de ADN humano. La figura 57 muestra los resultados de tales análisis. Tal como se esperaba los datos se ajustan al perfil esperado indicando que la RPA se comporta de una manera cuantitativa y puede someterse fácilmente a ensayo con SYBR green. Se observó un efecto de estabilización similar para las muestras con mayor concentración de diana, pero se corrigió en experimentos posteriores en los que se emplearon cantidades superiores de gp32 y uvsX (véase la figura 57C frente a B, y el aumento concomitante de los niveles de producto de punto final globales).

Se muestra que utilizando colorantes fluorescentes es posible monitorizar la cinética de reacciones de RPA, y que esto a su vez puede utilizarse para indicar la cantidad de dianas específicas en una muestra. La interpretación más sencilla es que se acumula ADN bicatenario de una manera exponencial en reacciones de RPA hasta un punto de masa por encima de los límites de detección de fluorescencia de SYBR green. Sin embargo, es posible que el perfil de fluorescencia de reacciones de RPA con SYBR green refleje actividades adicionales. Por ejemplo en algunas circunstancias productos de RPA pueden participar en reacciones de recombinación con otros productos conduciendo a productos intermedios complejos cuyo comportamiento de unión a SYBR green no se entiende bien. Además, el perfil cinético de acumulación de producto puede alterarse como consecuencia de fenómenos de envejecimiento de la reacción sólo parcialmente relacionados con el número de copias de partida. Esto puede subyacer a la estabilización de fluorescencia temprana falsa observada para las muestras con el mayor número de copias en algunos de estos experimentos iniciales, aunque experimentos posteriores con niveles de uvsX y gp32 aumentados evitaron este fenómeno.

Se observó en varios casos que el control de agua pareció comenzar a aumentar en un marco temporal similar a la menor concentración de muestra (normalmente una densidad de partida de 1 copia por microlitro, o menos), sin embargo la cinética de la acumulación de producto de control de agua pareció distinta de las muestras que contenían diana, presentando una fase exponencial más superficial indicativa de tiempos de duplicación más lentos. Esta observación se debe probablemente a propiedades estructurales que presentan los amplicones (por ejemplo repeticiones internas) que reducen la velocidad de síntesis en el sistema de RPA. Anteriormente se comentó sobre la posibilidad de que amplicones derivados de cebador tenderían a contener estructuras de repeticiones invertidas que con frecuencia requerirán 2 rondas de invasión/síntesis por duplicación de dúplex, en vez de la única que será suficiente para amplicones diana auténticos. Independientemente del origen de este fenómeno, se especula que con software de análisis de datos sofisticado y controles internos experimentales adecuados, este ruido puede identificarse y distinguirse del comportamiento cinético de amplificación de dianas auténticas. Además se observó cierta variación diferenciada en el momento que se tardó en alcanzar la detección, y las pendientes de las curvas, entre amplicones diferenciados. Esto se esperará como variación en la actividad de diferentes cebadores, y las longitudes y composición de secuencia variables de diferentes amplicones sugieren que los tiempos de duplicación promedio variarán entre amplicones. Es probable que las pendientes de los perfiles de fluorescencia mediante estos criterios solos varíen entre diferentes tipos de amplicones, y esto puede emplearse de manera útil en el análisis.

Los experimentos realizados en este caso sugieren que pueden utilizarse reacciones de RPA cinéticas para reducir el tiempo empleado para evaluar la presencia de ADN diana en muestras en comparación con electroforesis en gel posterior. La configuración experimental que se ha utilizado en este caso está lejos de ser ideal ya que las placas de 96 pocillos utilizadas se fabrican de plástico grueso, y la placa calentada en el fluorómetro no está en contacto directo con los pocillos de muestra. Se estima que se tardan hasta 5 minutos para que una reacción de un volumen de 50 μ l alcance la temperatura en estas condiciones, y quizás 8 minutos para un volumen de 100 μ l. En un dispositivo optimizado estos tiempos de retraso largos no existirán. Por consiguiente, se estima que para una cantidad clínicamente relevante de ADN humano (por ejemplo 1000-3000 copias, \sim 3 ng-9 ng), la amplificación puede someterse a ensayo fácilmente en aproximadamente 30 minutos con el equipo apropiado utilizando condiciones típicas mostradas aquí. A pesar de las limitaciones de estos experimentos utilizando placas de 96 pocillos y un fluorómetro convencional, estos experimentos pilotos son altamente motivadores e indican que la monitorización cinética de reacciones de RPA ofrece un enfoque rastreable para la cuantificación, y que esta cuantificación puede implementarse de manera práctica para evaluar niveles de ADN a lo largo de al menos 5 órdenes de magnitud.

Control de la reacción de RPA mediada por la concentración de ATP

La RPA es un procedimiento versátil, pero puede mejorarse mediante incorporación de características para controlar con precisión cuándo están activas recombinasas en la reacción. Tal control puede obtenerse mediante la liberación periódica de ATP mediante fotólisis de ATP enjaulado. Alternativamente, la concentración en la reacción de ATP u otros nucleósido trifosfatos, puede regularse de manera cíclica mediante adición manual repetida o la utilización de un oscilador bioquímico.

El ATP enjaulado no puede soportar la función ni de unión a ADN ni de recombinasa de proteína RecA de *E. coli* [Butler BC, Hanchett RH, Rafailov H, MacDonald G (2002) Investigating Structural Changes Induced By Nucleotide Binding to RecA Using Difference FTIR. *Biophys J* 82(4): 2198-2210]. Sin embargo, tras la fotólisis, el ATP liberado permite la función de recombinasa. Todas las recombinasas procariontas estudiadas hasta ahora son homólogos directos de la proteína RecA con homología de secuencia primaria, y homología estructural. Además, todos los homólogos de recA estudiados, incluyendo los homólogos eucariotas, requieren unión a ATP para permitir la función de recombinasa. Por tanto, se espera que puedan medirse fenómenos similares con uvsX de T4 y otras recombinasas según corresponda.

El papel de nucleótidos en la regulación de la acción recombinasa está relativamente bien documentado. En el caso de recombinasas procariontas, por ejemplo recA de *E. coli* y uvsX de fago T4, las recombinasas hidrolizan ATP para dar ADP (y AMP en el caso de uvsX). La hidrólisis se produce con una alta actividad siempre que las recombinasas estén unidas a ADN. El estado unido a ADP presenta una menor afinidad por ADN y generalmente está asociado con el desensamblaje de filamentos a partir de ADN (y paso de filamento de nucleoproteína alterado). En condiciones *in vitro* típicas ATP se mantiene a una concentración relativamente alta en exceso con respecto a ADP, para garantizar que un rápido cambio de ADP a ATP en filamentos de nucleoproteínas impide un desensamblaje prematuro. Por consiguiente, las recombinasas en una reacción responden a la razón de ATP:ADP y en cierta medida el desensamblaje neto del filamento de nucleoproteína se produce cuando la concentración de ADP supera la concentración de ATP.

Las reacciones de RPA se basan en la acción de recombinasas para cargarse sobre oligonucleótidos monocatenarios sintéticos y llevar a cabo actividad de búsqueda de homología. Tal como se describe, la actividad de las recombinasas depende de la presencia de nucleótido trifosfatos, lo más evidentemente de ATP. Cuando las recombinasas están unidas a ADN hidrolizan el nucleótido trifosfato a una alta velocidad, por ejemplo se sabe que la proteína uvsX de T4 hidroliza 200 moléculas de ATP por molécula de proteína por minuto a 37°C en ADN monocatenario (aunque las velocidades en oligonucleótidos más cortos pueden ser más variables). Por consiguiente, existe una necesidad de un gran suministro de ATP para mantener una reacción de recombinación

activa en la que una gran proporción de oligonucleótidos están asociados con filamentos de recombinasa, particularmente cuando los oligonucleótidos están presentes a concentraciones casi micromolares.

Se considera el flujo de niveles de nucleótidos de reacción que puede producirse durante una reacción de RPA típica. Si se emplea un par de oligonucleótidos en una reacción a una concentración de 1 μM cada uno, presentando los oligonucleótidos 35 residuos de longitud, entonces al 10% de saturación del oligonucleótido con recombinasa, hay aproximadamente una concentración de recombinasa unida de 2,8 μM (un valor del 10% de saturación en compuesto de PEG al 3-5% concuerda aproximadamente con los resultados de experimentos de los que se dispone, pero puede ser ligeramente superior o inferior). Esto convertirá una disolución 0,56 mM de ATP en la cantidad equivalente de ADP cada minuto basándose en la velocidad de hidrólisis publicada. Por consiguiente, si se utilizó una disolución 3 mM de ATP para iniciar la reacción, y no estaba presente ningún sistema de regeneración de ATP, entonces tras tan sólo 3 minutos la concentración de ADP aumentará hasta niveles iguales a los de ATP y la recombinasa se volverá inactiva.

Se ha utilizado de manera rutinaria una concentración de oligonucleótidos total de 0,6 μM , y una concentración de *UvsX* de aproximadamente 3 μM . Si toda esta *UvsX* se une a oligonucleótidos consumirá aproximadamente una disolución 0,6 mM de ATP en 3 minutos, dada una velocidad de reacción de 200 cantidades molares por minuto en oligonucleótidos. Sin embargo, basándose en los datos, datos de hidrólisis limitados, no es probable que se logre nunca una unión completa de moléculas de *UvsX* a ADN monocatenario en las condiciones de RPA típicas. Aunque es formalmente posible que la velocidad de hidrólisis por monómero sea inferior para la longitud de oligonucleótidos que se emplea. Estas alternativas se sugieren por el hecho de que en algunos casos se ha podido amplificar un ADN diana hasta niveles detectables mediante niveles de tinción con bromuro de etidio sin la presencia de un sistema de regeneración. Otros experimentos sugieren que se tarda aproximadamente 30 minutos en alcanzar este nivel de amplificación, y mediante deducción se calcula que un máximo de tan sólo ATP 0,15 mM podrá haberse consumido posiblemente en cada periodo de 3 minutos, un cuarto del nivel predicho.

El análisis de concentraciones eficaces de *UvsY* en reacciones concuerda con las estequiometrías esperadas. Se ha utilizado de manera rutinaria aproximadamente concentraciones de la mitad de la concentración molar a equimolares de *UvsY* en comparación con proteína *UvsX*, y datos publicados sugieren que la proteína *UvsY* funciona probablemente como hexámero. Si es así, y se requiere un hexámero para cargar, y estabilizar, cada filamento cargado, entonces aunque se necesitarán aproximadamente 12-14 moléculas de *UvsX* por oligonucleótido (30-35 meros), se necesitará que haya 6 moléculas de *UvsY* por oligonucleótido, es decir aproximadamente la mitad de la concentración molar. Este óptimo determinado experimentalmente satisface adecuadamente la predicción teórica de que se requieren concentraciones de la mitad de la concentración molar a equimolares de *UvsY* con respecto a *UvsX*.

En resumen, la conversión de ATP en ADP en una reacción soportada por *UvsX* típica de RPA con oligonucleótidos 0,6 μM , *UvsX* 3 μM , y *UvsY* 1-3 μM es de aproximadamente 50 μM por minuto y no más que eso. Se hidrolizan aproximadamente 16 moléculas de ATP por molécula de *UvsX* por minuto en la reacción. Esta cifra es seis veces menos que la predicha si todas las moléculas de *UvsX* se unieran a ADNmc e hidrolizaran ATP a 200 moléculas por *UvsX* por minuto, y supuestamente refleja que sólo una fracción de *UvsX* se une en cualquier momento dado, que las velocidades de hidrólisis son inferiores con oligonucleótidos cortos, y/o que en reacciones sin regeneración la velocidad de hidrólisis disminuye significativamente a medida que aumentan los niveles de ADP. Se sugiere que aunque este último factor puede finalmente volverse importante, durante la mayor parte de la reacción no es el factor principal.

Habiendo deducido experimentalmente la velocidad de consumo de ATP en una reacción de RPA típica, ahora falta estimar qué pulso de tamaño de concentración de ATP se necesitará utilizar para estimular ráfagas adecuadas de actividad recombinasa. Para ello, se necesita alguna estimación de la K_m para una recombinasa particular.

Se notifica que la K_m de hidrólisis de ATP mediante *RecA* es de 20 μM . Por consiguiente, se necesita liberar relativamente poco ATP libre en un sistema de recombinasa para fomentar la actividad. Suponiendo que esto también es cierto para *UvsX*, un pulso de ATP que cambie la concentración de reacción desde cero hasta 50 μM soportará ampliamente la búsqueda de homología hasta el momento en que el nivel de ADP se acumule hasta una razón de 1:1. En condiciones convencionales esto será de aproximadamente 30 segundos y producirá finalmente ADP 25 μM y ATP 25 μM . Es probable que una ráfaga de 30 segundos de actividad recombinasa sea más larga que lo que se requiere para que se produzca una ronda de invasiones. Pulsos adicionales de ATP pueden generar fácilmente ráfagas de actividad recombinasa adicionales. Por ejemplo un pulso adicional de aumento de 50 μM aumentará el nivel de ATP hasta 75 μM en comparación con ADP 25 μM . Tras 30 segundos el nivel de ATP se equilibrará a ATP 50 μM y ADP 50 μM y la reacción se detendrá de nuevo. Un pulso adicional aumentará el ATP hasta 100 μM y el ADP hasta 50 μM , y tras 30 segundos se equilibrarán 75 μM adicionales de cada uno. Por tanto pueden liberarse ráfagas cada 30 segundos de un exceso de ATP en ráfagas de 50 μM para soportar la ráfaga de actividad recombinasa. Evidentemente, es probable que las concentraciones absolutas globales cambiantes de ADP y ATP afecten al comportamiento de la reacción necesitando ajustes y posiblemente pueden necesitarse liberar pulsos ligeramente mayores de ATP en cada ronda. No obstante, resulta evidente que con una concentración de partida de ATP enjaulado de 3 mM (similar a la utilizada en los experimentos anteriores) y pulsos de 50 μM , es

5 posible soportar 60 pulsos independientes. Aunque se necesite aumentar progresivamente el tamaño de ráfaga para compensar el aumento global en la concentración de ADP, es bastante probable que puedan incluirse 30 ciclos. Además el ADP puede eliminarse de la reacción mediante inclusión de enzimas que metabolizan ADP en la reacción. Estas pueden incluir hidrólisis de ADP, o alternativamente regeneración de ADP para dar ATP y una fuente constante de actividad de ATP de consumo alternativa tal como generación de NADH.

10 El ATP enjaulado está fácilmente disponible en el comercio, y recientemente se han puesto a disposición dispositivos baratos de baja potencia que pueden utilizarse para impulsar el desenjaulado. Avances en diodos de emisión de luz (LED) han conducido al desarrollo de pequeñas fuentes baratas de baja potencia para generar luz de una longitud de onda de 365 nm. Se considera la integración de tales dispositivos en células calentadas de baja potencia, que son portátiles y alimentadas por batería. Alternativamente pueden generarse breves periodos de actividad recombinasa simplemente mediante adición repetida de pequeños volúmenes de ATP adicional, o utilizando un sistema oscilador, tal como el oscilador de fosfofructocinasa.

15 Control de la reacción de RPA mediado por la utilización de cebadores asimétricos

20 Pueden impulsarse reacciones de RPA unilaterales a partir de un único sitio diana de cebador. En ausencia de un cebador enfrentado, tales reacciones generarán ADN monocatenario. Se ha encontrado que los oligonucleótidos que presentan un nucleótido de ácido nucleico bloqueado (ANB) en 3' [Di Giusto DA, King GC (2004) Strong positional preference in the interaction of LNA oligonucleotides with DNA polymerase and proofreading exonuclease activities: implications for genotyping assays. Nucl Acids Res 32(3): e32], no pueden servir como cebadores para la elongación mediada por recombinasa por determinadas polimerasas, tales como la polimerasa I de *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus subtilis*, pero sí que sirven como cebadores para otras polimerasas tales como el fragmento de Klenow de *E. coli* lo que concuerda con datos anteriores que muestran que tales cebadores con el extremo ocupado por ANB en 3' pueden servir como cebadores en reacciones de extensión por polimerasa cuando se hibridan a ADN monocatenarios diana. También se ha encontrado que no todas las polimerasas parecen poder iniciar a partir de productos intermedios de recombinación, lo que quizás refleja que para algunas polimerasas se requieren tramos de ADN monocatenario más largos con cebadores unidos. Por ejemplo se ha encontrado que la polimerasa de phi-29 no puede iniciar la síntesis a partir de un producto intermedio de recombinación. También se ha demostrado que sin embargo puede sintetizar a partir de un cebador con el extremo ocupado con ANB en 3'. Finalmente, de manera que concuerda con informes publicados, se ha encontrado que para una recombinasa dada, hay una longitud de cebador mínima requerida para que se produzca eficazmente un intercambio de cadena asistido por recombinasa. Específicamente los oligonucleótidos de menos de 27-30 pares de bases son malos sustratos para uvsX. No obstante, cebadores de tan sólo 20-27 nucleótidos pueden ser perfectamente adecuados para soportar el cebado mediado por hibridación. Por tanto, combinando un cebador más largo y uno más corto pueden sesgarse reacciones de RPA para utilizar un cebador para la elongación impulsada por invasión y el otro para la elongación impulsada por hibridación.

40 Tomados en conjunto estos hechos sugieren una variedad de configuraciones en las que pueden ensamblarse reacciones de una manera que inicia la síntesis desde un lado, y sólo cuando ha pasado el segundo sitio comienza la síntesis opuesta. Por ejemplo, una reacción de RPA puede configurarse de tal manera que un cebador es un oligonucleótido normal y el cebador opuesto es un oligonucleótido con el extremo ocupado con ANB en 3'. En la misma reacción se mezcla una polimerasa que no puede utilizar oligonucleótidos con el extremo ocupado con ANB en 3', pero funciona a partir de estructuras de invasión, con una que puede utilizar oligonucleótidos con el extremo ocupado con ANB en 3' pero sólo funciona a partir de estructuras de hibridación. La invasión y la extensión mediadas por recombinasa a partir del cebador normal generarán moléculas de ADN monocatenario, que entonces pueden servir como moldes para la síntesis por la segunda polimerasa cuando se hibrida un cebador opuesto con el extremo ocupado con ANB en 3' en su sitio diana. Alternativamente un segundo cebador corto que sólo funciona en hibridación también garantizará la utilización de cebadores asimétricos. Otras configuraciones de longitud y naturaleza de oligonucleótidos, con diferentes polimerasas, pueden utilizarse para generar el efecto deseado. Por tanto la utilización de cebadores asimétricos resolverá cualquier interferencia a partir de la colisión de horquillas de replicación; sin embargo, puede ser necesario controlar también la actividad recombinasa para evitar una nueva invasión de ADN monocatenarios desplazados mediante síntesis a partir del cebador normal.

55 La combinación de cebadores asimétricos y el control de niveles de ATP puede proporcionar condiciones suficientes para amplificar ADN largos (>10 kb). Otro factor que puede afectar a la eficacia de amplificación de ADN largos es la interferencia de otros ADN de molde, otros ADN no de molde, y el propio producto de la reacción de RPA tal como ADN monocatenarios desplazados. Además de la posibilidad de que la recombinasa puede asociarse con un ADN monocatenario desplazado y mediar una reacción de invasión sobre ADN de molde, también existe la posibilidad de que ADN monocatenarios y otros ADN no de molde de la muestra pueden hibridarse de manera inapropiada con ADN de molde diana e interferir con la replicación eficaz. Para evitar algunas de estas dificultades, al menos para las primeras rondas de replicación será útil fijar espacialmente ADN de molde e impedir la asociación con otros ADN largos. Un medio conveniente para lograr esto es ensamblar reacciones de RPA en una matriz de gel, tal como un gel de poliacrilamida ajustado con un tamaño de poro promedio que permitirá una libre movilidad de componentes de RPA pequeños, tales como las enzimas y los cebadores, pero no permitirá la libre movilidad de ADN largos. Los ADN de muestra a una baja concentración de partida estarán físicamente separados, sin poder asociarse entre sí,

mientras que componentes de RPA más pequeños permanecerán relativamente libres para asociarse con moléculas de molde. Church y colaboradores han descrito utilizar geles de poliacrilamida de esta manera para PCR y colaboradores para producir amplicones espacialmente aislados, que pueden resolverse en dos dimensiones, conocidos como colonias de polimerasa, o polonias [Mitra R, Church G (1999) *In situ* localized amplification and contact replication of many individual DNA molecules. *Nucl Acids Res* 27(24): e34i-vi.]. Normalmente, se utilizan polonias para obtener imágenes de amplicones a partir de distintos moldes y por tanto se generan sobre portaobjetos para microscopio. Sin embargo, para la amplificación de ADN largos no será necesario resolver las polonias individuales, por tanto pueden ensamblarse las reacciones en cualquier recipiente apropiado.

El propio ensayo de polonias puede beneficiarse de utilizar RPA en vez de PCR. Hay al menos dos dificultades con la utilización de PCR. En primer lugar, dado que las polonias se generan habitualmente sobre portaobjetos de microscopio, y el vidrio es un mal conductor del calor, los tiempos requeridos para las PCR pueden ser significativamente más largos que para PCR en fase a granel normal. Esto significa que la difusión de producto de amplificación conduce a tamaños de polonias bastante grandes, incompatibles con ensayos de alta densidad, alto rendimiento. En segundo lugar, dado que la PCR requiere la fusión térmica de ADN de molde, se requieren temperaturas superiores a 90°C durante periodos extensos. Estas altas temperaturas aumentarán las velocidades de difusión aumentando adicionalmente el tamaño de polonia promedio. La RPA con su baja temperatura constante superará ambos de estos problemas.

Utilización del entorno de RPA de recombinación dinámica para permitir la identificación del estado polimórfico de un amplicón dado

Se ha demostrado ampliamente que la presencia o ausencia de una secuencia de ácido nucleico definida puede determinarse formando un híbrido entre una muestra ácido nucleico con una sonda de ácido nucleico de naturaleza anteriormente determinada, seguido por un procedimiento apropiado de detección de tal interacción. Por ejemplo, ahora se utilizan ampliamente micromatrices en las que se separan espacialmente oligonucleótidos de ADN, ARN u otra estructura principal y se inmovilizan sobre un soporte. Entonces se determina la presencia o ausencia de una secuencia homóloga en una muestra incubando conjuntamente las muestras en condiciones de temperatura y tampón apropiadas que permiten que se formen híbridos entre la sonda inmovilizada y los ácidos nucleicos de muestra. En este caso tanto la muestra como la sonda se proporcionan en un estado completa o parcialmente fundido de modo que pueden hibridarse. Con la condición de que se incorpore un marcador en la muestra entonces puede cuantificarse posteriormente la interacción.

Se han descrito enfoques alternativos a formar híbridos específicos de secuencia en los que uno de los ácidos nucleicos participantes se vuelve bicatenario al inicio, y se forma un híbrido que contiene proteína tricatenario mediante la acción de enzimas recombinasas tales como recA *E. coli* en presencia de análogos de nucleótido trifosfato no hidrolizables (véase la patente US número 5.460.941 y la patente US 5.223.414). También se describen procedimientos alternativos que emplean recombinasas pero buscan estabilizar productos intermedios de recombinación libres de proteínas formando estructuras tetracatenarias (véase la patente US número 5.273.881). Sin embargo, estos enfoques se diferencian de los descritos en la presente memoria tanto en cuanto al procedimiento como en cuanto al desenlace tal como se describe adicionalmente a continuación.

En muchos casos el procedimiento de formación de híbridos presenta una fidelidad suficiente para distinguir entre la presencia y la ausencia de la diana, y además para determinar si es un apareamiento perfecto o no. Por ejemplo, cebadores cortos (por ejemplo de 7 a 18 nucleótidos de longitud) pueden distinguir entre complementos perfectos e imperfectos si las condiciones de hibridación se controlan de manera rigurosa. Sin embargo, si el ácido nucleico es más largo y sólo hay pequeñas variaciones entre un híbrido perfecto y un híbrido imperfecto, por ejemplo algunos nucleótidos a lo largo de una región de por ejemplo cien o más, entonces es poco probable que exista una diferencia suficientemente grande en la eficacia de hibridación entre tal variante y un apareamiento perfecto.

Esta descripción se refiere a determinar el estado polimórfico de una muestra ácido nucleico formando híbridos entre los productos de una reacción de amplificación y ácidos nucleicos de sonda anteriormente sintetizados e inmovilizados presentes en ubicaciones definidas, y conteniendo cada ubicación individual una población pura de fragmentos que representan una de las longitudes de repetición conocidas presentes en la población.

Las secuencias de ADN amplificadas mediante el procedimiento de amplificación por recombinación-polimerasa (RPA) son dianas ideales para tal ensayo basado en formación de híbridos por los siguientes motivos. En primer lugar, es posible configurar el procedimiento de RPA para generar principalmente producto de ADN bicatenario, o principalmente producto de ADN monocatenario, por ejemplo alterando las razones de cebadores de amplificación. En segundo lugar, las reacciones de RPA contienen todos los componentes necesarios para permitir la asociación de híbridos entre ADN inicialmente en dúplex y ADN monocatenarios sin requerimiento de fundir térmicamente el ADN bicatenario. Por tanto se requiere poca manipulación adicional de la muestra.

Se han descrito otros procedimientos que emplean recombinasas y la utilización de análogos de ATP no hidrolizables, tales como ATP- γ -S, para estabilizar híbridos de ácidos nucleicos complementarios relacionados en un producto intermedio de "tríplice" escasamente definido que implica la presencia continuada de la recombinasa. Sin

embargo, un enfoque de este tipo no funcionará en el contexto descrito en este caso, porque estas estructuras altamente estables no son dinámicas y presentan resistencia significativa de productos de reacción al acceso por otros agentes. Como consecuencia la utilización de recombinasas con análogos de ATP no hidrolizables conduce a la formación de híbridos extremadamente estables entre ADN que contienen un grado significativo de apareamiento erróneo, no permitiendo por tanto la distinción eficaz entre secuencias. En cambio, el enfoque descrito aquí emplea un sistema dinámico que utiliza ATP u otros análogos hidrolizables en los que los híbridos se desestabilizan así como se generan fácilmente. El resultado neto es un gran enriquecimiento para interacciones de complementariedad perfecta.

En una realización preferida, tras la terminación de una reacción de RPA o de manera simultánea con esta, se pone la mezcla de reacción en contacto con una matriz de moléculas de sonda de tal manera que cada ADN polimórfico amplificado localizará en primer lugar el ácido nucleico de sonda inmovilizado correcto que contiene exactamente la misma secuencia, o la complementaria. Si no se produce esta reacción de formación de híbridos inicial con suficiente eficacia o fidelidad, como es probable con secuencias muy similares, entonces la naturaleza dinámica de la reacción impulsada por recombinasa resolverá los apareamientos erróneos. Esto es así porque los híbridos imperfectos contendrán burbujas y características distintas de dúplex, que actúan para ayudar a volver a cargar la recombinasa sobre estos híbridos y provocar una velocidad aumentada de alteración de híbridos en comparación con apareamientos perfectos. Se permite que se produzcan nuevos acontecimientos de formación de dúplex y sólo si se forman híbridos perfectos se vuelven relativamente resistentes a una reacción adicional. En la práctica, si todos los posibles números de una repetición de STR se dispusieron en matriz en orden de número de repetición, entonces al final se puede obtener como resultado un gradiente de híbridos formados que alcanzan un máximo en apareamientos exactos, son más débiles en los flancos directos y están ausentes más lejos. A medida que las burbujas de apareamiento erróneo aumentan de tamaño, hay una tendencia progresivamente mayor para que la recombinasa vuelva a cargarse sobre la región de burbuja monocatenaria (figuras 58 y 59).

Adicionalmente, si el sistema de recombinasa dinámico no es lo suficientemente específico como para distinguir entre híbridos perfectos e imperfectos, pueden incluirse componentes de alteración de híbridos adicionales en la reacción. Tales agentes incluyen, pero no se limitan a, helicasas, nucleasas, recombinasas, polimerasas y otros agentes de unión a ADN. Existen diversas helicasas y nucleasas que seleccionan selectivamente como diana formas específicas de ADN, o estructuras, de tal manera que interaccionan con, y resuelven, apareamientos erróneos o burbujas, pero no híbridos perfectos. Por ejemplo, la helicasa PriA de *E. coli* interacciona con regiones en las que ADN monocatenario está expuesto adyacente a ADN bicatenario, tal como sucederá en un apareamiento erróneo en el número de repeticiones que pueden producirse con hibridaciones de STR, y posteriormente pueden actuar para desenrollar ADN en un sentido de 3' a 5'. Tal desestabilización permitirá que la recombinasa vuelva a cargarse sobre estas cadenas separadas permitiendo que se forme en su lugar un nuevo híbrido alternativo. A lo largo del tiempo tal mecanismo enriquecerá híbridos sólo entre la diana correcta y la sonda. De manera similar, la helicasa de replicación de *E. coli*, DnaB, se cargará sobre ADN monocatenario y desenrollará ADN dúplex, en un sentido 5'-3', opuesto al de PriA. La helicasa dda de bacteriófago T4 se carga sobre ADN monocatenario. La helicasa dda es tan potente que puede desplazar a otras proteínas unidas a ADN en su trayectoria. Se ha mostrado que la helicasa dda altera interacciones de estreptavidina-biotina de afinidad muy alta (cuando la biotina está en el extremo 3' del oligonucleótido), por tanto la helicasa dda podrá utilizarse para desestabilizar complejos de sonda inmovilizada sobre una superficie (Byrd y Raney, 2004) (Morris y Raney, 1999).

Alternativamente los productos génicos de RuvA y RuvB de *E. coli* forman una helicasa que puede rodear ADN bicatenario e impulsar puntos de ramificación a lo largo del ADN. De esta manera puede "empujarse" una burbuja al extremo del molde provocando suficiente desestabilización como para permitir la carga de recombinasa así como otro acontecimiento. Las nucleasas que seleccionarán como diana imperfecciones en el carácter de dúplex incluirán, por ejemplo, nucleasa S1, que puede realizar mellas en ADN bicatenario en un apareamiento erróneo o burbuja. Existen otras nucleasas de este tipo con características específicas de la estructura. Tales mellas pueden servir para iniciar la elongación por polimerasa por desplazamiento de cadena. Alternativamente si la nucleasa escinde el ADN de sonda entonces es posible que se libere un grupo químico o enzimático del sitio de inmovilización de modo que a lo largo del tiempo una señal generada posteriormente permanece sólo en el punto en el que se forman híbridos perfectos.

Por tanto combinando los componentes necesarios debe ser posible crear un entorno en el que híbridos perfectos dominen significativamente y se agoten los sitios imperfectos, o se vuelvan indetectables. Para este enfoque resulta clave el establecimiento de un entorno dinámico en el que puedan formarse híbridos, y alterarse de tal manera que la estabilidad de híbridos perfectos e imperfectos permita una distinción sensible de productos de reacción con diferentes características polimórficas. Este entorno se proporciona de manera ideal mediante el sistema de recombinasa dinámico/estable que comprende gp32, uvsX, uvsY, compuesto de PEG y un sistema de regeneración de ATP tal como se describe.

La presencia o ausencia de un híbrido productor, o la pérdida de un marcador de un sitio de inmovilización (por ejemplo véase el enfoque de nucleasa anterior) puede medirse mediante procedimientos convencionales. Estos incluyen la incubación de la reacción en el punto final con un sustrato para una enzima inmovilizada sobre la diana de ADN o sonda de ADN. Otros enfoques de detección son posibles y se describen ampliamente en otra parte.

El entorno de recombinasa persistente dinámico para su amplia utilización en técnicas moleculares

5 Comienza a establecerse el entorno perfecto para actividad recombinasa dinámica con la intención de permitir una
amplificación geométrica masiva de ácidos nucleicos a una baja temperatura constante. Sin embargo el entorno
establecido puede emplearse evidentemente en combinación con otras enzimas, o de hecho sin ellas, en una
variedad de contextos para sustituir las reacciones de hibridación clásicas en general. Por ejemplo, procedimientos
de clonación molecular pueden aprovecharse de la posibilidad de recombinar grandes tramos de ADN unos con
10 otros de manera mucho más eficaz que mediante fusión térmica y apareamiento. Además, muchas otras enzimas
que pueden emplearse para procedimientos moleculares *in vitro* pueden beneficiarse del entorno de baja
temperatura compatible con la mayoría de las enzimas mesofílicas. Tales enzimas incluirán, además de las
polimerasas, nucleasas de reconocimiento de alteración de hélice (por ejemplo nucleasa S1), endonucleasas FLAP,
endonucleasas de restricción, enzimas de modificación o eliminación de bases, liasas, helicasas, topoisomerasas,
15 ligasas, transcriptasa inversas, actividad ARNasa H, resolvasas, ARN polimerasas, y cualquier otra enzima que
actúe sobre, o interaccione con, ácidos nucleicos. También pueden implicar otras enzimas pertinentes para el
sistema *in vitro* en la adición a enzimas que metabolizan el ADN, tales como fosfatasa alcalina o peroxidasa de
rábano utilizadas en protocolos de detección. La combinación de las propiedades únicas del sistema de
recombinación dinámica estable con otras actividades enzimáticas permite posiblemente un número muy grande de
nuevos procedimientos y aplicaciones.

20 Además de reconocer el importante impacto de combinar sistemas de hibridación enzimáticos dinámicos
completamente a baja temperatura con otros sistemas enzimáticos, se ha establecido conocimiento de secuencias
para el ensamblaje óptimo de recombinación altamente activa utilizando cebadores oligonucleotídicos cortos
basándose en experimentos que utilizan RPA. Se ha indicado que se caracterizaron cebadores muy activos
25 mediante una distribución particularmente rica de pirimidinas. En cambio, los residuos de guanosina parecieron estar
escasamente representados en la mayoría de los oligonucleótidos activos que se analizaron, y resultados anteriores
sugirieron que cuando se añaden al extremo 5' de oligonucleótidos pueden reducir su actividad. En esta descripción
se dan a conocer los resultados experimentales de monitorización dinámica de la reacción para estudiar los efectos
de añadir secuencias de ADN a los extremos 5' de oligonucleótidos. Añadir secuencias a la extensión más en 5' de
30 oligonucleótidos por lo demás idénticos presenta un efecto significativo sobre su actividad en RPA. Se sugiere que
estas observaciones se interpretan mejor como que reflejan el comportamiento de carga de la recombinasa sobre
ADN monocatenario, y posiblemente en dúplex. También pueden presentar papeles en el control de división en
fases definida de recombinasas sobre ADNmc.

35 Como punto de partida, se ha observado mediante estudios cinéticos (no en tiempo real), y observaciones
generales, que algunos pares de cebadores podían mediar una amplificación de ADN más rápida que otros. Se
identificaron cebadores particularmente rápidos para el marcador de STR humano CSF1PO, que pareció presentar
un tiempo de duplicación promedio de aproximadamente 30 segundos (tal como se estima mediante duplicaciones
promedio por unidad de tiempo desde el inicio hasta la acumulación de producto detectable), y que podía generar
40 niveles detectables de producto en el plazo de 15 minutos comenzando con algunos miles de copias de diana
(véase la figura 67). Otros pares de cebadores tardaron normalmente 20-35 minutos en alcanzar resultados
similares. Se buscó aprender más sobre la fuente de esta variabilidad (véase la figura 67, y datos no mostrados).

45 El análisis de la secuencia de ADN de los cebadores CSF1PO reveló que eran relativamente ricos en pirimidinas, y
también bastante pobres en guanosina. Esta observación se correlacionó con datos que surgen de un experimento
anterior en el que se investigó cómo la adición de un tramo de residuos de citosina o guanosina al extremo 5' de
oligonucleótidos afectaba a su comportamiento en RPA. En la figura 68 se muestra un experimento de amplificación
en tiempo real en el que se utilizaron cebadores específicos para el locus de esporulación SpOB de *Bacillus subtilis*,
denominados J1 y K2, para amplificar un fragmento a partir de ADN genómico de *B. subtilis*. En el experimento
50 mostrado en la figura 67 se observó que un tramo de guanosinas había "silenciado" la reacción global, mientras que
un tramo de citosinas añadidas había hecho las reacciones de amplificación más "ruidosas". Se repitió este
experimento y se monitorizó la reacción en tiempo real, los hallazgos se muestran en la figura 68. Los resultados
concordaron con la noción de que bases añadidas afectan, como mínimo, al comportamiento de velocidad y
supuestamente a la actividad de los cebadores. Los cebadores J1 y K2, en los que todas las bases se aparean con
55 diana genómica, generan un producto que puede detectarse por primera vez con colorante SYBR green tras poco
más de 30 minutos en este experimento (se observó una cinética más rápida en experimentos posteriores, y la
variación puede haber surgido debido a una rampa de temperatura no óptima cuando se utilizó un lector de
microplacas convencional, tal como se produjo en estos experimentos). En este experimento pudieron distinguirse
una muestra con ADN diana, y una sin, gracias a un pequeño retraso en la acumulación de producto, y cinética de
60 acumulación variables. Los cebadores con adición de residuos de citosina adicionales, J1(C) y K2(C), podían
claramente amplificar ADN de manera significativamente más rápida. Sin embargo se observa que la acumulación
de artefactos (derivados de cebador) se produce a una escala temporal similar a con el ADN diana, distintivamente
peor separada que en los cebadores sin adiciones. Se deduce que los cebadores con cola de C son simplemente
cebadores más rápidos (aunque también "más ruidosos" en este caso). A la inversa, la cinética de acumulación para
65 los cebadores con adición de residuos de G fue muy escasa, y no se observó ningún producto final esperado
identificable en la electroforesis en gel incluso a los 90 minutos.

Basándose en estos resultados, e integrando estos hallazgos con trabajos publicados, se llega a especular que la composición de secuencia puede afectar a la carga de recombinasa sobre cebadores, y que las pirimidinas pueden fomentar este procedimiento de carga. Los trabajos publicados son opuestos en esta área; en algunos estudios se ha defendido la preferencia de unión de recA para procedimientos de recombinación para residuos de G y T que están enriquecidos en puntos calientes de recombinación de *E. coli* (Tracy y Kowalczykowski). Por el contrario, estudios de dinámica de carga de recA realizados utilizando anisotropía de fluorescencia extrajeron conclusiones sorprendentemente diferentes (Bar-Ziv y Libchaber). En este caso la barrera a la nucleación de recA (la fase lenta de la formación de filamentos de nucleoproteínas) fue altamente sensible a la composición, mostrando un fuerte sesgo favorable hacia pirimidinas. Estas últimas observaciones concuerdan más con las presentes observaciones. De hecho, dado que la RPA tiende a emplear oligonucleótidos bastante cortos, se vuelve fácil ver lo importante que es el acontecimiento de nucleación de recombinasa para proporcionar un comportamiento de amplificación eficaz. No sólo es altamente deseable una nucleación rápida para permitir niveles aceptables de carga de filamentos, sino que además será crítico que esto se produzca preferentemente hacia el extremo más en 5' del filamento. Si el extremo 5' es un mal sustrato para la nucleación, mientras que una secuencia interna es bastante buena, hay posibilidad de que la mayoría de los filamentos sólo se carguen parcialmente, y como tal no logren funcionar apropiadamente en la RPA. Tales filamentos parcialmente cargados pueden cargarse insuficientemente para hidrolizar la ATP apropiadamente, no pueden experimentar eficazmente intercambio de cadena, y se extraen eficazmente de una combinación activa de filamentos. Resulta incluso peor que pueden "envenenar" la reacción formando complejos de búsqueda de homología con ADN, pero, al no poder experimentar el comportamiento dinámico normal (si presenta una longitud inferior a la necesaria para fomentar la hidrólisis), bloquean ADN diana en complejos no productores, como se produce cuando se emplea ATP- γ -S.

A pesar de que los resultados anteriores concuerdan con la noción de que las pirimidinas son buenos sitios de nucleación, y la atractiva posibilidad de que esto por sí solo explique la variación observada, debe indicarse que ninguno de los ensayos anteriores es realmente equivalente al sistema experimental que está empleándose. Todos los comportamientos de, descarga, hidrólisis de filamentos etcétera, son relevantes en sintonía en la situación de amplificación, y pueden estar influyendo múltiples factores. Además, es probable que la división en fases de la recombinasa puede desempeñar un papel en la determinación de la actividad de cebadores, y que esto se establezca mediante nucleación preferible en ubicaciones particulares, un fenómeno notificado anteriormente para recA (Volodin *et al.*; Volodin y Camerini-Otero). En este caso la nucleación se producirá preferentemente en el extremo 5', establecerá una fase dedicada a todo el filamento, y la longitud del filamento necesitará presentar una longitud perfecta para colocar la última proteína sobre el extremo 3' de la manera más deseable. Además de las complejidades adicionales asociadas con la situación de amplificación tal como se describe, todos de estos estudios iniciales se realizaron con proteína RecA de *E. coli*, y no con proteína UvsX de T4, y dado que estas proteínas divergen significativamente a nivel de secuencia primaria, no puede ser posible extrapolar conclusiones de estudios con RecA a la proteína UvsX. No obstante, constatando la importancia de la composición de secuencia, y en particular la composición de secuencia en 5', se ha comenzado a analizar con mayor profundidad qué secuencias son las más eficaces para añadirlas al extremo más en 5', es decir se busca determinar "sitios de aterrizaje" idealizados para la recombinasa en este sistema, y/o aquellos que están asociados con otras propiedades beneficiosas para procedimientos de amplificación e *in vitro* en general. Más adicionalmente, se anticipa que la división en fases de recombinasas puede desempeñar un papel significativo en la actividad global, y que esto se verá influido por la composición y la longitud precisa del oligonucleótido.

Se investigó si la adición de un tramo de residuos de timina, o una mezcla de citosina y timinas (pirimidinas) será tan eficaz como un tramo de residuos de citosina en la estimulación de actividad primaria mayor. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 69. De manera interesante, la adición de una serie de timinas al extremo más en 5' de los oligonucleótidos no mejoró, en este experimento, el comportamiento de velocidad de amplificación. De hecho, más bien al contrario, la combinación de cebadores con timinas añadidas proporcionó un comportamiento de amplificación muy escaso en este experimento. También se sometieron a prueba cebadores en los que la secuencia añadida era una mezcla de citosina y timina, tal como se indica. El comportamiento de estos cebadores en diversas combinaciones fue bastante más variable y complejo. Por ejemplo se observó la presencia de bandas adicionales que concuerdan, aunque no se demostró que fueran, equivalentes monocatenarios del producto. Un análisis cuidadoso muestra que en diferentes combinaciones el comportamiento de migración de esta posible banda monocatenaria era o bien de un tipo, o bien de un segundo tipo, y esto se correlacionaba con el cebador utilizado. En resumen, se sospecha que en estas reacciones uno u otro cebador era más activo conduciendo al desarrollo de asimetría en la reacción y acumulación de ADN monocatenario no observada con los oligonucleótidos originales, sin adiciones. Fue difícil justificar los resultados, pero puede concluirse que en este experimento los tramos de timina no fueron eficaces, ni tampoco fueron muy eficaces los polímeros mixtos a pesar de una ligera tendencia a parecer más activos si estaban presentes más citosinas.

En el siguiente experimento se añadieron aún más residuos al extremo de oligonucleótidos y se comparó su comportamiento en un análisis en tiempo real. Una vez más, hubo variabilidad entre cebadores, y en este experimento se incluyó como control cada cebador incubado por sí solo. De manera interesante, se observó que, a las concentraciones muy bajas de diana utilizadas en este caso (densidad de partida de 1 copia por microlitro), el ruido generado por cebadores individuales apareció en un marco temporal similar a la acumulación de ADN producto

observado cuando se utilizaron pares de cebadores. Además, esto es lo más evidente para el oligonucleótido K2(C), estudiado anteriormente, y responsable de una amplificación muy rápida cuando se combina con oligonucleótidos J1. Esto sugiere que monitorizar oligonucleótidos individualmente para determinar su velocidad de generación de ruido resulta útil en la determinación de su actividad global. Finalmente, y de manera desconcertante, un oligonucleótido que era tan sólo un par de bases más corto que K2(C), el oligonucleótido 9 en la serie en la figura 70, careció de este comportamiento de amplificación fuerte y rápida. Aunque los oligonucleótidos utilizados en este estudio no se purificaron mediante HPLC, se supone no obstante que la mayoría de los oligonucleótidos son la forma de longitud completa (basándose en fotografías en gel proporcionadas por el fabricante). Aceptada sin cuestionarla, esta sorprendente observación debe interpretarse como que refleja que o bien el número de residuos de C, que cambia desde 5 hasta 6, en el extremo 5' es un punto de transición significativa para alguna característica estructural de este oligonucleótido, o bien puede interpretarse como que refleja la influencia adicional de algún comportamiento de división en fases. En este último caso se especulará que las secuencias en 5' influyen fuertemente sobre la división en fases y la deposición del primer monómero de UvsX, y que esta división en fases se mantiene completamente hasta el extremo 3'. Supuestamente, el hecho de si el monómero de UvsX más en 3' descansa perfectamente sobre el extremo del oligonucleótido o no, o hay ligeramente demasiados o demasiados pocos pares de bases como para permitir que cada monómero de UvsX se una a su número máximo de residuos de estructura principal, puede influir sobre la probabilidad de que la recombinación avance eficazmente hasta completarse. También puede influir sobre el fondo, ya que si hay algunas bases "de repuesto" que sobresalen del extremo 3' esto puede fomentar el ruido de cebador potenciado.

En conclusión, se ha mostrado en este caso lo críticas que pueden ser la longitud y la composición de secuencia de oligonucleótidos para provocar el mejor rendimiento en la RPA, y otros procedimientos impulsados por recombinasa. Además, se demuestra formalmente que las secuencias no diana pueden añadirse a los extremos 5' de oligonucleótidos para realizar la regulación de su actividad en RPA.

Además de la amplificación de ADN, puede emplearse un sistema de recombinasa que incluye análogos de ATP hidrolizables, y componentes para garantizar la alta carga de moléculas de ADN en esta situación, como sustitución a otros enfoques de hibridación descritos.

Control de la contaminación en reacciones de RPA

Dado que la RPA es un procedimiento de detección muy sensible, se han encontrado problemas con la contaminación cruzada observada con otros protocolos de amplificación ultrasensibles tales como PCR. Se muestra en este caso que puede utilizarse dUTP para sustituir parcial o completamente a dTTP en reacciones de RPA, ofreciendo así una manera sencilla de distinguir los productos de reacciones de RPA anteriores de dianas de muestra auténticas. Dado que no es deseable tratar con calor las reacciones de RPA en su iniciación con la intención de desactivar la dUTP desglucosilasa (como se produce en protocolos de PCR con control de la contaminación), se sugiere como alternativa un enfoque en el que se mezclan inhibidores de desglucosilasa con las reacciones para permitir la iniciación (véanse las figuras 61 y 62).

RPA de transcripción inversa

En circunstancias en las que se desea la detección de la presencia de moléculas de ARN específicas es posible utilizar la RPA para detectarlas con la condición de que el ARN se convierta en primer lugar en una forma de ADN utilizando actividad de transcriptasa inversa. Lo más conveniente será si la transcripción inversa y la RPA pueden realizarse ambas en un único entorno homogéneo. Se muestra que pueden realizarse reacciones de RPA de transcripción inversa (RT-RPA) en un entorno de un único tubo incluyendo transcriptasa inversa en el entorno de la reacción, y con otras modificaciones minoritarias (véase la figura 60).

Detección sencilla y evaluación de reacciones de amplificación utilizando membranas de flujo lateral.

Las características de la RPA hacen que sea adecuada de manera ideal para configurar productos integrados de diagnóstico de acceso fácil portátiles. En un conjunto de casos la evaluación de si se ha producido una reacción de amplificación de ADN específica o no, sólo con una necesidad moderada de análisis cuantitativo, puede realizarse mediante formatos sencillos para evaluar si se han asociado físicamente dos cebadores marcados dentro de un amplicón. En este caso se muestra que esta idea sencilla es eficaz, y en particular que la tecnología ampliamente empleada de sistemas de tira de flujo lateral es ideal para realizar esta función. Pueden mezclarse reacciones de RPA directamente con tampón de ejecución de muestra para estos sistemas, y determinarse la presencia de amplicón en el plazo de varios minutos (véase la figura 63).

Compatibilidad de preparaciones en bruto de muestras biológicas con RPA

En este caso se muestra que pueden utilizarse directamente lisados sencillos de sangre en reacciones de RPA. Esto ofrece la posibilidad de que el formato de productos de diagnóstico que contiene el sistema de RPA puede requerir sólo un tratamiento trivial de las muestras antes de la adición directa a reacciones de RPA (véase la figura 64).

Comportamiento de sondas fluorescentes en el entorno estable, persistente, de recombinación dinámica

En este caso se muestra que la presencia del entorno de recombinación dinámica utilizado en RPA altera el comportamiento de sondas fluorescentes con respecto a entornos equivalentes en otras técnicas tales como PCR. Lo más particularmente, si deben utilizarse sondas marcadas de manera doble que contienen fluoróforos y extintores, el número de bases que separan los dos grupos en el oligonucleótido debe ser menor, supuestamente porque las proteínas de unión a ADN saturantes estiran las sondas con respecto tanto a su estado en ADN dúplex de forma B, así como a la espiral al azar que existe para oligonucleótidos en disolución libre (figura 73). Además se han identificado enzimas clave que pueden emplearse para procesar específicamente híbridos dúplex entre tales sondas y sus ADN diana. Estos enfoques enseñan el enfoque mediante el cual deben configurarse con RPA estrategias de "tercera" sonda en tiempo real, y cómo se diferencia esto de los enfoques bien establecidos en PCR tales como el enfoque "Taqman", balizas moleculares y similares. En particular se ha determinado que el enfoque "Taqman" no puede emplearse en RPA supuestamente porque la nucleasa en 5' asociada con enzimas de tipo Pol I de *E. coli* presenta actividad endonucleasa de FLAP que inhibe las reacciones de RPA.

Bibliografía

Adams, D. E., Tsaneva, I. R. y West, S. C. (1994). Dissociation of RecA filaments from duplex DNA by the RuvA and RuvB DNA repair proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 9901-5.

Alexseyev, A. A., Bakhlanova, I. V., Zaitsev, E. N. y Lanzov, V. A. (1996). Genetic characteristics of new RecA mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 178, 2018-24.

Bar-Ziv R, Libchaber A. (2001). Effects of DNA sequence and structure on binding of RecA to single-stranded DNA. *PNAS USA* 31 Jul; 98(16):9068-73

Baumann, P., Benson, F. E., Hajibagheri, N. y West, S. C. (1997). Purification of human Rad51 protein by selective spermidine precipitation. *Mutat Res* 384, 65-72.

Benkovic, S. J., Valentine, A. M. y Salinas, F. (2001). Replisome-mediated DNA replication. *Annu Rev Biochem* 70, 181-208.

Bennett, R. L. y Holloman, W. K. (2001). A RecA homologue in *Ustilago maydis* that is distinct and evolutionarily distant from Rad51 actively promotes DNA pairing reactions in the absence of auxiliary factors. *Biochemistry* 40, 2942-53.

Better, M. y Helinski, D. R. (1983). Isolation and characterization of the RecA gene of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 155, 311-6.

Bianco, P.R. y Weinstock, G.M. (1996). Interaction of the RecA protein of *Escherichia coli* with single-stranded oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Research* 15 Dic; 24(24):4933-9

Bork, J. M., Cox, M. M. y Inman, R. B. (2001). The RecOR proteins modulate RecA protein function at 5' ends of single-stranded DNA. *EMBO J* 20, 7313-22.

Bork, Cox y Inman *J Biol Chem.* 7 Dic 2001; 276(49):45740-3

Butler BC, Hanchett RH, Rafailov H, MacDonald G (2002) Investigating Structural Changes Induced By Nucleotide Binding to RecA Using Difference FTIR. *Biophys J* 82(4): 2198-2210

Byrd AK, Raney KD (2004). Protein displacement by an assembly of helicase molecules aligned along single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol.* Jun; 11(6):531-8

Cox, M. M., Goodman, M. F., Kreuzer, K. N., Sherratt, D. J., Sandler, S. J. y Marians, K. J. (2000). The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* 404, 37-41.

Cox, M. M., McEntee, K. y Lehman, I. R. (1981). A simple and rapid procedure for the large scale purification of the RecA protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 256, 4676-8.

Cromie, G. A. y Leach, D. R. (2000). Control of crossing over. *Mol Cell* 6, 815-26.

Dillingham, M. S. y Kowalczykowski, S. C. (2001). A step backward in advancing DNA replication: rescue of stalled replication forks by RecG. *Mol Cell* 8, 734-6.

Eggler, Lusetti y Cox, *J Biol Chem.* 2 May 2003; 278(18):16389-96

- Eggleston, A. K. y West, S. C. (2000). Cleavage of holiday junctions by the *Escherichia coli* RuvABC complex. *J Biol Chem* 275, 26467-76.
- 5 Elias-Amanz M, Salas M. *EMBO J.* 15 Sep 1997; 16(18):5775-83
- Ferrari *et al.*, *J Mol Biol.* 11 Feb 1994; 236(1):106-23
- Formosa T, Alberts BM. *Biol Chem.* 5 May 1986; 261(13):6107-18
- 10 Formosa T, Alberts BM. *Cell.* 5 Dic 1986; 47(5):793-806. DNA synthesis dependant on genetic recombination: characterization of a reaction catalyzed by purified bacteriophage T4 proteins.
- Glover, B. P. y McHenry, C. S. (2001). The DNA polymerase III holoenzyme: an asymmetric dimeric replicative complex with leading and lagging strand polymerases. *Cell* 105, 925-34.
- 15 Goodman, H. J., Parker, J. R., Southern, J. A. y Woods, D. R. (1987). Cloning and expression in *Escherichia coli* of a RecA-like gene from *Bacteroides fragilis*. *Gene* 58, 265-71.
- Hacker KJ, Alberts BM. *J Biol Chem.* 15 Oct 1992; 267(29):20674-81
- 20 Harris LD, Griffith J. *J Biol Chem.* 5 Jul 1987; 262(19):9285-92
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* Oct 1996; 6(10):986-94.
- 25 Heyer, W. D. y Kolodner, R. D. (1989). Purification and characterization of a protein from *Saccharomyces cerevisiae* that binds tightly to single-stranded DNA and stimulates a cognate strand exchange protein. *Biochemistry* 28, 2856-62.
- Hickson, I. D., Gordon, R. L., Tomkinson, A. E. y Emmerson, P. T. (1981). A temperature sensitive RecA protein of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 184, 68-72.
- 30 Hsieh, P., Camerini-Otero, C. S. y Camerini-Otero, R. D. (1992). The synapsis event in the homologous pairing of DNAs: RecA recognizes and pairs less than one helical repeat of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6492-6.
- 35 Hsieh P, Camerini-Otero CS, Camerini-Otero RD. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 Jul 1992; 89(14):6492-6
- Kato, R. y Kuramitsu, S. (1993). RecA protein from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB8. *J Biochem (Tokyo)* 114,926-9.
- 40 Katz FS, Bryant FR. *Biochemistry.* 18 Sep 2001; 40(37):11082-9
- Kelman, Z. y O'Donnell, M. (1995). DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu Rev Biochem* 64, 171-200.
- 45 Komori, K., Miyata, T., DiRuggiero, J., Holley-Shanks, R., Hayashi, I., Cann, I. K., Mayanagi, K., Shinagawa, H. y Ishino, Y. (2000). Both RadA and RadB are involved in homologous recombination in *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem* 275, 33782-90.
- Kornberg, A. y Baker, T. A. (1992). *DNA Replication.* New York: W. H. Freeman y Company. Kuil *et al.*, *Biophys Chem.* Dic 1988; 32(2-3):211-27
- 50 Kowalczykowski SC, Lonberg N, Newport JW, Paul LS, von Hippel PH., *Biophys J.* Oct 1980; 32(1):403-18.
- Kuramitsu, S., Hamaguchi, K., Ogawa, T. y Ogawa, H. (1981). A large-scale preparation and some physicochemical properties of RecA protein. *J Biochem (Tokyo)* 90, 1033-45.
- 55 Kurumizaka, H., Ikawa, S., Ikeya, T., Ogawa, T. y Shibata, T. (1994). A chimeric RecA protein exhibits altered double-stranded DNA binding. *J Biol Chem* 269, 3068-75.
- 60 Lavery PE, Kowalczykowski SC. *J Biol Chem.* 5 May 1992; 267(13):9307-14
- Liu, J., Nurse, P. y Marians, K. J. (1996). The ordered assembly of the phiX174-type primosome. III. PriB facilitates complex formation between PriA and DnaT. *J Biol Chem* 271, 15656-61.
- 65 Lohman y Ferrari, *Annu Rev Biochem.* 1994; 63:527-70

- 5 Lovett, C. M., Jr. y Roberts, J. W. (1985). Purification of a RecA protein analogue from *Bacillus subtilis*. J Biol Chem 260, 3305-13.
- Maeshima, K., Morimatsu, K. y Horii, T. (1996). Purification and characterization of XRad51.1 protein, Xenopus RAD51 homologue: recombinant XRad51.1 promotes strand exchange reaction. Genes Cells 1, 1057-68.
- Marians, K. J. (1992). Prokaryotic DNA replication. Annu Rev Biochem 61, 673-719.
- 10 Marians, K. J. (1999). PriA: at the crossroads of DNA replication and recombination. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 63, 39-67.
- Mazin, A. V. y Kowalczykowski, S. C. (1998). The function of the secondary DNA-binding site of RecA protein during DNA strand exchange. EMBO J 17, 1161-8.
- 15 McGlynn, P. y Lloyd, R. G. (1999). RecG helicase activity at three- and four-strand DNA structures. Nucleic Acids Res 27, 3049-56.
- McGlynn, P., Mahdi, A. A. y Lloyd, R. G. (2000). Characterisation of the catalytically active form of RecG helicase. Nucleic Acids Res 28, 2324-32.
- 20 Mitra, R., Church, G. (1999). *In situ* localized amplification and contact replication of many individual DNA molecules. Nucl Acids Res 27(24): e34i-vi
- Morel, P., Cherny, D., Ehrlich, S. D. y Cassuto, E. (1997). Recombination-dependent repair of DNA double-strand breaks with purified proteins from *Escherichia coli*. J Biol Chem 272, 17091-6.
- 25 Morrical SW, Wong ML, Alberts BM. J Biol Chem. 1991 Jul 25; 266(21):14031-8. Amplification of snapback DNA synthesis reactions by the uvsX recombinase of bacteriophage T4.
- 30 Morrical y Alberts J Biol Chem. 1990 Sep 5; 265(25):15096-103. The UvsY protein of bacteriophage T4 modulates recombination-dependant DNA synthesis *in vitro*.
- Morris PD, y Raney KD. (1999). DNA helicases displace streptavidin from biotin-labeled oligonucleotides. Biochemistry 20 Abr; 38(16):5164-71
- 35 Ng, J. Y. y Marians, K. J. (1996a). The ordered assembly of the phiX174-type primosome. I. Isolation and identification of intermediate protein-DNA complexes. J Biol Chem 271, 15642-8.
- Ng, J. Y. y Marians, K. J. (1996b). The ordered assembly of the phiX174-type primosome. II. Preservation of primosome composition from assembly through replication. J Biol Chem 271, 15649-55.
- 40 Paulus, B. F. y Bryant, F. R. (1997). Time-dependent inhibition of RecA protein-catalyzed ATP hydrolysis by ATP-gammaS: evidence for a rate-determining isomerization of the RecA- ssDNA complex. Biochemistry 36, 7832-8.
- 45 Pham, P., Bertram, J. G., O'Donnell, M., Woodgate, R. y Goodman, M. F. (2001). A model for SOS-lesion-targeted mutations in *Escherichia coli*. Nature 409, 366-70.
- Pierre, A. y Paoletti, C. (1983). Purification and characterization of RecA protein from salmonella typhimurium. J Biol Chem 258, 2870-4.
- 50 Rashid, N., Morikawa, M., Kanaya, S., Atomi, H. y Imanaka, T. (2001). RecA/Rad51 homolog from Thermococcus kodakaraensis KOD1. Methods Enzymol 334, 261-70.
- Reddy, Weitzel y Von Hippel, Proc Natl Acad Sci U S A. 15 Abr 1993; 90(8):3211-5
- 55 Riddles PW, Lehman IR. J Biol Chem. 10 Ene 1985; 260(1):170-3
- Rosselli, W. y Stasiak, A. (1990). Energetics of RecA-mediated recombination reactions. Without ATP hydrolysis RecA can mediate polar strand exchange but is unable to recycle. J Mol Biol 216, 335-52.
- 60 Salinas F, Jiang H, Kodadek T. J Biol Chem. 10 Mar 1995; 270(10):5181-6. Homology dependence of UvsX protein-catalyzed joint molecule formation.
- Scheerhagen *et al.*, J Biomol Struct Dyn. Abr 1986; 3(5):887-98
- 65 Shan, Q., Bork, J. M., Webb, B. L., Inman, R. B. y Cox, M. M. (1997). RecA protein filaments: end-dependent

dissociation from ssDNA and stabilization by RecO and RecR proteins. J Mol Biol 265, 519-40.

Singleton, M. R., Scaife, S. y Wigley, D. B. (2001). Structural analysis of DNA replication fork reversal by RecG. Cell 107, 79-89.

5 Spies, M., Kil, Y., Masui, R., Kato, R., Kujo, C., Ohshima, T., Kuramitsu, S. y Lanzov, V. (2000). The RadA protein from a hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum* is a DNA-dependent ATPase that exhibits two disparate catalytic modes, with a transition temperature at 75 degrees C. Eur J Biochem 267, 1125-37.

10 Steffen, S. E. y Bryant, F. R. (2000). Purification and characterization of the RecA protein from *Streptococcus pneumoniae*. Arch Biochem Biophys 382, 303-9.

Tang, M., Pham, P., Shen, X., Taylor, J. S., O'Donnell, M., Woodgate, R. y Goodman, M. F. (2000). Roles of *E. coli* DNA polymerases IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis. Nature 404, 1014-8.

15 Tissier, A. F., Lopez, M. F. y Signer, E. R. (1995). Purification and characterization of a DNA strand transferase from broccoli. Plant Physiol 108, 379-86.

20 Tracy RB, Kowalczykowski SC (1996). *In vitro* selection of preferred DNA pairing sequences by the *Escherichia coli* recA protein. Genes Dev. Aug 1;10(15):1890-903.

Vester B, Wengel J., Biochemistry. 2004 Oct 26;43(42):13233-41 Villemain, *et al.* J Biol Chem. 6 Oct 2000; 275(40): 31496-504

25 Volodin AA, Camerini-Otero RD (2002). Influence of DNA sequence on the positioning of RecA monomers in RecA-DNA cofilaments. J Biol Chem. 11 Jan; 277(2):1614-8.

Volodin AA, Smirnova HA, Bocharova TN, Camerini-Otero RD (2003). Phasing of RecA monomers on quasi-random DNA sequence. FEBS Lett. 10 Jul; 546(2-3):203-8

30 Webb, B. L., Cox, M. M. y Inman, R. B. (1995). An interaction between the *Escherichia coli* RecF and RecR proteins dependent on ATP and double-stranded DNA. J Biol Chem 270, 31397-404.

35 Webb, B. L., Cox, M. M. y Inman, R. B. (1997). Recombinational DNA repair: the RecF and RecR proteins limit the extension of RecA filaments beyond single-strand DNA gaps. Cell 91, 347-56.

Webb, B. L., Cox, M. M. y Inman, R. B. (1999). ATP hydrolysis and DNA binding by the *Escherichia coli* RecF protein. J Biol Chem 274, 15367-74.

40 West, S. C., Countryman, J. K. y Howard-Flanders, P. (1983). Purification and properties of the RecA protein of *Proteus mirabilis*. Comparison with *Escherichia coli* RecA protein; specificity of interaction with single strand binding protein. J Biol Chem 258, 4648-54.

45 Wetmur, J. G., Wong, D. M., Ortiz, B., Tong, J., Reichert, F. y Gelfand, D. H. (1994). Cloning, sequencing, and expression of RecA proteins from three distantly related thermophilic eubacteria. J Biol Chem 269, 25928-35.

Wittwer CT, Hermann M., Moss AA, y Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Biotechniques. Ene 1997; 22(1):130-1, 134-8

50 Wittwer C.T., Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. Biotechniques. Ene 1997; 22(1):176-81 Xu L, Mariani KJ. J Biol Chem. 2002 Apr 19;277(16):14321-8.

Ejemplos

55 Tal como se muestra en la presente memoria, se ha desarrollado un sistema de amplificación de ADN *in vitro* que acopla la selección como diana de secuencias impulsada por recombinasa con síntesis por desplazamiento de cadena. Esto permite la amplificación de ADN sin fusión del molde global térmica, química o enzimática. Las reacciones son sensibles, específicas y funcionan a 37°C sin tratamiento previo del ADN de muestra. Se observa
60 una amplificación de hasta 10¹² veces en el plazo de 1-1½. Pueden detectarse menos de 10 copias de un ADN diana dado en una muestra compleja con una sencilla reacción de una sola etapa. Este procedimiento es una alternativa ideal a la PCR para una variedad de aplicaciones y permitirá sistemas de diagnóstico de ADN altamente portátiles.

65 Los ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la invención. Estos ejemplos no deben interpretarse de ninguna manera como que limitan el alcance de la invención, tal como

queda abarcada por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: Un ejemplo de una amplificación por recombinasa-polimerasa de la cadena adelantada (IsRPA)

5 Pueden amplificarse secuencias de ADN utilizando la síntesis de la cadena adelantada según el procedimiento de amplificación por recombinasa-polimerasa (RPA) representado en la figura 1. La figura 1 muestra la carga de RecA/cebador. Antes de la adición de ADN de molde y/o polimerasa, RecA y SSB competirán por la unión a cebadores oligonucleotídicos monocatenarios. En presencia de una RecR y RecO, RecA se estabiliza selectivamente sobre los cebadores monocatenarios formando filamentos de nucleoproteína de RecA en un complejo con RecO y RecR. Este complejo es competente para invadir ADN bicatenario para formar un bucle D en sitios homólogos a los cebadores oligonucleotídicos. Alternativamente, pueden cargarse previamente RecA, RecO y RecR sobre cebadores oligonucleotídicos antes de la introducción de SSB en la mezcla de reacción.

15 Lo siguiente detalla la composición probable de una reacción de RPA ensamblada con recA de *E. coli* y agentes estabilizantes recO y recR de *E. coli*:

COMPONENTES DE FORMACIÓN/RESOLUCIÓN DE BUCLE D:

Componente	Concentración
RecA	20 μ M
Cebadores oligonucleotídicos monocatenarios	0,25 μ M
ATP	3 mM
RecF	0,1 μ M
RecO	0,13 μ M
RecR	0,5 μ M
Proteína de unión monocatenaria (SSB)	de 1 a 10 μ M
ADN polimerasa V	5 unidades

20

MEZCLA DE POLIMERASA/HELICASA/RESOLVASA:

Componente	Concentración
ADN Polimerasa	5 unidades
RuvA	0,5 μ M
RuvB	0,5 μ M
RuvC	0,5 μ M
RecG	10 nM

TAMPÓN DE REACCIÓN:

Componente	Concentración
MgCl ₂	de 2 a 10 mM
TrisHCl pH 7,2	50 mM
DTT	de 0 a 10 mM
KCl	de 0 a 50 mM
Desoxirribonucleótido trifosfatos	0,2 mM
Albúmina sérica bovina (BSA)	de 0 a 10 μ g por ml

25

Se ensambla la reacción de modo que la concentración final satisface los componentes de formación/resolución de bucle D, la mezcla de polimerasa/helicasa/resolvasa, y el tampón de reacción, añadiendo la ADN polimerasa y/o el molde en último lugar si es necesario. Por ejemplo, puede prepararse una disolución concentrada 2X de componentes de formación/resolución de bucle D y de la mezcla de polimerasa/helicasa/resolvasa en 1X tampón de reacción. Puede iniciarse la reacción mezclando un volumen igual de cada uno de los dos componentes (cada uno en 1x tampón de reacción). Opcionalmente, y tal como se mencionó anteriormente, pueden añadirse la ADN polimerasa o el molde (ADN diana) en último lugar. Se incuba la reacción durante un tiempo suficiente hasta que se agotan los reactivos. Los tiempos de incubación típicos oscilarán entre 1 hora, 2 horas, 3 horas, 5 horas, 10 horas o durante la noche (aproximadamente 16 horas). Al contrario que la PCR, que requiere volúmenes pequeños para un cambio de temperatura rápido, no hay ningún límite en cuanto al volumen de reacción de la RPA. Pueden realizarse volúmenes de reacción de 25 μ l, 50 μ l, 100 μ l, 1 ml, 10 ml y 100 ml o más en un recipiente. La temperatura de incubación puede ser una temperatura de laboratorio típica, tal como 25°C, 30°C o 37°C.

30

35

40

Antes de la adición de ADN de molde y/o polimerasa, recombinasa y SSB competirán por la unión a cebadores oligonucleotídicos monocatenarios. En presencia de una RecR y RecO, RecA se estabiliza selectivamente sobre los cebadores monocatenarios formando filamentos de nucleoproteína de RecA en un complejo con RecO y RecR. Este complejo es competente para invadir ADN bicatenario para formar un bucle D en sitios homólogos para los cebadores oligonucleotídicos. Alternativamente, pueden cargarse previamente RecA, RecO y RecR sobre cebadores

oligonucleotídicos antes de la introducción de SSB a la mezcla de reacción (figura 1).

Las cadenas invasoras se extenderán mediante la polimerasa en un sentido de 5' a 3'. A medida que se forman bucles D y avanza la síntesis, se recubre ADN monocatenario desplazado con SSB. Puede producirse liberación de RecA a partir de ADN bicatenario mediante hidrólisis de ATP en un sentido de 5' a 3' o como resultado de actividad helicasa/resolvasa o polimerasa (figura 2A, B). Se producirán continuamente nuevas rondas de invasión/síntesis. La tercera ronda de invasión de cadena/síntesis liberará productos diferenciados liberados cuyos extremos corresponden a los dos sitios de cebador enfrentados. Estos fragmentos se volverán en seguida el producto de reacción dominante y se acumularán a altos niveles. A medida que cada complejo sintético procesa el extremo del molde, la proteína RecA se desplaza o bien mediante actividad polimerasa o bien mediante la actividad de helicasas, tales como RuvAB o resolvasas, tales como RuvC. Una vez agotados los cebadores, ATP, desoxinucleósido trifosfatos, o cualquier otro componente limitante, la reacción se detendrá.

La inclusión de mutantes de recombinasa sensibles a la temperatura permitirá la iniciación controlada de la síntesis de ADN. En una situación de este tipo, la reacción de iniciación se realiza a de 25 a 37°C permitiendo la formación de bucles D. Las reacciones de elongación se realizan a 42°C, que no es permisiva para la invasión bicatenaria mediada por RecA. El número de ciclos determinará la cantidad de producto de reacción. Fases de elongación prolongadas permitirán la amplificación de ADN extremadamente largos sin interferencia de nueva invasión.

Ejemplo 2: RPA anidada

Se realiza la reacción de RPA tal como se describió en el ejemplo 1. Se retira una fracción de una décima (1/10) y una centésima (1/100) parte de la reacción y se utiliza en lugar del molde de ADN en una segunda ronda de RPA. Puede utilizarse IsRPA, RPA de la cadena adelantada/retrasada, y combinaciones de las mismas para la RPA anidada.

Ejemplo 3: Amplificación por recombinasa-polimerasa de la cadena adelantada y retrasada simultánea

Pueden amplificarse secuencias de ADN utilizando síntesis de la cadena adelantada y retrasada simultánea según el procedimiento de amplificación por recombinasa-polimerasa (RPA) representado en la figura 2. Esta figura ilustra específicamente la IsRPA. La figura 2A muestra que filamentos de nucleoproteínas de RecA/cebador invaden ADN de molde bicatenario preferentemente asociándose con sitios diana homólogos. A medida que se forman bucles D y avanza la síntesis, se recubre ADN monocatenario desplazado con SSB (figura 2A). Puede producirse liberación de RecA a partir de ADN bicatenario mediante hidrólisis de ATP en un sentido de 5'-3' o como resultado de actividad helicasa/resolvasa o polimerasa (figura 2A). A medida que continúa la síntesis (figura 2B), las polimerasas se encuentran con molde bicatenario, desplazado, unido a SSB. Vuelven a invadirse sitios diana bicatenarios por filamentos de nucleoproteínas de RecA/cebador. Rondas posteriores de IsRPA avanzan a partir de sitios invadidos de nuevo (figura 2B).

Lo siguiente detalla componentes probables de una amplificación mediada por replisoma utilizando componentes de *E. coli*. Se ensambla una reacción con la siguiente composición:

COMPONENTES DE FORMACIÓN/RESOLUCIÓN DE BUCLE D

Componente	Concentración
RecA	20 µM
Cebadores oligonucleotídicos monocatenarios	0,25 µM
ATP	3 mM
RecF	0,1 µM
RecO	0,13 µM
RecR	0,5 µM
Proteína de unión monocatenaria (SSB)	de 1 a 10 µM
ADN polimerasa V	5 unidades

MEZCLA DE HELICASA/RESOLVASA

Componente	Concentración
RuvA	0,5 µM
RuvB	0,5 µM
RuvC	0,5 µM
RecG	10 nM

COMPLEJO DE PRIMOSOMA

Componente	Concentración
------------	---------------

PriA	20 nM
PriB	20 nM
DnaT	100 nM
DnaB	100 nM
DnaC	200 nM
DnaG	200 nM

COMPLEJO DE HOLOENZIMA DE ADN POLIMERASA III

Componente	Concentración
Abrazadera β	2 μ M
Cargador de abrazadera de DnaX	500 nM
Complejo de núcleo de polimerasa	500 nM

5

MEZCLA DE CADENA RETRASADA

Componente	Concentración
ADN polimerasa I	5 unidades
ADN ligasa	2 unidades

TAMPÓN DE REACCIÓN

Componente	Concentración
MgCl ₂	de 2 a 10 mM
TrisHCl pH 7,2	de 10 a 60 mM
DTT	de 0 a 10 mM
KCl	de 0 a 50 mM
Desoxirribonucleótido trifosfatos	de 0,2 a 0,4 mM
Albúmina sérica bovina (BSA)	de 0 a 10 μ g por ml

10

Se ensambla la reacción de modo que la concentración final de todos los reactivos es tal como se indicó anteriormente. Por tanto, por ejemplo, se prepara una disolución concentrada 5 veces de cada uno de los componentes (componentes de formación/resolución de bucle D, mezcla de helicasa/resolvasa, complejo de primosoma, complejo de holoenzima de ADN polimerasa III, mezcla de cadena retrasada) en 1 X tampón de reacción. Después, se mezclan entre sí las cinco disoluciones en volúmenes iguales para iniciar la reacción. Se incuba la reacción durante un tiempo suficiente hasta que se agotan los reactivos. Los tiempos de incubación típicos oscilarán entre 1 hora, 2 horas, 3 horas, 5 horas, 10 horas o durante la noche (aproximadamente 16 horas). Tal como se mencionó anteriormente, no hay ningún límite en cuanto al volumen de reacción de RPA. Pueden realizarse volúmenes de reacción de 25 μ l, 50 μ l, 100 μ l, 1 ml, 10 ml y 100 ml o más en un recipiente. La temperatura de incubación puede ser una temperatura de laboratorio típica tal como 25°C, 30°C o 37°C.

15

20

La figura 3 muestra la iniciación (figura 3A), la síntesis (figura 3B) y la amplificación por polimerasa (figura 3C-3D). En primer lugar, el primosoma se carga en bucle D formado mediante invasión de filamentos de nucleoproteínas de RecA (figura 3A). El primosoma sintetiza un tramo de ARN cebador. Finalmente, el primosoma recluta al cargador de abrazadera, el cual recluta tanto al dímero de abrazadera deslizante como al núcleo de ADN polimerasa asimétrico (figura 3A). La síntesis se produce simultáneamente en los sentidos tanto adelantado como retrasado. Finalmente la síntesis de la cadena retrasada se detiene y se descarga la abrazadera de la cadena retrasada (figura 3B). La síntesis de la cadena adelantada continúa hasta que se forma un nuevo sitio de síntesis de la cadena retrasada (figura 3B). Mientras continúa la síntesis de la cadena adelantada, se forma un nuevo sitio de síntesis de la cadena retrasada. La síntesis de la cadena retrasada continúa de vuelta al fragmento de Okazaki anterior en el que se descarga la abrazadera de la cadena retrasada (figura 3C). La ADN polimerasa I elimina el cebador de ARN y rellena el hueco mientras que la ADN ligasa conecta los dos fragmentos de Okazaki formando una cadena retrasada continua (figura 3D).

25

30

35 Ejemplo 4: Establecimiento de un entorno de amplificación utilizando el conjunto de componentes heterólogos recA(C) de *E. coli* y gp32(N) de T4

La figura 18 muestra los resultados de un experimento en el que se ha combinado recA(C) con gp32(N) en presencia de pares de oligonucleótidos, Tester3bio (que presenta un marcador de biotina en 5') y Sizer1, Sizer2, Sizer3, Sizer4 o Tester2. Estos últimos oligonucleótidos no biotinilados se colocaron progresivamente más alejados del oligonucleótido Tester3bio común. El molde era un fragmento de ADN lineal, de aproximadamente 300 pb, liberado a partir de un plásmido. Se diseñó Tester3bio para ser complementario con un extremo de este fragmento e incluyó una proyección en 5' con respecto a esta secuencia.

40

45 El tampón de reacción incluyó acetato de magnesio a 10 mM, requerido para soportar la unión de recA a ADN, y

ATP 3 mM. También se incluyó un sistema de regeneración de ATP, que comprendía fosfocreatina y creatina cinasa, así como dNTP a 200 μ M, y el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli*. Se empleó compuesto de PEG tal como se muestra. Se utilizó ADN de molde bicatenario (0,5 fmoles), derivado de un plásmido que portaba el gen de *ruvB* de *E. coli*, como diana de partida. Los oligonucleótidos Sizer1, Sizer2, Sizer3 y Sizer4 no reconocieron el otro extremo del molde. En vez de eso, estos oligonucleótidos se colocaron para enfrentarse a Tester3bio con distancia creciente entre sus extremos 3' relativos.

Tras una incubación de 2 horas a 37°C, hubo una amplificación sustancial de fragmentos específicos del tamaño correcto cuando se utilizaron Tester2, 3 y 4. En las mejores condiciones (con Sizer2), se estimó que el producto de amplificación era 10⁴ veces mayor que el molde de partida.

Ejemplo 5: La naturaleza de los productos de amplificación y la sensibilidad de la reacción utilizando un conjunto heterólogo de *recA(C)* de *E. coli* y *gp32(N)* de bacteriófago T4

La figura 19 muestra los resultados de un experimento en el que se ha combinado *recA(C)* con *gp32(N)* en presencia del par de oligonucleótidos, Tester3bio (que presenta un marcador de biotina en 5') y Sizer2, en condiciones similares a las utilizadas en el ejemplo 1. Se emplearon compuesto de PEG o PEG 1450 tal como se muestra y se utilizaron 0,5 fmoles de molde como cantidad de molde de partida. En este ejemplo, se investigó la dilución progresiva del molde. Alternativamente se exploró la utilización de molde de partida linealizado que no presentaba ningún extremo que se solape con el cebador (utilizando una digestión con ClaI del plásmido que lleva el gen de *ruvB* de *E. coli*), y dilución del fragmento de Klenow. Se produjo la amplificación de fragmentos de tamaño correcto en todos los carriles y fue más fuerte en el caso de 0,5 fmoles de molde de partida en presencia de compuesto de PEG.

Cuando se sometieron los productos de estas reacciones óptimas a electroforesis en geles de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio, se observó una banda limpia de ADN bicatenario del tamaño correcto. Cuando se trató esta muestra con enzima de restricción BbvC1 antes de la electroforesis se produjo el aumento esperado en la movilidad en gel de manera que concuerda con un único corte tal como se esperaba. Se observó la amplificación de un producto del tamaño correcto con diluciones de molde de partida de 100 veces, o más, aunque el producto fue menos abundante e incluyó un desarrollo escalonado de productos más cortos por debajo de la banda principal. Se observó un patrón similar cuando se empleó molde no cortado o cuando no se empleó ningún molde. Se razonó que las proteínas utilizadas en estos estudios estaban significativamente contaminadas con ADN genómico de *E. coli* (que naturalmente lleva el gen de *ruvB*) ya que se purificaron en purificaciones de una única columna sin la utilización de nucleasas. Por consiguiente, se cree que este sistema de prueba genera falsos positivos cuando la sensibilidad es lo bastante alta.

Ejemplo 6: Establecimiento de un entorno de amplificación utilizando un conjunto de *gp32(N)* y *uvsX(C)*

La figura 24 muestra resultados de un experimento en el que se había combinado *uvsX(C)* con *gp32(N)* en presencia de los oligonucleótidos Tester3bio y Sizer2. El ADN de molde en este experimento fue una digestión con EcoRV del plásmido que lleva el gen de *ruvB* de *E. coli* utilizado en los ejemplos 1 y 2. Tester3bio reconoció un extremo de un fragmento de aproximadamente 300 pares de bases e incluyó una proyección en 5' con respecto al extremo de la secuencia diana. Sizer2 reconoció la otra cadena de este molde. Este oligonucleótido se dirigió hacia secuencias incrustadas de modo que su extremo 3' estaba a aproximadamente tres giros helicoidales y medio del extremo de Tester3bio.

En presencia de PEG1450, se observó la amplificación del fragmento esperado en el plazo de 2 horas de la reacción. En los casos en los que se produjo la amplificación, se consumió casi la totalidad de la población de oligonucleótidos indicando una amplificación de 3-5 X 10⁴. Los componentes de reacción se indican en la figura 24. En algunas muestras se incluyeron componentes adicionales. Se encontró que ADP- β -S 200 μ M incluido en esta reacción aumentó ligeramente la cantidad de producto formado en estas condiciones. A la inversa, en las condiciones utilizadas en este caso, la inclusión de topoisomerasa I de *E. coli* fue inhibidora para la amplificación de ADN. En las condiciones utilizadas, no se detectó ninguna amplificación con proteína *uvsX(C)*delta. Sin embargo, no se incluyó PEG1450 en estas muestras y *uvsX(C)* tampoco logró amplificar en estas condiciones sin PEG1450.

Ejemplo 7: Amplificación de una diana a partir de ADN genómico humano utilizando proteínas de recombinación de T4

La figura 30 muestra los resultados de un experimento en el que se emplearon varios pares de cebadores para amplificar un fragmento de ADN específico a partir de ADN genómico humano. La reacción incluyó las proteínas *gp32(C)K3A*, *uvsX(C)* y *uvsY(N)* de bacteriófago T4, así como fragmento de Klenow deficiente para exonucleasa, y proteínas que comprendían el sistema de regeneración de ATP para convertir ADP y AMP. Para detectar el fragmento de ADN específico, se transfirieron los productos de reacción separados por electroforesis a una membrana de nailon, después se hibridó una sonda biotinilada, que reconoció una secuencia interna distinta de cebador única.

Se emplearon tres pares de cebadores, y en cada caso se realizó una comparación entre ningún ADN genómico introducido, 10.000 copias de ADN genómico humano no cortado y 10.000 copias de ADN genómico cortado con HpaI (que genera al menos un extremo para los pares de cebadores). En todos los casos, se produjo amplificación específica de la secuencia de ADN deseada, mientras que la eficacia mostró variación entre pares de cebadores, y entre ADN no cortados y cortados. En todos los casos, no se requirió absolutamente la digestión previa con HpaI de la muestra de ADN, pero mejoró la eficacia de amplificación. En todos los casos, el ADN genómico introducido fue importante. En la mejor amplificación (mostrada en el carril 4), se estimaron al menos 10^{11} moléculas, lo que indica una amplificación de un orden aproximado de 10^7 .

10 **Ejemplo 8: Sensibilidad de IsRPA cuando se selecciona como diana un ADN complejo: ADN genómico humano**

La figura 31 muestra los resultados de un experimento en el que se emplearon varios pares de cebadores para amplificar un fragmento de ADN específico a partir de ADN genómico humano. La reacción incluyó las proteínas gp32(C)K3A, uvsX(C) y uvsY(N) de bacteriófago T4, así como un fragmento de Klenow deficiente para exonucleasa, y que comprende el sistema de regeneración de ATP para convertir ADP y AMP. Para detectar el fragmento de ADN específico, se transfirieron los productos de reacción separados por electroforesis a una membrana de nailon. Después se hibridó una sonda biotinilada, que reconoce una secuencia interna distinta de cebador única.

Se emplearon tres pares de cebadores y en cada caso se realizó una comparación entre ausencia de molde de partida y aproximadamente 10, 100, 1000, 3000 y 10.000 copias de la diana genómica. En todos los casos, se detectó una clara amplificación cuando se utilizaron al menos 1000 copias de la diana genómica (se observa una señal débil con el mejor par de cebadores a 100 copias). Se concluyó que durante las reacciones de IsRPA configuradas de esta manera podía amplificarse ADN a partir de dianas muy complejas con una sensibilidad de al menos 1000 copias, y posiblemente superior.

25 **Ejemplo 9: Competición entre la acumulación de producto auténtico y artefactos de cebadores (independientes del molde) durante las reacciones**

La figura 32 muestra los resultados de un experimento en el que se empleó un par de cebadores para amplificar un fragmento de ADN específico a partir de ADN genómico humano. En la reacción se emplearon las proteínas gp32(C), uvsX(C) y uvsY(N) de bacteriófago T4, así como un fragmento de Klenow deficiente para exonucleasa, y proteínas que comprendían el sistema de regeneración de ATP para convertir ADP y AMP. Se incluyó el 10% p/v de PEG 1450. Uno de los oligonucleótidos incluyó una biotina en 5' de modo que todos los productos de reacción podían observarse al final de la amplificación. Se tomaron muestras a 1, 2 y 3 horas para observar cómo avanzaba la reacción. En una muestra, cuando se empleó una cantidad mínima de uvsY(N) (50 ng/μl), se observó amplificación del fragmento correcto (véase la flecha en el carril 4). Se escindió este fragmento mediante BstXI para dar el fragmento de tamaño esperado, lo que indica que era principalmente bicatenario. Sin embargo, el fragmento era menos abundante que bandas aparentemente independientes del molde que también se acumularon durante la reacción. El tamaño y la naturaleza independiente del molde de estas bandas sugirieron que eran artefactos de cebadores, por ejemplo, dímeros de cebador y/o productos de síntesis de recuperación rápida. La ausencia de amplificación del fragmento específico sugirió que, a concentraciones de uvsY(N) superiores a 50 ng/μl, la reacción se produjo de manera inferior a la óptima. Esto se confirmó mediante experimentos posteriores.

45 **Ejemplo 10: Optimización de la composición de reacción para limitar intensamente o eliminar artefactos de cebadores y permitir una amplificación sensible libre de ruido a partir de moldes complejos**

La figura 36 muestra los resultados de un experimento en el que se empleó un par de cebadores para amplificar un fragmento de ADN específico a partir de ADN genómico humano. En la reacción se emplearon las proteínas gp32(C), uvsX(C) y uvsY(N) de bacteriófago T4, así como un fragmento de Klenow deficiente para exonucleasa, o polimerasa de Bst, y proteínas que comprendían el sistema de regeneración de ATP para convertir ADP y AMP. Uno de los oligonucleótidos incluyó una biotina en 5' de modo que todos los productos de reacción podían observarse al final de la amplificación. Se visualizaron fragmentos amplificados tras la separación de fragmentos por tamaños corriendo una pequeña muestra de la reacción sobre un gel de acrilamida. En este experimento, se valoró ADN genómico humano no cortado a partir de cero copias, 45 copias, y después duplicaciones en el número de copias de diana hasta 2880. Se emplearon condiciones ligeramente diferentes en este experimento para cada una de las dos especies de polimerasa con respecto tanto al tampón como a la temperatura. La reacción con el fragmento de Klenow se realizó a 37°C, mientras que aquella con polimerasa de Bst se realizó a 42°C. Los detalles de la composición del tampón se facilitan en la descripción de la figura.

Debe indicarse, y resulta importante para la eficacia de reacciones en estas condiciones optimizadas, que se incluyó compuesto de PEG al 5% en peso final con respecto a volumen en ambos casos. Ambas polimerasas amplificaron eficazmente el fragmento correcto, y en algunos casos, utilizaron la mayor parte de los cebadores disponibles. En las condiciones utilizadas para el fragmento de Klenow, la sensibilidad fue tan grande que se observó una señal débil incluso en el carril con cero copias lo que supuestamente refleja contaminación con una cantidad de ADN humano que representa menos de las 45 copias presentes en el carril inmediatamente adyacente. Al nivel de

sensibilidad que se demuestra en este caso, era difícil eliminar niveles traza de contaminación del equipo que se utilizó, conduciendo a señales en los controles negativos. El empleo rutinario de condiciones similares a las utilizadas en la amplificación mediada por Klenow demostró ser eficaz para la amplificación libre de ruido de numerosos pares de cebadores en experimentos posteriores. Esto sugirió que estas condiciones eran próximas a la óptima para reacciones que implicaron este conjunto componentes de proteínas.

Ejemplo 11: Procedimientos experimentales para la producción de clones y proteínas

Todos los clones se han construido clonando productos amplificados por PCR a partir de *E. coli*, fago T4, *B. subtilis* o fago Phi-29. Todos los organismos de reserva utilizados para la amplificación se obtuvieron de una fuente pública en el DSMZ. Los ADN clonados utilizados para la expresión de proteínas se clonaron en general en vectores pET (por ejemplo, pET-21) con la inserción de una etiqueta peptídica de hexahistidina en el extremo o bien N o bien C-terminal durante la amplificación por PCR del fragmento, o en vectores pQE (por ejemplo, pQE31) en el caso de Pol I de *B. subtilis* (polimerasa de Bsu). En esta descripción todas las proteínas que contenían una etiqueta N-terminal se denominan como el nombre de la proteína seguido por (N), por ejemplo gp32(N), o si contienen la etiqueta en el extremo C-terminal el nombre va seguido por (C), por ejemplo gp32(C). Adicionalmente se construyeron varios clones para producir proteínas modificadas de otra manera. Estos incluyen una recA(C) con una delección de los últimos 17 residuos de aminoácido de la proteína nativa, denominada recA(C)delta17. Se generó una forma similar de la proteína UvsX(C) de T4 y se denomina UvsX(C)delta 21. También se construyeron formas mutantes de gp32, que modifican o bien la lisina 3 o bien la arginina 4.

Se sobreexpresaron todas las proteínas en *E. coli* y se purificaron utilizando protocolos convencionales. Generalmente se purificaron las proteínas mediante procedimientos convencionales en resina de níquel en NaCl 1 M y tampón fosfato. Se eluyeron las proteínas con imidazol 250 mM y se dializaron en tampones apropiados. Las proteínas producidas a partir de clones generados de manera interna incluyen: recA(C) de *E. coli*, SSB(N) de *E. coli*, PriA(N) de *E. coli*, PriB de *E. coli*, PriC de *E. coli*, DnaB de *E. coli*, DnaC de *E. coli*, DnaC810 de *E. coli*, DnaT de *E. coli*, RuvA de *E. coli*, RuvB de *E. coli*, UvsX(C) de fago T4, UvsX(N) de fago T4, gp32(N) de T4, gp32(C) de T4, gp32(C)K3A de T4, gp32(C)R4Q de fago T4, gp32(C)R4T de fago T4, gp32 de fago T4, gp32 K3A de fago T4, gp32R4Q de fago T4, gp32R4T de fago T4, UvsY(N) de fago T4, UvsY(C) de fago T4, gp43 de fago T4, gp43(exo-) de fago T4, fragmento de Klenow de *E. coli*, Klenow exo- de *E. coli*. Se purificaron proteínas gp32 sin etiqueta mediante un procedimiento de 2 columnas que implicó intercambio aniónico con DEAE-Sephrose seguido por unión a matriz de celulosa de ADN monocatenario.

ADN utilizados en reacciones de RPA.

Se han empleado varios ADN diana diferentes en este estudio, y varios oligonucleótidos. A continuación se facilita la secuencia de la sección relevante de los moldes, y la secuencia de los oligonucleótidos.

La diana de gen de RuvB de *E. coli*

A continuación se facilita la secuencia del fragmento de EcoRV del gen de RuvB.

**ATCATGATTGGTGAAGGTCCGGCGGCACGCTCCATTAATAATTGATTTGCCGC
CGTTTACCCTGATTGGTGCAACCACGCGCGCAGGTTTCGCTGACATCACCGTTGCGCG
ACCGTTTTGGTATTGTGCAACGTCTGGAGTTTTATCAGGTGCCGGATCTGCAATATA
TCGTCAGTCGCAGCGCACGCTTTATGGGGCTTGAGATGAGTGATGACGGCGCGCTG
GAAGTTGCTCGTCGCGCTCGCGGTACGCCGCGCATTGCCAACCGTCTGCTGCGTCTGA
GTGCGTGATTTCCCGGAAGTGAAGCACGATGGCACCATCTCGGCAGAT (SEQ ID
NO:1)**

A continuación se facilita la secuencia de oligonucleótidos que seleccionan como diana este molde mencionados en este estudio:

Tester2

CTAGCGATGGTGCCATCGTACAGAATTCCTCAGCATCTGCCGA (SEC ID n°: 2)

Tester3

CTCACTATACCTCAGCATCATGATTGGTGAAGGTCCGGCGGCAC (SEC ID n°: 3)

Tester1bio

ES 2 425 354 T3

5'-biotina-GCTAATACGACTCACTATACCTCAGCATCATGATTGGTGAAGGTC CGGCGGCAC (SEC ID n°: 4)

Tester3bio

5 5'-biotina-CTCACTATACCTCAGCATCATGATTGGTGAAGGTCCGGCGGCAC (SEC ID n°: 5)

Sizer1

10 CTATGCGAATTCAGCGAACCTGCGCGCGTGGTTGCACCAATCAGGG (SEC ID n°: 6)

Sizer2

15 CTATGCGAATTCGGTGATGTCAGCGAACCTGCGCGCGTGGTTGCA (SEC ID n°: 7)

Sizer3

CTATGCGAATTCTCCAGACGTTGCACAATACCAAAACGGTCGCGC (SEC ID n°: 8)

20 Sizer4

CTATGCGAATTCGGTGGCTGCGACTGACGATATATTGCAGATCC (SEC ID n°: 9)

Gen2bio

25 5'-biotina-ATCTGCCGAGATGGTGCC (SEC ID n°: 10)

A continuación se muestra la secuencia de parte de la enzima convertidora de la angiotensina humana seleccionada como diana en este estudio:

30 **AACCAACTCCGCCCGGCCACGGCCTCGCTCTGCTCCAGGTACTTTGTCAG
CTTCATCATCCAGTTCAGTTCACGAGGCACTGTGCCAGGCAGCTGGCCACACGG
GCCCCCTGCACAAGTGTGACATCTACCAGTCCAAGGAGGCCGGGCAGCGC (SEQ ID
NO:11)**

Se subrayan los sitios de restricción de HpaII que se han seleccionado como diana con HpaII en la preparación de algunos ADN en algunos experimentos.

35 A continuación se muestra la secuencia de oligonucleótidos utilizados para seleccionar como diana parte del gen de ACE humana:

Up3

40 ATTCGTAGCCTCGCTCTGCTCCAGGTACTT'TGTCAGCTTCATC (SEC ID n°: 12)

Down1

45 GCCTCCTTGGACTGGTAGATGTCACACTTGTGC (SEC ID n°: 13)

Down2

50 GCGCTGCCCGGCCTCCTTGGACTGGTAGATGTCACACTTGTGC (SEC ID n°: 14)

Down3

TATGCGAATTCCTCCTTGGACTGGTAGATGTCACACTTGTGC (SEC ID n°: 15)

55 Angio1bio

5'-biotina-GCCTCCTTGGACTGGTAGATGTCACACTTGTG (SEC ID n°: 16)

Angio3

60 GGCCACGGCCTCGCTCTGCTCCAGGTACTTTGTCAGCTTCATC (SEC ID n°: 17)

Ejemplo 12: Resultados experimentales y análisis

La figura 9 muestra los resultados de investigaciones sobre la naturaleza de dianas de ADN bicatenario y oligonucleótidos de selección como diana. Experimentos utilizando o bien moldes superenrollados o bien ADN linealizados sugieren que recA cataliza la formación de productos intermedios que pueden soportar elongación por polimerasa más fácilmente en ADN superenrollado, o los extremos de ADN linealizado. Se muestran los resultados de un experimento en el que se incubó el oligonucleótido biotinilado, Tester3bio, o bien con ADN diana superenrollado, o bien un molde diana linealizado con EcoRV, o ClaI. Esto generó un extremo que se solapó con el oligonucleótido o secuencias incrustadas respectivamente. La disolución de reacción incluyó Tris-acetato pH 7,9 20 mM, acetato de Mg 10 mM, 13 µg de recA, 1 µg de SSB de *E. coli*, fosfocreatina 27 mM, 1 U de creatina cinasa, Tester3bio 0,2 µM, ATP 3 mM, dG, dC y dT 200 µM; dA 1 mM, 50 U de Klenow, 0,5 pmoles de molde, recO 120 ng, recR 120 ng, dnaB 0,5 µM y dnaC810 0,5 µM. Se incluyeron las proteínas recO y recR de *E. coli*, así como las proteínas dnaB y dnaC810, en este experimento aunque no afectaron significativamente a los resultados. Tras 2 horas de reacción a 37°C, se precipitó la reacción y se corrió sobre un gel desnaturalizante al 6%, se transfirió a una membrana de nailon, y se incubó con estreptavidina-HRP antes de realizar ECL para detectar material reactivo. En cada reacción, se utilizaron 0,5 pmoles de molde. En el gel se incluyó como control para el tamaño y la cantidad fue de 0,5 pmoles de fragmento de PCR biotinilado (indicado CON). Otros componentes y condiciones de reacción se indican en la figura.

La figura 10 muestra la síntesis de activación inversa. La síntesis de activación inversa se produce cuando un oligonucleótido de selección como diana recubierto con recombinasa que presenta una proyección en 5' invade un extremo de ADN dúplex en presencia de una polimerasa adecuada y dNTP. Esta nueva región de dúplex es estable frente a la posterior migración de ramificaciones y puede utilizarse como plataforma para otras aplicaciones. La activación directa es la elongación del oligonucleótido invasor, que también se produce en estas reacciones. Se muestran los resultados de experimentos para detectar la actividad de polimerasas en productos intermedios formados cuando se incubó el oligonucleótido Tester3, que presenta una proyección en 5' con respecto al extremo de un ADN diana linealizado, con diversos moldes.

En la parte A, el molde utilizado es un producto de PCR bicatenario generado de tal manera que el producto presenta un marcador de biotina en el extremo 5' de la cadena complementaria al oligonucleótido de selección como diana. Este fragmento es por lo demás similar al fragmento de EcoRV liberado a partir de un plásmido que llevaba el gen de RuvB de *E. coli* utilizado en otra parte en este estudio, y que es una diana para el oligonucleótido Tester3bio. La disolución de reacción incluyó acetato de Mg 10 mM, 7,5 µg de recA, 1 µg de SSB, fosfocreatina 27 mM, 1 U de creatina cinasa, Tester3bio 0,3 µM, ATP 3 mM, dNTP 200 µM, 50 U de Klenow, 0,5 pmoles de molde biotinilado. Opcionalmente, se incluyeron ruvA 0,5 µM y ruvB 0,5 µM; o ruvA 1 µM y ruvB 1 µM; o ruvA 1,5 µM y ruvB 1,5 µM. El volumen final fue de 30 µl. La incubación se llevó a cabo durante 1 hora a 37°C. En presencia de recA, la cadena biotinilada de la diana se extendió en 16 bases, tal como se esperaría si estuviera accesible un producto intermedio de recombinación por una polimerasa para copiar la región de proyección del oligonucleótido invasor.

En la parte B, la reacción está configurada de una manera similar excepto porque el molde no está biotinilado, y el oligonucleótido invasor está biotinilado. Se investigaron varias polimerasas en este experimento, y sólo el fragmento de Klenow sin modificar proporcionó una producción significativa de producto. En este experimento, también se investigó incluir un pequeño oligonucleótido diseñado para reconocer la diana directamente en el sentido de 3' del sitio de selección como diana de Tester3. La disolución de reacción incluyó acetato de Mg 10 mM, 10 µg de recA, 1 µg de SSB, fosfocreatina 27 mM, 1 U de creatina cinasa, Tester3bio 0,3 µM, ATP 3 mM, dNTP 200 µM, 50 U de Klenow, 0,5 pmoles de molde no biotinilado. Opcionalmente, se incluyeron 5 µl de oligonucleótido ATPγS estable cargado previamente. El volumen final fue de 30 µl. Se llevó a cabo la incubación durante 1 hora a 37°C. Se incubó previamente con recA en presencia de ATP-γ-S en un esfuerzo por cargar recombinasa de manera estable sobre el mismo. La disolución de carga previa incluyó acetato de Mg 10 mM, 2,5 µg de recA, ATPγS 50 µM y oligonucleótido 0,15 µM. Se añadió la disolución de carga previa en la mezcla de invasión/extensión de Tester3bio. En todos los casos, el rendimiento de producto disminuyó mediante la inclusión de este material mezclado previamente. Basándose en los datos, se cree que la presencia de ATP-γ-S (concentración final de ~8 µM) en la reacción fue levemente inhibitoria. El propósito de este experimento fue tratar si la presencia de un híbrido tricatenario estable formado inmediatamente en el sentido de 3' del sitio de selección como diana de Tester3 estabilizará estas invasiones frente a la migración de ramificaciones.

La figura 11 muestra utilidades de síntesis de activación inversa. La síntesis de activación inversa puede ser útil porque genera una plataforma resistente a la migración de ramificaciones que puede emplearse en aplicaciones distintas de la activación directa sencilla. En este caso se muestran algunos ejemplos, incluyendo la introducción de un sitio diana de enzima de formación de mellas, la introducción de un promotor de ARN polimerasa, y la generación lineal de fragmentos de ADNbc cortos mediante acontecimientos sucesivos de invasión/síntesis/escisión. Si se incluye un sitio de enzima de restricción en la secuencia de proyección adicional de tal manera que tras seleccionar como diana un fragmento linealizado adecuado, la síntesis de activación inversa generará la diana dúplex para la enzima de restricción. Entonces la enzima puede cortar la secuencia liberando un ADN bicatenario corto, y un ADN bicatenario más largo, que es una diana para acontecimientos de invasión adicionales.

En la figura 11B, la proyección en 5' de un oligonucleótido de selección como diana se diseña de tal manera que si se produce síntesis de activación inversa, se genera una diana para una endonucleasa de formación de mellas. En presencia de la endonucleasa de formación de mellas, por ejemplo BbvC1a o b, una polimerasa adecuada, por ejemplo el fragmento de Klenow, puede extenderse desde la mella y desplazar una cadena de ADN. Pueden copiarse múltiples cadenas mediante formación de mellas y elongación sucesivas a partir de un único molde. En la figura 11C, la proyección en 5' que se convierte en dúplex mediante síntesis de activación inversa contiene la secuencia de un promotor de ARN polimerasa, tal como el gen de ARN polimerasa de fago T7. En presencia de la polimerasa necesaria y los nucleósido trifosfatos adecuados, puede iniciarse la transcripción en el sentido de 3' del promotor para generar un ARN tal como se muestra. No se prevé que la presencia de una rotura en la cadena que no es molde prevenga la elongación satisfactoria. Pueden utilizarse productos de ARN en algún tipo de reacción de amplificación, o para otros fines.

La figura 12 muestra que las proteínas de unión monocatenarias facilitan la invasión de recombinasa y la extensión de cebador. Tanto SSB de *E. coli* como gp32 de bacteriófago T4 con una etiqueta de His N-terminal (gp32(N)) pueden estimular la invasión/elongación mediada por recA en un molde de ADN lineal. Se muestran los resultados de un experimento en el que se incubaron 0,5 pmoles de molde diana (el fragmento de EcoRV liberado a partir de un plásmido que llevaba el gen de ruvB de *E. coli*) con el oligonucleótido Tester3bio que se solapa con un extremo del molde. Se incluyó o bien la proteína SSB de *E. coli* o bien la proteína gp32(N) de T4 para estimular la reacción. La disolución de reacción incluyó acetato de Mg 10 mM, 6 µg de recA, 8,8 µg de gp32 o 1 µg de SSB, fosfocreatina 27 mM, 1 U de creatina cinasa, Tester3bio 0,3 mM, ATP 3 mM, dNTP 200 µM, 50 U de Klenow, 0,5 pmoles de molde. Opcionalmente, se incluyeron 120 ng de recO y 120 ng de recR. El volumen final fue de 30 µl. Se llevó a cabo la incubación durante 1 hora a 37°C. Otros componentes y condiciones de reacción se indican en la figura. La figura también muestra la relación general del cebador y el ADN diana. En las reacciones en las que se incluyeron las proteínas recO y recR de *E. coli*, se observó poco efecto debido a su adición en estas condiciones. La invasión y la elongación parecieron avanzar en todos los casos, y la gp32(N) pareció presentar síntesis estimulada incluso mejor que SSB de *E. coli*, aunque se utilizó a una concentración superior en este experimento.

La figura 13 muestra el requisito de una longitud o proyección de oligonucleótido mínima para la invasión y elongación durante la selección como diana de extremos de moldes lineales. Se muestran los resultados de un experimento en el que se incubaron 0,5 pmoles de molde diana (el fragmento de EcoRV liberado a partir de un plásmido que llevaba el gen de ruvB de *E. coli*) con el oligonucleótido Tester3bio. Este oligonucleótido se solapa con un extremo del molde, o el oligonucleótido Gen2bio, que está alineado con el otro extremo del molde y sólo presenta 18 residuos de longitud. La disolución de reacción incluyó acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, 1 U de creatina cinasa, Tester3bio o Gen2bio 0,2 µM, dATP 10 mM, ATP 3 mM, mezcla de dNTP 200 µM, 50 U de Klenow o polimerasa de Phi29, 13 µg de recA(C), 1 µg de SSB de *E. coli* y 0,5 pmoles de molde. El volumen final fue de 30 µl. Se llevó a cabo la incubación durante 2 horas a 37°C, y se cargaron 2 µl de la reacción en cada carril del gel. Otros componentes de reacción, condiciones y la relación general de los cebadores y ADN diana se indican en la figura. La invasión y elongación parecieron haber avanzado eficazmente en presencia del fragmento de Klenow, de manera menos eficaz con la polimerasa de Phi29, y peor con el cebador Gen2bio y el fragmento de Klenow. Se concluyó que se requería una longitud y/o una proyección de cebador mínima con respecto al molde para estimular una invasión y elongación eficaz.

La figura 14 muestra uniones paranémicas (A-E) y plectonémicas (F-H). Para las uniones paranémicas, la interacción del filamento de recombinasa con ADN estimula el desenrollado (figura 14A). La región desenrollada se mueve con la búsqueda de homología (figura 14B). Se encuentra la homología (figura 14C). La recombinasa se disocia e intenta volver a enrollarse un nuevo dúplex (figura 14D). Dado que está topológicamente limitado, se fuerza la cadena "saliente" a volver a enrollarse alrededor del nuevo dúplex (figura 14E). Este estado es altamente desfavorable e inestable, y no siempre puede gestionarse mediante SSB (figura 14E). Para las uniones plectonémicas, la interacción del filamento de recombinasa con ADN estimula el desenrollado (figura 14F). Si se solapa un intercambio de cadena con un extremo de ADN, se libera la cadena "saliente" y puede relajarse ya que el oligonucleótido entrante y su complemento vuelven a enrollarse a medida que se disocia la recombinasa (figura 14G). Esto forma un producto no limitado, y una proteína de unión a ADN monocatenario inhibe la migración de ramificaciones (figura 14H).

Esta figura compara los acontecimientos probables que se producen cuando un filamento de nucleoproteína inicia el intercambio de cadena con una secuencia homóloga ubicada en el extremo de un dúplex linealizado (lado derecho de la figura), o dentro de un dúplex que carece de homología en cualquier lado (lado izquierdo de la figura). Comenzando con el lado izquierdo, una vez que el filamento de nucleoproteína ha localizado la secuencia correcta, apareará el ADN de búsqueda con su complemento, y una cadena del dúplex original se vuelve desapareada. De hecho, el complejo de intercambio consiste en 3 cadenas, que están relativamente sub-enrolladas y estabilizadas por la recombinasa. A medida que la recombinasa comienza a desensamblarse en un sentido de 5' a 3', el producto intermedio tricatenario sub-enrollado se vuelve inestable. Para que el nuevo dúplex recupere la conformación normal de ADN relajado, debe rotar. Sin embargo, al hacer eso, debe rotar conjuntamente la cadena saliente, ya que está unida en el sentido de 5' y en el sentido de 3' a su pareja original. Esto da como resultado un sobre-enrollamiento de la cadena saliente, ya que debe realizar el mismo número de giros pero tomar un trayecto más largo alrededor del

nuevo dúplex, y esto es energéticamente desfavorable. Por consiguiente existe un requisito de proteínas de unión monocatenarias con interacciones con ADN muy estables para permitir que tales estructuras existan durante cualquier tiempo significativo. Alternativamente el lado derecho del diagrama indica que si el intercambio incluye un extremo del dúplex, entonces el intercambio puede provocar la liberación completa de la cadena saliente en un extremo y por tanto permitir que gire libremente sin limitación por las otras cadenas implicadas en la recombinación. Esto conduce a una situación estable en la que el nuevo dúplex es libre de enrollarse tras el desensamblaje de recombinasa, y las proteínas de unión a ADN monocatenario sólo necesitan impedir la migración de ramificaciones espontánea.

La figura 15 muestra el efecto de agentes de agrupamiento. En presencia de polietilenglicoles, gp32(N) y la recombinasa recA pueden mediar múltiples acontecimientos de invasión en moldes individuales sin un requisito de regeneración de los extremos del molde que permitirá proyecciones en 5' en el oligonucleótido de selección como diana. La figura 15A muestra los resultados de un experimento en el que se incubaron los oligonucleótidos o bien Tester1bio o bien Tester3bio (que se diferencian en la longitud de la proyección en 5' con respecto al molde) con el fragmento de EcoRV liberado a partir de un plásmido que llevaba el gen de ruvB de *E. coli*, o la digestión con ClaI del plásmido, en presencia o ausencia del PEG 8000 al 10%. La disolución de reacción incluyó acetato de Mg 10 mM, 10,6 µg de recA, 8,8 µg de gp32, fosfocreatina 27 mM, 1 U de creatina cinasa, Tester3bio o Tester1bio 0,3 mM, ATP 3 mM, mezcla de dNTP 200 µM, 50 U de Klenow y 0,5 pmoles de molde (especies indicadas en la figura). Opcionalmente, se incluyeron 120 ng de recO y 120 ng de recR. Se incluyó PEG8000 tal como se muestra. El volumen final fue de 30 µl. Se llevó a cabo la incubación durante 1 hora a 37°C.

El diagrama mostrado representa la relación de los oligonucleótidos con los dos posibles moldes. En particular, ambos oligonucleótidos reconocieron una secuencia incrustada dentro del fragmento de ClaI. En cada caso, se utilizaron 0,5 pmoles de molde, otras condiciones se llevaron a cabo tal como se indica. Ambos cebadores estimularon la invasión/elongación en el molde de EcoRV. Basándose en la intensidad de señal, se produjo aproximadamente una elongación por molde diana. Sin embargo, en presencia del PEG 8000 al 10%, la intensidad del fragmento completamente elongado fue significativamente mayor que en su ausencia y más fuerte que los 0,5 pmoles de producto de PCR biotinilado de control. La señal más fuerte se observó con el oligonucleótido Tester3bio. En este caso, se estimó que se produjeron al menos 10 invasiones/ejecuciones por molde.

En la figura 15B, se comparó la estimulación de invasión/elongación en el 10% p/v de diversos polietilenglicoles disponibles comercialmente. La disolución de reacción incluyó acetato de Mg 10 mM, 10,6 µg de recA, 8,8 µg de gp32, fosfocreatina 27 mM, 1 U de creatina cinasa, Tester3bio o Tester1bio 0,3 mM, ATP 3 mM, dNTP 200 µM, 50 U de Klenow y 0,5 pmoles de molde de RV. Se incluyeron especies de PEG tal como se muestra. Se observó una variación significativa en el grado de estimulación. El compuesto de PEG (PM = de 15.000 a 20.000) pareció ser el más eficaz, seguido por PEG1450.

La figura 16 muestra el efecto de la amplificación dirigida a extremos utilizando RPA de la cadena adelantada. Se demostró amplificación que comprendía varias rondas de invasión y extensión, alcanzando una amplificación de al menos 10 veces a partir de 0,05 pmoles de molde. En este experimento, se emplearon pares de cebadores oligonucleotídicos para establecer una reacción de amplificación. Se muestra esquemáticamente la relación de los oligonucleótidos utilizados para el fragmento de EcoRV a partir de un plásmido que llevaba el gen de ruvB de *E. coli*, que se utilizó como molde. La disolución de reacción incluyó acetato de Mg 10 mM, 6 µg de recA, 8,8 µg de gp32(N), fosfocreatina 27 mM, 1 U de creatina cinasa, Tester3bio 0,3 mM, oligonucleótido variable 0,3 mM, ATP 3 mM, dNTP 200 µM, compuesto de PEG al 10%, 50 U de Klenow y 0,5 pmoles de molde. Se utilizaron proteínas adicionales tal como se indica.

Tester3bio incluyó una proyección de 16 nucleótidos con respecto al molde de partida, mientras que Tester2 incluyó una proyección de 21 nucleótidos y se dirigió al otro extremo del molde. Se utilizó Phospho1 como oligonucleótido con una estructura principal de fosforotiorato. Este oligonucleótido presentaba 15 residuos de longitud, y se alineó con el extremo de la diana. Se predijo que Phospho-1 no interaccionaba con recombinasa o proteína de unión a ADN monocatenario ya que carecía de una estructura principal de fosfato. Sin embargo, se predijo que funcionaba en una hibridación en disolución sencilla. Se empleó un fragmento de control de producto de PCR biotinilado para demostrar la intensidad de señal de 0,5 pmoles de ADN, y también fue el tamaño preciso del molde de partida. Se corrieron los productos de reacción sobre un gel desnaturante al 6%, se transfirieron a nailon y se unieron con estreptavidina-HRP antes de realizar quimioluminiscencia potenciada para revelar los productos biotinilados de las reacciones.

En todos los casos, se produjo la invasión y elongación satisfactorias con el Tester3bio biotinilado según se observó mediante la presencia de productos completamente elongados. Los productos presentaron una movilidad ligeramente menor que el control, debido a la presencia de proyecciones en los oligonucleótidos. Además, hubo evidencias de varias rondas de invasión/ejecuciones ya que la intensidad de señal fue al menos tan grande como los 0,5 pmoles de control (se inició la reacción con tan sólo 0,05 pmoles). Hubo una acumulación significativa de un producto aproximadamente 37 nucleótidos más grande que el control. Se predijo que esto surgía a partir de Tester3bio que se elongaba sobre una cadena anteriormente copiada a partir del, y que incluía la proyección del, cebador opuesto. Se muestran dos exposiciones del mismo gel.

La inclusión de diversas proteínas diferentes, que están implicadas normalmente en el metabolismo del ADN, presentaron diversos efectos. La ADN girasa, y topoisomerasa I (humana), disminuyeron el rendimiento de producto de amplificación, y la topoisomerasa redujo enormemente la generación de productos de elongación más cortos. La inclusión de *ruvA* y *ruvB* de *E. coli* también condujo a una reducción general en la formación de producto. La *priA* de *E. coli* aumentó la cantidad de producto formado, y aumentó significativamente el número de productos más cortos formados. La inclusión de las proteínas *dnaB* y *dnaC810* de *E. coli* aumentó ligeramente la cantidad de producto formado. Obsérvese que se detectó una señal significativamente más fuerte en reacciones que contenían oligonucleótido Phospho-1 en comparación Tester3bio solo. Esto sugirió que Phospho-1 podía hibridarse con cadenas desplazadas y conducir a la formación de ADN dúplex.

La figura 17 muestra capacidad de procesamiento de Klenow y RPA de la cadena adelantada. En este experimento, se emplearon pares de cebadores oligonucleotídicos en un esfuerzo por establecer una reacción de amplificación de una manera similar a la mostrada en la figura 16, excepto porque se utilizó una dilución de 100 veces adicional del molde de partida. La disolución de reacción incluyó acetato de Mg 10 mM, 6 ó 12 µg de *recA*, 8,8 ó 14,3 µg de *gp32*, fosfocreatina 27 mM, 1 U de creatina cinasa, Tester3bio 0,3 ó 0,9 µM, Tester2 0,3 ó 0,9 µM, ATP 3 mM, dNTP 200 µM, compuesto de PEG al 10%, 50 U de Klenow y 0,5 pmoles de molde. El volumen final fue de 30 µl. Se llevó a cabo la incubación durante 2 horas a 37°C. Se muestra esquemáticamente la relación de los oligonucleótidos utilizados en un fragmento de *EcoRV* a partir de un plásmido que llevaba el gen de *ruvB* de *E. coli*, que se utilizó como molde diana. Tester3bio incluyó una proyección de 16 nucleótidos con respecto al molde de partida, mientras que Tester2 incluyó una proyección de 21 nucleótidos, se dirige al otro extremo del molde, y codifica para un sitio de *EcoRI* dentro de la proyección. Se empleó un fragmento de control de producto de PCR biotinilado para demostrar la intensidad de señal de 0,5 pmoles de ADN, y también fue el tamaño preciso del molde de partida. Se corrieron los productos de reacción sobre un gel desnaturante al 6%, se transfirieron a nailon y se unieron con estreptavidina-HRP antes de realizar quimioluminiscencia potenciada para revelar los productos biotinilados de las reacciones.

Se varió la concentración de los oligonucleótidos, *gp32(N)* y *recA(C)*, y también se investigó si la inclusión de enzima de restricción *EcoRI*, que puede escindir parte de la secuencia adicional incorporada por la proyección de Tester2, presenta algún efecto sobre la reacción. En la mayoría de los casos, hubo evidencias de algún grado limitado de amplificación del tamaño esperado de fragmento, pero hubo principalmente generación de fragmentos de ADN más cortos. Se dedujo que puede producirse la acumulación relativamente escasa de producto de longitud completa auténtico a estas concentraciones de molde más diluidas porque la escasa capacidad de procesamiento del fragmento de Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli* (10-50 nucleótidos) da como resultado que la mayoría de las interacciones generen fragmentos cortos, lo cual es más significativo a bajas concentraciones de molde diana.

La figura 18 muestra la dependencia de la separación de cebadores de RPA. Como consecuencia de resultados anteriores, se intentó establecer si disminuir la distancia entre pares de cebadores dará como resultado un aumento de la eficacia de amplificación. Para someter esto a prueba, se empleó una serie de oligonucleótidos, Sizer1, 2, 3 y 4, que se colocaron a distancias crecientes desde el extremo 3' del oligonucleótido Tester3bio. Todos los oligonucleótidos Sizer incluyeron la proyección de *EcoRI* indicada en el lado inferior derecho de la figura. Se muestran la secuencia del ADN diana, un fragmento de *EcoRV* a partir de un plásmido que llevaba el gen de *ruvB* de *E. coli*, y la posición de los oligonucleótidos utilizados. La disolución de reacción incluyó acetato de Mg 10 mM, 6 µg de *recA*, 8,8 µg de *gp32*, fosfocreatina 27 mM, 1 U de creatina cinasa, Tester3bio 0,3 µM, oligonucleótido variable 0,3 µM, ATP 3 mM, dNTP 200 µM, compuesto de PEG al 10%, 50 U de Klenow, 5 U de *EcoRI* y 0,5 pmoles de molde. El volumen final fue de 30 µl. Se incubó la disolución de reacción durante 2 horas a 37°C. Otras condiciones de reacción se indican en la figura.

Se empleó un fragmento de control de producto de PCR biotinilado para demostrar la intensidad de señal de 0,5 pmoles de ADN, y también fue el tamaño preciso del molde de partida. Se corrieron los productos de reacción sobre un gel desnaturante al 6%, se transfirieron a nailon y se unieron con estreptavidina-HRP antes de realizar quimioluminiscencia potenciada para revelar los productos biotinilados de las reacciones. Se amplificaron eficazmente fragmentos específicos de las longitudes esperadas a partir de 0,5 fmoles de molde de partida cuando se emplearon Sizer2, 3 y 4. Sin embargo, el rendimiento de producto disminuyó algo a medida que aumentó la longitud del producto. Se produjo poco o nada de producto del tamaño esperado cuando se utilizó Sizer1. Se estimó que el carril 4 contenía una amplificación de $\sim 4 \times 10^4$ veces. Este cebador incluyó la distancia inter-oligonucleótido más corta de tan sólo 25 nucleótidos. Esto sugirió que hay una distancia requerida mínima para separar los extremos de los oligonucleótidos, aunque otras explicaciones tales como un mal comportamiento de cebador también podrían explicar el resultado. En el experimento se incluyeron varias muestras que no contenían ADN de molde. En el caso de Sizer2, se observa una banda débil aproximadamente del tamaño esperado incluso en ausencia de ADN exógeno. Basándose en una variedad de datos, se cree que esto surge de contaminación de las preparaciones de proteínas con cantidades significativas de ADN genómico de *E. coli*.

La figura 19 muestra que los productos de RPA son ampliamente bicatenarios. La reacción de RPA puede generar productos de ADN bicatenario tal como se demuestra mediante electroforesis en gel de agarosa y escisión por enzimas de restricción. Sin embargo, en las condiciones utilizadas en este caso, hubo disminuciones significativas en la eficacia de la reacción si el molde de partida disminuyó significativamente por debajo de 0,5 fmoles. Además,

señales observadas en el control sólo de agua sugirieron una contaminación genómica significativa de ADN de *E. coli*. En este experimento se incubaron 0,5 fmoles, o cantidades más diluidas, del fragmento detallado en la figura 10 con Tester3bio y Sizer2 en las condiciones indicadas. La disolución de reacción incluyó acetato de Mg 10 mM, 6 µg de recA, 8,8 µg de gp32, fosfocreatina 27 mM, 1 U de creatina cinasa, Tester3bio 0,3 µM, Sizer2 0,3 µM, ATP 3 mM, dNTP 200 µM, compuesto de PEG al 10%, 50 U de Klenow y 0,5 pmoles de molde o dilución indicada en la figura. El volumen final fue de 30 µl.

Se incluyó un control sin ADN, dilución progresiva del molde, y se investigó la iniciación de la reacción en molde incrustado (el fragmento de Clal detallado en las figuras 1 y 7), utilización de PEG 1450 y dilución del fragmento de Klenow. Se corrió una fracción (1/10) de los productos de reacción sobre un gel desnaturante al 6%, se transfirió a nailon y se unió con estreptavidina-HRP antes de realizar quimioluminiscencia potenciada para revelar los productos biotinilados de las reacciones (figura 19A). Se extrajo con fenol una fracción adicional (3/10), se precipitó y se corrió sobre un gel de agarosa al 2% y se tiñó con bromuro de etidio (figura 19B). Se cortó una fracción final (3/10) con BbvCl y se sometió a electroforesis sobre un gel de agarosa al 2% junto con ADN no cortado equivalente (figura 19C).

Se estimó que el carril 2 (figura 19A) contenía una amplificación de 5×10^4 veces, lo que correspondió a 10^{13} moléculas de producto final. En presencia de 0,5 fmoles de molde de partida, se observó una amplificación extremadamente robusta del fragmento de tamaño esperado tal como se demuestra mediante electroforesis en gel desnaturante. Además, cuando se sometió a electroforesis parte de la muestra sobre agarosa, se observó una banda limpia fuerte precisamente del tamaño correcto para un producto de ADN bicatenario. Este producto pudo cortarse mediante BbvCl para proporcionar un fragmento ligeramente más pequeño del tamaño esperado. La dilución del molde en 100 veces o más dio como resultado una banda significativamente menos intensa, y una cantidad mucho mayor de fragmentos más cortos que la longitud esperada. Esto se determinó mediante electroforesis en gel desnaturante y mediante electroforesis en gel de agarosa. Se observó un patrón similar cuando se utilizó ADN cortado con Clal, o si no se utilizó ADN. Se cree que cuando se utiliza menos de una cantidad umbral de ADN en estas condiciones, hay una reacción de amplificación inferior a la óptima, lo cual conduce a productos heterogéneos, y además que las muestras están altamente contaminadas con ADN genómico de *E. coli* a partir de los procedimientos de purificación en una sola etapa utilizados en la generación de las proteínas recombinantes utilizadas en este caso.

La figura 20 muestra la actividad de un mutante por truncamiento C-terminal de recA. Las proteínas RecA con una delección del péptido ácido C-terminal (recA(C)□) son activas en fomentar el intercambio y la extensión de cadena en un ensayo de ejecución con molde lineal. Sin embargo, hubo alguna sugerencia de que la concentración de proteína óptima era inferior a la de proteína recA(C). Este experimento trata si una forma truncada C-terminal de la proteína RecA de *E. coli*, descrita en otra parte, podía utilizarse satisfactoriamente en reacciones de invasión/extensión. Se muestra el resultado de un ensayo de ejecución en un único lado utilizando o bien la proteína recA(C) de *E. coli* o bien la proteína recA□17(C) de *E. coli*, que carece de los 17 residuos ácidos C-terminales. Se indica la relación entre cebadores y molde y otras condiciones experimentales. La disolución de reacción incluyó acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, 1 U de creatina cinasa, Tester3bio 0,3 µM, ATP 3 mM, dNTP 200 µM, 50 U de Klenow, 0,5 pmoles de molde de RV, y especies y cantidad de recA tal como se indica en la figura. Se incluyó PEG tal como se muestra. El volumen final fue de 30 µl. Se incubó la disolución durante 2 horas a 37°C. Se realizaron las reacciones con o sin PEG1450 al 10%, y con las cantidades indicadas de la recombinasa respectiva. Ambas recombinasas soportaron satisfactoriamente la invasión/extensión, aunque en las condiciones utilizadas en este caso parece haber un óptimo diferente para la cantidad de proteína requerida.

La figura 21 muestra proteínas gp32 modificadas. Se muestra una representación esquemática de proteínas gp32 de T4 utilizadas en este estudio y la posición de diversas modificaciones y mutaciones.

La figura 22 muestra actividad de proteínas gp32. Variaciones significativas confirman que la cooperatividad de gp32 presenta un efecto sustancial sobre la velocidad de reacciones de invasión/extensión, y además confirma que gp32(N) presenta una disminución significativa en la cooperatividad que concuerda con interferencia con la función del dominio B N-terminal. Se muestran los resultados de un experimento en el que se generaron ejecuciones lineales utilizando como molde el fragmento de EcoRV de un plásmido que llevaba el gen de RuvB de *E. coli* y el oligonucleótido Tester3bio. La disolución de reacción incluyó acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, creatina cinasa 100 ng/µl, Tester3bio 400 nM, ATP 3 mM, dNTP 200 µM, 10 U de miocinasa de pollo, 8 µg de uvsX con etiqueta en C, 7,5 ó 15 µg de gp32 (cada especie), 50 U de Klenow y 0,5 pmoles de molde; no se incluyó PEG. El volumen final fue de 30 µl. Se incubó la disolución durante 2 horas a 37°C. Las reacciones contenían uvsX(C) y diversas formas de gp32 tal como se indica. Se utilizaron dos concentraciones de cada forma de gp32 en este experimento. Para analizar los productos de reacción, se cargaron 2 µl del volumen total (30 µl) sobre el gel.

En todos los casos, se generaron productos elongados del oligonucleótido que se extendían hasta una longitud que concuerda con ejecuciones de longitud completa. Se observa que en este experimento hay un artefacto de gel que se observó ocasionalmente. Se observó una sombra con menor movilidad de las bandas. Esto también se observó en el carril con fragmento de control de PCR. La menor cantidad de producto se formó cuando se utilizó la proteína gp32(C), lo que concuerda con permitir que esté presente en la reacción sólo un nivel bajo de filamentos cargados

con recombinasa. Se formó una cantidad menor de producto con 15 µg en comparación con 7,5 µg, lo que concuerda con la noción de que concentraciones superiores disminuyeron la eficacia de la carga con recombinasa.

Se predijo que la proteína gp32(C)K3A era la siguiente forma más cooperativa. De manera que concuerda con esto, produjo un número limitado de productos de longitud completa cuando se utilizaron 15 µg de proteína. Sin embargo, el número de ejecuciones fue mayor que el observado con cualquier cantidad de gp32(C), lo que indica que había más filamentos cargados con recombinasa en la reacción y una velocidad superior de invasión/elongación. Cuando se utilizaron 7,5 µg de gp32(C)K3A, hubo un cambio drástico en la cantidad de producto formado. Una explicación es que una velocidad aumentada de invasión/elongación en esta reacción podía conducir a la valoración de copias de ADN monocatenario fuera mayor que la de la gp32(C)K3A. En estas condiciones, la mayor parte del oligonucleótido se recubrirá con uvsX(C), conduciendo a una alta velocidad de invasión y a la incapacidad de estabilizar la cadena saliente y recubrirla con gp32. Esto dará como resultado productos truncados más cortos, algunos de los cuales se plegarán de vuelta sobre sí mismos, se auto-cebarán y formarán una variedad de otros de tales productos. Esto sugeriría que la velocidad de invasión/ elongación de gp32(C)K3A era notablemente superior para esta proteína que para gp32(C).

Comparando las intensidades de los productos producidos cuando se utilizan 15 µg de cada proteína, se estimó que las reacciones que contenían gp32(C)K3A presentaban una velocidad de invasión/elongación aproximadamente 10 veces mayor que la de gp32(C). Todas las demás proteínas gp32 sometidas a prueba en este experimento produjeron un patrón similar al observado cuando se empleó gp32(C)K3A y grandes cantidades de producto. Esto fue el caso incluso cuando se emplearon 15 µg de la proteína relevante, sugiriendo que todas mostraban una cooperatividad menor que cualquiera de gp32(C) o gp32(C)K3A. Sin embargo, de manera notable, tanto gp32(N) como gp32(C)R4T produjeron significativamente menos producto cuando se utilizaron sólo 7,5 µg de proteína en comparación con 15 µg. Esto contrastó con la situación con las demás proteínas. Basándose en esto, se sugiere que gp32(N) y gp32(C)R4T presentan un grado de cooperatividad similar. Un estudio anterior sugirió que gp32K3A y gp32R4Q presentan una cooperatividad similar. Sin embargo, los datos sugieren que gp32(C)R4Q se encuentra en algún punto entre gp32(C)K3A y gp32(C)R4T con respecto a su comportamiento para soportar la invasión/síntesis.

La figura 23 muestra la invasión y extensión utilizando uvsX. Este experimento trata si una forma truncada C-terminal de la proteína uvsX de bacteriófago T4 puede utilizarse satisfactoriamente en reacciones de invasión/extensión. Se muestran los resultados de ensayos de ejecución en un único lado utilizando o bien la proteína uvsX(C) o bien la proteína uvsX□21(C) que carece de los 21 residuos ácidos C-terminales. La disolución de reacción incluyó acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, 1 U de creatina cinasa, Tester3bio 0,4 µM, ATP 3 mM, dNTP 200 µM, 50 U de Klenow, 1 U de miocinasa de pollo, uvsX(C) o uvsX□21(C), 8,8 µg de gp32(N) y 0,5 pmoles de molde de RV. El volumen final fue de 30 µl. Se incubó la disolución durante 2 horas a 37°C, y se cargaron 2 µl de mezcla de reacción sobre cada carril del gel. La relación del molde y los oligonucleótidos y otras condiciones experimentales se indican en la figura. Se realizaron reacciones con las cantidades indicadas de la recombinasa respectiva.

Ambas recombinasas soportaron satisfactoriamente la invasión/extensión. Sin embargo, en las condiciones utilizadas en este caso, parece haber un óptimo diferente para la cantidad de proteína requerida. En el caso de uvsX(C), la velocidad de invasión/extensión aumentó progresivamente con la concentración de proteína dentro del intervalo sometido a prueba. Sin embargo para la proteína uvsX□21(C), la velocidad se vio inhibida a una concentración superior y el nivel global de producción de producto fue menor en estas condiciones. Al contrario que la invasión/extensión mediada por recA en reacciones similares, la uvsX(C) pareció estimular múltiples acontecimientos de invasión/extensión sin necesidad de adición de polietilenglicol.

La figura 24 muestra RPA utilizando uvsX(C). En este experimento, se ha combinado uvsX(C) con gp32(N) en presencia de los oligonucleótidos Tester3bio y Sizer2. El ADN de molde en este experimento fue el plásmido digerido con EcoRV que llevaba el gen de ruvB de *E. coli* utilizado en el ejemplo 1. La disolución de reacción incluyó acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, creatina cinasa 100 ng/µl, Tester3bio 400 nM, Sizer2 400 nM, ATP 3 mM, dNTP 200 µM, 50 U de fragmento de Klenow, 10 U de miocinasa de pollo, 10 µg (1X) o 20 µg (2X) de uvsX con etiqueta en C, 8,8 µg de gp32(N). Opcionalmente, se incluyó ADPβS 0,2 mM, 10 µg de topoisomerasa I de *E. coli*, PEG 1450 al 10% y 10 µg de uvsX□21(C). Tester3bio reconoció un extremo de un fragmento de aproximadamente 300 pares de bases e incluyó una proyección en 5' con respecto al extremo de la diana. Sizer2 reconoció la otra cadena de este molde y se dirigió hacia una secuencia incrustada de tal manera que su extremo 3' está a aproximadamente tres giros helicoidales y medio del extremo de Tester3bio.

En presencia de PEG1450, se observó la amplificación del fragmento esperado en el plazo de 2 horas. En los casos en los que se produjo amplificación, se consumió casi la totalidad de la población de oligonucleótidos lo que indica una amplificación de $3-5 \times 10^4$. Se indican los componentes de reacción. En algunas muestras se incluyen componentes adicionales. Se encontró que ADP-β-S 200 µM aumentó ligeramente la cantidad de producto generado en estas condiciones. A la inversa, en las condiciones utilizadas en este caso, la adición de topoisomerasa I de *E. coli* inhibió la amplificación. En las condiciones utilizadas, no se detectó amplificación con proteína uvsX□21(C). Sin embargo, no se incluyó PEG1450 en estas muestras, y uvsX(C) tampoco se amplificó en estas condiciones sin PEG1450.

La figura 25 muestra gp32 de tipo natural frente a modificada. Se determinó que la proteína uvsX(C) variante era cualitativamente diferente de la gp32 sin etiqueta nativa. La disolución de reacción incluyó acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, creatina cinasa 100 ng/μl, Tester3bio 300 nM, Sizer2 300 nM, ATP 3 mM, dNTP 200 μM, 50 U de fragmento de Klenow, 10 U de miocinasa de pollo, uvsX(C) 300 ng/μl, gp32 (sin etiqueta) 300 ng/ml o gp32(C) 100, 200, 300, 400, 500 ó 600 ng/ml, y PEG según se indica. Se incubó la reacción durante 2 horas a 37°C. Se muestra una comparación entre reacciones de amplificación realizadas en presencia de gp32 sin etiqueta y una valoración de gp32(C), o bien en presencia o bien en ausencia de PEG1450. Se observó que se requería PEG en la reacción para gp32(C) para funcionar, mientras que no se daba este caso para gp32 sin etiqueta. Sin embargo, PEG aumentó significativamente la cantidad de producto formado durante el periodo de reacción periodo cualquier caso. Incluso en presencia de PEG, gp32 sin etiqueta pareció generar de manera sistemática ligeramente más producto que gp32(C) en cada punto en la curva de valoración.

La figura 26 muestra la valoración de gp32 y el efecto de uvsY. La valoración de gp32 reveló un requisito de una cantidad mínima de gp32, y un requisito de proteína uvsY(N) cuando se empleó gp32 sin etiqueta. En la figura 26A, se muestran los resultados de un experimento que demuestra que cuando se utilizó gp32 sin etiqueta, se requería proteína uvsY(N) para la amplificación. La disolución de reacción incluyó acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, creatina cinasa 100 ng/μl, Tester3bio 300 nM, Sizer2 300 nM, ATP 3 mM, dNTP 200 μM, PEG1450 al 10%, 50 U de fragmento de Klenow, 10 U de miocinasa de pollo, uvsX(C) 300 ng/μl, gp32 (sin etiqueta) 300 ng/μl y uvsY(N) tal como se indica en la figura. Se incubó la disolución durante 2 horas a 37°C. La proteína uvs(Y) funcionó a lo largo de un intervalo de concentraciones mostrado en este caso (de 50 a 300 ng/μl). Otros experimentos demostraron que cantidades superiores inhibían la reacción. Por tanto, debe establecerse un óptimo para cualquier reacción dada (probablemente entre 5 y 50 ng/μl).

La figura 26B muestra los resultados de valorar la proteína gp32 sin etiqueta en presencia o ausencia de uvsY(N). La disolución de reacción incluyó acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, creatina cinasa 100 ng/μl, Tester3bio 300 nM, Sizer2 300 nM, ATP 3 mM, dNTP 200 μM, PEG1450 al 10%, 10 U de miocinasa de pollo, uvsX(C) 750 ng/μl, gp32 (sin etiqueta) 300 ng/μl y uvsY(N) 300 ng/μl. Se incubó la disolución durante 2 horas a 37°C. Una vez más, hay un requisito de uvsY(N) para alcanzar la amplificación. Adicionalmente, este experimento demuestra la necesidad de una cantidad mínima de gp32. En este experimento, variar las concentraciones de gp32 entre gp32 80 y 160 ng/μl dio como resultado una brusca transición desde ausencia de amplificación hasta amplificación eficaz. Un análisis sencillo del tamaño de sitio de unión conocido para gp32, la longitud de los oligonucleótidos, y su concentración, sugirió que este aumento en la concentración representaba una transición desde niveles estequiométricos de gp32 para el cebador, hasta niveles saturantes. Por consiguiente, la interpretación más sencilla es que gp32 satura los oligonucleótidos con el fin de disponer de un exceso de gp32 en la reacción para recoger y estabilizar la cadena saliente.

La figura 27 muestra factores que afectan a la velocidad de reacción y al ruido. La alta cooperatividad de gp32 inhibe la formación de filamentos de recombinasa (figura 27A). Además, uvsY actúa para aumentar la carga de recombinasa en un entorno de gp32 desfavorable (figura 27B). PEG ayuda a la función de gp32 incapacitada para cooperación (figura 27C). La velocidad de reacción se ve influida tanto por la actividad recombinasa como por la eficacia de gp32 (figura 27D). Las fases tras la invasión se potencian en presencia de gp32 cooperativa (figura 27E). La gp32 cooperativa es más eficaz para silenciar el ruido de reacción (figura 27F).

Se sugirieron los efectos y las interacciones previstas de gp32, uvsX, uvsY y PEG, con la conclusión de que debe alcanzarse un equilibrio óptimo entre velocidad de reacción y ruido. El grado de cooperatividad de gp32 se indica en la parte superior de la figura. Una alta cooperatividad favoreció una unión eficaz a ADN monocatenario, lo que previno ruido de reacción significativo inhibiendo un comportamiento de cebado indeseable. La alta cooperatividad también favoreció la estabilización de la cadena saliente durante la recombinación y síntesis de ADN. A la inversa, la gp32 altamente cooperativa redujo la abundancia de filamentos de búsqueda cargados con recombinasa, y puede afectar considerablemente a la velocidad de reacción.

Este comportamiento pudo superarse parcialmente incluyendo uvsY en la reacción. Sin embargo, aún queda por determinar si esto podía alcanzar una velocidad de carga igual de alta. Pueden emplearse proteínas gp32 modificadas que son menos cooperativas. Además, la cooperatividad de proteínas gp32 y proteínas uvsX puede verse afectada por la inclusión de PEG. PEG también puede tener consecuencias beneficiosas o, algunas veces, perjudiciales, sobre otros componentes de la reacción tales como comportamiento de hibridación de ADN y capacidad de procesamiento de polimerasa. La velocidad óptima puede adquirirse en alguna posición alejada de ambos extremos, tal como se indica, ya que puede ser necesario alcanzar un equilibrio entre la carga de recombinasa y la función de gp32.

La figura 28 muestra los efectos de PEG. PEG pudo reducir la longitud promedio de productos de invasión/ejecución lineales en un experimento de ejecución lineal mediado por uvsX en presencia de gp32(C). Se muestran los resultados de un experimento de ejecución lineal utilizando el oligonucleótido Tester3bio dirigido al extremo del fragmento de EcoRV de RuvB de *E. coli* de aproximadamente 300 pares de bases. Este fragmento se utilizó a lo largo de los experimentos dados a conocer y se representa esquemáticamente en la parte derecha de la figura. Se

reconstituyó la reacción con 8 mg de UvsX(C) en un volumen de reacción final de 30 ml, en presencia de gp32(C), y en algunos casos, cantidades variables de UvsY(N) o UvsY(C). La disolución de reacción incluyó acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, 1 U de creatina cinasa, Tester3bio 0,4 μ M, ATP 3 mM, dNTP 200 μ M, 50 U de fragmento de Klenow, 1 U de miocinasa de pollo, 8 μ g de uvsX(C), 7,5 μ g de gp32(C) u 8,8 μ g de gp32(N) y 0,5 pmoles de molde. El volumen final fue de 30 μ l. Se incubó la disolución durante 2 horas a 37°C, y se cargaron 2 μ l de la disolución en cada carril.

En ausencia de PEG, pareció que habían sucedido múltiples ciclos de invasión/ejecución en cada molde, y hubo generación de una cantidad significativa de producto de longitud completa. Sin embargo, se produjo una cantidad incluso mayor de fragmento ligeramente más corto, que se cree que constituye ejecuciones ligeramente más cortas que pueden haberse plegado de vuelta sobre sí mismas y sintetizado una horquilla corta. Se interpretan todas las bandas que no son de longitud completa como resultantes de alguna forma de reacción de invasión/extensión auténtica que no ha alcanzado una extensión completa. Tanto UvsY(N) como UvsY(C) estimulan la cantidad de producto formado en algún grado. En el caso de ausencia de PEG, UvsY(C) parece ser más eficaz que UvsY(N). Esto contrasta con otros datos de amplificación geométrica que se generaron, que sugerían que sólo UvsY(N) soportó una amplificación geométrica eficaz.

De la manera más notable, la inclusión de PEG, en contradicción con hallazgos con recA de *E. coli*, pareció disminuir la cantidad global de producto en este gel. También disminuyó la distribución de longitud promedio de productos. Con el fin de explicar esto, se sugiere que en estas condiciones la cooperatividad de gp32(C), quizás ya en un máximo, no puede aumentarse por PEG mientras que la de UvsX sí puede aumentarse. Por tanto, un comportamiento de UvsX relativamente hiperactiva da como resultado una rápida carga sobre la cadena saliente, nueva invasión, y "migración de burbujas" eficaz que expulsa la cadena recién sintetizada y la desplaza más fácilmente. Por consiguiente, la longitud de producto promedio se ve significativamente reducida.

La figura 29 muestra la invasión dirigida a extremo de ADN. Se ilustra la primera ronda de invasión/síntesis utilizando la selección como diana de extremo y proyección de oligonucleótido (figura 29A). De ~10 a 15 residuos (extremo 5') y ~30 residuos (extremo 3') adicionales se aproximan al requisito mínimo para el intercambio de cadena (figura 29B). Se produce la invasión, seguida por la liberación de la cadena saliente no limitada, y síntesis de activación inversa (figura 29C). La mayoría de los filamentos de nucleoproteínas que están lo suficientemente recubiertos para completar el intercambio de cadena catalizarán la liberación completa y no limitada de la cadena saliente (figura 29D). Se producen rondas de invasión/síntesis posteriores (figura 29E). Pocos o ningún filamento de nucleoproteína puede intercambiarse en el extremo de la diana (figura 29F). Se proporcionan una o ninguna molécula de gp32 (figura 29G). A esto le sigue la carga de recombinasa (figura 29H) y migración de ramificaciones (figura 29I).

Esta figura describe cómo pueden comportarse oligonucleótidos de selección como diana, que presentan inicialmente una proyección con respecto a un molde diana lineal, durante el primer intento, y después intentos posteriores, de llevar a cabo intercambio de cadena. El propósito de este modelo es racionalizar datos que sugieren que cuando se reconstituye experimentalmente una situación de este tipo, hay una diferencia significativa entre la primera invasión y las invasiones posteriores. La parte superior de la figura representa filamentos de oligonucleótido cargados con recombinasa, que presentan diferentes extensiones de cobertura en 5'. El ensamblaje direccional de 5 a 3' significa que la mayor parte debe presentar recubrimiento en el extremo más en 3'. Tal como se representa en la figura, todos los oligonucleótidos presentan una proyección en 5' con respecto a la diana inicial.

Es probable que el primer acontecimiento de invasión de cómo resultado una liberación completa de la cadena saliente ya que hay una probabilidad significativa de que la recombinasa recubrirá el oligonucleótido de búsqueda en una extensión en 5' adicional que la secuencia que se verá implicada en el intercambio de cadena. Una vez liberada la cadena saliente, está topológicamente no limitada y puede estabilizarse fácilmente mediante proteínas de unión a ADN monocatenario, supuestamente incluso aquellas con cooperatividad relativamente escasa. Además, también se genera estabilidad mediante polimerasas que extienden el extremo 3' del ADN dúplex para generar el complemento en el extremo más en 5' del oligonucleótido de selección como diana. Esta síntesis se denomina síntesis de activación inversa. Como consecuencia de la síntesis de activación inversa cualquier invasión posterior estará alineada con el molde extendido.

En estas circunstancias, la mayor parte de los oligonucleótidos no están completamente recubiertos con recombinasa en sus extremos más en 5'. En algunos casos, puede haber una o más moléculas de gp32 que recubren la parte en 5' del oligonucleótido. Cuando estos oligonucleótidos realizan el intercambio de cadena en la diana ahora extendida, no es probable que la cadena saliente se libere inmediatamente. Como consecuencia, el acontecimiento se parece inicialmente al acontecimiento topológicamente limitado ya representado en la figura 6. El modelo sugiere que sólo si la cooperatividad de la proteína de unión a ADN monocatenario es suficiente, entonces estos productos intermedios inestables limitados podrán existir durante algún periodo limitado. En la parte inferior de la figura se explora lo que podría suceder a estos productos intermedios inestables.

En la situación 1, la extensión en 5' no sometida a intercambio del oligonucleótido experimenta migración de ramificaciones con la parte dúplex equivalente de la diana. Esto puede conducir fácilmente a una completa

disociación de esta parte de la cadena saliente que entonces rotará rápidamente para liberar cualquier tensión y estabilizarse mediante proteínas de unión a ADN monocatenario tal como sucedió en la primera invasión. Estos sustratos ahora estables serán conjuntos ideales y relativamente estables para la elongación mediante polimerasa. Alternativamente, en la situación 2, la proteína de unión a ADN monocatenario se desensambla de la cadena saliente y la migración de ramificaciones avanza en el sentido opuesto al de la situación 1, de modo que se expulsa el ADN invasor. En la situación 3, la cadena saliente se recubre con recombinasa y vuelve a invadir conduciendo a la expulsión del oligonucleótido. Este procedimiento se parece a un procedimiento descrito en otra parte como migración de burbujas. Si la recombinasa se carga sobre la cadena saliente liberada en la situación 1 entonces también puede suceder la migración de burbujas. Se dispone de datos experimentales que se reconcilian muy fácilmente considerando la existencia de migración de burbujas tal como se muestra en la figura 28.

La figura 30 muestra la RPA en una muestra compleja. En este experimento se examinó la sensibilidad de RPA, y la necesidad de un extremo de ADN, en una reacción de RPA en una diana de ADN compleja. Se proporciona una representación esquemática de la secuencia de ADN, que corresponde a la parte del gen de enzima convertidora de la angiotensina (ACE) humana. Se utilizaron tres combinaciones diferentes de cebadores. El experimento utilizó una mezcla de *uvsX(C)*, *uvsY(N)* y *gp32(C)K3A*. La disolución de reacción incluyó acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, creatina cinasa 100 ng/μl; cebador Up3 300 nM, cebador Down1, 2 ó 3 300 nM, ATP 3 mM, dNTP 200 μM, PEG1450 al 10%, 50 U de fragmento de Klenow, 10 U de miocinasa de pollo, *uvsX(C)* 300 ng/μl, *gp32(C)K3A* 300 ng/μl y *uvsY(N)* 50 ng/μl. El volumen final fue de 30 μl. Se incubó la disolución durante 5 horas a 37°C. Se separaron los productos de reacción por electroforesis sobre un gel de acrilamida, se transfirieron a una membrana de nailon y se analizaron con sonda con un oligonucleótido biotinilado que reconocía una secuencia interna única.

Para la reacción de RPA, se compararon molde no cortado (ADN genómico) y molde cortado, y se compararon pares de cebadores. Se detectó un fragmento del tamaño esperado. En todos los casos, no hubo producto específico cuando no se añadió ADN genómico a la reacción, pero se generó un producto específico cuando se añadió ADN (equivalente a aproximadamente 10.000 copias de cualquier secuencia). La digestión del ADN antes de la RPA con HpaI dio como resultado la generación de al menos un extremo solapante con uno de los oligonucleótidos, y un aumento en la intensidad de la señal. Sin embargo, no hubo un requisito absoluto de digestión con HpaI para que se produjera la RPA.

La figura 31 muestra sensibilidad de RPA. En este experimento, se examinó la sensibilidad en una reacción de RPA en una diana de ADN compleja. Se proporciona una representación esquemática de la secuencia de ADN, que corresponde a parte del gen de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) humana. Se utilizaron tres combinaciones diferentes de cebadores. El experimento utilizó una mezcla de *uvsX(C)*, *uvsY(N)* y *gp32(C)K3A*. La disolución de reacción incluyó acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, creatina cinasa 100 ng/μl; cebador Up3 300 nM; cebador Down1, 2 ó 3 300 nM; ATP 3 mM, dNTP 200 μM, PEG1450 al 10%, 50 U de fragmento de Klenow, 10 U de miocinasa de pollo, *uvsX(C)* 300 ng/μl, *gp32(C)K3A* 300 ng/μl y *uvsY(N)* 50 ng/μl. El volumen final fue de 30 μl. Se incubó la disolución durante 5 horas a 37°C, y se utilizó una sonda ACE-hyb. Se separaron los productos de reacción por electroforesis sobre un gel de acrilamida, se transfirieron a una membrana de nailon y se analizaron con sonda con un oligonucleótido biotinilado que reconocía una secuencia interna única. Se detectó un fragmento del tamaño esperado. En todos los casos, no hubo producto específico cuando no se añadió ADN genómico a la reacción, pero se generó un producto específico cuando se añadió suficiente ADN. En todos los casos, 1000 copias fueron suficientes para generar una señal significativa, y en un caso pudo detectarse una señal muy débil a 100 copias.

La figura 32 muestra la sensibilidad de RPA y artefactos independientes del molde. Se muestran los resultados de un experimento en el que se investigó la sensibilidad en una reacción de RPA en una diana de ADN compleja. Se proporciona una representación esquemática de la secuencia de ADN, que corresponde a parte del gen de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) humana. Se realizó un transcurso de tiempo de la amplificación tomando muestras de reacción a las 1, 2 y 3 horas. Se detectaron productos de reacción gracias a la presencia de residuos de biotina unidos al extremo 5' de uno de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación. De esta manera, fue posible visualizar todos los productos de reacción que implicaron a este oligonucleótido, incluyendo cualquier artefacto que pudiera surgir. Se sometieron a prueba varias concentraciones diferentes de la proteína *uvsY(N)*. La disolución de reacción incluyó acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, creatina cinasa 100 ng/μl; cebador Up3 300 nM; cebador Down1 300 nM; ATP 3 mM, dNTP 200 μM, PEG 1450 al 10%, 50 U de fragmento de Klenow, 10 U de miocinasa de pollo, *uvsX(C)* 300 ng/μl, *gp32(C)* 300 ng/μl y *uvsY(N)* 50 ng/μl. El volumen final fue de 30 μl. Se incubó la disolución durante 5 horas a 37°C. A una concentración de *uvsY(N)* de 50 ng/μl, se detectó el producto correcto directamente, aunque débilmente, tras 3 horas de incubación. Durante este periodo hubo una acumulación de bandas fuertes de aproximadamente el doble de la longitud del oligonucleótido, que se acumularon de manera similar en la muestra sin molde. Fueron lo más probablemente artefactos de cebadores.

La figura 33 muestra cómo pueden surgir artefactos de cebadores. Los artefactos de cebadores se inician probablemente mediante acontecimientos de auto-cebado erróneos tal como se representa en este caso. Los cebadores pueden formar horquillas, tal como sucede en la figura 33A, o hibridarse con un segundo cebador, tal como sucede en la figura 33B. Si una polimerasa puede extender una horquilla de este tipo, puede formarse un tramo significativo de ADN bicatenario, tal como se observa en A* y B*. Estas estructuras pueden convertirse en

dianas para otros filamentos cargados con recombinasa, valorar filamentos activos a partir de dianas auténticas, y posiblemente entrar por sí mismas en formas geométricas de amplificación.

La figura 34 muestra la supresión de artefactos de cebadores. Se representan esquemáticamente varias estrategias para suprimir el ruido de artefactos de cebadores. En la figura 34A, se incluye un segundo oligonucleótido bloqueado en 3', corto, complementario a las secuencias en 3' del oligonucleótido de selección como diana, en la reacción para competir por la formación de estructura secundaria que puede dar como resultado cebado erróneo. En las figuras 34B y 34C, se emplea un oligonucleótido bloqueado corto similar al de (A), pero en este caso se diseña por ingeniería un puente covalente entre el extremo 5' del oligonucleótido de selección como diana y el extremo 5', o 3', del cebador corto de competición. De esta manera, se ancla el nucleótido bloqueado en su extremo 5' al extremo 5' del oligonucleótido de selección como diana (figura 34A-B). En la figura 34D, se añade una secuencia corta complementaria a la región en 3' del oligonucleótido de selección como diana a la región en 5' del oligonucleótido de selección como diana. Compite eficazmente con la formación de estructura secundaria.

La figura 35 muestra la utilización de oligonucleótidos de horquilla para estimular el auto-cebado de cadenas desplazadas. Se representa un esquema que muestra cómo pueden utilizarse oligonucleótidos cuyo diseño incluye una sección en 5' con complementariedad perfecta con la sección en 3' para estimular la amplificación mediante auto-cebado. En la parte superior del diagrama se muestra un ADN diana, denominado A, que presenta extremos diferenciados que son dianas para uno de los dos oligonucleótidos de selección como diana mostrados en la parte superior izquierda y derecha de la figura. Ambos de estos oligonucleótidos presentan complementariedad entre sus regiones en 5' y 3' tal como se indica mediante flechas cortas. La diana, A, se habrá generado probablemente mediante acontecimientos de invasión/elongación anteriores que implican a estos oligonucleótidos y una diana inicial que carece de las regiones más en 5' de estos oligonucleótidos. En el lado izquierdo o derecho de la figura se sigue el desenlace de acontecimientos de invasión/elongación iniciados mediante selección como diana por parte de los cebadores izquierdo o derecho, respectivamente. El desenlace es similar en ambos casos, aunque los productos finales están dispuestos de manera ligeramente diferente.

Centrándose en el lado izquierdo de la figura, se observa que cuando la diana A se somete a invasión y elongación con el cebador izquierdo, el resultado es la formación de un nuevo dúplex idéntico a A y un ADN monocatenario equivalente a la cadena superior de la diana inicial, denominada B. Debido a la presencia de la complementariedad entre la región más en 3' y secuencias adyacentes, B puede formar una horquilla que cebará la síntesis de ADN para generar un producto C ampliamente bicatenario. El producto C puede seleccionarse como diana fácilmente una vez más por el oligonucleótido izquierdo. Sin embargo, en este caso, no se forma ninguna cadena desplazada monocatenaria. En vez de eso, se forma producto D con una longitud que es aproximadamente el doble de la de la diana original. Este producto es una repetición invertida y contiene dos secuencias que son dianas para el oligonucleótido izquierdo, y una para el oligonucleótido derecho ubicada en el centro.

Acontecimientos de invasión/elongación posteriores, y la posible aparición de acontecimientos de hibridación entre cadenas desplazadas, pueden conducir fácilmente a que tales especies "diméricas" se agranden adicionalmente, y a la formación generalmente de productos más complejos. Se muestra un transcurso similar de acontecimientos en el lado derecho de la figura, esta vez iniciado por la invasión/elongación por el cebador derecho. El producto dimérico final, D', no es equivalente a D ya que las dos secuencias de extremo son dianas para el cebador derecho, y la región central es una diana para el cebador izquierdo. Es probable que se produzcan procedimientos similares o idénticos a los mostrados en este caso con cierta frecuencia en algunas condiciones incluso en ausencia del diseño deliberado de oligonucleótidos para fomentarlo, ya que con frecuencia hay alguna capacidad limitada de auto-cebado de ADN monocatenarios.

La figura 36 muestra condiciones que soportan la amplificación de ADN con pocos o ningún artefacto de cebadores. Se muestran los resultados de un experimento en el que se investigó la sensibilidad de una reacción de RPA con una diana de ADN compleja. Se proporciona una representación esquemática de la secuencia de ADN, que corresponde a parte del gen de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) humana. Los oligonucleótidos utilizados fueron el cebador Angio1bio biotinilado y el cebador Angio3 no biotinilado, cuya secuencia se facilita en los procedimientos experimentales. Estos cebadores amplificaron un fragmento de ADN bicatenario de 132 pb. Se valoró ADN genómico humano no cortado desde 45 copias hasta 2880 copias. Se detectaron productos de reacción gracias a la presencia de un residuo de biotina fijado al extremo 5' de uno de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación. De esta manera, era posible visualizar todos los productos de reacción que implicaban a este oligonucleótido, incluyendo cualquier artefacto que pueda surgir.

Se incubó la reacción durante 2 horas a 37°C en el caso de Klenow exo-, y 2 horas a 42°C en el caso de la polimerasa de Bst. La reacción incluyó lo siguiente: uvsY(N) 50 ng/μl, gp32(C) 300 ng/μl, uvsX(C) 100 ng/μl, fosfocreatina 20 mM, ATP 3 mM, miocinasa 25 miliunidades/μl, creatina cinasa 100 ng/μl, dNTP 200 μM, compuesto de PEG al 5% p/v, cebador Angio1bio 300 nM, cebador Angio3 300 nM, Klenow exo- 800 ng/μl o polimerasa de Bst 1,2 unidades/μl. Se realizó la amplificación mediada por Klenow en tampón U2 que comprendía una composición final de Tris acetato pH 7,9 20 mM, acetato de magnesio 8 mM, acetato de potasio 120 mM. Se realizó la amplificación mediada por polimerasa de Bst en tampón U1 que comprendía una composición final de Tris acetato pH 7,5 20 mM, acetato de magnesio 6 mM, acetato de potasio 100 mM.

Ejemplo 13: amplificación de ADN para aplicaciones de punto de utilización

Se produjeron clones y proteínas tal como se describió en el ejemplo 11, anterior.

ADN utilizados en reacciones de RPA

Se emplearon varios ADN diana diferentes en este estudio, y varios oligonucleótidos. A continuación se facilita la secuencia de los oligonucleótidos, y la diana de molde en el experimento mostrado en la figura 39B. Se utilizó la diana de gen de RuvB de *E. coli* para el ensayo de ejecución lineal (figura 39B). Se cortaron cantidades idénticas de molde de plásmido que contenía este fragmento o bien con EcoRV, liberando fragmentos de aproximadamente 300 pb, o bien con ClaI que linealiza el ADN. Se utilizaron cantidades molares iguales de molde en los experimentos de ejecución (20 nM cada molde). A continuación se facilita la secuencia de un fragmento de KpnI/ClaI de este molde. El fragmento de EcoRV se incrusta dentro de esta secuencia, y los sitios se destacan.

**GGTACCACTTTGCCGGAAGATGTAGCAGATCGCGCCATTCGCCCAAATTAC
 TGGAAGAGTATGTTGGTCAGCCGAGGTTTCGTTACAGATGGAGATTTTCATCAAAG
 CAGCGAAACTGCGCGGCGATGCCCTCGATCATTTGTTGATTTTTGGTCCTCCGGGGT
 TGGGTA AAACTACGCTTGCCAACATTGTCGCCAATGAAATGGGCGTTAATTTACGC
 ACGACTTCTGGTCCGGTCTGGAAAAGGCGGGCGATTTGGCTGCGATGCTCACTAA
 CTTGAACCGCATGACGTGCTGTTTATTGATGAGATCCACCGTCTATCGCCAGTTGT
 TGAAGAAGTGCTGTACCCGGCAATGGAAGACTACCAACTGGATATCATGATTGGTG
 AAGGTCCGGCGGCACGCTCCATTA AAATTGATTTGCCGCCGTTTACCCTGATTGGTG
 CAACCACGCGCGCAGGTTGCTGACATCACCGTTGCGCGACCGTTTGGTATTGTGC
 AACGTCTGGAGTTTATCAGGTGCCGGATCTGCAATATATCGTCAGTCGCAGCGCAC
 GCTTATGGGGCTTGAGATGAGTGATGACGGCGCGTGGAAAGTTGCTCGTCGCGCT
 CGCGGTACGCCGCGCATTGCCAACCGTCTGCTGCGTCGAGTGCCTGATTTCCGCCGAA
 GTGAAGCACGATGGCACCATCTCGGCAGATATCGCTGCTCAGGCGCTGGATATGTT
 GAATGTCGATGCTGAAGGTTTCGATTATATGGACCGCAAATTGTTGCTGGCGGTAAT
 CGAT (SEQ ID NO:18)**

Secuencia de oligonucleótido Tester3bio. Las bases homólogas a la diana están en negrita.

5'biotina-CTCACTATACCTCAGCATCATGATTGGTGAAGGTCCGGCGGCAC (SEC ID n°: 19).

ADN humanos

Se han utilizado ADN genómicos humanos de diversas fuentes. Se utilizó una población mixta de ADN genómico masculino de Promega. Además, se estudió ADN de muestras masculinas individuales en la figura 38A. Los individuos 1 y 2 eran padre e hijo. Se utilizó el ADN del individuo 2 en el experimento en la figura 39E, mientras que el ADN para el experimento en la figura 39F fue de otro individuo masculino. Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas para amplificar secuencias humanas y de *B. subtilis* son las siguientes:

Correspondientes al locus de apolipoproteína B humana:

- ApoB4 5' CAGTGTATCTGGAAAGCCTACAGGACACCAAAA 3' (SEC ID n°: 20)
- Apo300 5' TGCTTTCATACGTTTAGCCCAATCTTGGATAG 3' (SEC ID n°: 21)
- Apo700 5' TGGTAAACGGAAGTCTGGCAGGGTGATTCTCG 3' (SEC ID n°: 22)
- Apo800 5' CAATTGTGTGTGAGATGTGGGGAAGCTGGAAT3' (SEC ID n°: 23)
- Apo900 5' GAGGTGGTTCCATTCCCTATGTCAGCATTTGC 3' (SEC ID n°: 24)
- Apo1000 5' GGGTTTGAGAGTTGTGCATTTGCTTGAAAATC 3' (SEC ID n°: 25)
- Apo1500 5' TTGAATTTCAAGTTTAGAAAAGTTGAGGGAGCCAG 3' (SEC ID n°: 26)

Correspondientes al locus de SRY humana:

- SRY3 5' AAAGCTGTAAGTCTAAGTATCAGTGTGAAAC 3' (SEC ID n°: 27)
- SRY4 5' GTTGCCAGTTGCACTTCGCTGCAGAGTACC 3' (SEC ID n°: 28)

Correspondientes a ADN genómico de *B. subtilis*:

- BSA1 5' TTGGCACTTGGATATGATGGAAGTGGCAC 3' (SEC ID n°: 29)
- BSA3 5' ACAGAAAGCTATTAAGCAACTGACGGTGTGG 3' (SEC ID n°: 30)
- BSB3 5' CCATCTTCAGAGAACGCTTTAACAGCAATCC 3' (SEC ID n°: 31)

Cebadores de marcador de STR humanos:

CSF1PO 5' GTTGCTAACCACCCTGTGTCTCAGTTTTCTAC (SEC ID n°: 32)
 CSF1PO 3' AGACTCTCCACACACCACTGGCCATCTTCAGC (SEC ID n°: 33)
 D7S820 5' GAACACTTGTGCATAGTTTAGAACGAACTAACG (SEC ID n°: 34)
 D7S820 3' GAATTATAACGATTCCACATTTATCCTCATTGAC (SEC ID n°: 35)
 5 D13S317 5' TTGCTGGACATGGTATCACAGAAGTCTGGGATG (SEC ID n°: 36)
 D13S317 3' CCATAGGCAGCCCAAAAAGACAGACAGAAAAGA (SEC ID n°: 37)
 D16S539 5' AAACAAAGGCAGATCCCAAGCTCTTCCTTCC (SEC ID n°: 38)
 D16S539 5' ATACCATTTACGTTTGTGTGTGCATCTGTAAGC (SEC ID n°: 39)
 D18S51 5' GGTGGACATGTTGGCTTCTCTCTGTTCTTAAC (SEC ID n°: 40)
 10 D18S51 3' GGTGGCACGTGCCTGTAGTCTCAGCTACTTGC (SEC ID n°: 41)
 THO1 5' TACACAGGGCTTCCGGTGCAGGTCACAGGGA (SEC ID n°: 42)
 THO1 3' CCTTCCAGGCTCTAGCAGCAGCTCATGGTGG (SEC ID n°: 43)
 TPOX 5' ACTGGCACAGAACAGGCACTTAGGGAACCC (SEC ID n°: 44)
 TPOX 3' GGAGGAACCTGGGAACACACAGGTTAATTA (SEC ID n°: 45)

15 Experimento de transcurso de tiempo:

APOB600 GCTCACTGTTCTGCATCTGGTCAATGGTCTG (SEC ID n°: 46)
 APOB300REV CTATCCAAGATTGGGCTAAACGTATGAAAGCA (SEC ID n°: 47)

20 Experimento de oligonucleótido más corto:

APOB500 ATGGTAAATTCTGGTGTGGAAAACCTGGATGG (SEC ID n°: 48)
 AP0500-28 TAAATTCTGGTGTGGAAAACCTGGATGG (SEC ID n°: 49)
 25 AP0500-25 ATTCTGGTGTGGAAAACCTGGATGG (SEC ID n°: 50)
 APOB300REV CTATCCAAGATTGGGCTAAACGTATGAAAGCA (SEC ID n°: 51)
 APOB300REV-28 CCAAGATTGGGCTAAACGTATGAAAGCA (SEC ID n°: 52)
 APOB300REV-25 AGATTGGGCTAAACGTATGAAAGCA (SEC ID n°: 53)
 D18S51 5' GGTGGACATGTTGGCTTCTCTCTGTTCTTAAC (SEC ID n°: 54)
 30 D18551 5'-28 GACATGTTGGCTTCTCTCTGTTCTTAAC (SEC ID n°: 55)
 D18S51 5'-25 ATGTTGGCTTCTCTCTGTTCTTAAC (SEC ID n°: 56)
 D18S51 3' GGTGGCACGTGCCTGTAGTCTCAGCTACTTGC (SEC ID n°: 57)
 D1855 3'-28 GCACGTGCCTGTAGTCTCAGCTACTTGC (SEC ID n°: 58)
 D18S51 3'-25 CGTGCCTGTAGTCTCAGCTACTTGC (SEC ID n°: 59)
 35 SRY3 AAAGCTGTAAGTCTAAGTATCAGTGTGAAAC (SEC ID n°: 60)
 SRY3-28 GCTGTAAGTCTAAGTATCAGTGTGAAAC (SEC ID n°: 61)
 SRY3-25 GTAAGTCTAAGTATCAGTGTGAAAC (SEC ID n°: 62)
 SRY4 GTTGTCCAGTTGCACTTCGCTGCAGAGTACC (SEC ID n°: 63)
 SRY4-28 GTCCAGTTGCACTTCGCTGCAGAGTACC (SEC ID n°: 64)
 40 SRY4-25 CAGTTGCACTTCGCTGCAGAGTACC (SEC ID n°: 65)

Las condiciones de reacciones de RPA convencionales incluyeron: Tris pH 8,4 50 mM, acetato de potasio 80 mM, acetato de magnesio 10 mM, DTT 1 mM, compuesto de PEG al 5% (Carbowax-20 M), ATP 3 mM, fosfocreatina 20 mM, creatina cinasa 100 ng/μl, gp32 600 ng/μl; uvsX 109 ng/μl o 125 ng/μl o 200 ng/μl; uvsY 16 ng/μl o 25 ng/μl o 40 ng/μl o 60 ng/μl; polimerasa de Bsu 20 ng/μl, dNTP 200 μM y 300 nM de cada oligonucleótido. Las condiciones de reacción C1-C4 fueron como anteriormente con: C1 = uvsX 109 ng/μl, uvsY 16 ng/μl; C2 = uvsX 125 ng/μl, uvsY 25 ng/μl; C3 = uvsX 200 ng/μl, uvsY 40 ng/μl; C4 = uvsX 200 ng/μl, uvsY 60 ng/μl.

50 Resultados experimentales

La figura 37 muestra una representación esquemática de procedimiento de RPA. En la figura 37A(i), la proteína recombinasa uvsX se une cooperativamente a oligonucleótidos monocatenarios en presencia de ATP. Los filamentos de nucleoproteínas hidrolizan activamente ATP para dar ADP. El desensamblaje espontáneo puede conducir a unión competitiva de proteína de unión monocatenaria gp32, impidiéndose esto y ayudándose la nueva carga por la proteína uvsY y polietilenglicol. En la figura 37A(ii), los filamentos de recombinasa catalizan el intercambio de cadena si se detecta ADN homólogo. En la figura 37A(iii), el intercambio de cadena aparea la cadena de búsqueda con su complemento y desplaza una cadena entonces unida a gp32. Se desensambla la recombinasa. En la figura 37A(iv), las polimerasas acceden a la estructura y extienden el oligonucleótido, desplazando más de la cadena original. En la figura 37B (i), dos complejos de nucleoproteínas de selección como diana opuestos se recombinan con sus respectivas dianas y se inicia la síntesis de ADN. En la figura 37B(ii), los complejos de polimerasa se encuentran entre sí y una de las polimerasas se disocia. En la figura 37B (iii), la polimerasa restante continúa la síntesis liberando las dos cadenas originales, una polimerasa vuelve a unirse al extremo 3' libre y por tanto se produce la replicación de ambas cadenas. En la figura 37B(iv), se producen nuevos acontecimientos de selección como diana. En la segunda ronda un cebador de selección como diana desplazará un extremo libre. En la figura 37C, la comparación de los productos de intercambio de cadena en un extremo de ADN o en una secuencia de ADN incrustada.

La figura 38A muestra los resultados de amplificación de marcadores de STR a partir de dos individuos (1 y 2, padre e hijo) utilizando pares de cebadores para siete marcadores independientes. Se emplearon las condiciones de RPA C4 (véase anteriormente). La figura 38B muestra la valoración de componentes de reacción para determinar concentraciones que soportan la amplificación *in vitro*. Las reacciones incluyeron los cebadores SRY3 y SRY4 a 0,3 μ M (que seleccionan como diana el gen de SRY), acetato de potasio 80 mM, TrisCl pH 8,4 50 mM, DTT 2 mM, Carbowax-20M al 5%, uvsX 200 ng/ μ l, uvsY 60 ng/ μ l, gp32 600 ng/ μ l, polimerasa de Bsu 20 ng/ μ l y ADN cromosómico Y 50 copias/ μ l, excepto cuando un componente dado era el que estaba investigándose. Se determinaron cantidades óptimas de gp32, ATP, uvsX, uvsY, PEG y polimerasa de Bsu para una amplificación eficaz de este producto particular. ATP- γ -S y ADP- β -S inhibieron las reacciones.

La figura 39A muestra los límites de tamaño de reacciones de RPA. Se combinó el cebador ApoB4 con cebadores opuestos que podían generar productos amplificados de los tamaños indicados. Se emplearon las condiciones de uvsX 125 ng/ μ l y uvsY 25 ng/ μ l (C2) excepto C1 cuando se utilizaron uvsX 109 ng/ μ l y uvsY 16 ng/ μ l; se utilizó ADN humano 15 copias/ μ l (reacciones de 30 μ l). En las condiciones C2, se produjo algo de duplicación de producto mediada por horquilla convirtiendo parte del amplicón de 300 pb en 2x y 3x la longitud unitaria (*) (L. D. Harris, J. D. Griffith, J Mol Biol 206, 19-27 (5 de marzo de 1989)).

La figura 39B muestra eficacias de elongación a partir de secuencias incrustadas o de extremo. Se incubó un cebador biotilado con ADN de plásmido linealizado. Se utilizaron cantidades iguales (20 nM finales) de moldes linealizados o bien con Clal (carril 3) o bien con EcoRV (carriles 1 y 2), solapándose el cebador o bien con el extremo cortado, o bien con el sitio de diana que estaba incrustado (carril 3). La incubación con recombinasa que selecciona como diana componentes con (carriles 2 y 3) o sin (carril 1) Klenow revela una elongación limitada a partir del sitio incrustado (producto 1*), y una elongación abundante a partir del sitio de extremo (producto 2*). Se transfirieron productos sometidos a electroforesis a nailon y se detectó la biotina mediante quimioluminiscencia. La banda común débil (~300 pb, carriles 1 y 3) era un artefacto que surgía de este protocolo particular.

La figura 39C muestra la sensibilidad de reacciones de RPA. Se amplificó el número de copias indicado de genomas de *B. subtilis* con oligonucleótidos BsA1 y BsB3, que amplifican un fragmento de 200 pb. Se emplearon las condiciones C1. La figura 39D muestra ADN humano del número de copias indicado amplificado con cebadores ApoB4 y Apo300 para generar un fragmento de 300 pb. Se emplearon las condiciones C2. La figura 39E, F muestra resultados a partir de ADN humano de individuos individuales. Se diluyó el ADN y se amplificaron muestras que contenían teóricamente el número de copias indicado con cebadores D18S51 5' y 3' que amplifican una STR de ~300-360 pb de tamaño. A los números de copias predichos de 2 ó 3, varias muestras amplificaron alelos individuales (*). Las condiciones empleadas fueron C2 en (E), y C4 en (F).

La figura 40 muestra la especificidad de reacciones de RPA. Se incubaron los cebadores BsA3 y BsB3, que amplifican un fragmento de 380 pb a partir de ADN genómico de *B. subtilis*, con 1 μ g de ADN humano, con (+) o sin (-) adición de 100 copias de ADN de *B. subtilis* (figura 40A). Un asterisco indica la posición del producto de reacción esperado, y una flecha indica la posición del ADN genómico. Se emplearon las condiciones C3. Para investigar cuánto tarda la RPA en generar productos de reacción detectables, se estableció una serie de reacciones de amplificación con los oligonucleótidos Apo600bio y Apo300rev generando un fragmento de 345 pb. Se utilizó un número de copias de 60 copias/ μ l (figura 40B) o 6 copias/ μ l (figura 40C). Se detuvieron las reacciones individuales al número de minutos indicado y se analizaron sobre un gel. Se emplearon las condiciones C4 (figura 40D).

Para el almacenamiento a largo plazo de componentes de reacción, se liofilizaron las reacciones de RPA. Se ensamblaron mezclas de componentes de reacción en ausencia de los componentes indicados, PEG y tampón. Se liofilizó el material, y después se reconstituyó con PEG y tampón más los componentes omitidos adicionales. Se indican los cebadores utilizados. Todos los componentes, aparte de PEG y tampón, pudieron liofilizarse y reconstituirse satisfactoriamente en una reacción funcional. El ADN diana era ADN genómico masculino humano a 150 copias/ μ l (figura 40E). Se incubaron oligonucleótidos que seleccionaban como diana tres loci independientes en ADN genómico humano con pares de cebadores solapantes de 25, 28 ó 32 bases tal como se indica. Sólo los cebadores de 32 bases de longitud amplificaron satisfactoriamente las dianas. Otros experimentos muestran que los cebadores de 30 residuos también son eficaces en la amplificación de ADN diana.

La figura 41 muestra ruido de cebadores a un bajo número de copias de diana.

Se incubaron dos cebadores, BsA1 y BsB3 (BsA1 - 5'TTGGGCACTTGGATATGATGGAAGTGGCAC3' (SEC ID n^o: 29), BsB3 - 5'CCATCTTCAGAGAACGCTTTAACAGCAATCC3' (SEC ID n^o: 30)), que flanquean un fragmento de aproximadamente 300 pb del genoma de *Bacillus subtilis*, con ADN genómico de *B. subtilis* diluido en serie con agua. Las condiciones utilizadas fueron acetato de potasio 80 mM, Tris.Cl pH 8,4 50 mM, DTT 2 mM, Carbowax 20M al 5%, dNTP 200 μ M, ATP 3 mM, fosfocreatina 20 mM, creatina cinasa 50 ng/ μ l, 300 nM de cada oligonucleótido, gp32 800 ng/ μ l, uvsX 120 ng/ μ l, uvsY 25 ng/ μ l y polimerasa de Bsu 28 ng/ μ l. Se incubó la reacción durante 90 minutos a 37°C. Se separaron los productos sobre un gel de agarosa al 2,5% y se tiñeron con bromuro de etidio. Las flechas indican la posición esperada del amplicón correcto.

La figura 42 detalla la selección de cebadores óptimos combinando una selección de cebadores directo e inverso candidatos y sometiendo a prueba el desenlace a densidades de copias de partida muy bajas.

Se diseñaron varios pares de cebadores para secuencias en el locus de esporulación SpoOB de *Bacillus subtilis*. La posición y la orientación de estos cebadores se indica en (B) tal como sigue:

J1 ACGGCATTAACAAACGAAGTTCATCTGCTTGG - SEC ID n°: 66
 J2 ATAACCATTTCTTCAATCATTTCAAAGACACGGTC - SEC ID n°: 67
 K1 TATAGACGCAAAGCACGAATCAAAGCTCTCAAACC - SEC ID n°: 68
 K2 CCTTAATTTCTCCGAGAACTTCATAT - SEC ID n°: 69
 L1 ATATGAAGTTCTCGGAGAAATTAAGGATTTGTCCG - SEC ID n°: 70
 L2 AATCAGCTGTCTGTCAGGATGATCCGTTTGAAGCG - SEC ID n°: 71
 NEST1 CATTAACAAACGAAGTTCATCTGCTTGG - SEC ID n°: 72
 NEST2 ACAGATGAAACAGCTTTCTCATCAGTTTCG - SEC ID n°: 73.

Se combinaron estos cebadores tal como se indica en (A), y se incubaron durante 90 minutos en las siguientes condiciones: acetato de potasio 80 mM, Tris.Cl pH 8,4 50 mM, DTT 2 mM, Carbowax 20M al 5%, dNTP 200 μM, ATP 3 mM, fosfocreatina 20 mM, creatina cinasa 50 ng/μl, 300 nM de cada oligonucleótido, gp32 800 ng/μl, uvsX 120 ng/μl, uvsY 25 ng/μl y polimerasa de Bsu 28 ng/μl, ADN genómico de *B. subtilis* ~2 copias/μl (estimado mediante dilución en serie), 37°C. Las flechas indican la posición de productos que se determina que son el fragmento esperado basándose en el tamaño. Algunos pares de cebadores proporcionan producto, pero esto estuvo acompañado por manchas o algunas bandas adicionales. Algunas combinaciones no lograron proporcionar producto del tamaño esperado. El cebador J1 y K2 proporciona una cantidad significativa del producto del tamaño esperado, y de manera bastante limpia. De manera interesante, cuando el cebador NEST1, que carece de las 4 bases más en 5' presentes en J1, sustituye a J1 en la reacción equivalente, la reacción no mejora lo que indica que añadir así como eliminar bases puede mejorar el rendimiento del cebador incluso cuando todos los sometidos a prueba presentan más de 30 residuos de longitud.

La figura 43 muestra una consideración teórica de cómo se inicia el ruido de cebadores.

(A) Se muestra un oligonucleótido, y encima del mismo hay una flecha, indicando la cabeza el extremo 3' del oligonucleótido. La secuencia se generó arbitrariamente, aunque 4 de las 5 bases más en 3' forman un palíndromo, que en la práctica podrá evitarse fácilmente (B) Se supone que la mayor parte de los acontecimientos iniciales consisten en que el extremo 3' se pliega transitoriamente sobre secuencias más en 5' para formar transitoriamente un par de bases de Watson-Crick. (C) Ocasionalmente una polimerasa elonga satisfactoriamente esta estructura para dar una horquilla bicatenaria larga con un giro en un extremo (marcado H). La secuencia y el sentido de 5'-3' del complemento inverso del original se indican mediante una flecha blanca. (D) En la estrategia 1 se supone que un segundo oligonucleótido recubierto con recombinasa de secuencia idéntica selecciona como diana el cuerpo bicatenario homólogo de la horquilla, por tanto desenredándolo. Se producen apareamientos erróneos en la región en 3' del oligonucleótido invasor porque el complemento para esta sección no se generó correctamente en la etapa C. Si no se hubiera generado fortuitamente un palíndromo de 4 pares de bases los apareamientos erróneos serían incluso más graves que lo mostrado en este caso. (E) Una polimerasa, muy ocasionalmente, puede extender la región en 3' con apareamiento erróneo de este producto intermedio para generar una repetición invertida con apareamientos erróneos en el centro. Esta estructura también se parecería al producto si dos cebadores idénticos hubieran formado un breve solapamiento en 3' dando como resultado la formación de un dímero de cebador. Estas estructuras no pueden entrar fácilmente en una amplificación en fase geométrica. (F) En la estrategia 2, la horquilla larga formada en (C) se abre brevemente en un extremo. Esta etapa puede potenciarse mediante la unión de recombinasa a ADNbc porque algunos informes indican que recA puede unirse a ADNbc y fomentar la fusión de dúplex cortos. (G) El extremo 3' fundido de manera transitoria (complemento inverso al extremo 5' original del oligonucleótido) se pliega de vuelta de una manera similar a (B) y forma una estructura que puede elongarse. (H) La elongación por polimerasa crea una horquilla grande. En este caso un extremo contiene una secuencia dúplex idéntica al oligonucleótido original. (I) Otro oligonucleótido original invade la diana dúplex perfecta. (J) La elongación por polimerasa de (I) genera una gran repetición invertida con la estructura indicada. Ambos extremos contienen sitios diana de cebador perfectos y por tanto esta estructura puede amplificarse exponencialmente. Resulta interesante que la estructura de repetición invertida significa que si se produce una invasión y elongación desde un extremo, la cadena desplazada tenderá rápidamente a plegarse de vuelta sobre sí misma para formar la estructura mostrada en (H). Este producto requerirá otro acontecimiento de recombinación para convertirse en la estructura (J), y por tanto puede resultar que una actividad de recombinación superior beneficie particularmente a la amplificación de ruido, y se impide fuertemente mediante una actividad de recombinación inferior.

La figura 44 muestra varias estrategias de diseño de oligonucleótidos para mejorar la relación señal-ruido en reacciones de RPA

Se muestran tres estrategias generales para mejorar las relaciones señal-ruido en reacciones de RPA mediante aspectos de diseño de oligonucleótidos. (1) Pueden someterse a prueba oligonucleótidos progresivamente acortados. La suposición es que acortar un oligonucleótido progresivamente desde el extremo 5' conduce a una

disminución de la actividad del filamento de nucleoproteína respectivo, y que esto influye en el tiempo de duplicación de artefactos ruidosos más rápidamente que en el de la diana. También pueden combinarse eficazmente filamentos de nucleoproteínas con baja actividad con otros más activos en algunos casos. (2) Pueden incluirse ácidos nucleicos bloqueados, u otros azúcares modificados, en los cebadores con efecto consecuente sobre el comportamiento de amplificación. Se indica la estructura de un azúcar de ácido nucleico bloqueado (ANB). (3) Puede mejorarse el comportamiento de oligonucleótidos mediante la adición de residuos en 5', posiblemente no relacionados con la diana, que suprimen el ruido mediante mecanismos tales como impidiendo el cebado de recuperación rápida, o alterando la actividad de recombinación de la nucleoproteína. Las secuencias pueden ser tramos homopoliméricos, o de otro modo. Pueden determinarse empíricamente las secuencias ideales.

La figura 45 muestra las consecuencias de reducir la longitud de cebador

(A) Descripción esquemática del diseño experimental. Se sintetizaron pares de oligonucleótidos para tres dianas humanas, y se prepararon conjuntos de cebadores en los que se delecionaron progresivamente los residuos más en 5' (los cebadores de longitud completa se han descrito anteriormente: D18S51 5' GGTGGACATGTTGGCTTCTCTCTGTTCTTAAC (SEC ID n°: 54), D18S51 3' GGTGGCACGTGCCTGTAGTCTCAGCTACTTGC (SEC ID n°: 57), SRY3 5' AAAGCTGTAAGTCTAAGTATCAGTGTGAAAC 3' (SEC ID n°: 27), SRY4 5' GTTGTCCAGTTGCACTTCGCTGCAGAGTACC 3' (SEC ID n°: 28), APOB500 ATGGTAAATTCTGGTGTGGAAAACCTGGATGG (SEC ID n°: 48), APOB300REV CTATCCAAGATTGGCTAAACGTATGAAAGCA (SEC ID n°: 51). Se prepararon cebadores más cortos delecionando las bases más en 5' para proporcionar la longitud indicada final). Se combinaron pares de cebadores de longitud idéntica en reacciones de amplificación de la manera indicada. (B) Se realizaron reacciones de amplificación con ADN genómico humano, presente en la reacción de partida a 50 copias/μl. Las tres dianas, un marcador de STR D18S51II, parte del gen de SRY humano, y el locus de apolipoproteína B humana, se amplificaron con pares de oligonucleótidos. Se truncaron progresivamente los oligonucleótidos desde el extremo 5' de la manera tal como se describió en (A), y la longitud de ambos cebadores en los pares de cebadores utilizados se indica encima del carril respectivo. Resulta evidente que hay una disminución bastante empinada del comportamiento de amplificación a medida que se acortan los oligonucleótidos desde justo por encima hasta justo por debajo de 30 residuos. Por consiguiente, generalmente es probable que la comparación de oligonucleótidos con una variación de longitud de justo por encima a justo por debajo de 30 residuos revele la longitud óptima para conseguir una amplificación específica suficiente, pero poco o ningún fondo. Por ejemplo dos 29-meros fueron suficientes para amplificar el locus de D18S51 II, y hacerlo de manera limpia. Las condiciones de amplificación fueron: Tris.Cl pH 8,3 50 mM, acetato de magnesio 90 mM, DTT 2 mM, acetato de potasio 80 mM, dNTP 200 μM, gp32 600 ng/μl, uvsX 200 ng/μl, uvsY 60 ng/μl, cebadores 300 nM, polimerasa de Bsu 20 ng/μl, ADN genómico 50 copias/μl, 90 minutos a 37°C.

La figura 46 muestra cómo residuos de ANB en 3' alteran el comportamiento de amplificación en RPA

Se muestra la amplificación de una parte del locus de ACE humana utilizando una combinación de oligonucleótidos regulares y equivalentes en los que el residuo más en 3' presenta un azúcar de ANB. (A) Representación esquemática de la relación de cebadores oligonucleotídicos entre sí. LNA1 y DNA1 son idénticos excepto porque LNA1 contiene un azúcar de ANB en la posición más en 3'. Del mismo modo, LNA2 y DNA2 se diferencian de manera similar. (La secuencia de LNA/DNA1 es: GCTCCTTGGACTGGTAGATGTCACACTTGTG - SEC ID n°: 74, la secuencia de LNA/DNA2 es GCCTTGGCTCTGCTGTGCGCATGTGACTTAGC - SEC ID n°: 75). (B) Se ensamblaron reacciones de RPA con las combinaciones de cebadores oligonucleotídicos indicadas. Los niveles de producto se reducen significativamente cuando ambos oligonucleótidos contienen un ANB en 3' en condiciones de reacción convencionales. Sin embargo, la sustitución de tan sólo un oligonucleótido no suprime la reacción en gran medida (carriles 2 y 3). Obsérvese que el patrón de fondo en el carril 3 se parece al del carril 4, mientras que en 2 está ampliamente ausente. Esto sugiere que el fondo se deriva principalmente de las actividades de una única especie de cebador. Las condiciones de amplificación fueron: Tris.Cl pH 8,3 50 mM, acetato de magnesio 90 mM, DTT 2 mM, acetato de potasio 80 mM, dNTP 200 μM, gp32 800 ng/μl, uvsX 200 ng/μl, uvsY 60 ng/μl, cebadores 300 nM, polimerasa de Bsu 20 ng/μl, ADN genómico 50 copias/μl, 120 minutos a 37°C. (C) Aumentar los niveles de polimerasa da como resultado la restauración de actividad robusta cuando se utilizan dos oligonucleótidos modificados con ANB. Se combinaron LNA1 y LNA2, o DNA1 y DNA2, en presencia de las concentraciones indicadas de polimerasa. De manera notable, los cebadores de ADN presentaron una alta actividad a la menor concentración utilizada, y en cualquier caso los productos parecieron peores a medida que se aumentó la concentración de polimerasa. También se observan de manera notable productos cortos, de 50-100 pares de bases. A la inversa, los cebadores de ANB sólo fueron activos de manera óptima a concentraciones de polimerasa superiores. Se observaron menos productos pequeños, y los observados aparte del tamaño esperado están probablemente relacionados con el producto (véase a continuación). Las condiciones de amplificación fueron: Tris.Cl pH 8,3 50 mM, acetato de magnesio 90 mM, DTT 2 mM, acetato de potasio 80 mM, dNTP 200 μM, gp32 800 ng/μl, uvsX 200 ng/μl, uvsY 60 ng/μl, cebadores 300 nM, polimerasa de Bsu de 43 a 1400 ng/μl, ADN genómico 100 copias/μl, 120 minutos a 37°C. (D) Los oligonucleótidos modificados con ANB dieron poco, si es que dieron algo de, fondo cuando no estaba presente diana, pero amplificaron eficazmente producto auténtico a altos niveles cuando se optimizaron las condiciones de reacción. Se empleó una concentración de polimerasa de polimerasa de Bsu

200 ng/μl. Se llevaron a cabo las reacciones con pares de cebadores de ADN, o pares de cebadores de ANB, en presencia o ausencia de diana. Se encontró una banda débil del tamaño esperado en los controles negativos lo que indica un problema de contaminación. No obstante, ambos pares de cebadores amplificaron eficazmente en presencia de diana, pero en su ausencia el par de ADN proporcionó manchas ruidosas significativas, mientras que el par de ANB no proporcionó ningún otro producto aparte de la ligera contaminación. Esto indica que puede que el par de cebadores de ANB pueda distinguir de manera limpia entre la presencia y la ausencia de diana en la muestra, mientras que los cebadores de ADN generan productos derivados de cebador en ausencia de diana. Las condiciones de amplificación fueron: Tris.Cl pH 8,3 50 mM, acetato de magnesio 90 mM, DTT 2 mM, acetato de potasio 80 mM, dNTP 200 μM, gp32 800 ng/μl, uvsX 200 ng/μl, uvsY 60 ng/μl, cebadores 300 nM, polimerasa de Bsu 200 ng/μl, ADN genómico 50 copias/μl, 120 minutos a 37°C.

La figura 47 muestra que añadir tramos homopoliméricos a los extremos 5' de cebadores puede alterar la actividad de nucleoproteínas.

(A) Se muestra la secuencia de seis oligonucleótidos utilizados en el experimento. El oligonucleótido J1 y K2 selecciona como diana el locus SpoOB de *B. subtilis* (SEC ID n°: 66 y 69 respectivamente), y los otros oligonucleótidos indicados son derivados de los mismos, que llevan un tramo homopolimérico de citosinas, o guaninas tal como se indica. Estos oligonucleótidos pueden incubarse por parejas para evaluar qué par amplifica más eficazmente la diana. (B) Se muestran los resultados de incubar los seis cebadores solos, o en todas las combinaciones posibles. Se incubaron las reacciones a 37°C durante 2 horas. Las condiciones de reacción fueron Tris.Cl pH 8,4 50 mM, DTT 2 mM, Carbowax 20M al 5%, acetato de potasio 80 mM, dNTP 200 μM, ATP 3 mM, fosfocreatina 20 mM, creatina cinasa 50 ng/μl, 300 nM de cada oligonucleótido relevante, gp32 800 ng/μl, uvsX 120 ng/μl, uvsY 25 ng/μl y polimerasa de Bsu 28 ng/μl, ADN genómico de *B. subtilis* ~1 copia/μl (estimado mediante dilución en serie) (volumen de reacción de 20 μl). Los pares de cebadores óptimos fueron J1+K2, y después J1C+K2C. En general un tramo de citosina homopolimérico pareció preparar filamentos de nucleoproteínas más activos, y un tramo de guanosa menos activos.

La figura 48 muestra los efectos de betaína sobre reacciones de RPA

Se establecieron reacciones de RPA en las que estaba presente una concentración creciente de betaína en cada reacción. La concentración de betaína de 0,5 M, o superior, en este experimento redujo el grado de amplificación. A 0,75 M la banda de producto esperado todavía era claramente visible, sin embargo se había prevenido la mayor parte de las manchas presentes en algunas muestras. Se cree que la reducción de las manchas supera con creces la reducción de producto, lo que concuerda con la posibilidad de que pueden emplearse niveles de betaína para mejorar las relaciones señal-ruido. Las condiciones de amplificación fueron: Tris.Cl pH 8,3 50 mM, acetato de magnesio 90 mM, DTT 2 mM, acetato de potasio 80 mM, dNTP 200 μM, gp32 600 ng/μl, uvsX 200 ng/μl, uvsY 60 ng/μl, 300 nM de cebadores ApoB4 y Apo300 (SEC ID n°: 20 y 21), polimerasa de Bsu 40 ng/μl, ADN genómico 2,5 copias/μl, 120 minutos a 37°C.

La figura 49 muestra combinación estrategias que implican oligonucleótidos con diferentes actividades de nucleoproteína.

(A) Se explican resumidamente estrategias de anidamiento de reacciones individuales. Un par externo de filamentos de nucleoproteínas activos amplifica rápidamente ADN, aunque estos cebadores también pueden ser bastante ruidosos. El par de cebadores externo puede mantenerse a una concentración relativamente baja, lo bastante baja como para no poder alcanzar niveles de producto detectables en gel. Los oligonucleótidos internos son menos activos, pero mucho más limpios. Estos oligonucleótidos internos se mantienen a altos niveles. Puede ajustarse la actividad alterando la longitud, composición y carácter de estructura principal tal como se detalla en esta descripción. Los cebadores externos enriquecen rápidamente la diana en la muestra, por ejemplo mediante una amplificación de un millón de veces. Los cebadores internos, al ser lentos pero limpios, generan poco/ningún ruido, pero son menos sensibles. El enriquecimiento de diana mediante los cebadores externos es suficiente para permitir una acumulación de producto robusta mediante la acción de los cebadores internos lentos en un marco temporal apropiado. (B) Se muestran esquemas de amplificación en los que se combina un cebador activo con un cebador menos activo. Mientras que el cebador activo puede participar en ruido a bajas concentraciones de diana, el oligonucleótido más lento no participa en artefactos, y por tanto si se somete a prueba la asociación de los cebadores al final de la reacción esto puede determinar de manera limpia si la diana estaba presente o ausente en la muestra.

La figura 50 describe varios protocolos de detección. Se muestran esquemáticamente tres estrategias sencillas mediante las cuales puede evaluarse la amplificación de una diana sin necesidad de electroforesis en gel. En todos los casos se utiliza un cebador que puede fijarse a una fase sólida para permitir su separación de reactivos a granel, y que puede lavarse. En la figura un residuo de biotina en uno de los cebadores representa este cebador inmovilizable, sin embargo pueden utilizarse otras químicas de fijación. (1) Un cebador es inmovilizable, y el otro contiene un marcador de alguna descripción, por ejemplo una enzima. (2) Uno de los cebadores de amplificación está marcado de alguna manera, y el cebador inmovilizable es un tercer cebador, que reconoce secuencias dentro de los amplicones principales. Este tercer cebador puede estar presente en el entorno de reacción durante la amplificación principal, pero puede diseñarse por ejemplo para ser silencioso (por ejemplo por ser corto), o puede

añadirse sólo al final de la reacción. (3) Se emplea un tercer cebador. Sin embargo, en este caso la sonda inmovilizable se refiere a uno de los cebadores de amplificación, pero contiene residuos en 5' adicionales que permiten capturar de manera estable amplicones en el extremo de la reacción, a medida que la extensión por polimerasa del extremo 3' del complemento en el amplicón (es decir, síntesis de "activación inversa") crea un dúplex estable no sujeto a migración de ramificaciones si se eliminan las proteínas de reacción mediante lavado.

La figura 51 muestra una estrategia de enriquecimiento con tercera sonda: Captura de perlas, parte I. Esquema de la estrategia experimental en la que una tercera sonda enriquece productos auténticos derivados de la diana

(A) Representación esquemática de la relación entre cebadores. Se indica un sitio de enzima de restricción PstI, ubicado en el centro de los cebadores NEST3-28 (GGATGAATAAGCTGCAGCTGATTAAGG - SEC ID n°: 76) y NEST3-26 (ATGAATAAGCTGCAGCTGATTAAGG - SEC ID n°: 77) que son homólogos a una secuencia amplificada generada por el cebador J1 y K2 (SEC ID n°: 66 y 69 respectivamente, véase anteriormente). (B) Ilustración de la inmovilización de una versión biotinilada en 5' de N3-26 que se une a partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina. (C) Esquema para un experimento de captura. Se establece una reacción de amplificación en la que se combinan los oligonucleótidos J1 y K2 en fase de disolución con el cebador N3-26 inmovilizado sobre una perla. Se incubó la reacción durante 90 minutos, y cada 20 minutos se dispersan las perlas mediante giros rápido (sólo se sedimentan muy lentamente en la disolución de reacción de PEG al 5%). Al final del periodo de incubación se concentran las perlas utilizando un imán, y se retira el sobrenadante para su análisis. Se lavan las perlas dos veces rápidamente con agua, y después se incuban durante 30 minutos a 37°C con exceso de enzima PstI en tampón apropiado. Una vez más, se retira el sobrenadante y se analiza.

La figura 52 muestra una estrategia de enriquecimiento con tercera sonda: Captura de perlas II. Resultados experimentales que demuestran que un filamento de nucleoproteína de baja actividad inmovilizado sobre un soporte sólido puede participar como tercer cebador y separar amplicones diana de ruido de cebadores.

(A) Representación esquemática de la relación entre cebadores. Se indica un sitio de enzima de restricción PstI, ubicado en el centro de los cebadores N3-28 y N3-26. (B) Se realizó la amplificación de ADN de *B. subtilis* en presencia (panel inferior) o ausencia (panel superior) de ADN diana a 2 copias/µl. El carril 1 contiene un marcador de tamaño. Los cebadores J1 y K2 amplifican eficazmente su diana en presencia de pocas copias de ADN genómico diana (panel inferior, carril 2), sin embargo en ausencia de diana en la muestra generan una mancha tal como se demuestra en el panel superior, carril 2. Los oligonucleótidos N3-28 y N3-26 son homólogos a secuencias ligeramente en 3', y en el mismo sentido, a J1. N3-28 es un 28-mero, y N3-26 es un 26-mero que carece de las dos bases más en 5' de N3-28. La incubación conjunta de cebadores N3-28 o N3-26 con J1 y K2 da como resultado la generación de dos productos principales correspondientes al producto de J1/K2, y el producto de N3-28/K2 o N3-26/K2 esperado (panel inferior, carriles 3 y 4). Cuando se incubó N3-28 solo, genera algo de manchas, pero N3-26 incubado solo no lo hace. Se deduce que N3-26 es un oligonucleótido "silencioso" y puede basarse significativamente en la hibridación con cadenas desplazadas a partir de la elongación de cebadores más activos con el fin de generar productos. (C) Los resultados de un experimento llevado a cabo tal como se detalla esquemáticamente en la figura 51, y utilizando una densidad de diana de partida de 30 copias/µl. Carril 1, marcador de tamaño. Carril 2 y 3, productos de una reacción completamente en fase líquida (sin inmovilización de N3-26) realizada sin (carril 2) o con (carril 3) diana. Esto es eficazmente equivalente a los carriles 4 de los paneles superior e inferior de (A). Los carriles 4 y 5 contienen el primer sobrenadante retirado tras la incubación de amplificación, sin y con diana respectivamente. Tal como se espera, hay producto en la reacción que contiene diana, y no se observa el producto más pequeño derivado de la utilización del cebador N3-26 (inmovilizado sobre la perla). También hay una mancha, tal como se esperaba, en la muestra sin diana. Los carriles 6 y 7 contienen el sobrenadante tras la digestión con PstI de las perlas lavadas. De manera interesante, la mancha en la muestra sin diana no está presente, sin embargo en la muestra con diana hay ADN. Los productos liberados de las perlas parecen comprender el producto de N3-26/K2 esperado, movilidad ligeramente más rápida que en el carril 3 debido a corte con PstI, así como producto de J1/K2 no cortado que se ha purificado conjuntamente. Quizás no es sorprendente que algo del producto de J1/K2 se purifique conjuntamente porque pueden haberse formado híbridos entre tales productos y los oligonucleótidos y productos inmovilizados en perlas. Sin embargo, es sorprendente que este material no se haya cortado aparentemente por la enzima PstI. Se desconoce el motivo para esta extraña observación, pero puede indicar que estos productos estaban presentes en híbridos que eran resistentes a la digestión, o conducían a la formación de mellas en tan sólo una cadena de estos productos.

La figura 53 muestra que la trehalosa estabiliza liofilizados para permitir que todos los componentes excepto la muestra tamponada permanezcan activos durante al menos 10 días a temperatura ambiente.

Se ensamblaron las reacciones de RPA utilizando cebadores específicos para el locus de apolipoproteína B humana. En general, la composición de reacción final fue de Tris.Cl pH 8,4 55 mM, DTT 1 mM, acetato de potasio 80 mM, Carbowax 20M al 5%, dNTP 200 µM, ATP 3 mM, fosfocreatina 20 mM, creatina cinasa 100 ng/µl, oligonucleótido ApoB4 y Apo300 300 nM (SEC ID n°: 20 y 21 respectivamente), gp32 600 ng/µl, uvsX 200 ng/µl, uvsY 60 ng/µl y polimerasa de Bsu 17 ng/µl, ADN genómico humano ~160 copias/µl. Sin embargo, no se incluyeron Tris.Cl pH 8,4 55 mM y acetato de potasio 80 mM en el liofilizado, sino que se añadieron de nuevo con la muestra de ADN durante la reconstitución. Además también se omitieron determinados componentes de los liofilizados

detallados a continuación. Condición A, sin trehalosa utilizada, Carbowax añadido con ADN de muestra (no en el liofilizado), polimerasa añadida con ADN de muestra. Condición B, trehalosa 50 mM incluida en el liofilizado, Carbowax añadido con ADN de muestra, polimerasa añadida con ADN de muestra. Condición C, trehalosa 50 mM en el liofilizado, polimerasa añadida con la muestra. Condición D, trehalosa 50 mM en el liofilizado, sólo se añade ADN de muestra tamponado para la reconstitución. Tras un almacenamiento de 3, 6 ó 10 días en la mesa a temperatura ambiente, y sin condiciones de almacenamiento especiales (por ejemplo utilización de desecantes, etc.) se sometió a prueba la actividad de los liofilizados añadiendo los reactivos que faltaban al aglomerado seco en un volumen final de 50 µl. La condición de reacción D en cada caso careció tan sólo del ADN de muestra en tampón de reacción (Tris.Cl 55 mM y acetato de potasio 80 mM). Sólo si estaba presente trehalosa en el liofilizado las reacciones fueron estables, pero en esos casos las reacciones permanecieron estables durante al menos 10 días. No se investigaron periodos más largos por estar agotándose el material de prueba, pero puede ser posible.

Ejemplo 14: Pueden monitorizarse reacciones de RPA en tiempo real para permitir la evaluación del número de copias de diana de partida

La figura 54 muestra cómo se evaluaron los colorantes fluorescentes SYBR gold y SYBR green para determinar sus compatibilidades en reacciones de RPA, y sus propiedades de monitorización de la reacción. (A) Disposición de los cebadores ApoB4 y Apo300 (SEC ID n°: 20 y 21 respectivamente) que flanquean un fragmento del locus de apolipoproteína B humana. (B) Puede incluirse SYBR gold en reacciones de RPA a diluciones de 1:50.000 o más sin inhibición completa de la reacción. Las reacciones estuvieron compuestas por Tris pH 8,4 50 mM, acetato de potasio 80 mM, dATP, dCTP, dGTP y dTTP 200 µM, creatina cinasa 50 ng/µl, ATP 1,5 mM, acetato de magnesio 10 mM, DTT 2 mM, fosfocreatina 30 mM, cebador ApoB4 300 nM, cebador ApoB300 300 nM, Carbowax 20M al 5%, gp32 360 ng/µl, uvsX 86 ng/µl, uvsY 15 ng/µl, polimerasa de Bsu 35 ng/µl. Se incluyó SYBR gold a la dilución indicada en la reacción. (C) Se establecieron reacciones de RPA en una placa de 96 pocillos, cada uno con un volumen final de 50 µl. Se estableció en hielo una mezcla maestra de componentes que carecía tan sólo del ADN diana y del colorante SYBR gold. Se sometieron a prueba cinco diluciones diferente de SYBR gold, con diluciones finales a partir de disolución madre de 1:50.000, 1:60.000, 1:70.000, 1:80.000 y 1:100.000. Para cada dilución se investigaron densidades de copias de diana de partida de 2 y 20 copias por microlitro (ADN genómico humano diluido en TE hasta la densidad de copias esperada). Una vez mezcladas exhaustivamente las reacciones en hielo, se transfirió la placa a la placa previamente calentada (37°C) de un lector de microplacas fluorescente BIO-TEK FLX 800. Se recogieron lecturas cada 1 minuto, y se utilizaron 300 ng de ADN genómico humano diluido en 50 µl de agua como patrón de sensibilidad para el dispositivo. Se transfirieron los datos a Microsoft Excel y se trazó la fluorescencia relativa (arbitraria) frente al tiempo de incubación para cada reacción. (D) Se estableció un experimento como en (C) excepto porque se sometió a ensayo SYBR green en vez de SYBR gold.

La figura 55 muestra que la RPA en tiempo real demuestra un comportamiento cuantitativo a lo largo de cuatro órdenes de magnitud utilizando SYBR green. Figura 55 (A), disposición de cebadores utilizados en este análisis. (B) Se establecieron reacciones de RPA en placas Microwell de 96 pocillos, con un volumen final de 50 µl por volumen de reacción, utilizando cebadores específicos para el locus SpoOB de *B. subtilis* J1 y K2 (J1 - 5'-ACGGCATTAAACAACGAAGTTCATCTGCTTGG-3' SEC ID n°: 66, K2 - 5'-CCTTAATTTCTCCGAGAACTTCATATTCAAGCGTC-3' SEC ID n°: 69). Se transfirió con pipeta un número de copias definido de ADN genómico de *Bacillus subtilis* a pocillos en la placa de 96 pocillos, y se almacenó en hielo. Se mezcló una mezcla maestra de reacción en hielo, y después se extrajeron alícuotas en los pocillos que contenían ADN y se mezclaron bien. Entonces se transfirieron las reacciones a la placa previamente calentada de un lector de microplacas fluorescente BIOTEK FLX 800 (fijado a 38°C). La composición de reacción fue de Tris pH 8,4 50 mM, acetato de potasio 80 mM, acetato de magnesio 10 mM, DTT 2 mM, dATP, dCTP, dGTP y dTTP 200 µM, creatina cinasa 50 ng/µl, ATP 1,5 mM, fosfocreatina 30 mM, cebador BsJ1 300 nM, cebador BsK2 300 nM, Carbowax 20M al 5%, gp32 360 ng/µl, uvsX 86 ng/µl, uvsY 15 ng/µl, polimerasa de Bsu 35 ng/µl y dilución 1:50.000 de la disolución madre en DMSO de SYBR green de Molecular Probes. Se muestran los resultados de dos experimentos equivalentes en (B) y (C). Tras terminarse las reacciones se diluyeron 7 µl de las reacciones con 1x tampón de carga de sacarosa y se separaron sobre un gel de agarosa al 2% (D, E). Obsérvese que cuando se utilizó la mayor concentración de diana la fluorescencia se volvió detectable antes de lo esperado, pero no logró mostrar un aumento exponencial duradero. Esto puede surgir debido al consumo de reactivos de reacción (se utilizó gp32 a concentraciones inferiores a la típica en este experimento), o a una acumulación de inhibidor, o de otro modo. Experimentos posteriores sugieren que esto puede surgir debido a valoración inferior a la real de gp32/uvsX. Véase a continuación. Además, hubo algunas evidencias de contaminación de producto en (B) sugeridas por la débil presencia de la banda esperada en el gel de análisis de punto final (D).

La figura 56 muestra que las reacciones de RPA pueden evaluar cinéticamente un número de copias de ADN genómico de *B. subtilis* de al menos 5 órdenes de magnitud. Se establecieron reacciones de RPA utilizando los cebadores J1 y K2 de *Bacillus subtilis* como en la figura 55. Sin embargo se aumentó la cantidad de reactivos de proteína de la siguiente manera: se utilizó gp32 a 600 ng/µl, se utilizó uvsX a 140 ng/µl, se utilizó uvsY a 35 ng/µl y se utilizó ATP a 3 mM. Los volúmenes de reacción se aumentaron hasta un volumen final de 100 µl, y se utilizó un intervalo mayor de concentraciones de ADN genómico (desde 0,1 hasta 100.000 copias/µl). No se observó ninguna estabilización temprana de las muestras con número de copias superior, y se cree que esto refleja que en los experimentos anteriores se habían valorado gp32 y uvsX de manera algo inferior a la real. Tras terminarse las

reacciones se diluyeron 7 µl de las reacciones con 1x tampón de carga de sacarosa y se separaron sobre un gel de agarosa al 2%.

La figura 57 muestra que la RPA en tiempo real demuestra respuesta cuantitativa a la variación en el número de copias de ADN genómico humano. Figura 57 (A), disposición de cebadores ApoB4 y Apo300 que amplifican una secuencia de ADN humano. (ApoB4 - 5'-CAGTGTATCTGGAAAGCCTACAGGACACCAAAA3' SEC ID n°: 20, Apo300 - 5'-TGCTTTCATACGTTTAGCCCAATC TTGGATAG3' SEC ID n°: 21). (B) Se establecieron reacciones de RPA en placas Microwell de 96 pocillos, con un volumen final de 100 µl por volumen de reacción. Se transfirió con pipeta un número de copias definido de ADN genómico humano a pocillos en la placa de 96 pocillos, y se almacenaron en hielo. Se mezcló una mezcla maestra de reacción en hielo, y después se extrajeron alícuotas en los pocillos que contenían ADN y se mezclaron bien. Entonces se transfirieron las reacciones a la placa previamente calentada de un lector de microplacas fluorescente BIOTEK FLX 800. La composición de la reacción fue de Tris pH 8,4 50 mM, acetato de potasio 80 mM, acetato de magnesio 10 mM, DTT 2 mM, dATP, dCTP, dGTP y dTTP 200 µM, creatina cinasa 50 ng/µl, ATP 1,5 mM, fosfocreatina 30 mM, cebador ApoB4 300 nM, cebador Apo300 300 nM, Carbowax 20M al 5%, gp32 360 ng/µl, uvsX 86 ng/µl, uvsY 15 ng/µl, polimerasa de Bsu 35 ng/µl y dilución 1:50.000 de la disolución madre en DMSO de SYBR green de Molecular Probes. Obsérvese que, como en el ejemplo 2 (C), la mayor concentración de diana generó una curva que se estabilizó de manera inesperadamente temprana. Como con la figura 55, estos experimentos se realizaron en condiciones de concentraciones de uvsX, uvsY, gp32, ATP y dNTP que pueden requerir delicadeza para garantizar una fase exponencial detectable robusta a concentraciones de diana superiores. Esto se soporta por (C), en el que se realizó un experimento similar al de (B), excepto porque las concentraciones de determinados reactivos fueron las siguientes: se utilizó gp32 a 600 ng/µl, se utilizó uvsX a 140 ng/µl, se utilizó uvsY a 35 ng/µl, se utilizó ATP a 3 mM. Tras terminarse las reacciones se diluyeron 7 µl de las reacciones con 1x tampón de carga de sacarosa y se separaron sobre un gel de agarosa al 2%.

25 **Ejemplo 15: RPA con cebadores asimétricos utilizando un cebador con el extremo ocupado con ANB en 3'**

Como ejemplo de amplificación de un ADN diana utilizando el procedimiento de RPA con cebadores asimétricos, se emplearon condiciones de RPA convencionales con dos diferencias. En primer lugar, un cebador es un cebador con el extremo ocupado con ANB en 3'. En segundo lugar, se utiliza una polimerasa adicional, de phi29, que no puede iniciar la síntesis a partir de productos intermedios de recombinasa.

Por tanto, las condiciones de amplificación son las siguientes:

35 Tris.Cl pH 7,85 50 mM
 acetato de magnesio 10 mM
 ditiotreitól 2 mM
 acetato de potasio 80 mM
 compuesto de PEG al 5% (Carbowax 20M)
 40 fosfocreatina 15 mM
 ATP 3 mM
 dNTP 200 µM
 creatina cinasa 12 ng/µl
 oligonucleótido 1, con el extremo ocupado con ANB en 3' 0,3 µM
 oligonucleótido 2 0,3 µM
 45 gp32 de T4 350 ng/µl
 uvsX de T4 100 ng/µl
 uvsY de T4 20 ng/µl
 polimerasa de Bsu 20 ng/µl
 polimerasa de phi29 (exo-, o atenuada para exo-) 20 ng/µl
 50 Incubación a 33-40°C durante de 30 minutos a 2 horas

Ejemplo 16: Iniciación de RPA en tiempo real con desprotección de ATP enjaulado

55 Como ejemplo de la utilización de RPA pulsada por ATP para cuantificar ADN de molde introducido, se ensamblan reacciones como reacciones de RPA convencionales con varias diferencias. En primer lugar, se utiliza ATP enjaulado en lugar de ATP. En segundo lugar, se utiliza un reactivo de detección de ADN bicatenario, SYBR green, para cuantificar productos de RPA. Se diseñan cebadores de tal manera que se generan productos de reacción cortos (<200 pb), para garantizar la síntesis completa con cada pulso de ATP.

60 Por tanto, las condiciones de amplificación son las siguientes:

65 Tris.Cl pH 7,85 50 mM
 acetato de magnesio 10 mM
 ditiotreitól 2 mM
 acetato de potasio 80 mM
 compuesto de PEG al 5% (Carbowax 20M)

ATP enjaulado 3 mM
 dilución 1:50.000 de disolución madre comercial de SYBR-green I (Molecular Probes)
 dNTP 200 µM
 oligonucleótido 1 0,3 µM
 oligonucleótido 2 0,3 µM
 gp32 de T4 600 ng/µl
 uvsX de T4 150 ng/µl
 uvsY de T4 25 ng/µl
 polimerasa de Bsu 20 ng/µl
 Incubación a 33-40°C.

Antes de cada ciclo de desenjaulado de ATP, se mide la fluorescencia de SYBR-green I (excitación máxima a 494 nm - emisión máxima a 521 nm) en la muestra. La fluorescencia detectada será la base de la cuantificación. Cada minuto se aplica un pulso corto de luz a 365 nm para desenjaular ATP, conduciendo a una ráfaga de actividad recombinasa. Entonces se compara la fluorescencia medida en cada ciclo con un patrón de molde introducido y puede determinarse la cantidad de molde de muestra introducido.

El ejemplo 17 describe la utilización de ATP enjaulado para controlar la iniciación de RPA en un análisis de colonias

Como ejemplo de análisis de colonias basado en RPA, se generan geles de poliacrilamida sobre portaobjetos de microscopio tal como se describe por Church y colaboradores [Mitra R, Church G (1999) *In situ* localized amplification and contact replication of many individual DNA molecules. Nucl Acids Res 27(24): e34i-vi.]. En este análisis se detectan productos polimórficos distintos tras una amplificación inicial mediante extensión de una única base utilizando nucleótidos fluorescentes y cebadores específicos de diana polimórfica. Una diferencia entre esta configuración y el análisis de colonias normales es que puede no ser necesario utilizar los cebadores modificados con acridita en 5', ya que la RPA se realiza a una temperatura constante baja y durante tiempos significativamente más cortos (normalmente las reacciones de colonias basadas en PCR tardarán 3-7 horas). En este ejemplo, se utilizan tanto cebadores modificados con acridita en 5' como cebadores normales.

En lugar de la mezcla "de difusión" de PCR, se utiliza una mezcla de "difusión" de RPA y comprende lo siguiente:

Tris.Cl pH 7,85 50 mM
 acetato de magnesio 10 mM
 ditiotreitól 2 mM
 acetato de potasio 80 mM
 compuesto de PEG al 5% (Carbowax 20M)
 fosfocreatina 15 mM (incluida dependiendo de la configuración)
 dNTP 200 µM
 * ATP enjaulado 3 mM (incluido dependiendo de la configuración)
 creatina cinasa 12 ng/µl (incluida dependiendo de la configuración)
 oligonucleótido 1 0,3 µM
 oligonucleótido 2 0,3 µM
 gp32 de T4 350 ng/µl
 uvsY de T4 100 ng/µl
 uvsY de T4 20 ng/µl
 polimerasa de Bsu 20 ng/µl

Entonces se inicia la reacción o bien difundiendo en ATP, o bien activando ATP enjaulado incluido en la mezcla "de difusión" original. Se generan colonias tras la incubación a 33-40°C durante de 30 minutos a 2 horas.

Tras la amplificación, se difunde un nuevo cebador de diana polimórfico junto con nucleótidos marcados de manera fluorescente, y vuelve a iniciarse la reacción con un pulso adicional de ATP, aplicado o bien manualmente o bien mediante fotólisis. Entonces puede cuantificarse la fluorescencia incorporada utilizando microscopía de fluorescencia.

Ejemplo 18: Determinación no basada en gel de número de repeticiones polimórficas en un amplicón utilizando formación de híbridos mediada por recombinasa entre ADN amplificado monocatenario y sondas dúplex

En este ejemplo se amplifica una STR mediante cebadores oligonucleotídicos flanqueantes. La STR es el marcador conocido como TPOX y utilizado comúnmente en conjuntos de marcadores de STR convencionales tanto en los USA como en Europa utilizados para análisis forense. El marcador se amplifica mediante cebadores flanqueantes con la secuencia para el cebador 1 de 5'-ACTGGCACAGAACAGGCACTTAGGGAACCC-3', y cebador 2 5'-GGAGGAAGTGGGAACACAGGTTAATTA-3'. El marcador presenta una repetición de 4 nucleótidos, AATG, que varía entre 5 y 14 repeticiones.

Las condiciones de amplificación son las siguientes:

- 5 Tris.Cl pH 7,85 50 mM
- acetato de magnesio 10 mM
- ditiotreitól 2 mM
- acetato de potasio 80 mM
- compuesto de PEG al 5% (Carbowax 20M)
- fosfocreatina 15 mM
- 10 ATP 3 mM
- dNTP 200 µM
- creatina cinasa 12 ng/µl
- oligonucleótido 1, marcado con fluoresceína en 5' 0,3 µM
- oligonucleótido 2 0,05 µM
- 15 gp32 de T4 600 ng/µl
- uvsX de T4 150 ng/µl
- uvsY de T4 35 ng/µl
- polimerasa de Bsu 20 ng/µl
- 20 Incubación a 33-40°C durante de 30 minutos a 2 horas.

La reacción de amplificación genera una cantidad de ADN monocatenario debido al desequilibrio de cebador, y este ADN monocatenario está marcado de manera fluorescente. Al final de la reacción de amplificación se pone la mezcla de reacción en contacto directamente con una matriz de sondas bicatenarias inmovilizadas espacialmente. Cada sonda corresponde a una de las formas polimórficas conocidas del ADN que está estudiándose, y presenta la misma longitud que el amplicón que se prepararía si existiera esta forma en la muestra.

La recombinasa se carga sobre el ADN de muestra monocatenario amplificado para formar filamentos de búsqueda de homología. Estos filamentos podrán seleccionar como diana las sondas bicatenarias inmovilizadas sobre la superficie de soporte de la matriz. Cuando se produce un acontecimiento de recombinación entre el producto de amplificación recubierto con recombinasa y las sondas, esto conducirá a que el producto de amplificación experimente apareamiento de bases de Watson-Crick de manera productiva con su complemento en la sonda, mientras que la cadena equivalente originalmente apareada se desplaza y se libera a la disolución. De manera ideal la terminación de tales acontecimientos de recombinación se inhibirá si el acontecimiento se inicia entre un ADN de muestra y una sonda con apareamiento imperfecto conduciendo a un enriquecimiento sólo de híbridos perfectos.

La reacción es dinámica de tal manera que los híbridos formados entre sonda y muestra pueden convertirse en sí mismos en dianas para otros ADN de selección como diana. Este comportamiento dinámico acoplado con una eficacia inferior de terminación de la recombinación de híbridos formados de manera imperfecta debe conducir a un enriquecimiento de los híbridos perfectos en la población de mezclas de sonda/muestra. Esto se potencia adicionalmente mediante la adición o bien de una helicasa tal como PriA de *E. coli* (2-20 ng/µl), DnaB de *E. coli* (5-50 ng/µl), RuvAB de *E. coli* (5-50 ng/µl), helicasa dda de fago T4 (5-50 ng/µl), gp41 de fago T4 (5-50 ng/µl) o bien una nucleasa apropiada. Estos agentes utilizan, o potencian, alteraciones en la hélice, que existen debido a apareamientos erróneos, y conducen a que tales híbridos imperfectos sean menos estables que los híbridos perfectos.

Tras un periodo de incubación adecuado, tal como 10-30 minutos a 28-40°C, se termina la reacción si es necesario, por ejemplo, mediante la adición de EDTA o agentes caotrópicos tales como urea o clorhidrato de guanidina, aunque puede no ser necesaria una terminación de este tipo. Entonces se miden interacciones productivas entre sonda y muestra exponiendo la matriz a luz de una longitud de onda apropiada, y registrando la fluorescencia utilizando filtros apropiados y una cámara.

El ejemplo 19 muestra una determinación no basada en gel de número de repeticiones polimórficas en un amplicón que utiliza una formación de híbridos basada en recombinasa entre ADN amplificado dúplex y sondas monocatenarias

Como anteriormente, este ejemplo implicará la amplificación del marcador de STR TPOX utilizado en la ciencia forense. Las condiciones de amplificación serán las mismas que para el ejemplo 18 excepto porque la razón de cebadores de amplificación será de 1:1, utilizándose ambos a una concentración de 0,3 µM. Entonces se pone la reacción de amplificación en contacto con una matriz de sondas monocatenarias correspondientes a las formas polimórficas posibles conocidas del ADN que está estudiándose. Con este formato la recombinasa se carga preferentemente sobre las sondas que entonces buscan y forman híbridos con los ADN de muestra bicatenarios. Como en el ejemplo 18, los híbridos se enriquecerán de manera ideal si son perfectos, y de manera similar la inclusión de agentes tales como helicasas (por ejemplo PriA, recG, DnaB, RuvAB, gp41 o dda) o nucleasas apropiadas puede acelerar y mejorar este enriquecimiento. Tras un periodo de incubación adecuado, con o sin parada de la reacción según sea necesario, se visualizan las interacciones tal como se describió en el ejemplo 18.

El ejemplo 20 muestra una determinación no basada en gel del número de repeticiones polimórficas en un amplicón utilizando formación de híbridos mediada por recombinasa y procesamiento mediante nucleasa de heterologías para liberar un marcador a partir de un punto de inmovilización

5 En este ejemplo la reacción de amplificación y la formación de híbridos entre sonda y muestra se realizan tal como se describió en el ejemplo 1, excepto porque los cebadores de amplificación no necesitan contener un marcador. Se marca la sonda en lugar de la muestra en un extremo. Tras un periodo de incubación apropiado, tal como se describió para los ejemplos 18 y 19, se tratan matrices con una nucleasa apropiada, que escindirá dúplex de ADN imperfectos. Dado que tales cortes se realizan en la estructura principal de híbridos imperfectos y por tanto se libera el marcador a partir de un punto de inmovilización. Adicionalmente puede incluirse una ADN polimerasa de tal manera que si se introduce una mella por la nucleasa, y la polimerasa está desplazando la cadena, entonces actúa para sintetizar de una manera con desplazamiento de cadena y así retira por consiguiente la cadena marcada. Entonces puede cuantificarse la matriz tal como se describió en el ejemplo 18.

15 El ejemplo 21 muestra una determinación no basada en gel del número de repeticiones polimórficas en un amplicón utilizando formación de híbridos mediada por recombinasa y procesamiento mediante nucleasa de heterologías seguido por marcaje de síntesis de ADN

20 En este ejemplo la amplificación y la formación de híbridos son como para o bien el ejemplo 18 o bien el ejemplo 19 excepto porque los cebadores de amplificación no están necesariamente marcados. Durante la fase de formación de híbridos se incluye una nucleasa que forma mellas en burbujas o alteraciones de hélice y la inclusión en la reacción de nucleótidos marcados y una polimerasa de desplazamiento de cadena conduce a que los híbridos imperfectos se procesen para obtener una forma de híbrido perfecto que incluye bases marcadas modificadas que entonces pueden visualizarse.

25 El ejemplo 22 muestra la utilización de una helicasa para alterar híbridos imperfectos en un entorno de sistema de recombinación dinámica

30 En este ejemplo la amplificación y la formación de híbridos se realizan como para o bien el ejemplo 18 o bien el ejemplo 19 excepto porque los cebadores de amplificación no están necesariamente marcados. Sin embargo, la sonda o el ADN de muestra deben contener un marcador. La sonda o el ADN de muestra se inmovilizan en un extremo sobre un soporte sólido o perla mediante una interacción no covalente de alta afinidad tal como una interacción biotina-estreptavidina. Durante la fase de formación de híbridos se incluye una helicasa tal como la helicasa dda de T4, o una combinación de helicasas tal como helicasas PriA y dda, u otras mezclas, para seleccionar como diana híbridos imperfectos y desenrollarlos, acelerando eficazmente la disociación de la interacción no covalente de alta afinidad mediante alteración física. Tras un periodo de incubación adecuado se mide la asociación entre el ácido nucleico marcado y el soporte sólido, indicando una señal positiva que se han formado híbridos perfectos.

40 La figura 58 muestra en principio cómo híbridos imperfectos presentarán burbujas que permiten una alteración de dúplex global potenciada en un entorno de recombinación dinámica

45 Un amplicón bicatenario mostrado en A que contenía 8 repeticiones de una repetición en tándem corta y flanqueado por secuencias únicas para la amplificación, se selecciona como diana en B por oligonucleótidos de sonda monocatenarios que contienen números variables de la unidad de repetición. La hibridación se impulsa mediante recombinasa (no mostradas en este caso). En C se muestran los híbridos bicatenarios resultantes, algunos de los cuales contienen burbujas provocadas por números de repeticiones no idénticos entre híbridos. Estas burbujas son más grandes a medida que aumenta en número el número de repeticiones diferentes, y por tanto tales híbridos se convierten en mejores dianas para la recombinasa, u otras enzimas de procesamiento de ADN.

50 La figura 59 muestra el posible desenlace de una reacción de hibridación tal como se describió en el ejemplo 18, mostrado en la figura 58. Se incubaba un ADN de muestra que contiene 8 repeticiones con una matriz de sondas correspondientes a diferentes números de repeticiones. A lo largo del tiempo se enriquecen híbridos para números de repeticiones perfectos, y menos pero en un pequeño grado aquellos que sólo se diferencian en una o dos repeticiones.

La figura 60 muestra cómo de fácil pueden realizarse reacciones de RPA para evaluar la presencia de especies de ARN específicas incluyendo una enzima que puede realizar transcripción inversa en la reacción.

60 Se incubaron los números de copias definidos de ARN de MS2 viral (de una fuente comercial) en reacciones de RPA que incluyeron transcriptasa inversa tal como se indica. Se emplearon dos cebadores que reconocieron la secuencia de MS2 tal como se indica, más específicamente estos cebadores fueron:

MS2up2 TTCCGACTGCGAGCTTATTGTTAAGGCAATG - SEC ID n°: 78

65 MS2down2 CTTAAGTAAGCAATTGCTGTAAAGTCGTCAC - SEC ID n°: 79

Las condiciones de reacción fueron convencionales excepto por una concentración aumentada de dNTP (500 μ M), un aumento de DTT, la inclusión de inhibidor de ARNasa y la inclusión de transcriptasa inversa cuando se indica. Las condiciones fueron:

- 5 Tris.Cl pH 8,5 50 mM
 acetato de magnesio 10 mM
 ditiotreitól 10 mM
 acetato de potasio 80 mM
 compuesto de PEG al 5% (Carbowax 20M)
- 10 fosfocreatina 15 mM
 ATP 3 mM
 dNTP 500 μ M
 creatina cinasa 100 ng/ μ l
 MS2UP 0,3 μ M
- 15 MS2DOWN 0,3 μ M
 gp32 de T4 800 ng/ μ l
 uvsX de T4 120 ng/ μ l
 uvsY de T4 30 ng/ μ l
 polimerasa de Bsu 70 ng/ μ l
- 20 inhibidor de ARNasa 0,13 unidades/ μ l
 transcriptasa inversa de MuMLV (que contiene ARNasa H) 10 unidades/ μ l (Promega)

Se extrajeron con fenol los productos de las reacciones, se precipitaron y se separaron sobre un gel de acrilamida no desnaturante antes de la tinción con SYBR-gold. Pueden detectarse fácilmente concentraciones de ARN de tan sólo 100 copias por microlitro en este formato sin optimización adicional.

La figura 61 muestra que puede utilizarse dUTP para sustituir parcial o completamente a dTTP en reacciones de RPA, ofreciendo así una estrategia para controlar la contaminación cruzada.

30 Se establecieron reacciones de RPA utilizando las siguientes condiciones:

- Tris.Cl pH 8,5 50 mM
 acetato de magnesio 10 mM
 ditiotreitól 2 mM
- 35 acetato de potasio 100 mM
 compuesto de PEG al 5% (Carbowax 20M)
 fosfocreatina 15 mM
 ATP 3 mM
 dNTP (dA, dC y dG) 200 μ M
- 40 creatina cinasa 100 ng/ μ l
 cebador J1 para ADN de *B. subtilis* (SEC ID n^o: 66) 0,3 μ M
 cebador K2 para ADN de *B. subtilis* (SEC ID n^o: 69) 0,3 μ M
 gp32 de T4 630 ng/ μ l
 uvsX de T4 140 ng/ μ l
- 45 uvsY de T4 35 ng/ μ l
 polimerasa de Bsu 20 ng/ μ l
 ADN genómico de *B. subtilis* 100 copias/ μ l

Se separó el producto de reacciones sobre un gel de agarosa al 2% y se tiñó con bromuro de etidio. Tal como se indica en los paneles más a la izquierda, se empleó dUTP o dTTP en diferentes reacciones. Más específicamente, el carril superior más a la izquierda contenía dTTP 200 μ M, y por tanto era típico de una reacción de RPA convencional. Los seis carriles siguientes también contenían dTTP 200 μ M, pero en este caso también estaba presente dUTP a las concentraciones indicadas. Los últimos seis carriles del panel inferior más a la izquierda contenían los productos de reacciones de RPA en los que no se incluyó dTTP, y se utilizó la concentración indicada (dUTP 50-800 μ M) de dUTP. En todos los casos se produjo la amplificación del fragmento esperado, pero de manera notable la presencia de dUTP disminuyó la cantidad de amplicón generado, e inhibió el fenómeno de "duplicación" observado con frecuencia en el que se producía síntesis por recuperación rápida.

El panel más a la derecha indica los resultados de utilizar como material de partida productos generados a partir de las primeras reacciones en el panel más a la izquierda tras el procesamiento tal como se indica en el esquema. Más específicamente, se procesaron las reacciones mostradas como A, B, C, D y E en los paneles más a la izquierda de la siguiente manera. Basándose en la intensidad de tinción y la estimación del contenido de ADN, se incubaron de manera estimada 10^6 moléculas de cada producto durante 20 minutos con 1 μ l de una preparación comercial (Roche) de dUTP-desglicosilasa termolábil, se dejó una cantidad similar sin tratar, y después finalmente se calentaron todas las muestras hasta 94°C durante 10 minutos. Se controló la calidad de enzima por el fabricante para combatir eficazmente la contaminación cruzada a partir de 10^5 moléculas, por tanto en este caso se impuso una

exposición rigurosa. Entonces se utilizaron las muestras para sembrar una reacción de RPA configurada en condiciones de RPA normales con 200 μM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP (véanse las condiciones anteriormente). Tal como se indica las muestras no tratadas con dUTP-desglicosilasa fueron excelentes moldes de partida, mientras que aquellas que se habían tratado fueron extremadamente malas a menos que no se empleara inicialmente nada de dUTP. En particular incluso las combinaciones mixtas fueron eficaces.

La figura 62 muestra cómo puede combatirse la contaminación cruzada en el sistema de RPA.

Puede utilizarse la capacidad para emplear dUTP en reacciones de RPA para impedir la contaminación cruzada según el esquema representado. Las reacciones de RPA se realizarán con dUTP puro, o mezclas de dTTP y dUTP, tal como se muestra en la figura 61. Antes, o en el inicio, de una reacción de RPA, se incubará uracil desglicosilasa (UDG) de *E. coli* o similar con la muestra y atacará el material de contaminación cruzada. Después, tras varios minutos, o al inicio de la reacción, se añadirá un inhibidor de UDG. Se conoce un inhibidor específico de UDG de *E. coli* denominado inhibidor de uracil glicosilasa (UGI) y es un péptido de 9,5 kD de *Bacillus subtilis*, y está disponible comercialmente.

La figura 63 muestra cómo puede configurarse un sistema desechable integrado sencillo para permitir pruebas rápidas de punto de utilización para determinar la presencia de secuencias de ADN específicas en una muestra. En (A) se proporciona una descripción esquemática de una reacción de RPA/tira reactiva de flujo lateral desechable que puede colocarse en un calentador económico que puede suministrar aproximadamente 30-39°C en la proximidad de una bolsa de reacción que contiene reactivos de RPA secados. Se supone que la muestra procesada/lisada se utilizará para rehidratar el contenido de la bolsa en un volumen apropiado, y después se incubará la bolsa a una temperatura apropiada durante 15-60 minutos, según sea necesario. Posteriormente, se transferirá parte o la totalidad de la muestra a la almohadilla de muestra de una tira reactiva de flujo lateral, configurada de tal manera que sólo si se han formado los amplicones correctos se formará una línea visible en una posición específica en la tira. En (B) se muestra la disposición de dos cebadores oligonucleotídicos utilizados para una reacción de RPA realizada con ADN masculino y femenino, respectivamente. Se utilizaron los oligonucleótidos SRY3 y SRY4, y uno contenía un resto de fluoresceína en 5', y el otro un resto de biotina en 5'. Al final de la reacción se mezcló 1/500 de una reacción de 50 μl con "tampón de corrida" (Milenia, Alemania) y se aplicó a una tira reactiva de flujo lateral disponible comercialmente (Milenia, Alemania) de tal manera que sólo los productos en los que la fluoresceína y la biotina estaban asociadas conjuntamente (es decir en un producto de amplificación) condujeron a la acumulación de partículas doradas visibles en la línea de detección. En (C) se muestra el resultado de este experimento. Sólo la reacción realizada con ADN masculino genera la línea de señal, y la eficacia de la reacción de amplificación se validó por separado sobre geles de agarosa (datos no mostrados).

La figura 64 muestra que las reacciones de RPA no se ven inhibidas por la presencia de materiales en sangre con la condición de que se empleen razones apropiadas de reactivos.

Se investigó la capacidad de amplificar un fragmento de ADN genómico a partir de sangre completa y lisada añadida directamente a reacciones de RPA. Se configuraron las reacciones de RPA tal como sigue:

Tris.Cl pH 8,5 50 mM
 acetato de magnesio 10 mM
 ditiotreitól 2 mM
 acetato de potasio 80 mM
 compuesto de PEG al 5% (Carbowax 20M)
 fosfocreatina 25 mM
 ATP 3 mM
 dNTP 200 μM
 creatina cinasa 100 ng/ μl
 oligonucleótido ApoB4 (SEC ID n°: 20) 0,3 μM
 oligonucleótido ApoB300 (SEC ID n°: 21) 0,3 μM
 gp32 de T4 420 ng/ μl
 uvsY de T4 140 ng/ μl
 uvsY de T4 35 ng/ μl
 polimerasa de Bsu 20 ng/ μl

En (A), se añadió o bien 1 μl de agua o bien 1 μl de sangre humana completa reciente a una reacción de RPA. Se separaron los productos sobre un gel de agarosa al 2%, y una flecha indica la posición del amplicón esperado. Estuvieron presentes artefactos de "cebadores" no específicos en control de agua, y en la muestra, y supuestamente surgen como consecuencia de la ausencia de, o de muy pocas, copias de diana. Se deduce que estaban disponibles muy pocas copias de ADN genómico para la amplificación en la amplificación de muestra de sangre. En (B) se analizaron muestras en las que se había mezclado en primer lugar 1 μl de sangre con 1 μl , 2 μl , 3 μl , 4 μl o 5 μl de una disolución de lisis que comprendía Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaOH 120 mM, SDS al 0,1% (tal como se indica). En cada caso se utilizó 1 μl del lisado respectivo para iniciar una reacción de RPA (por tanto los lisados con más tampón contenían menos muestra de sangre por amplificación). También se muestran las muestras a partir del

mismo experimento en las que sólo se utilizó agua (carril 1), o ADN purificado equivalente a 500 copias de diana (Promega) (carril 7) para sembrar la reacción de amplificación. Cuando se utilizaron 4 µl o 5 µl de tampón de lisis, la lisis de glóbulos rojos era claramente visible y la disolución se volvió viscosa. Se observó que estas muestras se volvieron excelentes materiales de partida para reacciones de RPA, liberando supuestamente la mayor parte del ADN como moldes accesibles.

La figura 65 muestra cómo puede emplearse la monitorización en tiempo real de reacciones de RPA para optimizar las reacciones.

En este caso se establecieron reacciones de RPA utilizando el par de cebadores J1 y K2 mencionado anteriormente, y molde que consistía en ADN genómico de *Bacillus subtilis* (densidad de partida de 1 copia por microlitro). Se varió o bien la concentración de acetato de potasio o bien la concentración de compuesto de PEG. Otras condiciones fueron, a menos que se especifique lo contrario:

Tris.Cl pH 8,5 50 mM
 acetato de magnesio 10 mM
 ditiotreititol 2 mM
 acetato de potasio 80 mM (o tal como se indique)
 compuesto de PEG al 5% (Carbowax 20M) (o tal como se indique)
 fosfocreatina 25 mM
 ATP 3 mM
 dNTP 200 µM
 creatina cinasa 100 ng/µl
 cebador oligonucleotídico J1 (SEC ID n°: 66) 0,3 µM
 oligonucleótido K2 (SEC ID n°: 69) 0,3 µM
 gp32 de T4 620 ng/µl
 uvsX de T4 140 ng/µl
 uvsY de T4 35 ng/µl
 dilución 1:50.000 a partir de disolución madre de SYBR green (Invitrogen)
 polimerasa de Bsu 20 ng/µl.

Al final de la reacción se mezcló una parte de los reactivos con tampón de carga de sacarosa y se separó sobre un gel de agarosa, y después se tiñó con bromuro de etidio. Se observó que una alta concentración de sal ralentiza la reacción, pero hay un amplio intervalo de concentraciones de sal que funcionan bien. También se observó que aumentar las concentraciones de PEG desde el 4% hasta el 9% dio como resultado un comportamiento de la reacción aún más rápido, sin embargo la aparición de productos en el sistema de gel se vio adversamente afectada por concentraciones de PEG superiores. Se supone que la aparición de manchas en muestras con alta concentración de PEG puede surgir de redes en curso de ADN generado por una actividad de recombinación muy alta. Aunque esto puede no ser deseable para el análisis en gel, puede ser perfectamente adecuado para el análisis en tiempo real utilizando fluorescencia.

La figura 66 muestra cómo se ven afectadas las reacciones de RPA por la concentración de magnesio.

Se establecieron reacciones de RPA en tiempo real de la siguiente manera:

Tris.Cl pH 8,5 50 mM
 acetato de magnesio 6, 10 ó 16 mM tal como se indica
 ditiotreititol 2 mM
 acetato de potasio 80 mM
 compuesto de PEG al 5% (Carbowax 20M)
 fosfocreatina 25 mM
 ATP 3 mM
 dNTP 200 µM
 creatina cinasa 100 ng/µl
 cebador oligonucleotídico J1 (SEC ID n°: 66) 0,3 µM
 cebador oligonucleotídico K2 (SEC ID n°: 69) 0,3 µM
 gp32 de T4 600 ng/µl
 uvsX de T4 120 ng/µl
 uvsY de T4 30 ng/µl
 polimerasa de Bsu 20 ng/µl
 dilución 1:50.000 a partir de disolución madre de SYBR green (Invitrogen)

Se indica la densidad de partida de ADN diana, ADN genómico de *Bacillus subtilis*, en copias por microlitro. En las muestras con acetato de magnesio 6 mM y 16 mM era evidente algo de contaminación cruzada cuando se comprobaron muestras en el punto final sobre geles de agarosa, y esto puede explicar en parte la escasa resolución entre una densidad de partida de ninguna y 1 copia por microlitro. Obsérvese que RPA es eficaz a todas las

concentraciones de magnesio sometidas a prueba, pero es mucho más rápida a medida que aumenta la concentración de magnesio. Los productos finales a partir de estas muestras con concentración de magnesio superior todavía parecen ser de alta calidad (datos no mostrados). Esto indica que con el fin de alcanzar velocidades de reacción máximas, pueden emplearse de manera útil concentraciones de magnesio significativamente superiores a 10 mM (utilizada como patrón a lo largo de la mayor parte de este documento).

La figura 67 muestra que diferentes pares de cebadores/amplicones muestran diferentes cinéticas de amplificación. La dependencia del tiempo de reacción varía entre cebadores oligonucleotídicos, y el análisis indica un posible sesgo de secuencia subyacente a este fenómeno.

Se realizaron dos transcurros de tiempo diferentes utilizando diferentes pares de cebadores. Las condiciones no fueron idénticas entre estas reacciones, no obstante el nivel de variación indicado es típico de la gama de comportamientos que se observaron entre pares de cebadores de los que se disponía y se incluye como simplemente un ejemplo típico de las velocidades que se observaron (cebadores de CSF utilizados a UvsX 125 ng/μl, uvsY 45 ng/μl; cebadores de Apo utilizados a UvsX 200 ng/μl, uvsY 60 ng/μl). Se muestran las secuencias de cebadores. Los cebadores CSF5' (SEC ID n°: 32) y CSF3' (SEC ID n°: 33) (que seleccionan como diana el locus CSF1PO de STR humana) son realmente un par de cebadores excepcional en la medida en que demostraron una cinética de acumulación de producto particularmente rápida, la mayor que se ha determinado hasta el momento. Los cebadores ApoB600 (SEC ID n°: 46) y ApoB300rev (SEC ID n°: 47), que seleccionan como diana el locus de apolipoproteína B humana, demuestran una cinética de amplificación más lenta. En este experimento este último par generó una cantidad similar de material tras 40 minutos a la que se produjo tras tan sólo 20 minutos con los cebadores de CSF. Basándose en esto, y en otros datos, se concluye que los tiempos de duplicación típicos varían, en promedio, entre aproximadamente 30 segundos y 1 minuto para la mayoría de los pares de cebadores de 30-35 residuos en RPA. Los cebadores de CSF también fueron notablemente dominantes en experimentos con múltiplex (datos no mostrados), lo que concuerda con la noción de que eran particularmente eficaces y rápidos. El análisis de la composición de los cebadores, comparando ambos cebadores de CSF, en este caso, con los cebadores de Apo utilizados en este caso, destaca que el contenido de guanosina es bajo en ambos cebadores de CSF, mientras que es promedio en los cebadores de Apo, y el contenido de citosina es de un tercio o más para ambos cebadores de CSF, mientras que es de un cuarto o menos para los cebadores de Apo. Esto sugirió un posible origen en la composición para la variabilidad de la velocidad. Se realizaron reacciones en condiciones similares aparte de las diferencias mencionadas anteriormente en UvsX y UvsY, y concentraciones de dNTP ligeramente variables:

Tris pH 8,4 50 mM
 acetato de potasio 80 mM
 acetato de magnesio 10 mM
 DTT 2 mM
 compuesto de PEG al 5% (Carbowax-20M)
 ATP 3 mM
 fosfocreatina 20 mM
 creatina cinasa 100 ng/μl
 gp32 600 ng/μl
 dNTP 200 μM para el cebador de Apo, dNTP 100 μM para los cebadores de CSF
 300 nM de cada oligonucleótido

La figura 68 muestra que tramos homopoliméricos añadidos en 5' influyen sobre el comportamiento de la reacción: la citosina aumenta la actividad y la guanosina la disminuye.

Los cebadores fueron tal como se indica. J1 y K2 (SEC ID n°: 66 y 69) son homólogos a parte del locus SpoOB de *Bacillus subtilis*. Las condiciones de reacción fueron:

Tris pH 8,4 50 mM
 acetato de potasio 80 mM
 acetato de magnesio 10 mM
 DTT 2 mM
 compuesto de PEG al 5% (Carbowax-20M)
 ATP 3 mM
 fosfocreatina 30 mM
 creatina cinasa 100 ng/μl
 gp32 420 ng/μl
 UvsX 140 ng/μl
 UvsY 35 ng/μl
 dNTP 200 μM
 300 nM de cada oligonucleótido
 polimerasa de Bsu 35 ng/μl
 ADN genómico de *B. subtilis* 25 copias/μl
 dilución 1:50.000 a partir de disolución madre de SYBR green (Molecular Probes)

Volúmenes de reacción de 50 µl, 37°C

Los cebadores J1(C), K(C), J1(G) y K2(G) fueron equivalentes a J1 y K2, pero presentaban tramos añadidos de citosina o guanosina, tal como se indica. Se establecieron reacciones en hielo en una placa de microtitulación, y después se transfirieron a la fase calentada de un fluorómetro (FLX800). Tras 90 minutos se diluyeron las reacciones con 1x tampón de carga de sacarosa hasta el doble del volumen de reacción original, y después se corrieron 20 µl de esto directamente sobre un gel de agarosa al 2%. Las reacciones o bien contenían ADN diana, o bien no contenían diana. Se observó que añadir residuos de citosina a los cebadores dio como resultado una velocidad de amplificación más rápida, mientras que añadir guanosinas dio como resultado una amplificación defectuosa. Los cebadores con adición de citosina también amplificaron el “ruido” muy rápidamente.

La figura 69 muestra que secuencias en 5' añadidas secuencias que consistían en residuos de timina y citosina demuestran una variación significativa en el comportamiento de amplificación.

Los cebadores fueron tal como se indica. J1 y K2 (SEC ID n°: 66 y 69) son homólogos a parte del locus SpoOB de *Bacillus subtilis*. Las condiciones de reacción fueron:

Tris pH 8,4 50 mM
 acetato de potasio 80 mM
 acetato de magnesio 10 mM
 DTT 2 mM
 compuesto de PEG al 5% (Carbowax-20M)
 ATP 3 mM
 fosfocreatina 30 mM
 creatina cinasa 100 ng/µl
 gp32 420 ng/µl
 UvsX 140 ng/µl
 UvsY 35 ng/µl
 dNTP 200 µM
 300 nM de cada oligonucleótido
 polimerasa de Bsu 35 ng/µl
 ADN genómico de *B. subtilis* 20 copias/µl
 dilución 1:50.000 a partir de disolución madre de SYBR green (Molecular Probes)
 Volúmenes de reacción de 50 µl, 37°C

Se evaluaron reacciones de amplificación en tiempo real empleando el colorante SYBR green tal como se describe en la figura 66. Las condiciones fueron similares, excepto porque sólo se emplearon 20 copias/µl de molde diana de partida, y se variaron las secuencias de cebadores. Se realizó un análisis de punto final corriendo los productos generados a 60 minutos sobre un gel de agarosa al 2% tras dilución tal como se describe para la figura 68. Las reacciones que contenían tramos de timidina homopoliméricos, o tramos muy ricos en timidina, amplificaron de manera algo escasa. Normalmente se generó menos ADN, y hubo alguna indicación de que estaba produciéndose sustancialmente asimetría de amplificación. En general estos datos concordaban con que se prefieran residuos de citosina en las secuencias en 5', y que estaban produciéndose otros fenómenos difíciles de determinar, posiblemente algunos efectos de “división en fases” de recombinasa preferida.

La figura 70 muestra un estudio más detallado de los efectos de secuencias añadidas en 5'.

Se investigaron aún más cebadores derivados de los cebadores J1 y K2 (SEC ID n°: 66 y 69), que consistían principalmente en residuos de pirimidina adicionales, excepto un par que contenía un residuo de guanosina muy en 5'. Algunos cebadores (6 y 12 en esta serie) contenían pirimidinas en 5', pero se acortaron hasta un total de 33 residuos eliminando bases en los extremos 5' (J1) o 3' (K2) respectivamente. Por tanto, estos cebadores compartían menos de 30 residuos de homología con la diana genómica. Se incubaron cebadores en condiciones similares a las utilizadas en las figuras 69 y 70. Las diferencias principales fueron que se emplearon 630 ng/µl de gp32, y sólo se utilizó 1 copia por microlitro de ADN genómico diana. Además, en estos experimentos también se examinó la velocidad de amplificación que se producía en reacciones que sólo contenían cebadores individuales. En las reacciones que contenían pares de cebadores, se examinaron pares que contenían un oligonucleótido que es un derivado de J1 y uno que es un derivado de K2. Se utilizaron pares en los que los derivados contenían modificaciones en 5' similares. De manera notable, las velocidades de amplificación de cebadores individuales fueron bastante similares a las velocidades de amplificación con dos cebadores a esta baja densidad de diana, lo que indica que el ruido de cebadores tiende a iniciarse como un efecto competitivo aproximadamente a esta baja densidad de diana. De manera extraña, los cebadores 8 y 9, que sólo se diferenciaban en un residuo de citosina, mostraron un comportamiento de amplificación profundamente diferente. Esto puede indicar que se requiere un tramo mínimo de citosinas para una actividad de alta velocidad, o que está demostrándose algún efecto de división en fases específico.

La figura 71 muestra varias estrategias mediante las cuales puede mejorarse la especificidad de detección de

secuencias mediante la utilización de “terceras sondas”, y cómo pueden configurarse para funcionar con pares de fluoróforo/extintor.

Puede detectarse la presencia de una secuencia de ADN específica mediante la utilización de una tercera sonda oligonucleotídica que está bloqueada en el extremo 3', y por tanto no participa en amplificación ruidosa (al menos sin procesamiento posterior). Tales terceras sondas pueden formar híbridos con el amplicón de manera específica, y en tal entorno de dúplex convertirse en los sustratos para enzimas de procesamiento del ADN que escinden la sonda, separando así el fluoróforo y el extintor. Dada la naturaleza del entorno de recombinasa, el fluoróforo y el extintor estarán separados en no más de aproximadamente 10-12 nucleótidos. Se indica una selección de nucleasas candidatas, y se indican las bases modificadas que se incluirán en las sondas, o la naturaleza de estructura principal de la sonda para cada nucleasa.

La figura 72 muestra cómo puede emplearse una nucleasa de alteración de hélice o específica de base para detectar secuencias específicas incluyendo polimorfismos.

Se muestra un ADN monocatenario que se ha recubierto con recombinasa para formar un filamento de nucleoproteína de búsqueda de homología. Las flechas indican la interacción de una estructura de este tipo con dúplex homólogos, o bien idénticos a la sonda con respecto a un polimorfismo de un único nucleótido (SNP), o bien diferentes (A en vez de G). En ambos casos se produce satisfactoriamente un intercambio de cadena, y la cadena saliente se estabiliza mediante proteína de unión a ADN monocatenario. Los nuevos dúplex resultantes o bien son perfectamente complementarios, o bien contienen un apareamiento erróneo de base, que provocará una alteración local de la hélice. En presencia de una nucleasa específica de estructura adecuada, la sonda/molde que contiene la alteración se escinde específicamente, o bien como mellas posiblemente en cualquier cadena, o bien como rotura bicatenaria, dependiendo de la nucleasa. En otros formatos puede utilizarse un enfoque similar para detectar la presencia o ausencia de una secuencia específica, independientemente o no del estado polimórfico, incluyendo bases modificadas en la sonda, tales como 8-oxoguanina. En este caso puede emplearse una enzima de eliminación de base o de escisión de sitio abásico específica para 8-oxoguanina y entornos de dúplex, tal como proteína Fpg de *E. coli* (8-oxoguanina ADN glicosilasa). En cualquier caso, las moléculas de sonda pueden contener tanto un fluoróforo como un extintor que se separan con la escisión.

La figura 73 muestra cómo los oligonucleótidos fluorescentes marcados de manera doble muestran propiedades diferenciales en un entorno de RPA en comparación con un entorno que carece de recombinasa saturante y proteínas de unión a ADN monocatenario.

En la parte superior izquierda, se muestran tres sondas que se utilizan en un experimento para investigar las propiedades fluorescentes de esos oligonucleótidos en presencia o ausencia de proteínas utilizadas en entornos de RPA. Las condiciones fueron las siguientes:

Tris pH 8,4 50 mM
 acetato de potasio 80 mM
 acetato de magnesio 10 mM
 DTT 2 mM
 compuesto de PEG al 5% (Carbowax-20M)
 ATP 3 mM
 fosfocreatina 30 mM
 creatina cinasa 100 ng/μl
 dNTP 200 μM
 120 nM de cada oligonucleótido tal como se indica
 Opcional:
 gp32 630 ng/μl
 UvsX 140 ng/μl
 UvsY 35 ng/μl

Se observó que el FAM que sólo contenía oligonucleótido se extinguió ligeramente en presencia de proteínas de unión a ADN, lo que indica probablemente algo de extinción de la fluorescencia mediante proteína unida cerca del fluoróforo. Sin embargo, en marcado contraste, los oligonucleótidos que contenían tanto fluoróforo como extintor muestran un fenómeno inverso, y esto es notablemente diferente dependiendo de si presentan 10 ó 15 residuos de longitud. Más específicamente estas dos últimas sondas se extinguieron significativamente en ausencia de proteínas, lo que concuerda con la idea de que la formación de un enrollamiento al azar garantizará la extinción eficaz independientemente de la longitud. Sin embargo en presencia de proteínas esta extinción se reduce. En particular casi se elimina la extinción para el 15-mero, y adopta una fluorescencia cerca del nivel de FAM que sólo contiene oligonucleótido en presencia de proteínas. A la inversa, el 10-mero se ve poco afectado y permanece altamente extinguido. Esta reducción en la extinción para el 15-mero se explica muy fácilmente por la sugerencia de que en presencia de proteínas de unión a ADN la sonda se estira para formar un vástago bastante rígido. Por ejemplo UvsX y recA estiran ADN mono y bicatenario hasta aproximadamente 1,5 veces la longitud equivalente de ADN en forma B, y se describe una extensión similar para gp32. Por tanto, y al contrario que el comportamiento en

disolución libre, el fluoróforo y el extintor están altamente separados en un entorno de RPA, incluso más que en un dúplex de ADN, y es probable que se extingan más con la hibridación (aunque no se investigó en este experimento). Se proporciona un esquema en el lado derecho que indica cuáles pueden ser los estados de la sonda de 10 meros y 15 meros en ausencia o presencia de un entorno de recombinasa, y posiblemente cuando se hibridan a ADN dúplex.

5 Se muestran el fluoróforo y el extintor con un radio de "excitación" más grande, que cuando se solapan conducirá a una transferencia de energía por resonancia de fluorescencia eficaz, y una disminución concomitante de la emisión de fluorescencia.

10 La figura 74 muestra que un amplicón-sonda que contiene un residuo de tetrahidrofuranilo se convierte en un sustrato para la enzima Nfo de *E. coli* en una reacción de amplificación RPA, se escinde, y que el producto de escisión puede elongarse.

15 Se establecieron reacciones de RPA utilizando los cebadores específicos de ADN genómico de *B. subtilis*, J1 y K2 (SEC ID n°: 66 y SEC ID n°: 69), el cebador anidado NEST26 (SEC ID n°: 77) y la sonda marcada con biotina y digoxigenina THFProbe 1 (5'-biotina-CATGATTGGATGAATAAGCTGCAG-tetrahidrofurano-TGATTAAAGGAAAC-DIG-3' SEC ID n°: 80), que también contiene un residuo de tetrahidrofuranilo dentro del cuerpo de la sonda. Esta sonda es específica para el fragmento amplificado por los cebadores J1 y K2, y se solapa con la secuencia del cebador NEST26 (todos estos cebadores se comentan en otra parte). Se incluyó NEST26, un cebador que no genera ruido por sí mismo, de modo que podía generarse un producto anidado más pequeño, uno de cuyos extremos será la diana para la sonda, sólo por si la sonda era altamente inestable en el entorno topológicamente limitado que resultará de la invasión de la sonda en el amplicón de J1/K2 dúplex. Las reacciones presentaron las siguientes condiciones:

25 Tris pH 7,9 50 mM
acetato de potasio 80 mM
acetato de magnesio 10 mM
DTT 2 mM
compuesto de PEG al 5% (Carbowax-20M)
ATP 3 mM
30 fosfocreatina 25 mM
creatina cinasa 100 ng/μl
gp32 600 ng/μl
UvsX 120 ng/μl
UvsY 30 ng/μl
35 dNTP 100 μM
200 nM de cebador J1, cebador K2 y cebador NEST26
sonda 100 nM
polimerasa de Bsu 30 ng/μl
ADN genómico de *B. subtilis* 1000 copias/μl, o controles de agua tal como se indica

40 Se extrajeron con fenol las reacciones de amplificación, se precipitaron y se separaron sobre un urea-PAGE desnaturizante al 16,5%. Se transfirieron los productos separados a membrana de nailon y se detectaron los productos utilizando un conjugado de estreptavidina-HRP. Dado que el extremo 5' de la sonda estaba biotilado, esto permitió la detección de sondas no cortadas, cortadas y elongadas. (A) Detección de sondas libres y procesadas. Obsérvese que en presencia de un entorno de RPA que puede amplificar el fragmento diana, la sonda se elongó de manera preferentemente elongada. El tamaño de la sonda elongada concuerda con la elongación en el extremo del producto de amplificación de J1/K2, y esto puede suceder porque la actividad de escisión de Nfo genera un 3'-hidroxilo, "desbloqueando" así la sonda y permitiendo la extensión sintética. Se observó más elongación cuando se empleó una concentración superior de enzima Nfo. En (B) se muestra la estructura de la sonda utilizada en este experimento. Comprende una secuencia homóloga a parte de los amplicones generados por los cebadores J1 y K2, pero contiene un residuo de tetrahidrofuranilo y está marcada en el extremo 5' con biotina, y en el extremo 3' (y por tanto bloqueada) con digoxigenina. En (C) se proporciona una representación esquemática de las secuencias de acontecimientos que se piensa que subyacen a la generación de producto elongado mediante interacción de la sonda con el amplicón deseado, escisión y posterior elongación por polimerasa del extremo 3' libre.

55 En este experimento se cree que la aparente actividad en reacciones que carecen de molde de partida surge de contaminación cruzada del amplicón a partir de experimentos de laboratorio anteriores, un fenómeno que se volvió problemático en el laboratorio debido a la sensibilidad muy alta de la RPA. Se proporcionan evidencias de soporte en la siguiente figura.

60 La figura 75 muestra que un amplicón-sonda que contiene un residuo de tetrahidrofuranilo se convierte en un sustrato para la enzima Nfo de *E. coli* en una reacción de amplificación RPA, se escinde, y que el producto escindido puede elongarse.

65 En estos experimentos se presentan evidencias de que la escisión y extensión de una sonda específica de amplicón que contiene residuo de tetrahidrofuranilo es específica y dependiente de la presencia de esas secuencias diana en la reacción, y también que no es necesario disponer de un extremo libre que se solapa con la sonda diana (para

impedir la limitación topológica del producto intermedio de recombinación de sonda/diana). En (A) se representa esquemáticamente la configuración de la reacción. Se representan el locus de *Bacillus subtilis* seleccionado como diana por los cebadores J1, K2, L2, NEST26 (SEC ID n°: 66, 69, 71 y 77) y la sonda (la secuencia real se muestra en la figura 42B). Habitualmente los cebadores J1 y K2 se utilizan de manera rutinaria para amplificar este locus y por tanto el principal contaminante de laboratorio es el fragmento generado por estos dos cebadores. Por tanto también se combinó J1 con L2 en algunos experimentos, no sometiéndose este fragmento a amplificación a partir de contaminación cruzada del amplicón inicial. En (B) se muestran los resultados de un experimento en el que se configuraron reacciones de RPA para amplificar o bien el producto de J1/K2 o bien el producto de J1/L2, en presencia de molde de partida añadido (ADN genómico) o sin él. Se incluyeron en la reacción la sonda y la proteína Nfo de *E. coli*. En más detalle, se utilizaron las siguientes condiciones:

Tris pH 7,9 50 mM

acetato de potasio 80 mM

acetato de magnesio 10 mM

DTT 2 mM

compuesto de PEG al 5% (Carbowax-20M)

ATP 3 mM

fosfocreatina 25 mM

creatina cinasa 100 ng/μl

gp32 600 ng/μl

UvsX 120 ng/μl

UvsY 30 ng/μl

dNTP 100 μM

200 nM de cebador J1, cebador K2 o L2 200 nM, y cebador NEST26 200 nM (carriles 1-4), en los carriles 5 y 6 los cebadores J1 y L2 estaban a 300 nM y no se utilizó NEST26

sonda 120 nM

polimerasa de Bsu 30 ng/μl

ADN genómico de *B. subtilis* 1000 copias/μl, o controles de agua tal como se indica

Se extrajeron con fenol las reacciones de amplificación, se precipitaron y se separaron sobre un gel de urea-PAGE desnaturalizante al 16,5%. Se transfirieron los productos separados a una membrana de nailon y se detectaron los productos utilizando un conjugado de estreptavidina-HRP. Dado que el extremo 5' de la sonda estaba biotinilado, esto permitió la detección de sondas no cortadas, cortadas y elongadas. (A) Detección de sondas, libres y procesadas. Obsérvese que en presencia de un entorno de RPA que puede amplificar el fragmento diana, la sonda se elongó de manera preferentemente elongada. También se observa que aunque se produce elongación significativa en ausencia de la diana añadida para el par de cebadores J1/K2 (se cree que debido a contaminación), cuando se utiliza el par de cebadores J1/L2 esto no sucede (se cree que una banda muy débil muestra un artefacto de carga cruzada). Por consiguiente se deduce que el corte/elongación de sonda es un acontecimiento específico. Además las señales significativas en las muestras de J1/K2 sin molde sugieren que el sistema es altamente sensible incluso a números muy pequeños de dianas, tal como surge supuestamente de la contaminación cruzada. En (C) se muestran los resultados de un experimento similar en el que se utilizaron los cebadores J1 y L2 en combinación con la sonda o bien sin ADN diana, o bien con una muestra con ADN diana a 1000 copias por microlitro (ADN genómico). Las concentraciones de oligonucleótidos son las siguientes: se utilizaron J1 y L2 a 240 nM, sonda a tan sólo 12 nM, y ~1000 ng por microlitro de enzima Nfo. Se describen otras condiciones para el experimento en la parte (B). Se eliminaron las muestras en los momentos indicados y se detuvieron. Se extrajeron con fenol las muestras, se precipitaron y se corrieron sobre un gel desnaturalizante tal como ya se describió, se transfirieron a membrana de nailon y se detectaron tal como se describió anteriormente. Se observó que los productos de escisión/elongación pueden detectarse a los 30 minutos incluso cuando la sonda está a tan sólo 12 nM. Esto sugiere que la cinética de la acción de Nfo en estas condiciones es lo suficientemente rápida como para monitorizar reacciones de manera excelente en tiempo real.

La figura 76 muestra la estructura general de varias clases posibles de sonda que pueden utilizarse para el análisis en tiempo real de reacciones de RPA.

Combinando los datos que sugieren que las sondas marcadas de manera doble para su utilización en RPA requerirán distancias de separación relativamente cortas para permitir la extinción, con el conocimiento de la acción eficaz de la proteína Nfo de *E. coli* con productos intermedios de procesamiento entre sondas que contienen un residuo de THF y dianas dúplex, se sugieren varias estructuras de sondas. En (A) y (B) se muestran sondas en las que están presentes tanto un fluoróforo como un extintor de manera interna (mediante modificaciones de bases), y entre ellos se coloca un residuo de THF. La separación del fluoróforo y el extintor es inferior a 10-12 residuos para garantizar FRET eficaz entre los grupos. La sonda está bloqueada en el extremo 3' con un grupo adecuado. La escisión mediante la enzima Nfo en el residuo de THF eliminará la asociación covalente del fluoróforo y el extintor, conduciendo en última instancia a un aumento de la fluorescencia disolución. En (C) y (D) se representa una disposición alternativa. En este caso o bien el fluoróforo o bien el extintor está colocado en el extremo 3'-terminal de la sonda, bloqueando así la elongación. El otro resto de absorción de luz se fija mediante enlace interno ligeramente más en 5'. El residuo de THF está colocado entre estos 2 grupos, y los 2 grupos de absorción de luz están separados por no más de 10-12 residuos para garantizar una buena FRET incluso cuando se estiran por proteínas de unión a ADN.

Comentarios

Hay una necesidad desde hace mucho tiempo de procedimientos *in vitro* para amplificar secuencias de ADN específicas. Desde finales de la década de 1980 el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha cumplido principalmente esta necesidad (R. K. Saiki *et al.*, Science 239, 487-91 (29 de enero de 1988)). Sin embargo, el requisito de equipo de ciclación térmica presenta una barrera significativa a la utilización de PCR fuera del entorno de laboratorio. Tal como se describió en la presente memoria, se ha desarrollado un procedimiento denominado RPA, que elimina la necesidad de fusión térmica de ADN de molde. La RPA combina componentes del sistema de recombinación/replicación de bacteriófago T4 *in vitro* en condiciones definidas críticas para mediar la hibridación de cebadores oligonucleotídicos con ADN de molde. Específicamente, la recombinasa uvsX de bacteriófago T4, la proteína de unión a ADN monocatenario (SSB) gp32, y el factor de carga de recombinasa uvsY junto con agentes de agrupamiento molecular, permiten la selección como diana de ADN mediada por recombinasa *in vitro* de alta fidelidad. Cuando se combina este sistema de selección como diana con la síntesis de ADN por desplazamiento de cadena mediada por enzimas de la clase de Pol I de *E. coli* o *B. subtilis*, se alcanza una amplificación exponencial eficaz de ADN.

Cualquier secuencia oligonucleotídica puede recubrirse por recombinasa para formar filamentos de búsqueda de homología (figura 37) proporcionando a RPA una amplia utilidad que permite la amplificación de prácticamente cualquier secuencia de ADN. Esta característica ha sido una de las principales ventajas de la PCR con respecto a otros procedimientos de amplificación de ADN *in vitro* (G. T. Walquer, M. C. Little, J. G. Nadeau, D. D. Shank, Proc Natl Acad Sci U S A 89, 392-6 (1 de enero de 1992); D. Y. Zhang, M. Brandwein, T. Hsuih, H. B. Li, Mol Diagn 6, 141-50 (junio de 2001); M. Vincent, Y. Xu, H. Kong, EMBO Rep 5, 795-800 (agosto de 2004); J. Compton, Nature 350, 91-2 (7 de marzo de 1991)). Aseméjándose a su papel *in vivo*, los filamentos de búsqueda de homología barren el ADN dúplex para detectar secuencias complementarias a la del oligonucleótido (T. Yonesaki, Y. Ryo, T. Minagawa, H. Takahashi, Eur J Biochem 148, 127-34 (1 de abril de 1985); T. Shibata, C. DasGupta, R. P. Cunningham, C. M. Radding, Proc Natl Acad Sci U S A 76, 1638-42 (abril de 1979)). Al encontrar un apareamiento, la recombinasa cataliza varias reacciones: el cebador se aparea con su complemento, se desplaza la cadena "saliente" similar, y se disocia la recombinasa. Esto establece una estructura de "bucle D" accesible para otros componentes de reacción. Acontecimientos de intercambio que se producen lejos de un extremo de ADN libre generan uniones topológicamente limitadas, a medida que la cadena saliente se fija a ambos lados de la región intercambiada (figura 37C).

Las secuencias incrustadas generan productos intermedios topológicamente limitados que son inestables. Las uniones formadas en los extremos de ADN permiten la rotación libre de la cadena desplazada (P. W. Riddles, I. R. Lehman, J Biol Chem 260, 165-9 (10 de enero de 1985)). Dado que estas dos estructuras presentan diferentes estabildades, la elongación de acontecimientos de invasión de cadena iniciales es menos eficaz que las posteriores (figura 39B). El extremo 3' libre del oligonucleótido ceba la síntesis mediante una ADN polimerasa de desplazamiento de cadena tal como el fragmento de Klenow de *E. coli*, o la ADN polimerasa I de *Bacillus subtilis* (Bs). Las actividades sintética y de desplazamiento de cadena de la polimerasa dan como resultado la producción de un ADN bicatenario y una cadena individual desplazada. Esta cadena desplazada se replica o bien mediante hibridación directa y elongación del segundo oligonucleótido, o bien mediante síntesis por desplazamiento de cadena si ya se ha producido un acontecimiento de invasión desde el extremo opuesto. La generación de dos dúplex hijos completos completa una ronda de RPA. Las invasiones continúan actuando sobre productos de reacciones de síntesis anteriores dominando finalmente la reacción los productos dirigidos a extremo.

En el desarrollo del procedimiento dado a conocer, se ha encontrado que varias condiciones importantes son importantes para que se produzca una RPA óptima. En primer lugar, se necesita que estén presentes cantidades saturantes de proteínas de fusión de ácido nucleico en la reacción, especialmente una SSB tal como gp32. En

segundo lugar, se necesita que haya una cantidad suficiente cebador cargado con recombinasa para alcanzar una velocidad de invasión/intercambio de cadena aceptable. Finalmente, se necesita que los filamentos de recombinasa/cebador de ADN monocatenario sean dinámicos y puedan someterse a desensamblaje. Hay actividades bioquímicas de competición de los componentes de reacción. Por ejemplo, en una situación *in vitro* típica las recombinasas se ven habitualmente superadas en competición por cantidades saturantes de SSB tales como gp32.

Para superar este problema, otros han utilizado análogos de ATP no hidrolizables tales como ATP- γ -S, que estabiliza la interacción de recombinasa/ADN de cebador monocatenario (S. C. Kowalczykowski, J. Clow, R. Somani, A. Varghese, *J Mol Biol* 193, 81-95 (5 de enero de 1987); A. L. Egger, S. L. Lusetti, M. M. Cox, *J Biol Chem* 278, 16389-96 (2 de mayo de 2003); T. Shibata, C. DasGupta, R. P. Cunningham, C. M. Radding, *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 2606-10 (mayo de 1980)). Sin embargo, los análogos de ATP no hidrolizables son incompatibles con la actividad dinámica de filamentos de recombinasa/cebador de ADN monocatenario necesaria para completar reacciones de intercambio de cadena y permitir a las polimerasas acceso a los bucles D (L. Xu, K. J. Mariani, *J Biol Chem* 277, 14321-8 (19 de abril de 2002); P. W. Riddles, I. R. Lehman, *J Biol Chem* 260, 170-3 (10 de enero de 1985); N. Armes, D. Stemple, en la solicitud de patente PCT WO 03/072805 (ASM Scientific, Inc., USA, 2003)) (figura 38).

Hay otras maneras en que puede estabilizarse la interacción de recombinasa/ADN de cebador monocatenario. Por ejemplo, se sabe que otra proteína de bacteriófago T4 denominada *uvsY* ayuda a la carga de *uvsX* sobre ADN recubierto con gp32 (L. D. Harris, J. D. Griffith, *J Mol Biol* 206, 19-27 (5 de marzo de 1989)). Además, también se sabe que agentes de agrupamiento molecular facilitan la carga y la estabilización de la proteína recombinasa *recA* de *E. coli* (P. E. Lavery, S. C. Kowalczykowski, *J Biol Chem* 267, 9307-14 (5 de mayo de 1992)). Por tanto se sometió a prueba si *uvsY* y agentes de agrupamiento molecular podían aliviar la competición desfavorable entre *uvsX* y gp32 en un sistema dinámico dependiente de ATP.

La valoración de componentes de reacción revela que se requieren cantidades definidas de gp32 de T4, *uvsX* de T4, *uvsY* de T4, ATP y PEG para la amplificación de ADN (figura 38). De hecho, se requieren la proteína mediadora de recombinasa *uvsY* de T4 y el compuesto de PEG (Carbowax 20M) para alcanzar una amplificación detectable. A concentraciones reducidas de gp32, la eficacia de la amplificación se ve afectada generando manchas y desarrollo escalonado de productos de reacción. La proteína recombinasa *uvsX* es importante para la RPA y la velocidad de reacción se acelera a concentraciones superiores, aunque esto también puede aumentar los artefactos (figura 39A). ATP es importante para la reacción, y se ha encontrado que se necesita un sistema de regeneración de ATP para alcanzar niveles detectables de producto para la mayoría de las reacciones. A la inversa, ATP- γ -S es un potente inhibidor de la amplificación.

Para ser una herramienta útil para aplicaciones rutinarias de amplificación de ADN tales como pruebas de diagnóstico, la RPA debe ser sensible y específica, aplicable a diversas dianas de secuencia y poder amplificar fragmentos de tamaño suficiente. En primer lugar se investigó el tamaño de productos que podían generarse. Podían amplificarse productos amplificados hasta un tamaño de 1000 pares de bases utilizando condiciones de reacción convencionales (figura 38A). También pueden generarse productos amplificados más grandes utilizando RPA.

Se sometió a prueba la sensibilidad de RPA en las condiciones más rigurosas, utilizando una reacción de RPA de una única etapa, sin anidamiento, y detectando productos mediante tinción con bromuro de etidio convencional de geles de agarosa. Con varios conjuntos de cebador/diana independientes, se detectaron de manera rutinaria menos de 10 copias de molde dúplex de partida. Se observó variabilidad entre experimentos al menor número de copias detectable pero todos los intentos fueron satisfactorios en la detección de menos de 10 copias. Con una manipulación apropiada de la muestra, la RPA puede utilizarse para amplificar a partir de moléculas individuales hasta niveles detectable en una única reacción. Para explorar esta posibilidad, se amplificó un marcador de una única repetición en tándem (STR) polimórfica a partir de ADN humano diluido hasta que sólo quedaban unas pocas copias. Se generaron varios productos amplificados correspondientes a ambos posibles alelos separados presentes en el ADN de muestra (figura 39E, F). Este efecto de separación de alelos sugiere que la RPA presenta sensibilidad a moléculas individuales y por tanto supera la sensibilidad de muchos otros procedimientos de amplificación de ADN.

El análisis de la cantidad de producto amplificado muestra que la RPA amplificará rutinariamente muestras de ADN en 10^{11-12} veces a partir de pequeñas cantidades de molde de partida. Los niveles de producto final están normalmente en el intervalo de 10-250 nM, generando cantidades más que suficientes de ADN para incluso los protocolos de detección menos sensibles. Para evaluar la especificidad de reacciones de amplificación se analizaron muchos pares de cebadores, la mayoría dirigidos a secuencias de ADN humano. Para cada conjunto de cebador/molde, se sometieron a prueba tamaños de producto previstos, patrones de digestión por enzimas de restricción o secuencia de ADN del producto para mostrar que la amplificación era específica. No se observó amplificación de secuencias que no eran diana a partir de ADN de muestra en la mejor interpretación de los datos. Se observaron artefactos relacionados con el producto o el cebador (figura 39A).

Con frecuencia en los entornos de diagnóstico, surgen problemas de especificidad por las grandes cantidades de ADN que no es diana presentes en una muestra. Por ejemplo, en la detección de patógenos, el ADN humano de muestras de sangre puede interferir con la detección de ADN de patógeno. Por tanto se buscó detectar cantidades traza de ADN diana en una gran masa de ADN no relacionado. Se encontró que la RPA podía amplificar una diana hasta niveles detectables a partir de 100 copias de ADN de *Bacillus subtilis* en presencia de 1 µg de ADN humano (es decir, 10⁸ veces menos ADN de *B. subtilis* que ADN humano en masa). Con tal masa grande de ADN de muestra se encontró que debían aumentarse los niveles de uvsX y uvsY en comparación con reacciones equivalentes sin exceso de ADN competidor para alcanzar una velocidad de reacción aceptable. Quizás esto se deba a la valoración mayor con respecto a los componentes de búsqueda de homología.

En experimentos de transcurso de tiempo con varios conjuntos de cebador/molde diferentes, se encontró que la velocidad de amplificación dependía parcialmente de la longitud del producto. Sin embargo, para fragmentos en el intervalo de 150-400 pares de bases, se observaron velocidades bastante similares, permitiendo la amplificación a partir de cientos a miles de copias de partida hasta niveles detectables en gel (~10¹² copias) en tan sólo 20 minutos. Se estima que se ha podido reducir los tiempos de "ciclo" promedio hasta tan sólo 30 segundos de promedio para tales fragmentos. Utilizando secuencias diana cortas de manera óptima y un procedimiento de detección sensible, se espera que pueda realizarse un ensayo de amplificación/detección de diagnóstico en el plazo de una hora. Los estudios muestran que para un gran número de dianas de ADN arbitrarias en muestras complejas pueden diseñarse fácilmente pares de cebadores de alta calidad. Se ha tratado la longitud de oligonucleótido mínima y se ha encontrado que aunque los oligonucleótidos de menos de 30 nucleótidos no amplifican eficazmente el ADN, aquellos de 30-35 nucleótidos de longitud son cebadores excelentes y son lo suficientemente cortos como para una síntesis fácil (figura 40).

Tal como se demuestra en la presente memoria, RPA es un excelente procedimiento general para amplificar secuencias de ADN específicas. Se ha mostrado que pueden monitorizarse reacciones de RPA en tiempo real utilizando colorantes de unión al surco menor y se demuestra una excelente capacidad para evaluar el número de copias de diana de partida. Además pueden amplificarse conjuntamente múltiples dianas, y pueden incluirse fácilmente sensores en tiempo real específicos de secuencia ("terceras sondas") en el entorno de reacción. Se ha identificado y demostrado que enzimas de reparación del ADN tales como fpg, Nth y particularmente Nfo funcionan en reacciones de RPA y pueden combinarse con sondas adecuadas para permitir la evaluación en tiempo real del comportamiento de la reacción de una manera específica de secuencia. Se muestra que los sistemas de sondas basadas en fluorescencia muestran propiedades notablemente diferentes en el entorno de RPA con respecto a entornos de reacción de PCR convencionales, o similares. Finalmente los experimentos iniciales indican que es fácil liofilizar los componentes de la reacción de RPA para un almacenamiento y reconstitución convenientes (figura 40). Este procedimiento, que funciona de manera robusta a temperatura baja constante, puede liofilizarse para su fácil almacenamiento y no requiere ciclado térmico o fusión para presentar una alta sensibilidad, ni otras manipulaciones complejas, y puede monitorizarse fácilmente en tiempo real, ofrece un avance significativo en el desarrollo de aplicaciones de diagnóstico, forenses y otras de punto de utilización de ADN. Una vez integrada con sistemas de detección de producto y extracción de ADN de muestra portátiles, la RPA permitirá kits de pruebas domésticos o clínicos fáciles de utilizar para detectar una variedad de patógenos (por ejemplo, *Chlamydia* o MRSA) así como kits de campo para otras aplicaciones.

Se han expuesto los detalles de una o más realizaciones de la invención en la descripción adjunta anterior. Aunque en la práctica o en las pruebas de la presente invención puede utilizarse cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria, ahora se describen los procedimientos y materiales preferidos. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y a partir de las reivindicaciones.

En la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece esta invención. A menos que se mencione expresamente lo contrario, las técnicas empleadas y contempladas en la presente memoria son metodologías convencionales bien conocidas por un experto habitual en la materia.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de amplificación por recombinasa-polimerasa de amplificación de ADN de una molécula de ácido nucleico diana bicatenario, que comprende una primera y una segunda cadena de ADN, que comprende las etapas siguientes
- 10 (a) poner en contacto un agente de recombinasa con un primer y un segundo cebador de ácido nucleico para formar un primer y un segundo cebador de nucleoproteína que comprende una región monocatenaria en su extremo 3';
- 15 (b) poner en contacto los cebadores de nucleoproteína primero y segundo con dicha molécula de ácido nucleico diana formando así una primera estructura bicatenaria en una primera porción de dicha primera cadena; y una segunda estructura bicatenaria en una segunda porción de dicha segunda cadena;
- 20 (c) extender el extremo 3' de dichos cebadores de nucleoproteína primero y segundo con una o más polimerasas y dNTP para generar un primer y un segundo ácido nucleico bicatenario y una primera y una segunda cadena desplazada de ácido nucleico; y
- (d) continuar la reacción mediante repetición de (b) y (c) hasta que se alcanza un grado de amplificación deseado,
- realizándose dicho procedimiento en las etapas (b) y (c) en presencia de un agente de agrupamiento de tal manera que el agente de agrupamiento estimula la amplificación,
- 25 en el que además dicho agente de agrupamiento
- (i) se selecciona de entre el grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), dextrano, Ficoll, PEG1450, PEG3000, PEG8000, PEG10000, compuesto de PEG con un peso molecular de entre 15.000 y 20.000 Dalton y una combinación de los mismos; y/o
- 30 (ii) está presente a una concentración de entre el 1% y el 12% en volumen o en peso de la reacción.
- 35 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho agente de agrupamiento se selecciona de entre el grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), dextrano, Ficoll, PEG1450, PEG3000, PEG8000, PEG10000, compuesto de PEG con un peso molecular comprendido entre 15.000 y 20.000 Dalton y una combinación de los mismos.
- 40 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que las etapas (b) y (c) se realizan en presencia de uno o más agentes auxiliares seleccionados del grupo que consiste en proteína de unión monocatenaria, helicasa, resolvasa, RuvA, RuvB, RuvC, RecG, PriA, PriB, PriC, DnaT, DnaB, DnaC, DnaG, cargador de abrazadera de DnaX, complejo de núcleo de polimerasa, ADN ligasa, una abrazadera deslizante y una combinación de los mismos.
- 45 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichos cebadores de ácido nucleico se seleccionan de entre el grupo que consiste en ADN, ARN, ANP, ANB, ácido nucleico con estructura principal de morfolino, ácido nucleico con estructura principal de fosfortiorato y una combinación de los mismos.
- 50 5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento se realiza en presencia de un agente estabilizante de filamentos de nucleoproteínas de RecA/ADNmc.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicho agente estabilizante se selecciona de entre el grupo que consiste en RecR, RecO, RecF y una combinación de los mismos.
- 55 7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento se realiza en presencia de un agente estabilizante monocatenario seleccionado del grupo que consiste en gp32, proteína SSB de *E. coli*, proteína gp32 de T4 y derivados de los mismos.
- 60 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el derivado de la proteína gp32 se selecciona de entre el grupo que consiste en gp32 con aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal, gp32 con aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal, gp32 con la sustitución de lisina 3 por un aminoácido distinto de lisina, y gp32 con la sustitución de arginina 4 por un aminoácido distinto de arginina y una combinación de los mismos.
- 65 9. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicho derivado de gp32 se selecciona de entre el grupo que consiste en gp32(N), gp32(C), gp32(C)K3A, gp32(C)R4Q, gp32(C)R4T, gp32K3A, gp32R4Q, gp32R4T y una combinación de los mismos.
10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento se realiza en presencia de una proteína de carga de recombinasa.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la proteína de carga de recombinasa se selecciona de entre el grupo que consiste en uvsY de T4, recO de *E. coli*, recR de *E. coli* y una combinación de los mismos.
- 5 12. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento de amplificación por recombinasa-polimerasa comprende además un cofactor para el agente de recombinasa seleccionado del grupo que consiste en ATP, análogo de ATP y una combinación de los mismos.
- 10 13. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento de amplificación por recombinasa-polimerasa comprende además un sistema de regeneración de ATP para convertir ADP en ATP.
14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que dicho sistema de regeneración de ATP comprende fosfocreatina y creatina cinasa.
- 15 15. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento de amplificación por recombinasa-polimerasa comprende además pirofosfatasa para convertir pirofosfato en fosfato.
16. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que una o más ADN polimerasa se seleccionan de entre el grupo que consiste en polimerasa procariota, polimerasa eucariota y polimerasa codificada por fago.
- 20 17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que dicha polimerasa eucariota se selecciona de entre el grupo que consiste en pol- α , pol- β , pol- δ , pol- ϵ y una combinación de las mismas.
- 25 18. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que la polimerasa procariota se selecciona de entre el grupo que consiste en fragmento de Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli*, ADN polimerasa gp43 de bacteriófago T4, fragmento grande de polimerasa I de *Bacillus stearothermophilus*, ADN polimerasa de Phi-29, ADN polimerasa de T7, fragmento grande de Pol I de *Bacillus subtilis* (polimerasa de Bsu), ADN polimerasa I de *E. coli*, ADN polimerasa II de *E. coli*, ADN polimerasa III de *E. coli*, ADN polimerasa IV de *E. coli*, ADN polimerasa V de *E. coli* y una combinación de las mismas.
- 30 19. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el agente de recombinasa es sensible a la temperatura, en el que dicho agente de recombinasa sensible a la temperatura presenta actividad de invasión de cadena a una temperatura permisiva y ausencia de actividad de invasión de cadena a una temperatura no permisiva.
- 35 20. Procedimiento de amplificación por recombinasa-polimerasa anidada, que comprende las etapas siguientes:
- (a) amplificar una región de ADN utilizando el procedimiento de amplificación por recombinasa-polimerasa según la reivindicación 1 utilizando un primer y un segundo cebador para producir un primer producto amplificado;
- 40 (b) amplificar dicho producto amplificado utilizando un tercer y un cuarto cebador utilizando el procedimiento de amplificación por recombinasa-polimerasa según la reivindicación 1 para producir un segundo producto amplificado, en el que dicho segundo producto amplificado es una secuencia más pequeña contenida dentro de dicho primer producto amplificado.
- 45 21. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que cualquier ácido nucleico está marcado con un marcador detectable.
22. Procedimiento según la reivindicación 21, en el que dicho marcador se selecciona de entre el grupo que consiste en un fluorocromo, una enzima, un extintor de fluorescencia, un inhibidor enzimático, un marcador radiactivo y una combinación de los mismos.
- 50 23. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho agente de recombinasa es uvsX o uvsX de T4.
24. Procedimiento de amplificación por recombinasa-polimerasa de amplificación de ADN según la reivindicación 1, que comprende las etapas siguientes:
- 55 (a) combinar los siguientes reactivos en una reacción
- (1) al menos una recombinasa;
- 60 (2) al menos una proteína de unión a ADN monocatenario;
- (3) al menos una ADN polimerasa;
- (4) dNTP o una mezcla de dNTP y ddNTP;
- (5) un agente de agrupamiento;
- (6) un tampón;
- 65 (7) un agente reductor;
- (8) ATP o un análogo de ATP hidrolizable;

- (9) al menos una proteína de carga de recombinasa;
- (10) un primer cebador y opcionalmente un segundo cebador; y
- (11) una molécula de ácido nucleico diana;

5 (b) incubar dicha reacción hasta que se alcanza un grado de amplificación deseado

y en el que el agente de agrupamiento estimula la amplificación.

10 25. Procedimiento de amplificación por recombinasa-polimerasa de amplificación de ADN según la reivindicación 1, que comprende las etapas siguientes:

(a) combinar los siguientes reactivos en una reacción

- 15 (1) una recombinasa uvsX a una concentración comprendida entre 0,2 y 12 μM ;
- (2) una proteína de unión a ADN monocatenario gp32 a una concentración comprendida entre 1 y 30 μM ;
- (3) polimerasa de Bsu a una concentración comprendida entre 500 y 5000 unidades por ml;
- 20 (4) dNTP o una mezcla de dNTP y ddNTP a una concentración comprendida entre 1-500 μM ;
- (5) polietilenglicol a una concentración comprendida entre el 1% y el 12% en peso o en volumen;
- (6) tampón Tris-acetato a una concentración comprendida entre 25 mM y 60 mM;
- 25 (7) DTT a una concentración comprendida entre 1 mM - 5 mM;
- (8) ATP a una concentración comprendida entre 1,5 mM - 5 mM;
- 30 (9) uvsY a una concentración comprendida entre 0,2 μM - 8 μM ;
- (10) un primer cebador y un segundo cebador, en el que dichos cebadores están a una concentración de entre 10 nM y 1 μM ; y
- 35 (11) una molécula de ácido nucleico diana de al menos una copia;

(b) incubar dicha reacción hasta que se alcanza un grado de amplificación deseado;

40 y en el que dicho polietilenglicol estimula la amplificación.

46 26. Procedimiento de amplificación por recombinasa-polimerasa de amplificación de ADN según la reivindicación 1, que comprende las etapas siguientes:

45 (a) combinar los siguientes reactivos en una reacción;

- 45 (1) recombinasa uvsX 100-200 ng/ μl ;
- (2) gp32 600 ng/ μl ;
- (3) polimerasa de Bsu 20 ng/ μl ;
- 50 (4) dNTP 200 μM ;
- (5) DTT 1 mM;
- (6) ATP o un análogo de ATP hidrolizable 3 mM;
- (7) uvsY de 16 ng/ μl a 60 ng/ μl ;
- (8) 300 nM de un primer cebador y 300 nM de un segundo cebador;
- (9) acetato de potasio 100 mM
- 55 (10) acetato de magnesio 8-16 mM
- (11) fosfocreatina 25 mM;
- (12) creatina cinasa 100 ng/ μl

60 (b) liofilizar los reactivos de dicha etapa (a) para formar reactivos liofilizados;

(c) reconstituir dichos reactivos liofilizados con

- 65 (1) tampón Tris-acetato a una concentración de entre 1 mM y 60 mM;
- (2) polietilenglicol a una concentración de entre el 1% y el 12% en peso o en volumen;
- (3) un ácido nucleico diana;

(d) incubar dicha reacción hasta que se alcance un grado de amplificación deseado;

y en el que dicho polietilenglicol estimula la amplificación.

5 27. Procedimiento de amplificación por recombinasa-polimerasa de amplificación de ADN según la reivindicación 1, que comprende las etapas siguientes:

(a) combinar los siguientes reactivos en una reacción;

- 10 (1) recombinasa uvsX 100-200 ng/μl;
(2) gp32 300-1000 ng/μl;
(3) polimerasa de Bsu o polimerasa de T4 10-50 ng/μl;
(4) dNTP 50-500 μM;
15 (5) DTT de 0,1 a 10 mM;
(6) ATP o un análogo de ATP hidrolizable 3 mM;
(7) uvsY de 16 ng/μl a 60 ng/μl;
(8) 50-1000 nM de un primer cebador y 50-1000 nM de un segundo cebador;
(9) acetato de potasio 40-160 mM;
20 (10) acetato de magnesio 5-20 mM;
(11) fosfocreatina 10-40 mM;
(12) creatina cinasa 50-200 ng/μl;

(b) liofilizar los reactivos de dicha etapa (a) para formar reactivos liofilizados;

25 (c) reconstituir dichos reactivos liofilizados con

- (1) tampón Tris-acetato a una concentración de entre 1 mM y 60 mM;
(2) polietilenglicol a una concentración de entre el 1% y el 12% en peso o en volumen;
30 (3) un ácido nucleico diana;

(d) incubar dicha reacción hasta que se alcance un grado de amplificación deseado;

y en el que dicho polietilenglicol estimula la amplificación.

35 28. Procedimiento de amplificación por recombinasa-polimerasa de amplificación de ADN según la reivindicación 1, que comprende las etapas siguientes:

(a) combinar los siguientes reactivos en una reacción;

- 40 (1) recombinasa uvsX 100-200 ng/μl;
(2) gp32 300-1000 ng/μl;
(3) polimerasa de Bsu o polimerasa de T4 10-50 ng/μl;
(4) dNTP 50-500 μM;
45 (5) DTT de 0,1 a 10 mM;
(6) ATP o un análogo de ATP 3 mM;
(7) uvsY de 16 ng/μl a 60 ng/μl;
(8) 50-1000 nM de un primer cebador y 50-1000 nM de un segundo cebador;
(9) acetato de potasio 40-160 mM;
50 (10) acetato de magnesio 5-20 mM;
(11) fosfocreatina 10-40 mM;
(12) creatina cinasa 50-200 ng/μl;
(13) polietilenglicol a una concentración de entre el 1% y el 12% en peso o en volumen

(b) liofilizar los reactivos de dicha etapa (a) para formar reactivos liofilizados;

55 (c) reconstituir dichos reactivos liofilizados con

- (1) tampón Tris-acetato a una concentración de entre 1 mM y 60 mM;
60 (2) un ácido nucleico diana;

(d) incubar dicha reacción hasta que se alcance un grado de amplificación deseado;

y en el que dicho polietilenglicol estimula la amplificación.

65 29. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los cebadores están marcados con un marcador detectable.

30. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además detectar la molécula de ácido nucleico diana amplificado.
- 5 31. Procedimiento según la reivindicación 30, en el que dicha detección se realiza utilizando una tira reactiva de flujo lateral para evaluar si se han asociado físicamente dos cebadores marcados dentro del ácido nucleico diana amplificado.
- 10 32. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende convertir en primer lugar ARN en dicha molécula de ácido nucleico diana bicatenario utilizando actividad de transcriptasa inversa.

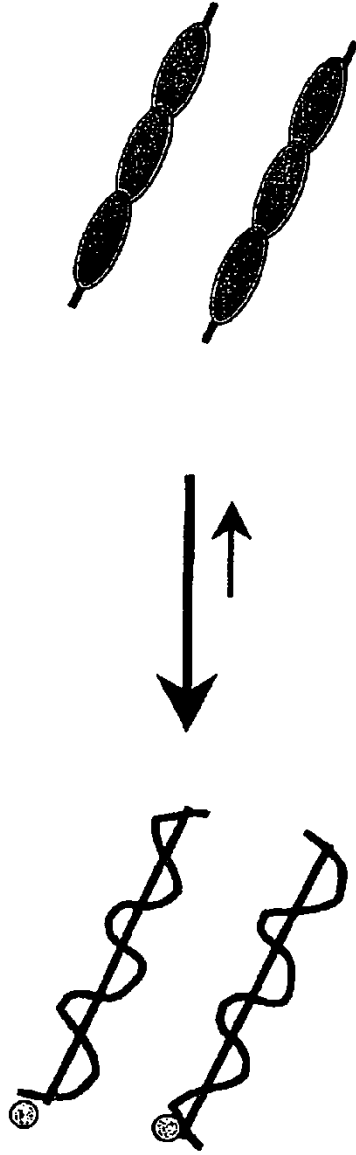
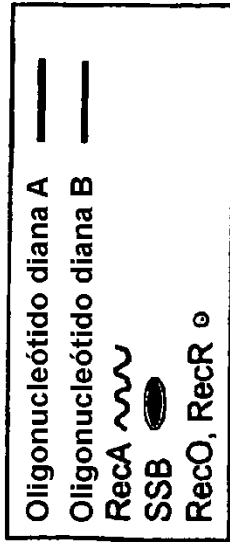


Figura 1. Carga de RecA/cebador. Antes de la adición del ADN de molde y/o polimerasa, RecA y SSB competirán por la unión a cebadores oligonucleotídicos monocatenarios. En presencia de una RecR y RecO, RecA se estabiliza selectivamente sobre los cebadores monocatenarios formando filamentos de nucleoproteínas de RecA en un complejo con RecO y RecR. Este complejo es competente para invadir ADN bicatenario para formar un bucle D en sitios homólogos a los cebadores oligonucleotídicos. Alternativamente, RecA, RecO y RecR pueden cargarse previamente en cebadores oligonucleotídicos antes de la introducción de SSB en la mezcla de reacción.

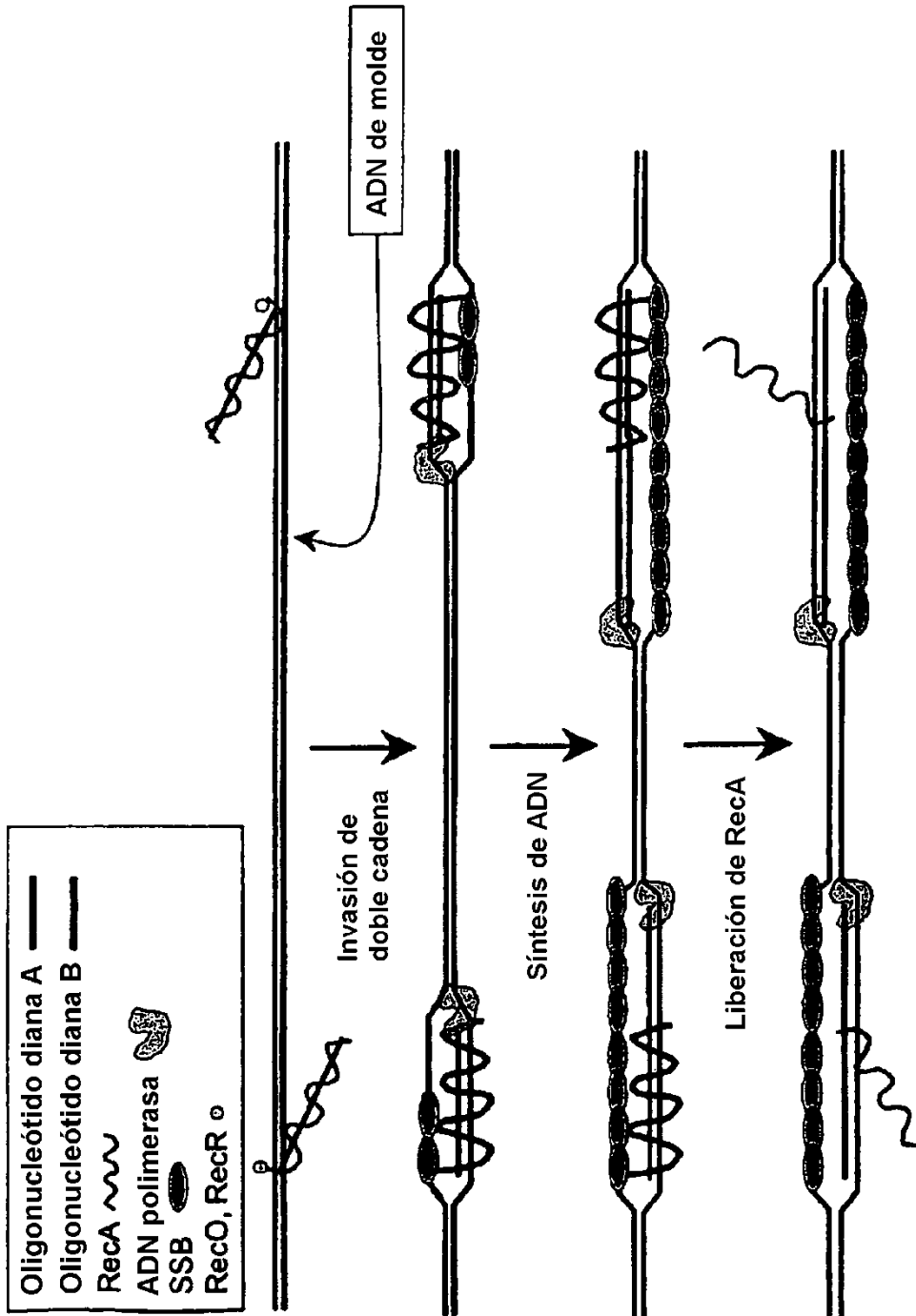


Figura 2A. Amplificación por recombinasa – polimerasa de la cadena adelantada (IsrPA). Filamentos de nucleoproteínas de cebador/RecA invaden ADN de molde bicatenario asociándose preferiblemente con sitios diana homólogos. A medida que se forman bucles D y avanza la síntesis el ADN monocatenario desplazado se recubre con SSB. La liberación de RecA a partir de ADN bicatenario puede producirse mediante hidrólisis de ATP en un sentido 5'-3' o como resultado de actividad helicasa/resolvasa o polimerasa.

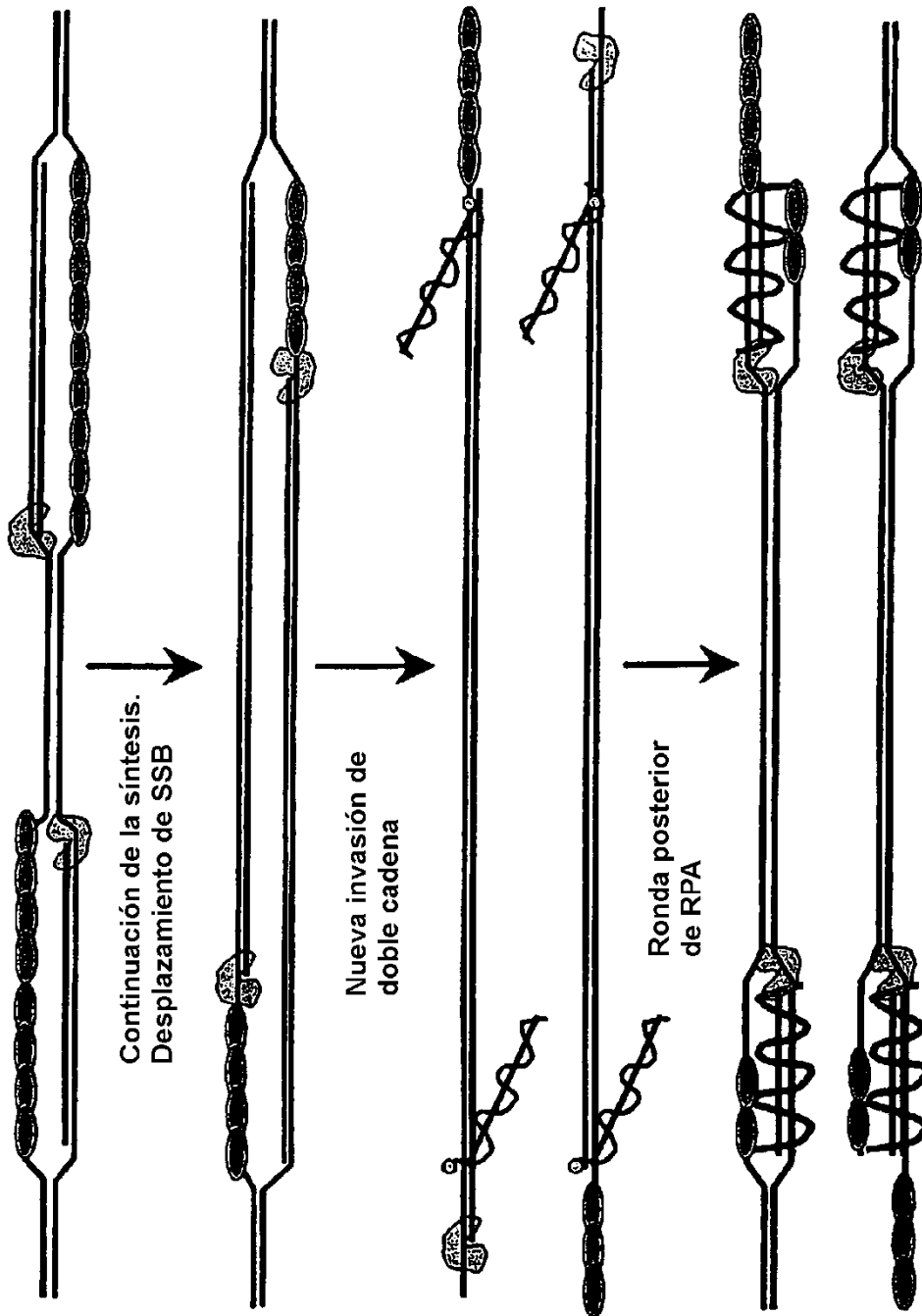


Figura 2B. Amplificación por recombinación – polimerasa de la cadena adelantada (IsRPA). A medida que continúa la síntesis, las polimerasas encuentran molde monocatenario, desplazado, unido a SSB. Filamentos de nucleoproteínas de cebador/RecA vuelven a invadir un sitio diana bicatenario. Rondas posteriores de IsRPA proceden a partir de sitios invadidos de nuevo.

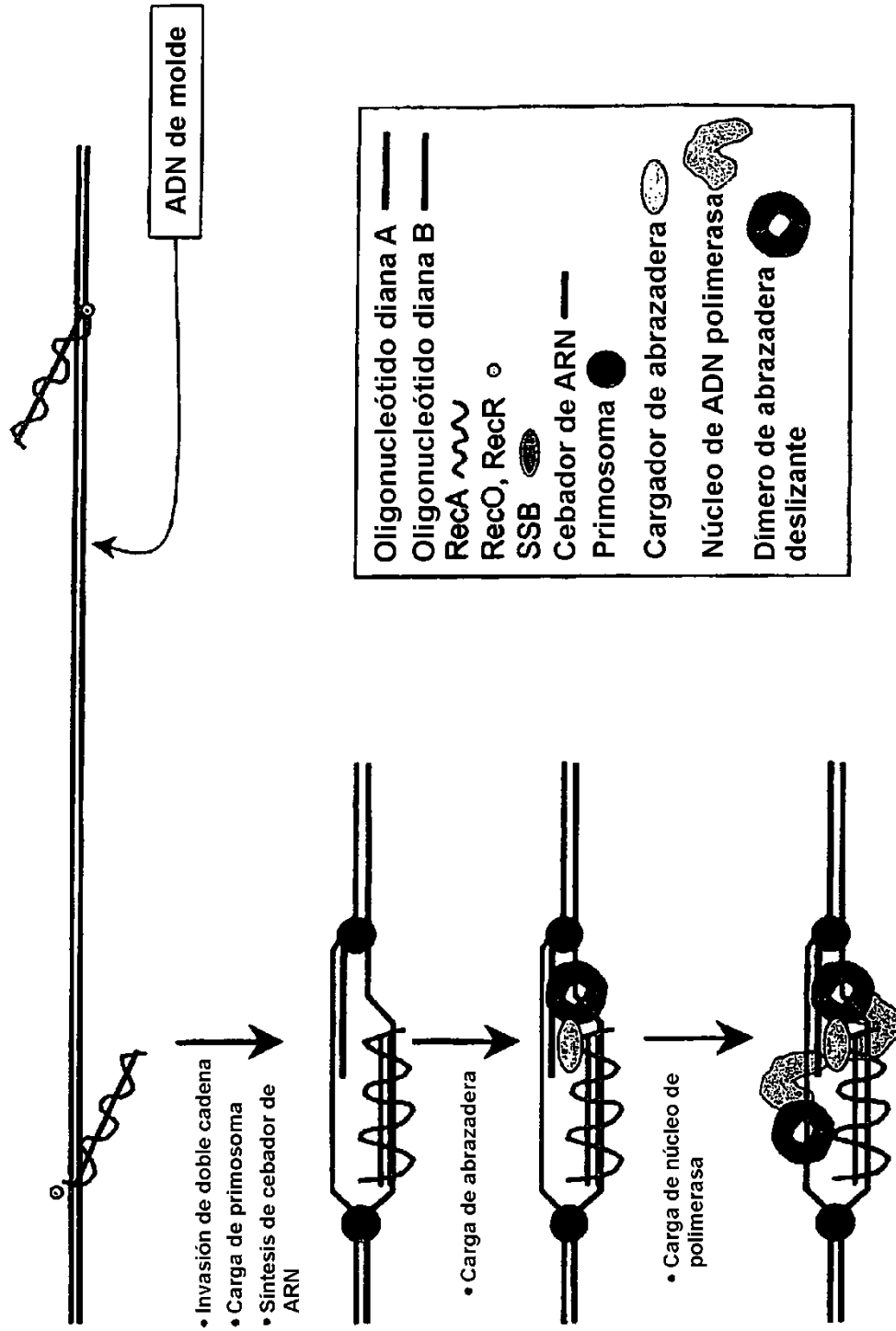


Figura 3A. Amplificación por recombinasa - polimerasa de la cadena adelantada/retrasada: Iniciación. En primer lugar, el primosoma se carga en el bucle D formado mediante invasión de filamentos de nucleoproteínas de RecA. El primosoma sintetiza un tramo de cebador de ARN. Finalmente, el primosoma recluta al cargador de abrazadera, el cual recluta tanto al dímero de abrazadera deslizante como al núcleo de ADN polimerasa asimétrico.

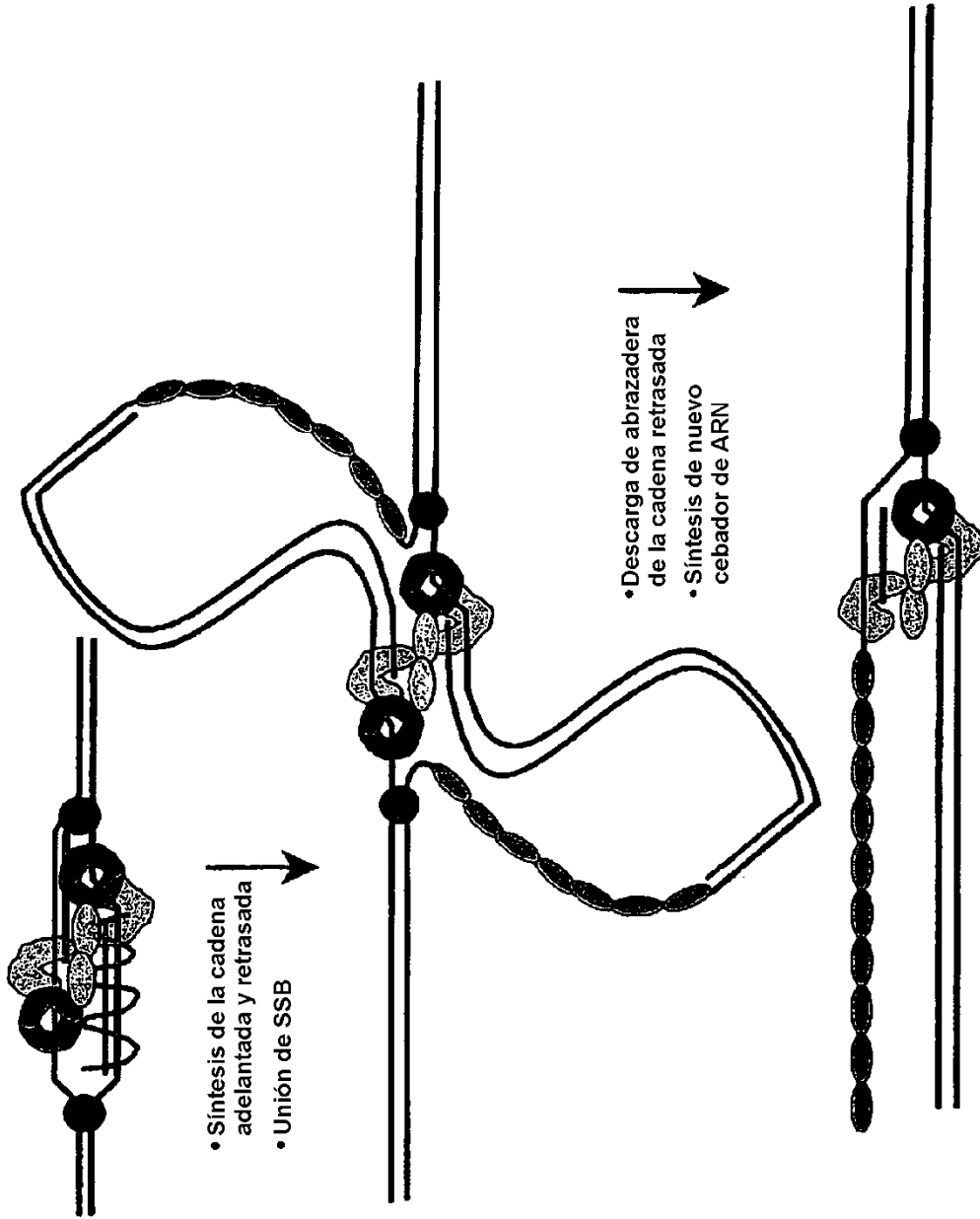


Figura 3B. Amplificación por recombinasa – polimerasa de la cadena adelantada/retrasada: Síntesis. La síntesis se produce simultáneamente en los sentidos tanto adelantado como retrasado. Finalmente la síntesis de la cadena retrasada se detiene y se descarga la abrazadera de la cadena retrasada. La síntesis de la cadena adelantada continúa hasta que se forma un nuevo sitio de síntesis de la cadena retrasada.

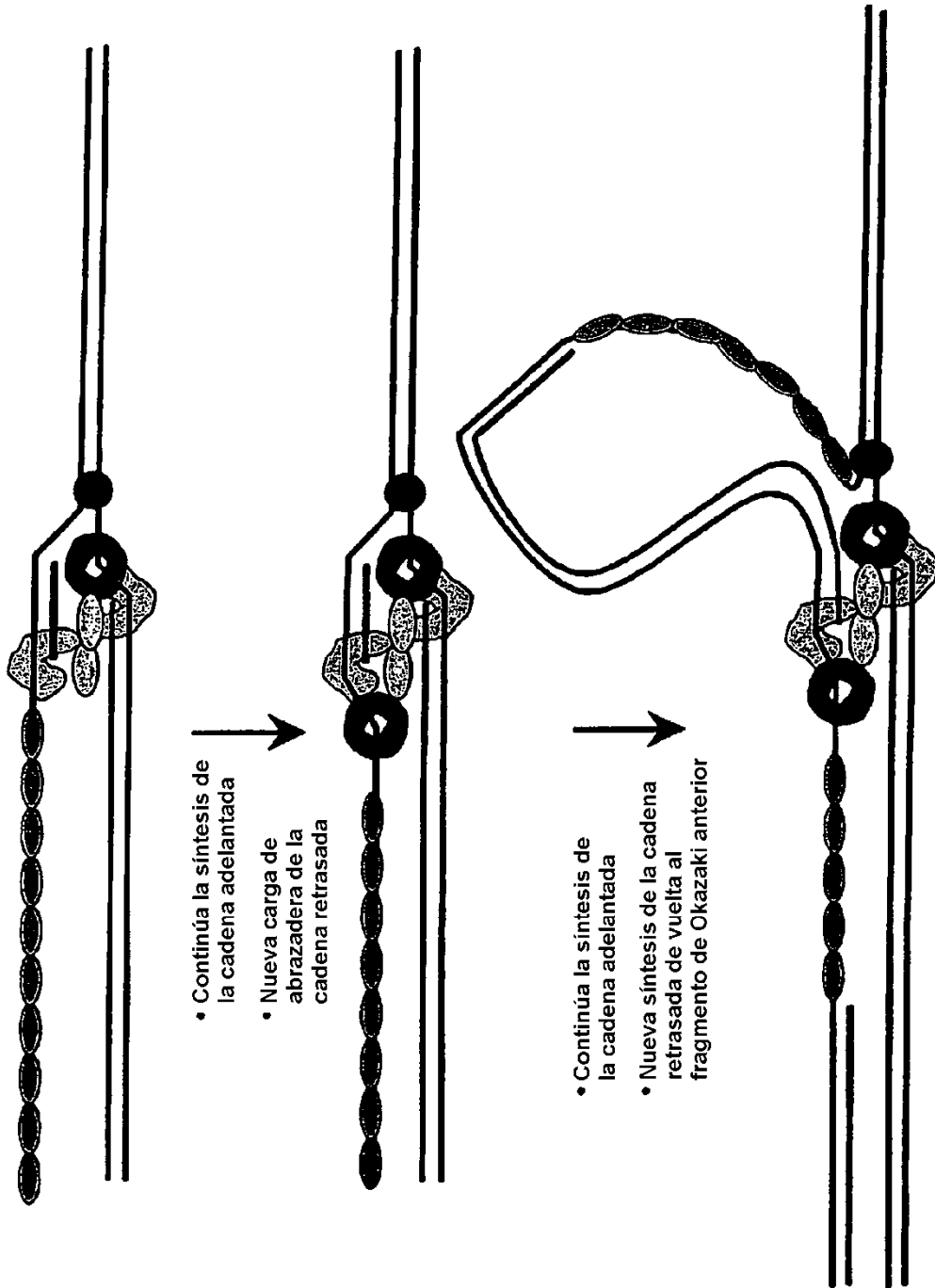


Figura 3C. Amplificación por recombinasa – polimerasa de la cadena adelantada/retrasada. Mientras continúa la síntesis de la cadena adelantada, se forma un nuevo sitio de síntesis de la cadena retrasada. La síntesis de la cadena retrasada continúa de vuelta al fragmento de Okazaki anterior en el que se descarga la abrazadera de la cadena retrasada.

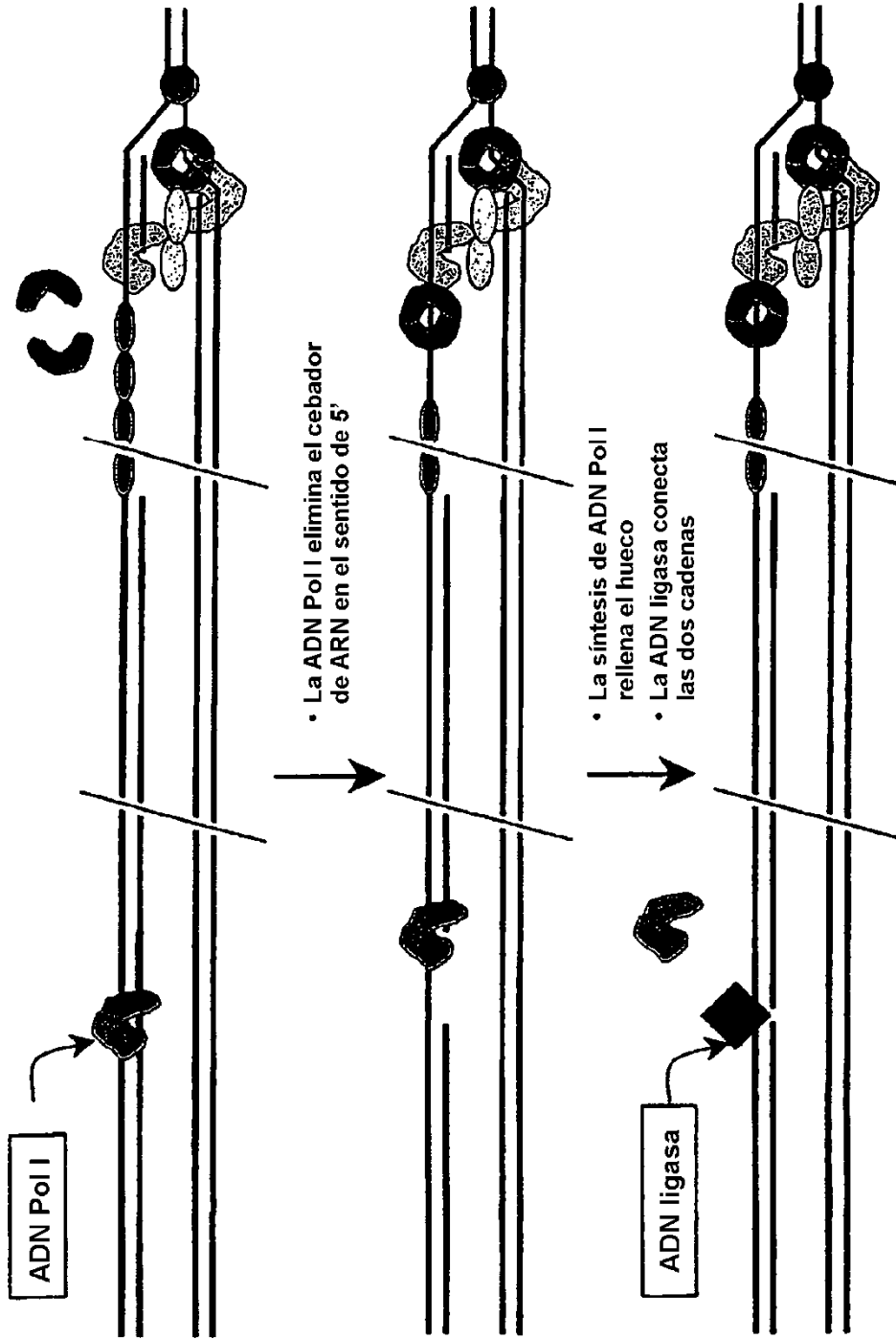
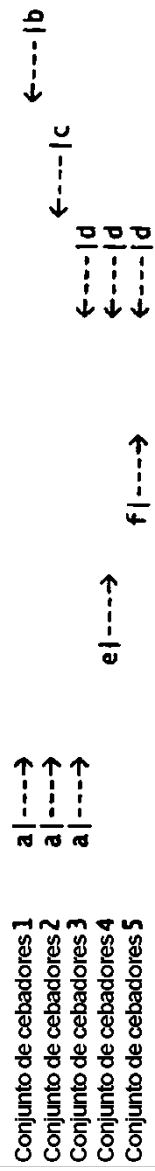


Figura 3D. Amplificación por recombinasa – polimerasa de la cadena adelantada/retrasada. La ADN polimerasa I elimina el cebador de ARN y rellena el hueco mientras que la ADN ligasa conecta los dos fragmentos de Okazaki formando una cadena retrasada continua.

Figura 4



Conjunto de cebadores 1
Conjunto de cebadores 2
Conjunto de cebadores 3
Conjunto de cebadores 4
Conjunto de cebadores 5

Figura 5. Ejemplos de ácidos nucleicos de molde bicatenarios adecuados.

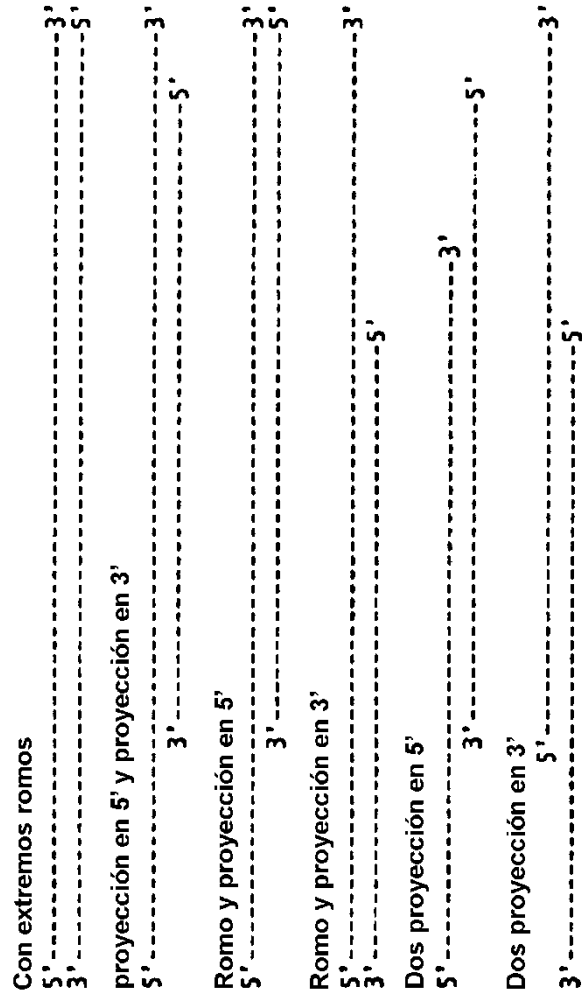


Figura 6A Orientación de pares de cebadores de ácido nucleico

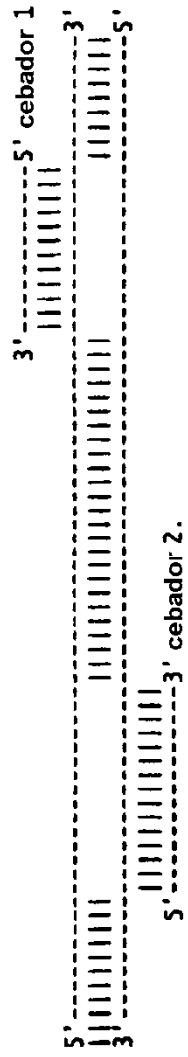


Figura 6B

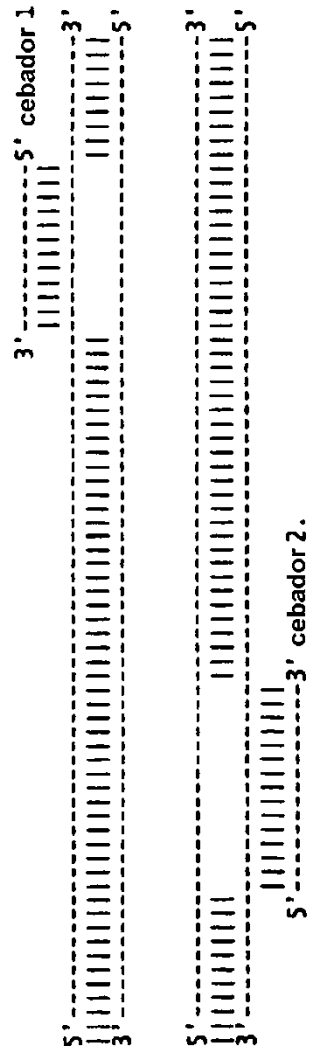


Figura 7A Reacción de RPA en curso

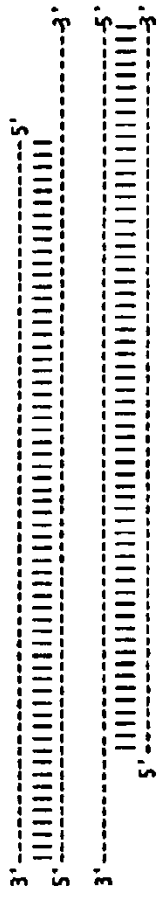


Figura 7B

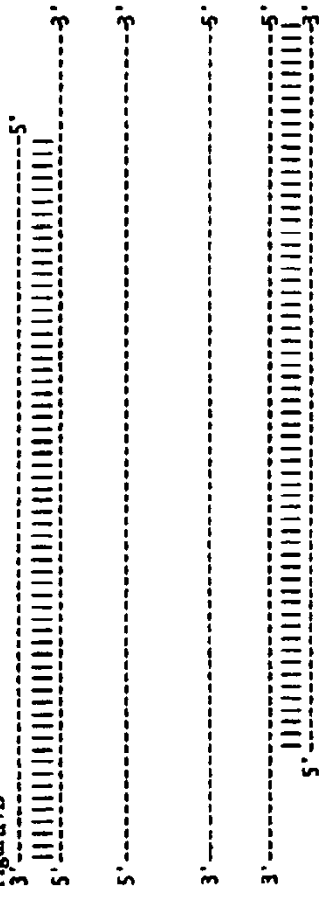


Figura 7C

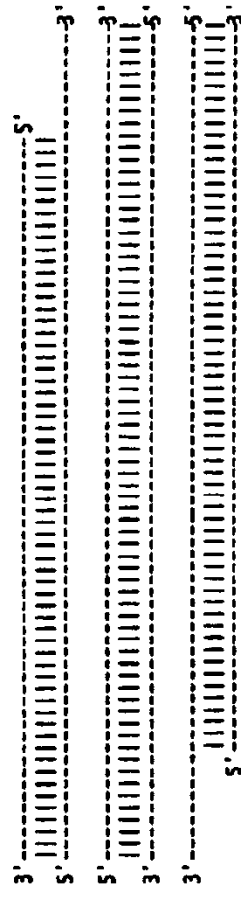


Figura 8A

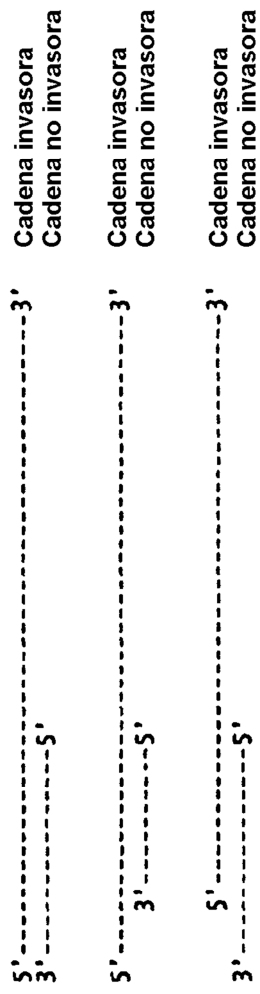


Figura 8B

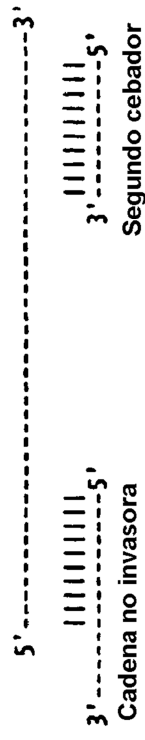
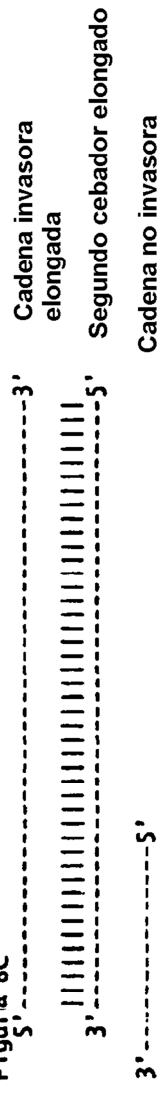


Figura 8C



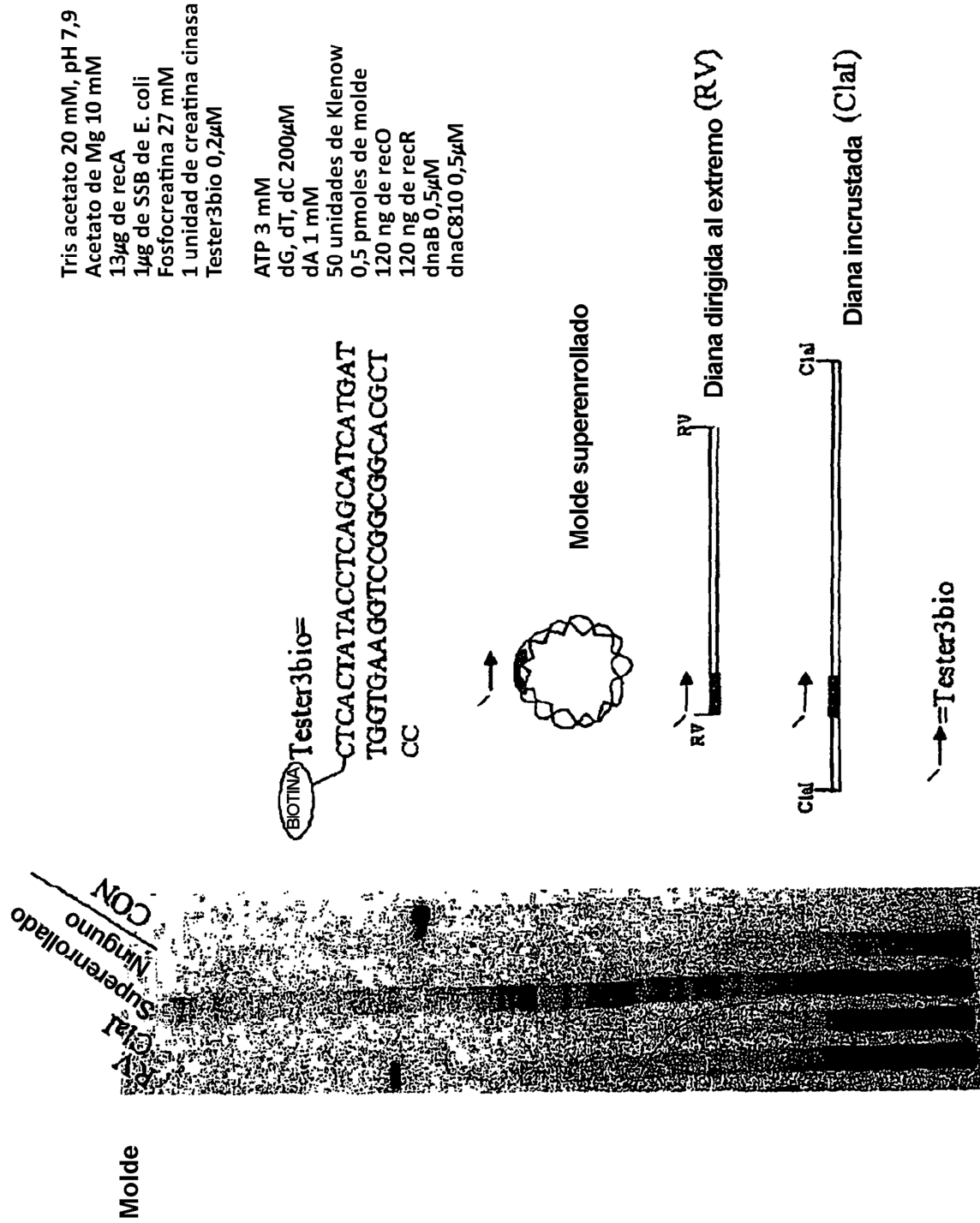


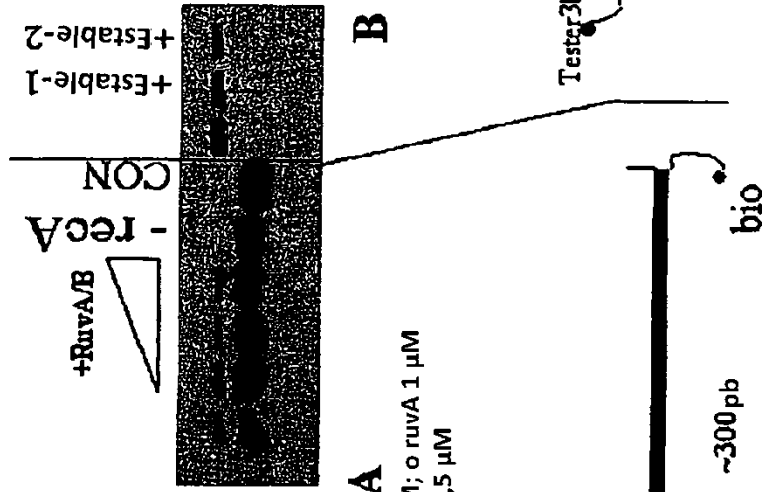
Figura 9

Experimento de activación inversa

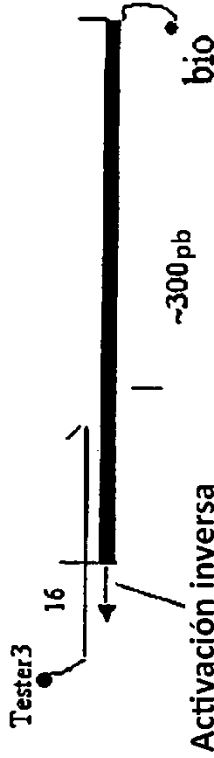
Condiciones:

- Acetato de Mg 10 mM
- 7,5 µg de recA
- 1 µg de SSB
- Fosfocreatina 27 mM
- 1 unidad de creatina cinasa
- Tester3bio 0,3 µM
- ATP 3 mM
- dNTP 200 µM
- 50 unidades de Klenow
- 0,5 pmoles de molde biotinilado
- Opcional: ruvA 0,5 µM y ruvB 0,5 µM; o ruvA 1 µM y ruvB 1 µM, o ruvA 1,5 µM y ruvB 1,5 µM

A



Vol. final=30µl, 37oC 1



Experimento de activación directa

Condiciones:

- Acetato de Mg 10 mM
- 10 µg de recA
- 1 µg de SSB
- Fosfocreatina 27 mM
- 1 unidad de creatina cinasa
- Tester3bio 0,3 µM
- ATP 3 mM
- dNTP 200 µM
- 50 unidades de Klenow
- 0,5 pmoles de molde no biotinilado
- Opcional: 5 µl de oligonucleótido de ATPyS estable cargado previamente

Vol. final=30µl, 37°C 1 horas

Condiciones de carga previa
Acetato de Mg 10 mM
2,5 µg de recA
ATP-γ-S 50 µM
oligonucleótido 0,15 µM

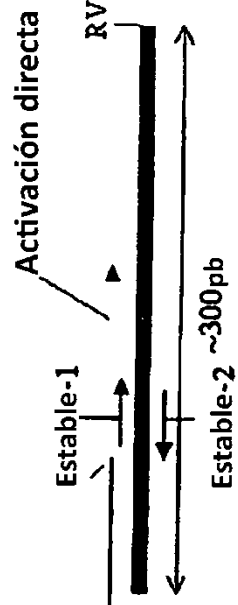
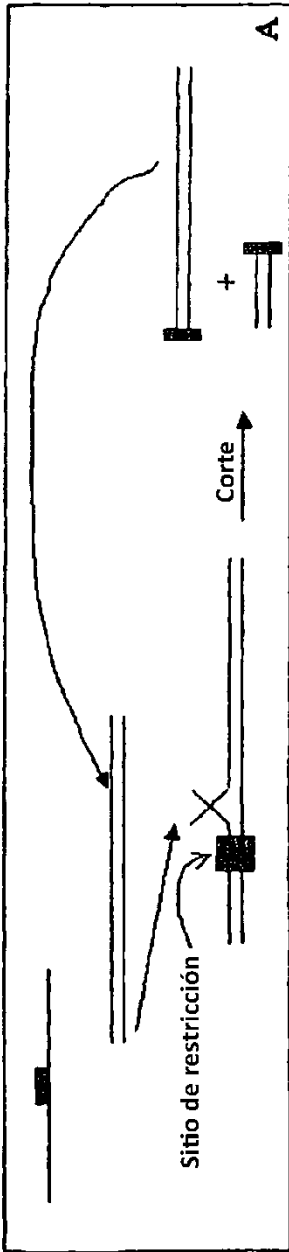


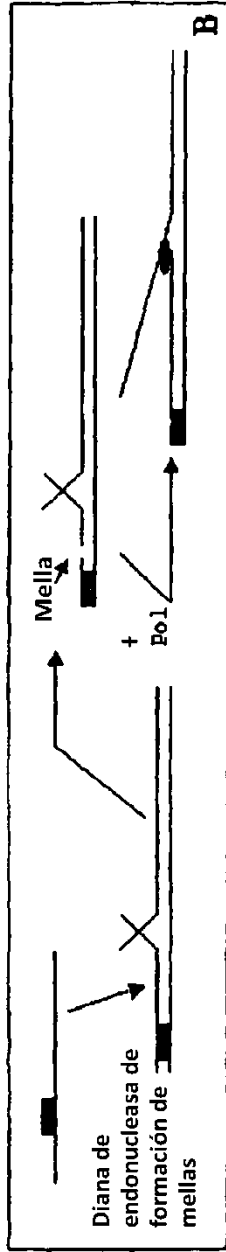
Figura 10

Utilizaciones para cebado de RPA de "activación inversa"

1. Amplificación lineal de ADNbc cortos



2. Introducción de un sitio de formación de mellas



3. Inserción de promotor de ARN polimerasa

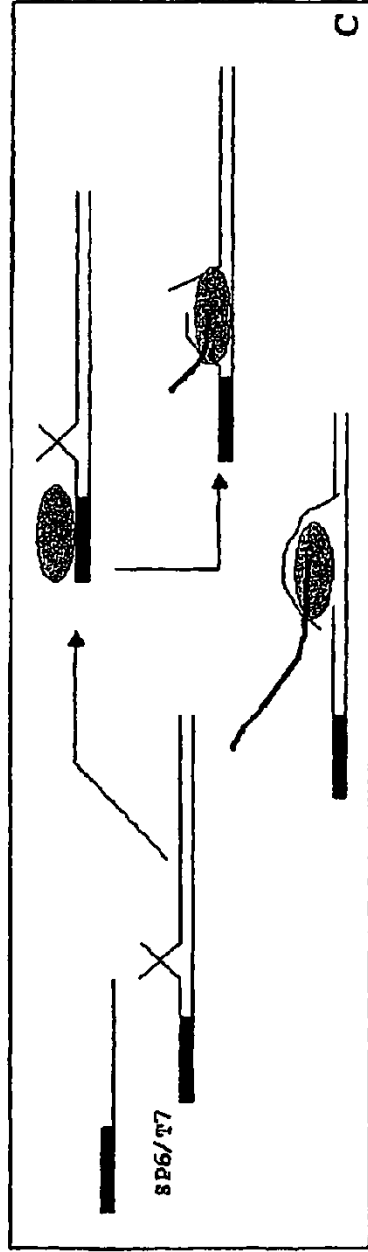


Figura 11

Tanto SSB de E. coli como gp32(N) de fago T4 soportan reacciones de recombinación/extensión

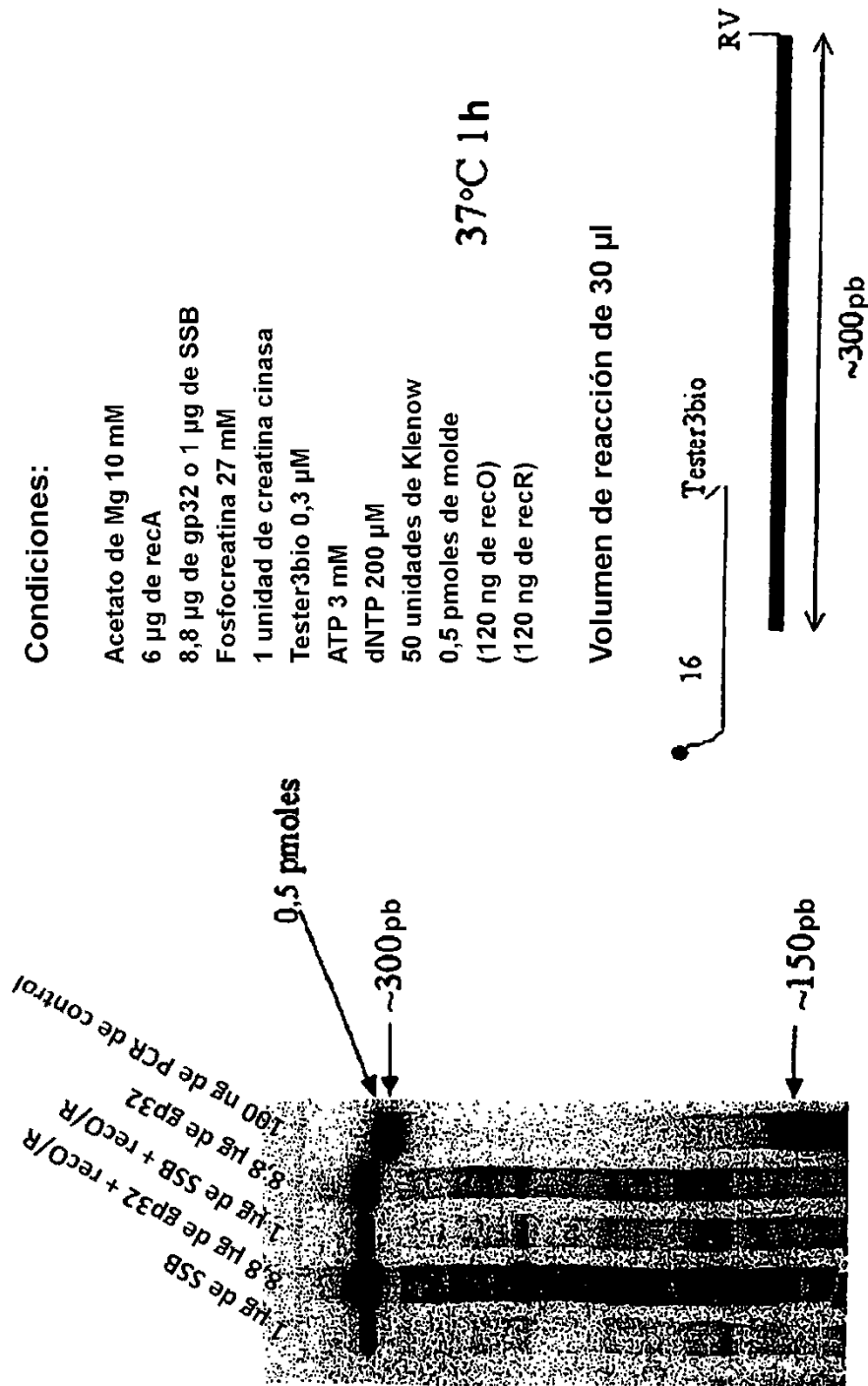


Figura 12

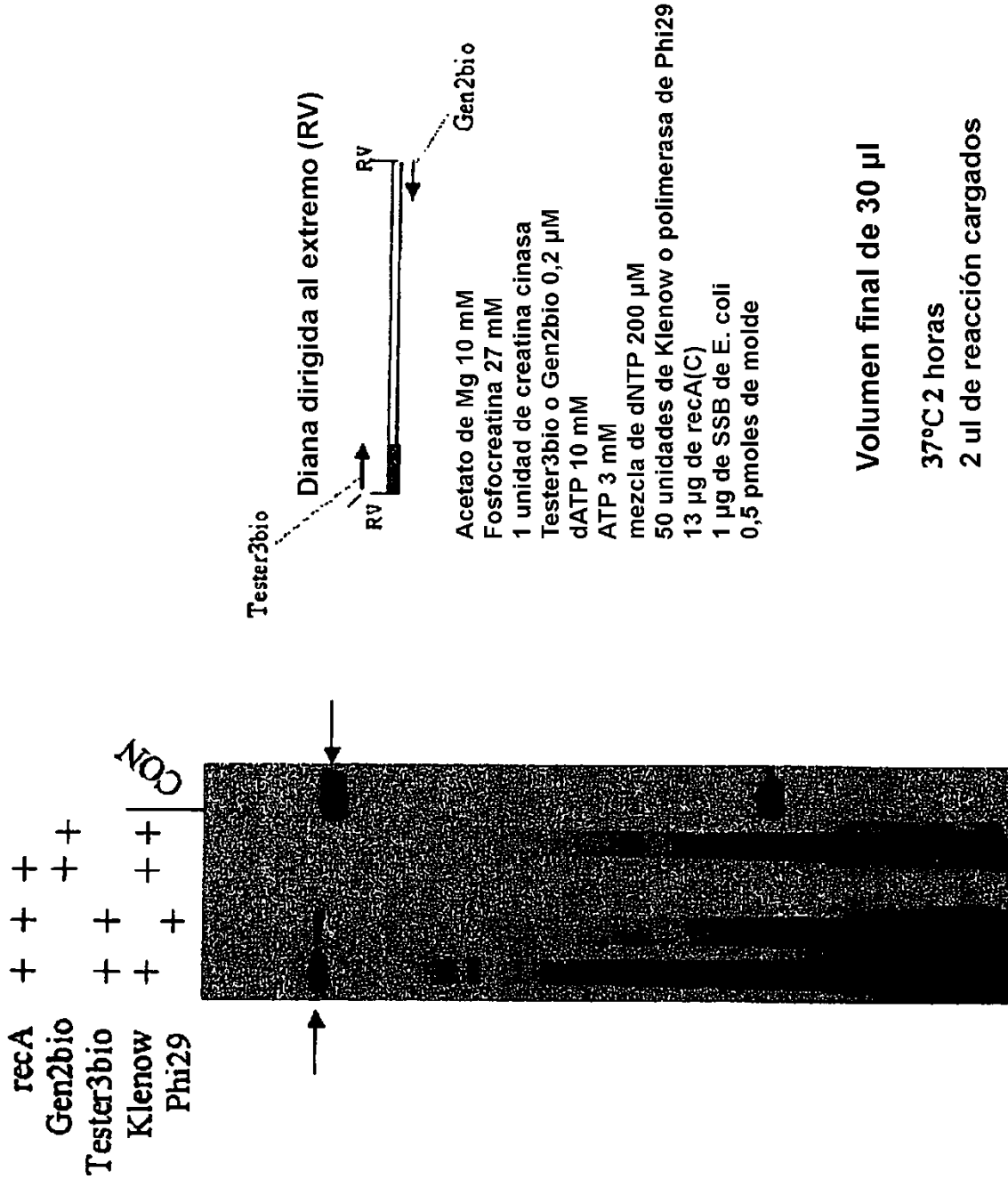


Figura 13

Selección como diana de extremos frente a selección como diana de secuencias incrustadas

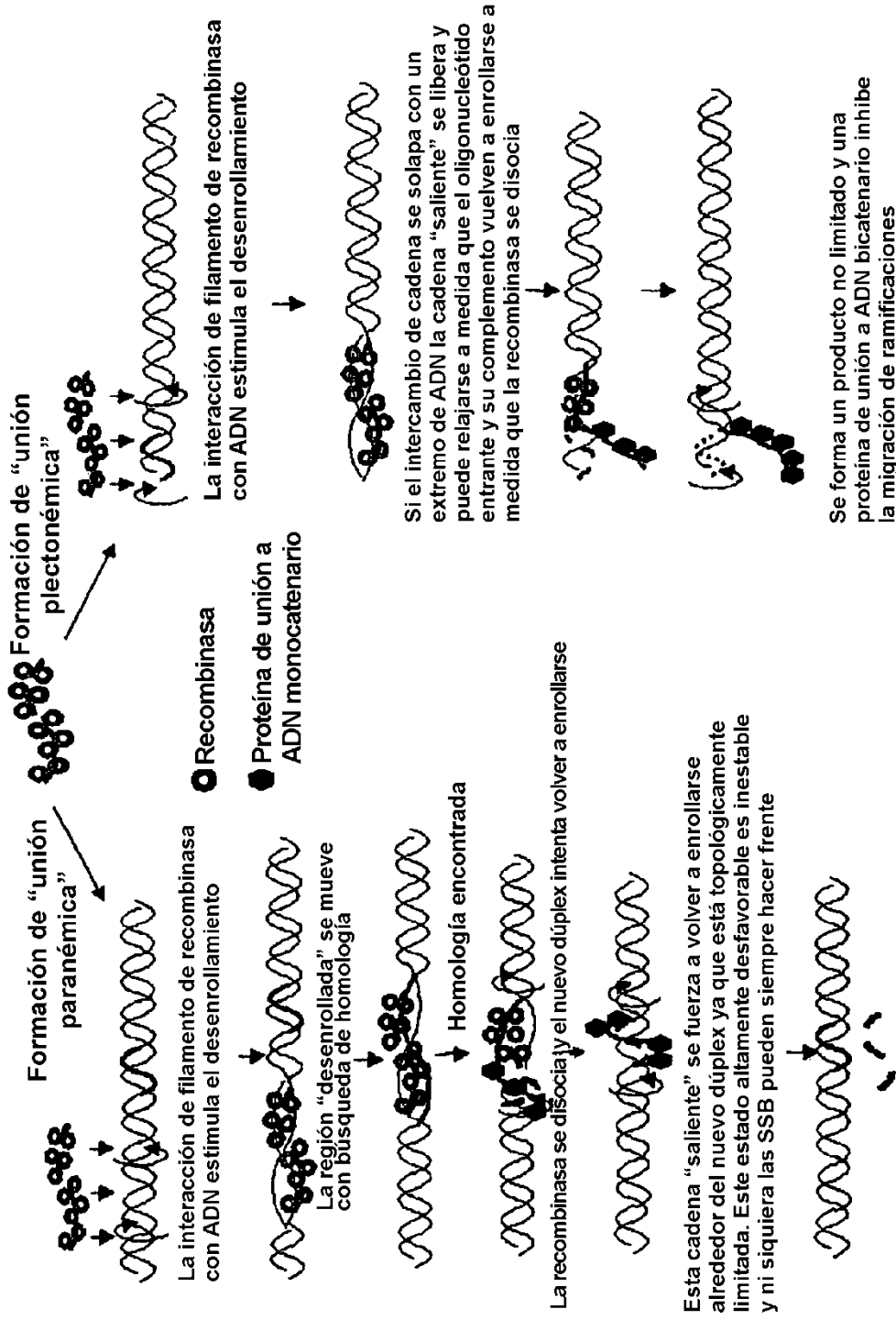


Figura 14

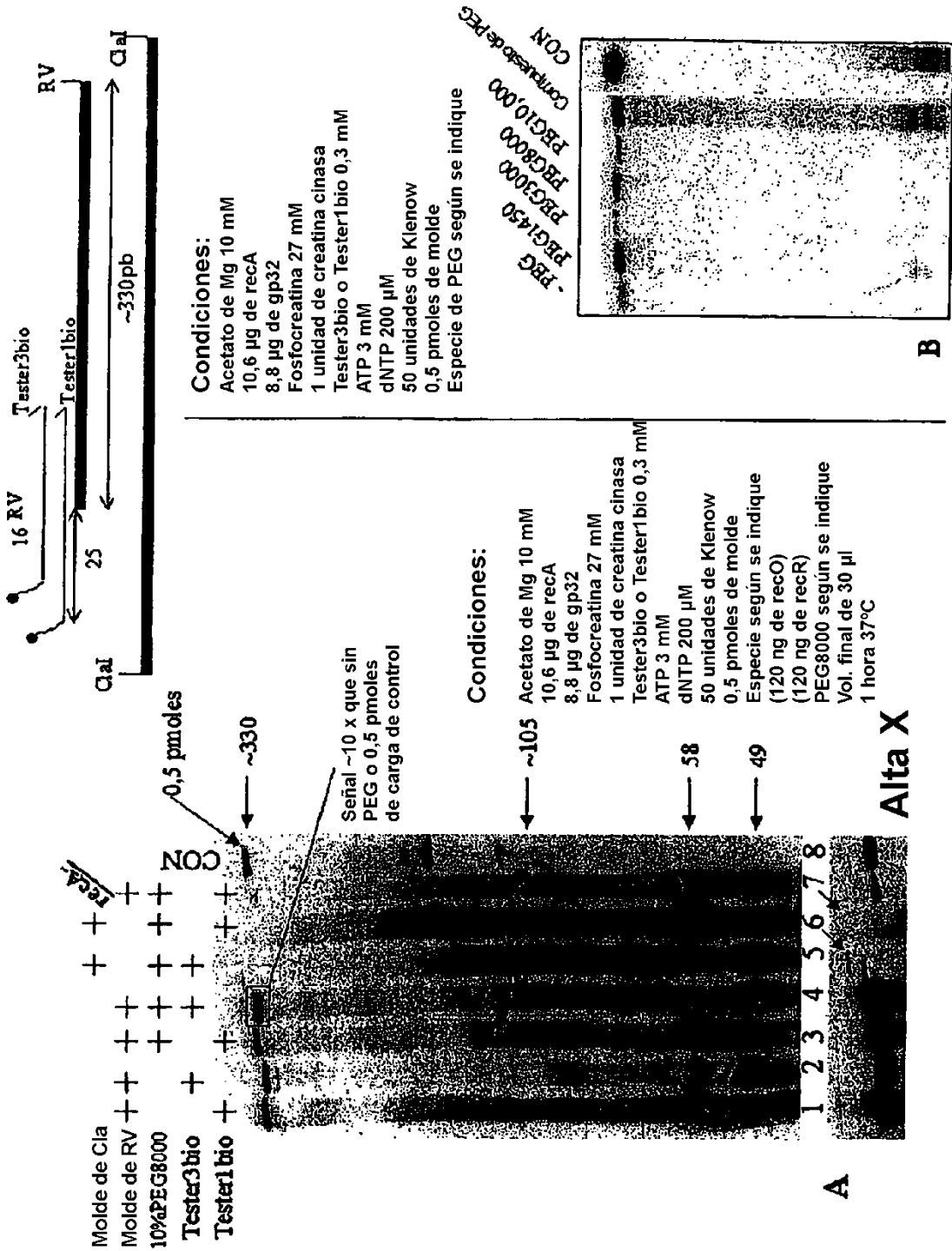
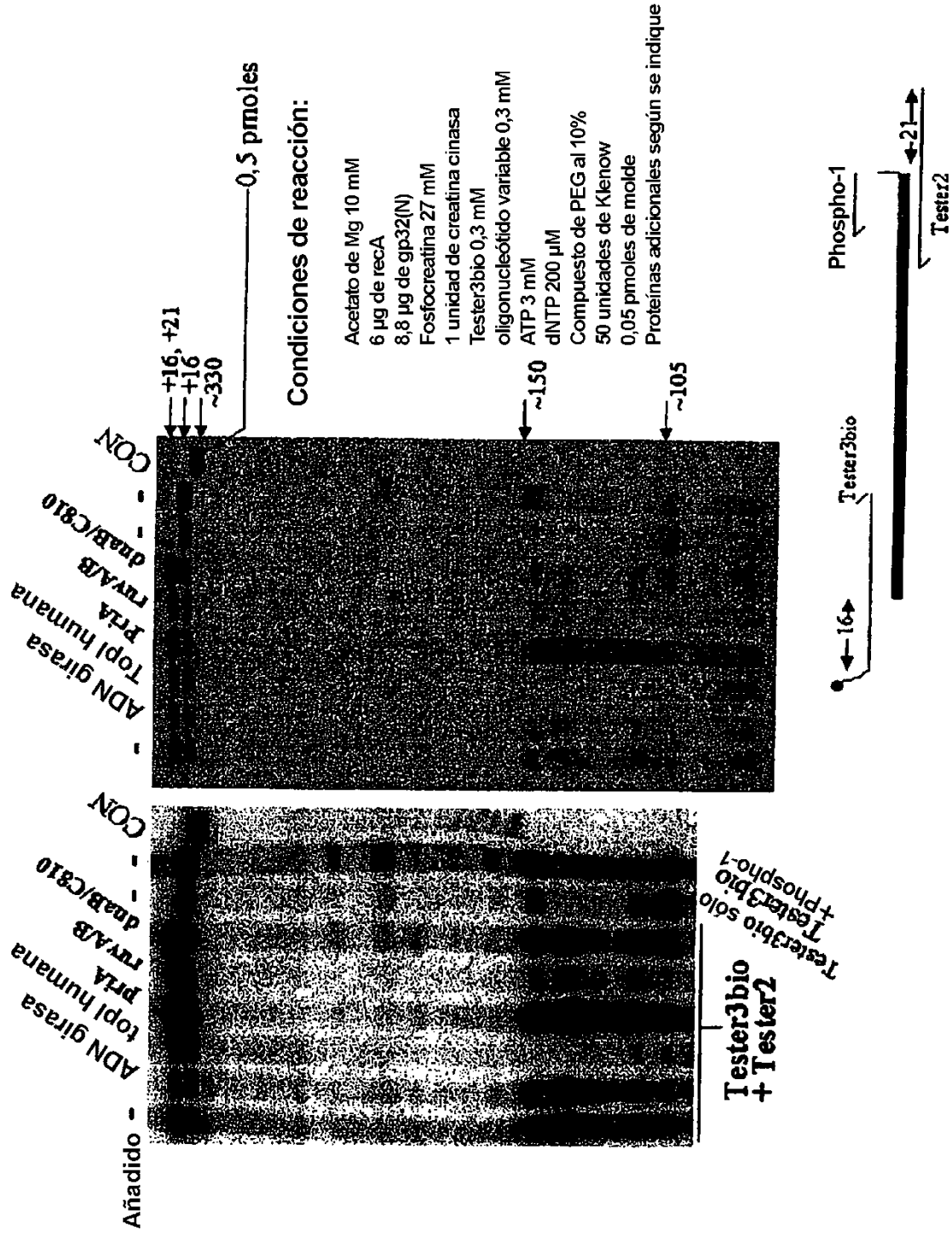


Figura 15



Sensibilidad de RPA

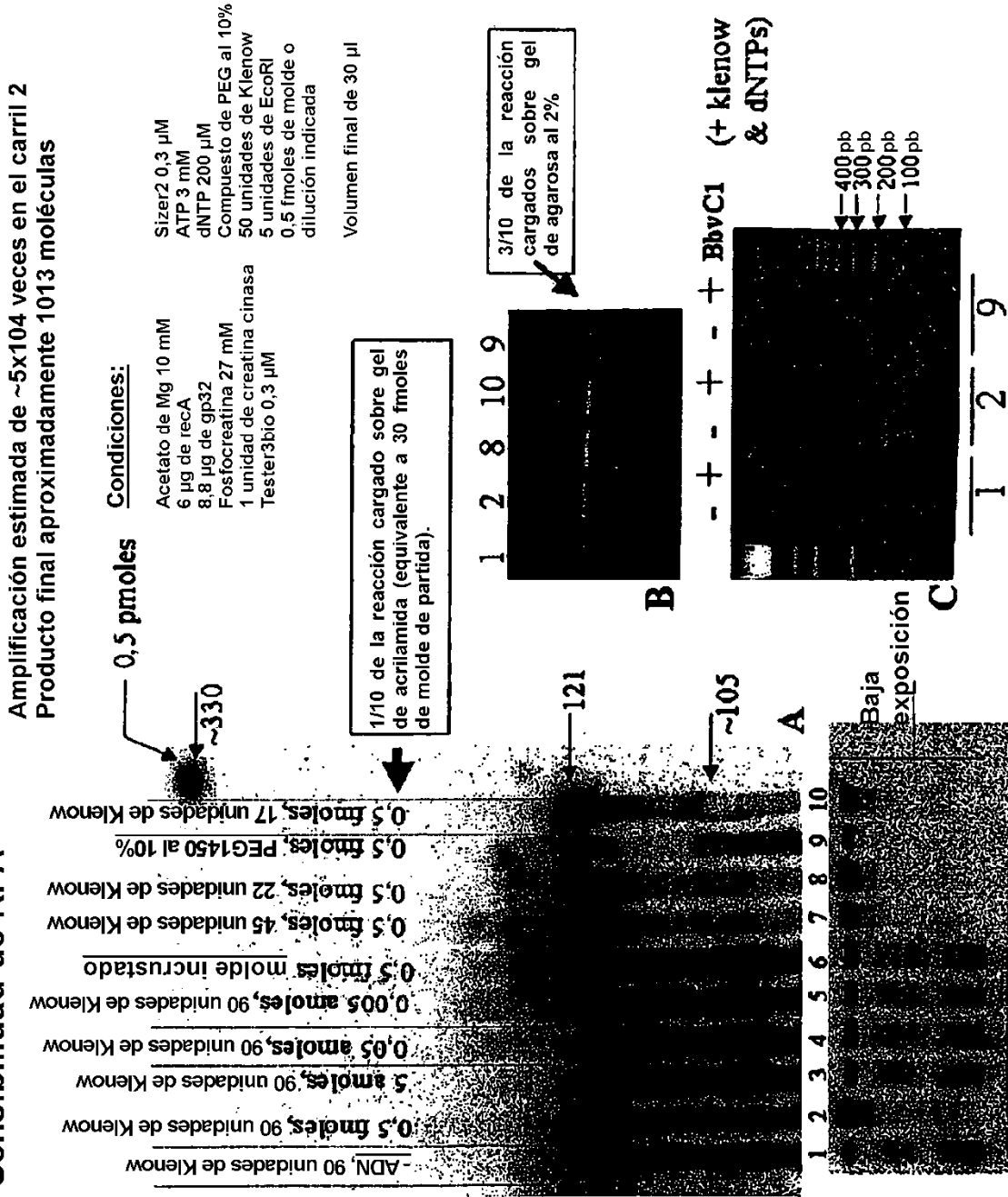


Figura 19

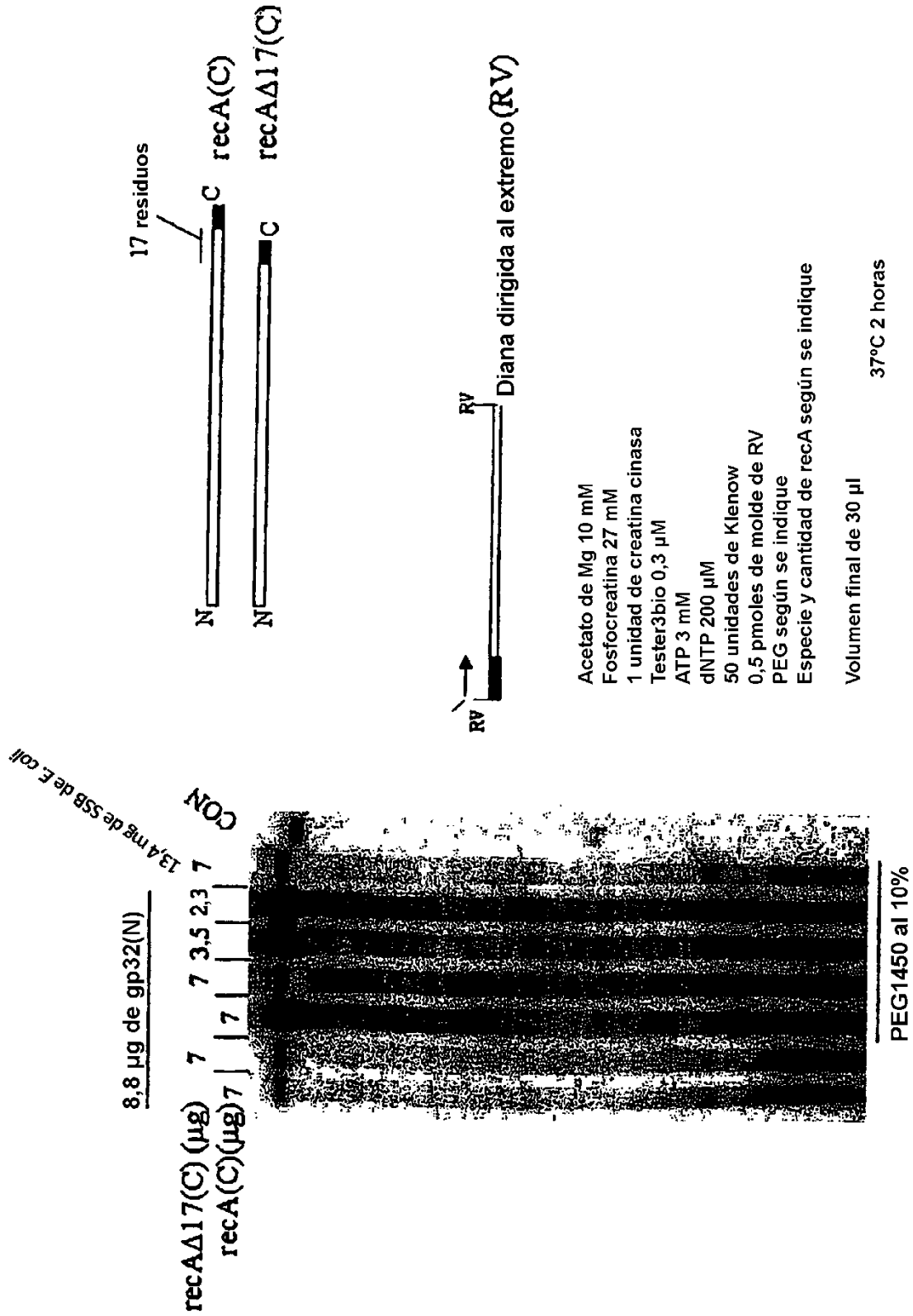


Figura 20

Estructura esquemática de proteínas gp32 utilizadas en este estudio

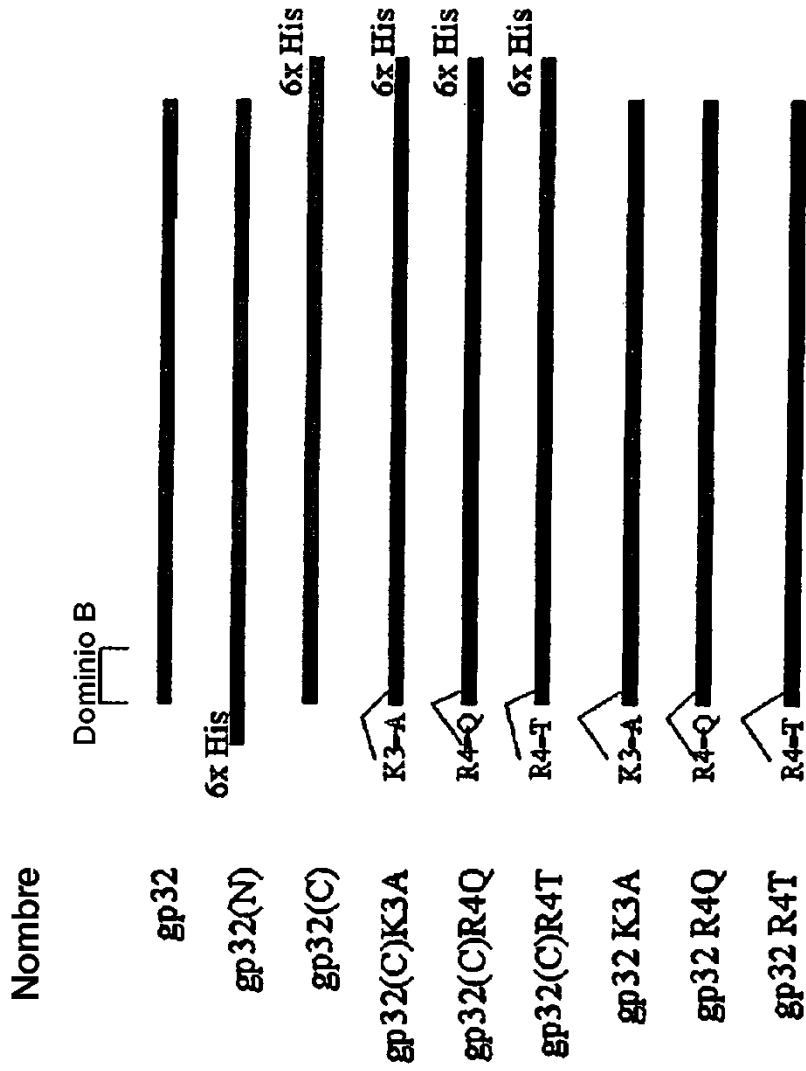


Figura 21

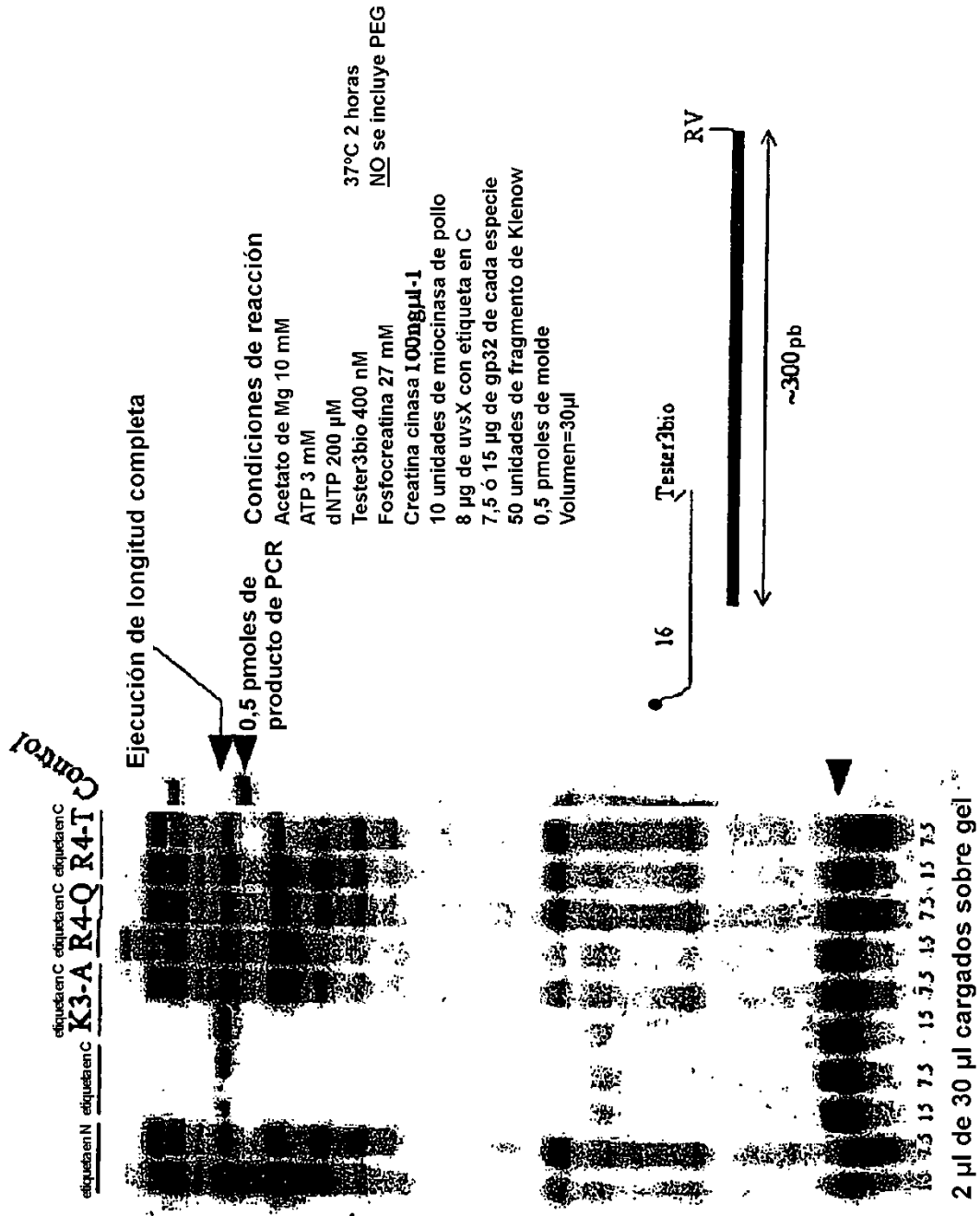


Figura 22

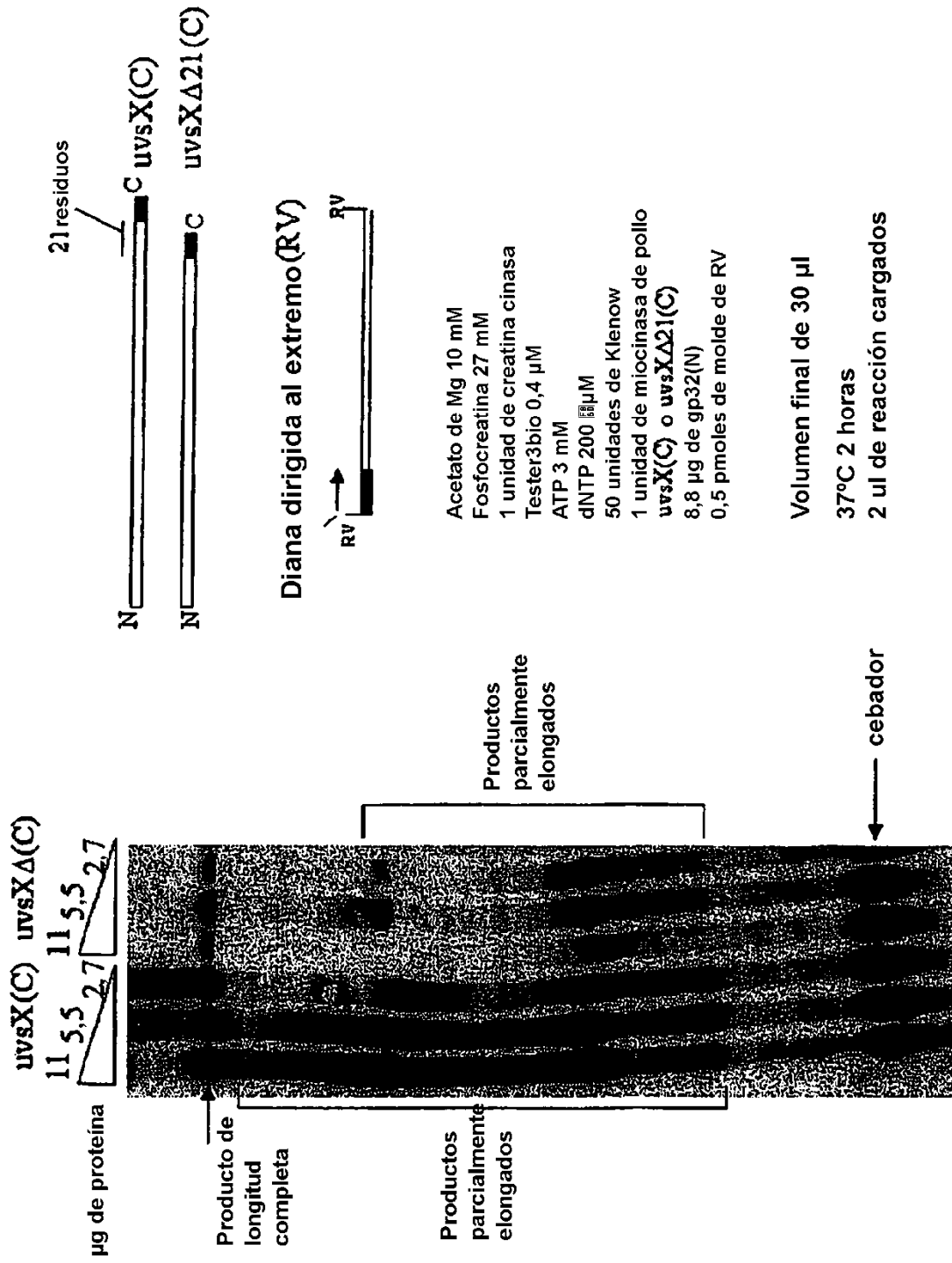


Figura 23

El gp32 con etiqueta en el extremo C-terminal es cualitativamente diferente de gp32 sin etiqueta

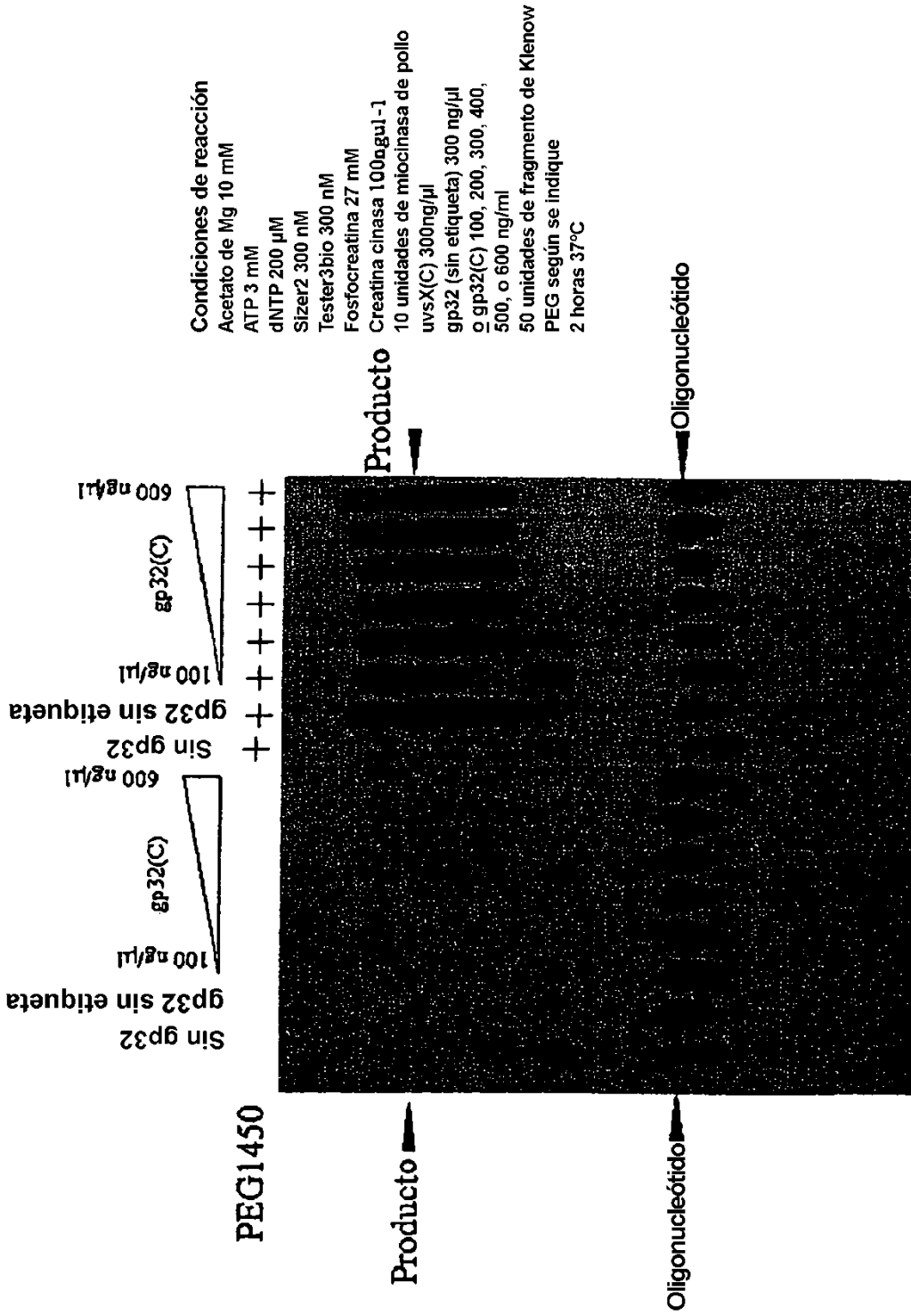


Figura 25

Valoración de gp32 sin etiqueta y requisito de uvsY

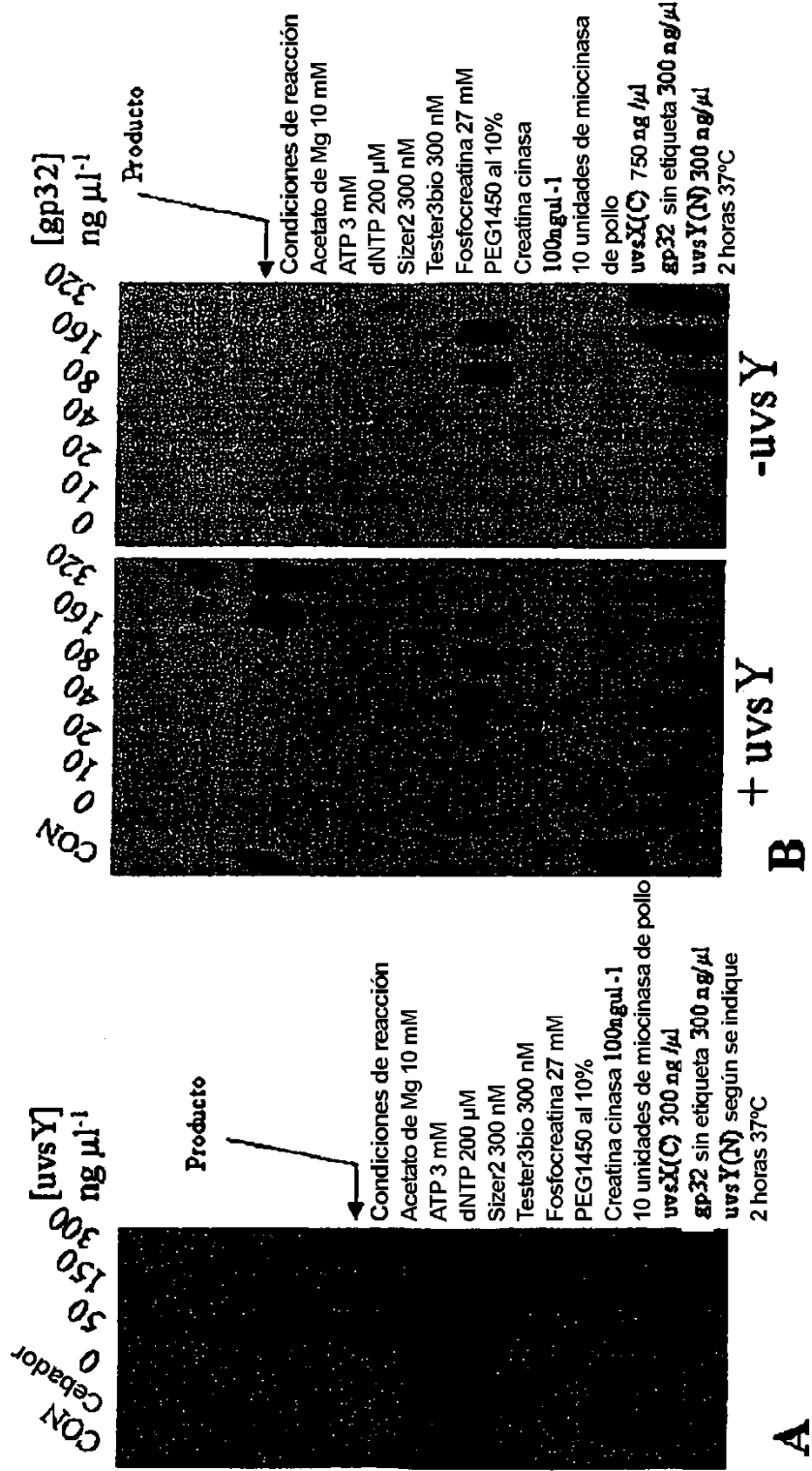


Figura 26

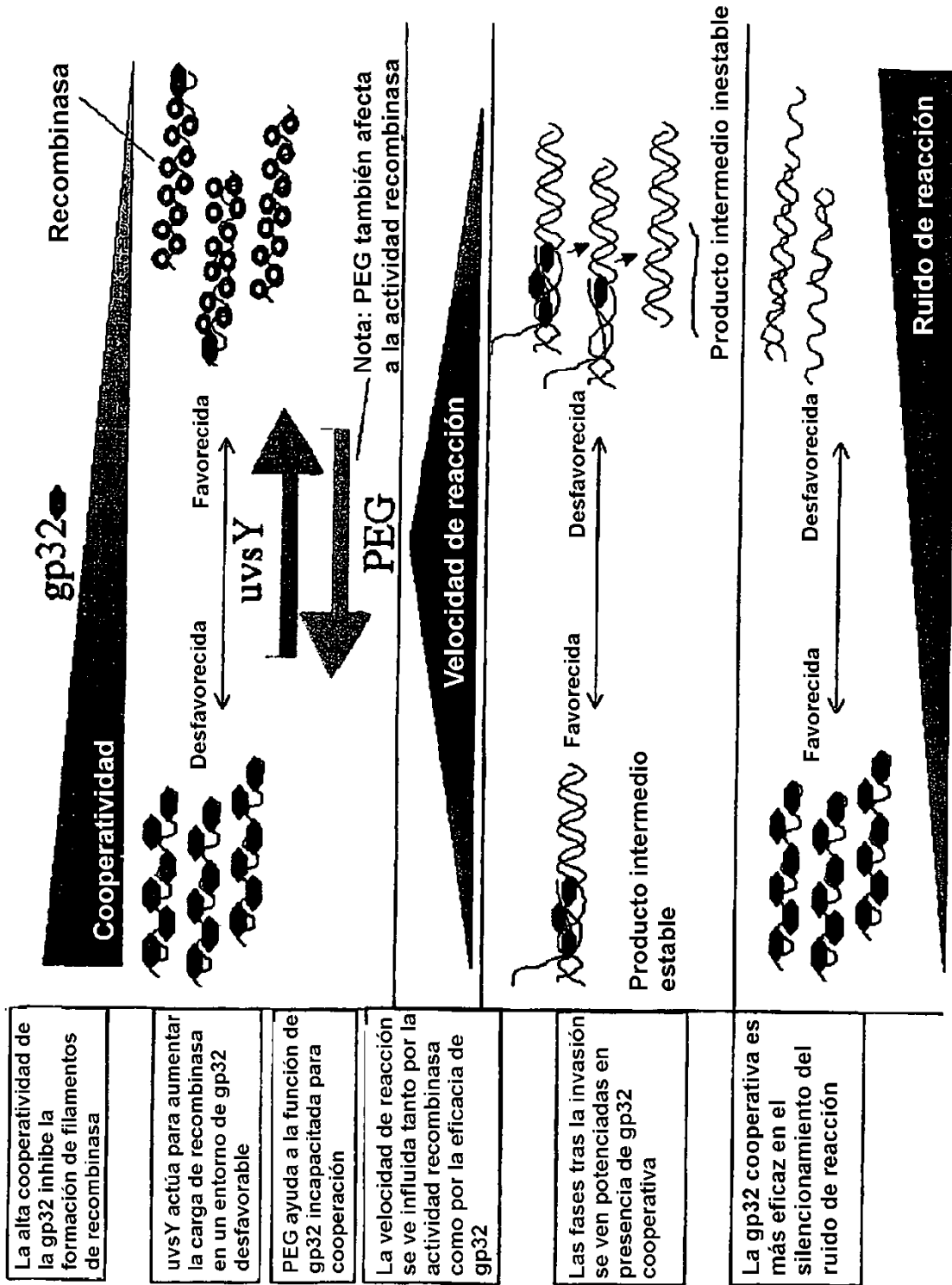


Figura 27

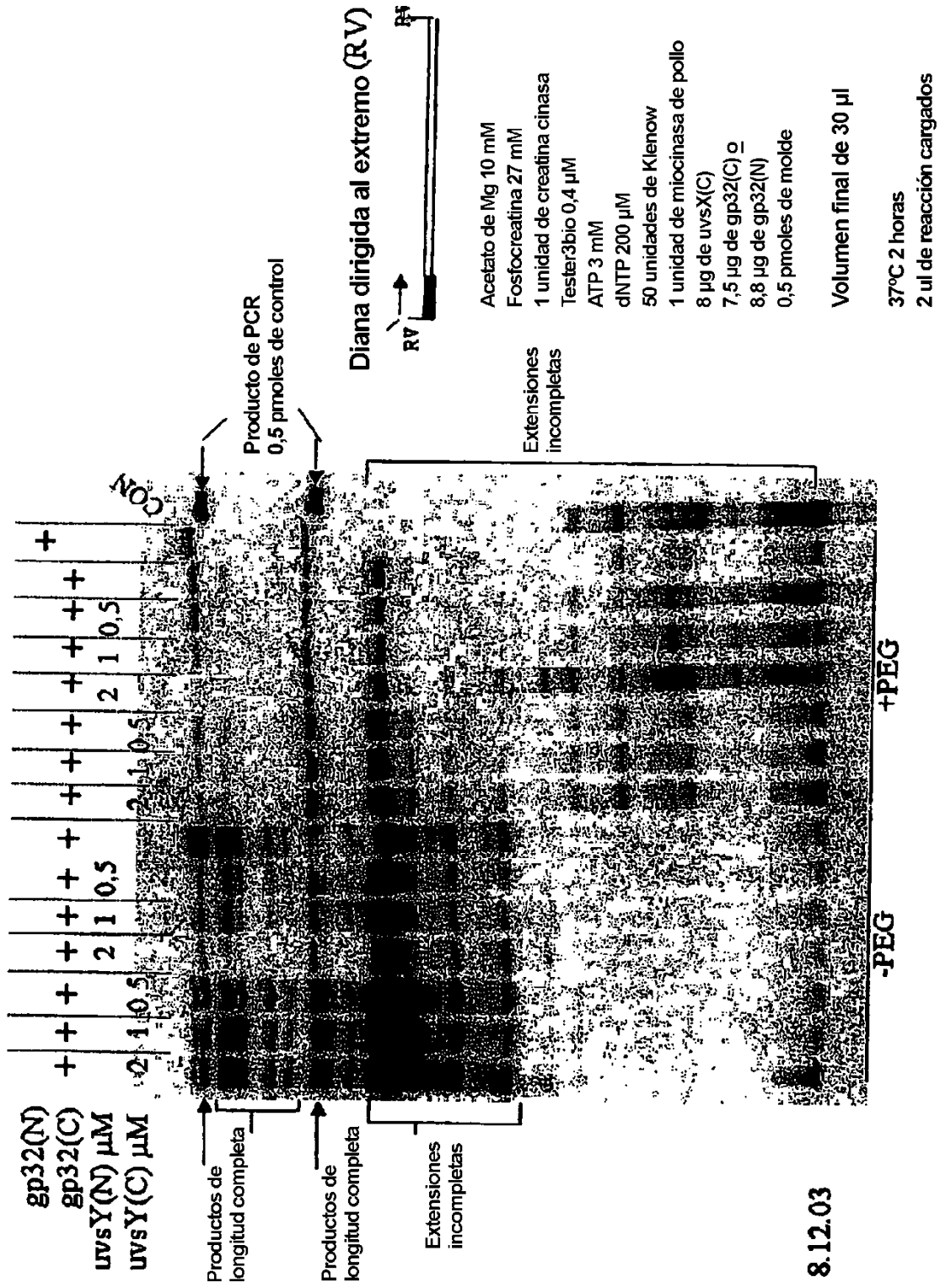
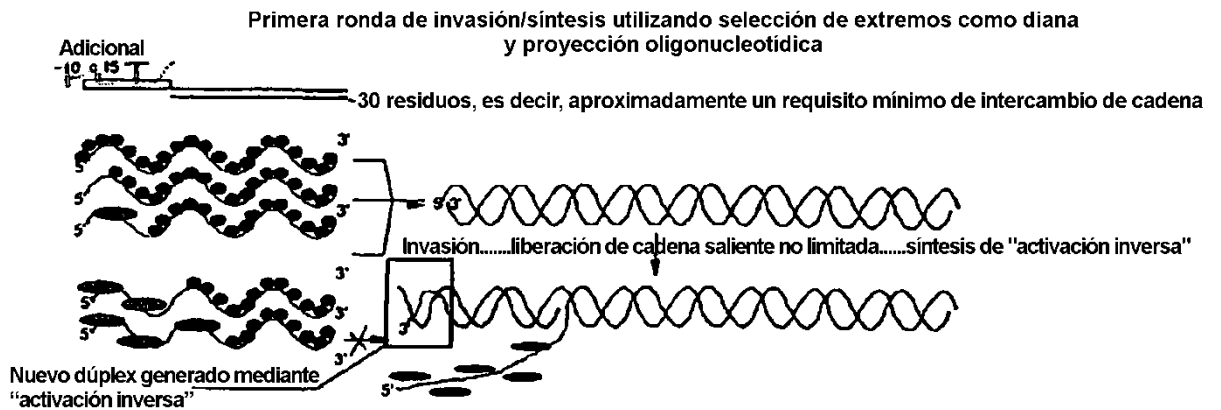


Figura 28



La mayoría de los filamentos de nucleoproteínas que están lo suficientemente recubiertos para completar el intercambio de cadena catalizarán la liberación completa y no limitada de la cadena saliente

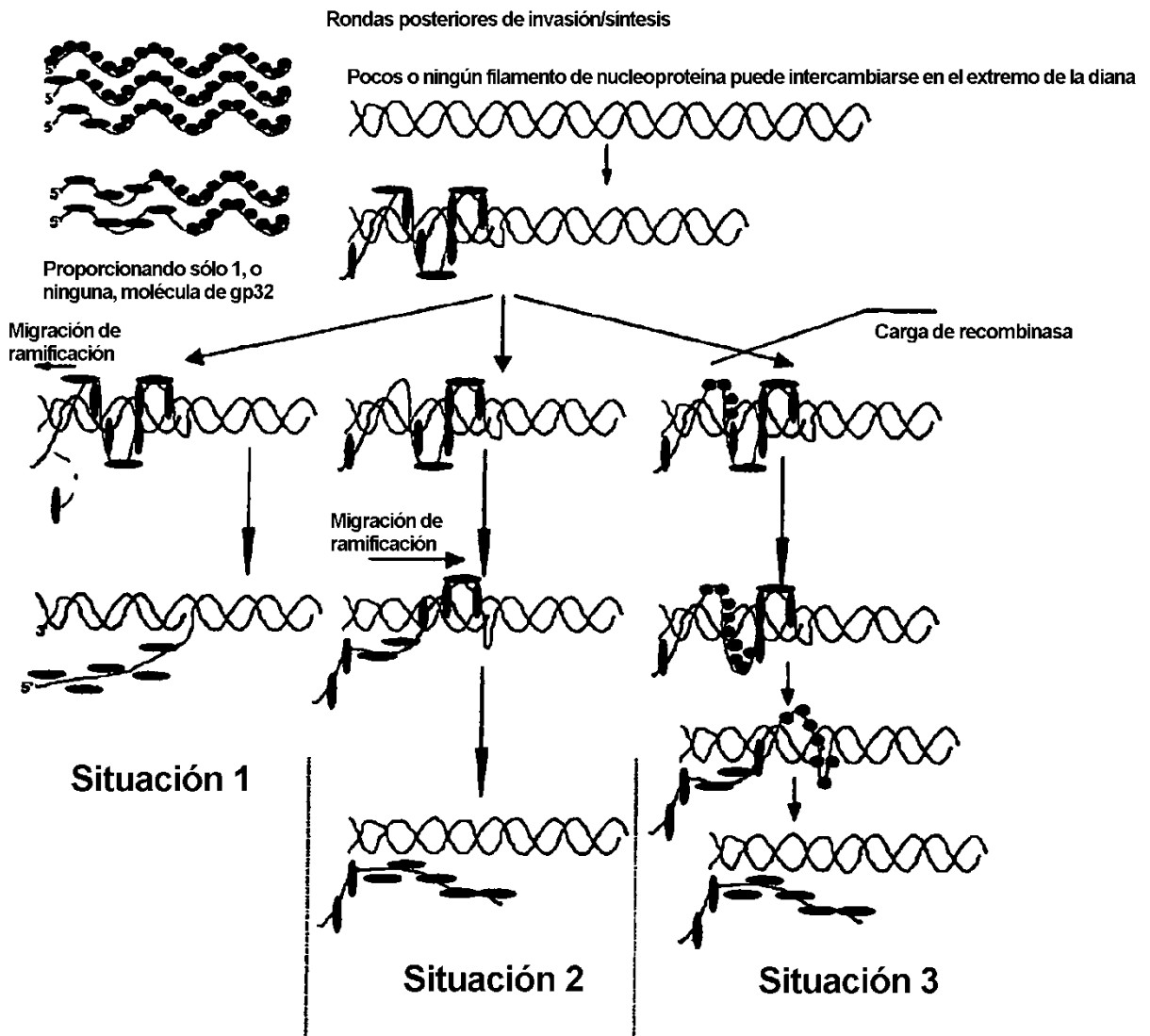


Figura 29

Reacción de RPA a partir de ADN genómico humano: comparar molde no cortado frente a cortado; comparar pares de cebadores

Condiciones de reacción

- Acetato de Mg 10 mM
- ATP 3 mM
- dNTP 200 µM
- cebador Up3 300 nM
- cebador Down1, 2 ó 3 300 nM
- Fosfocreatina 27 mM
- Creatina cinasa **100ngul-1**
- 10 unidades de miocinasa de pollo
- usvX(C) 300ng/µl
- gp32(C)K3A 300 ng/µl
- usvY(N)50 ng/µl
- 50 unidades de fragmento de Klenow
- PEG1450 al 10%

Volumen de reacción final de 30 µl
37°C 5 horas

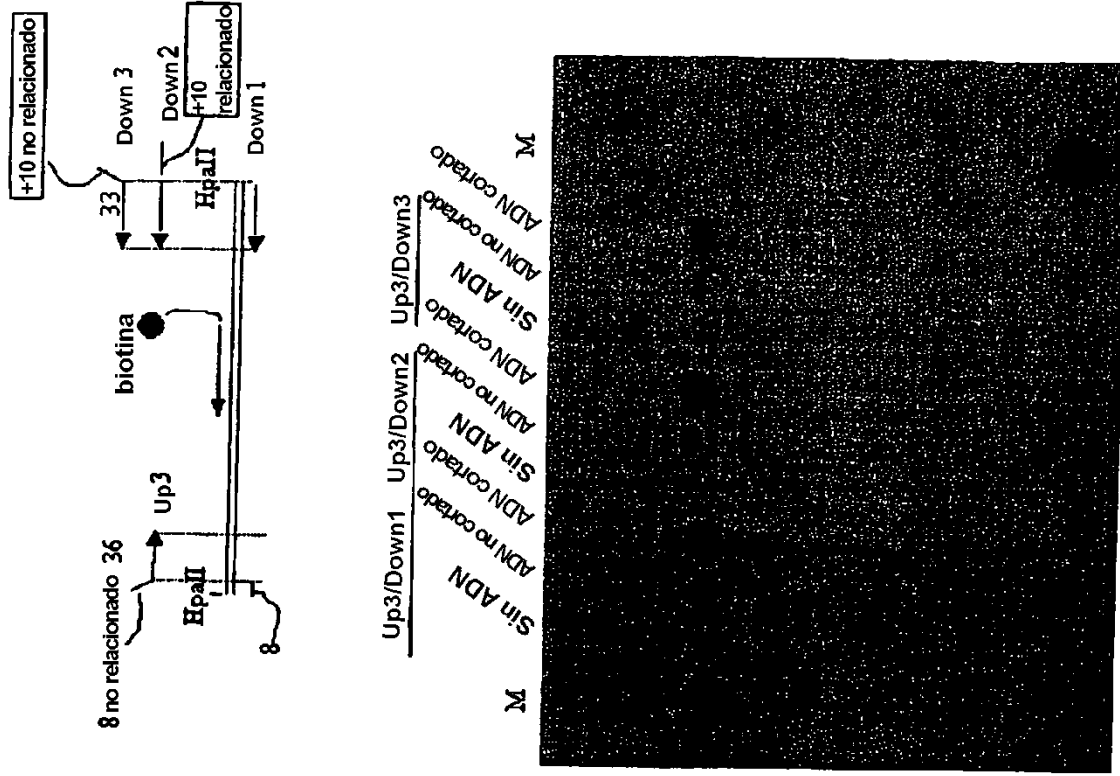


Figura 30

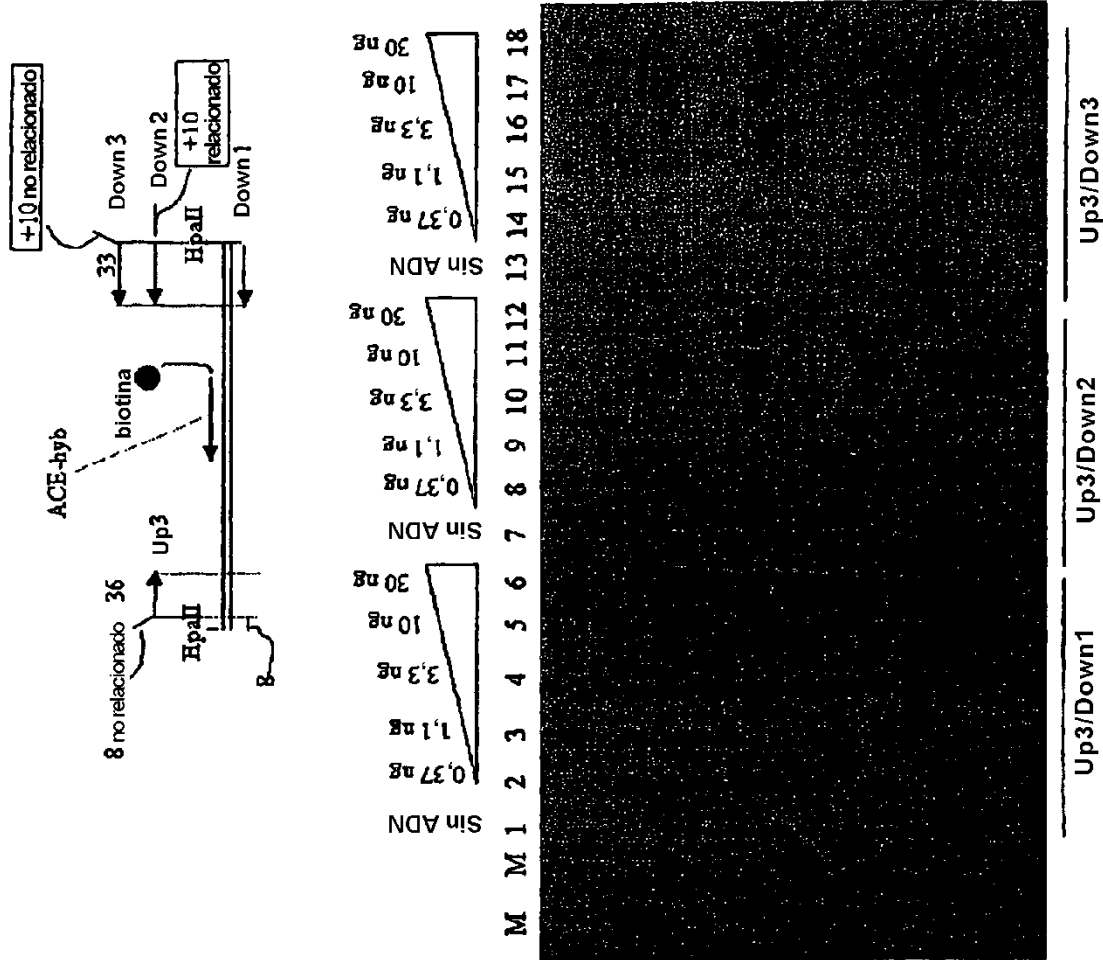


Figura 31

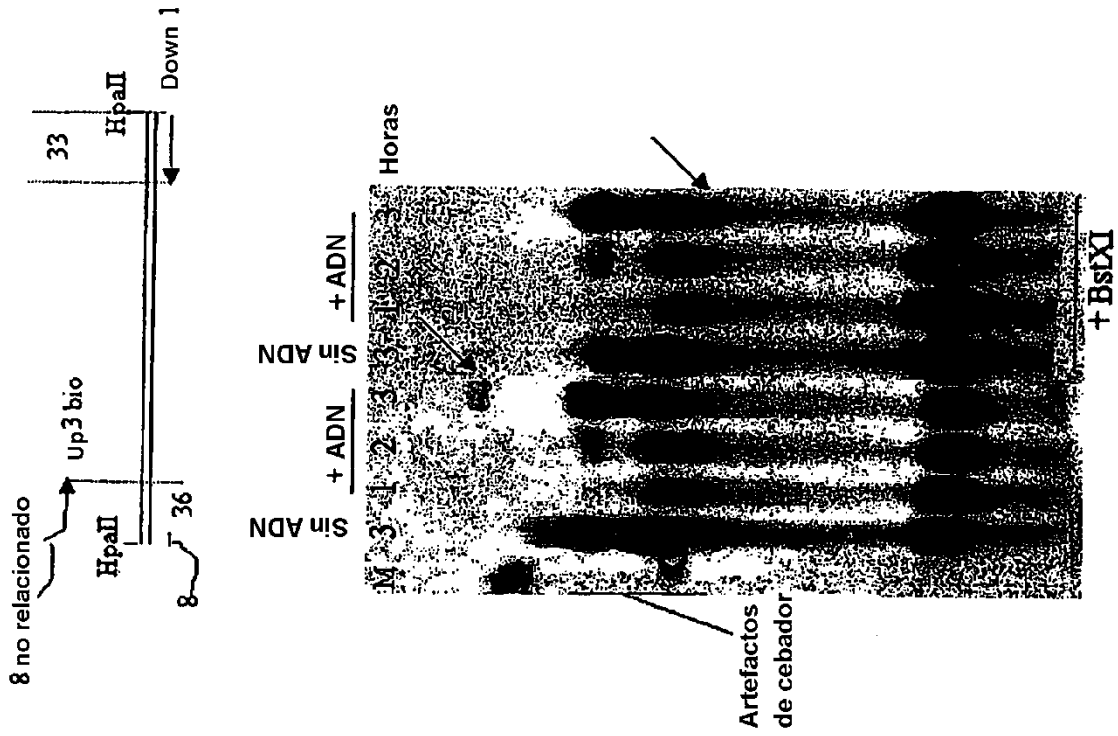
Condiciones de reacción

- Acetato de Mg 10 mM
- ATP 3 mM
- dNTP 200 µM
- cebador Up3 300 nM
- cebador Down1, 2 ó 3 300 nM
- Fosfocreatina 27 mM
- Creatina cinasa 100ngµl⁻¹
- 10 unidades de miocinasa de pollo
- uvsX(C) 300ng/µl**
- gp32(C)K3A 300 ng/µl**
- uvsY(N) 50 ng/µl**
- 50 unidades de fragmento de Klenow
- PEG1450 al 10%

Volumen de reacción final de 30 µl

37°C 5 horas

Sonda **ACE-hyb**



Condiciones de reacción

- Acetato de Mg 10 mM
- ATP 3 mM
- dNTP 200 µM
- cebador Up3bio 300 nM
- cebador Down1 300 nM
- Fosfocreatina 27 mM
- Creatina cinasa 100mgµl-1
- 10 unidades de miocinasa de pollo
- uvsX(C) 300ng/µl
- gp32(C) 300 ng/µl
- uvsY(N) 50 ng/µl
- 50 unidades de fragmento de Klenow
- PEG1450 al 10%

Volumen de reacción final de 30 µl
37°C 5 horas

Figura 32

Modo mediante el cual pueden generarse artefactos de cebador en condiciones de baja temperatura

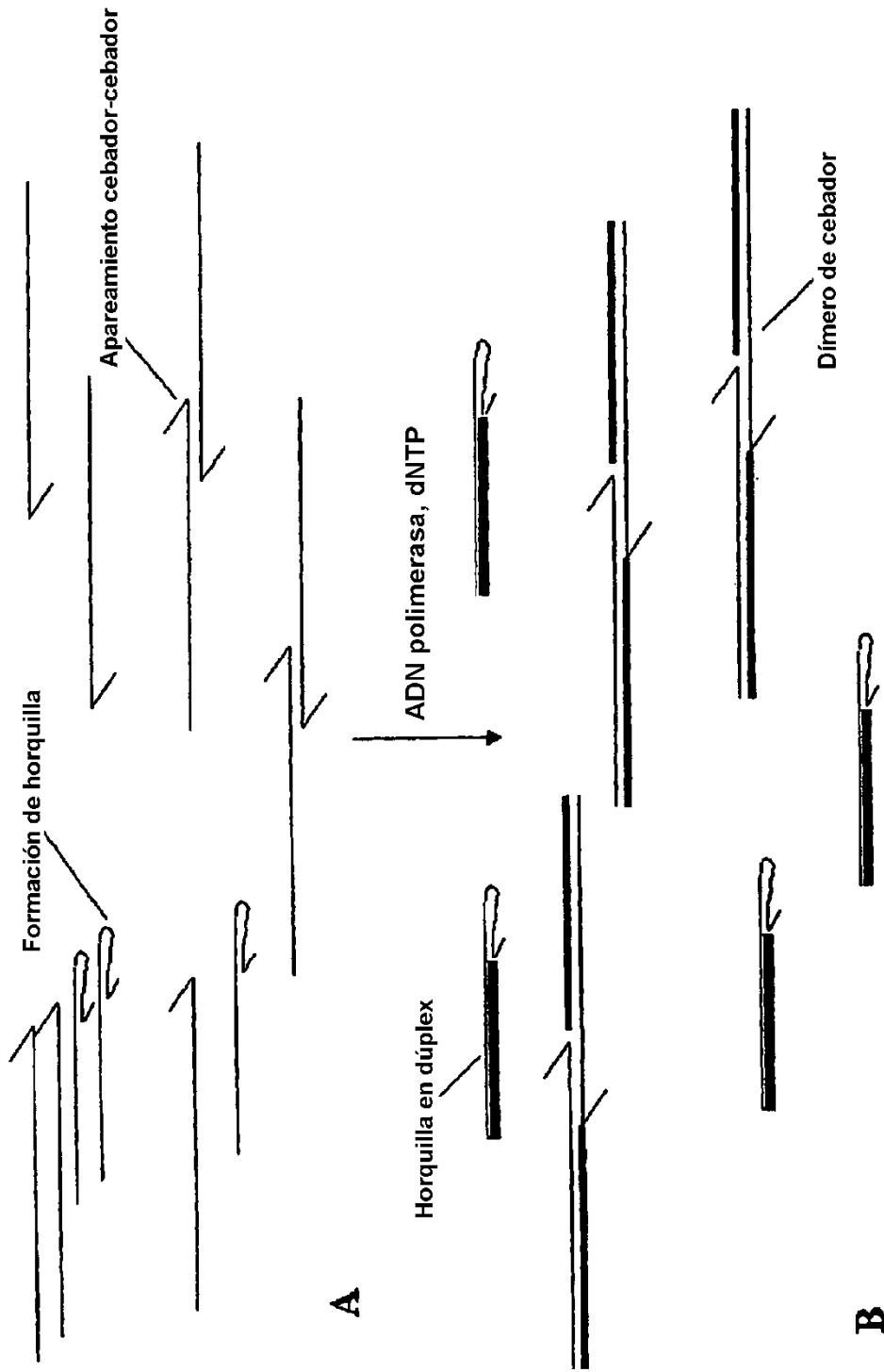


Figura 33

Procedimientos para limitar el ruido de cebador

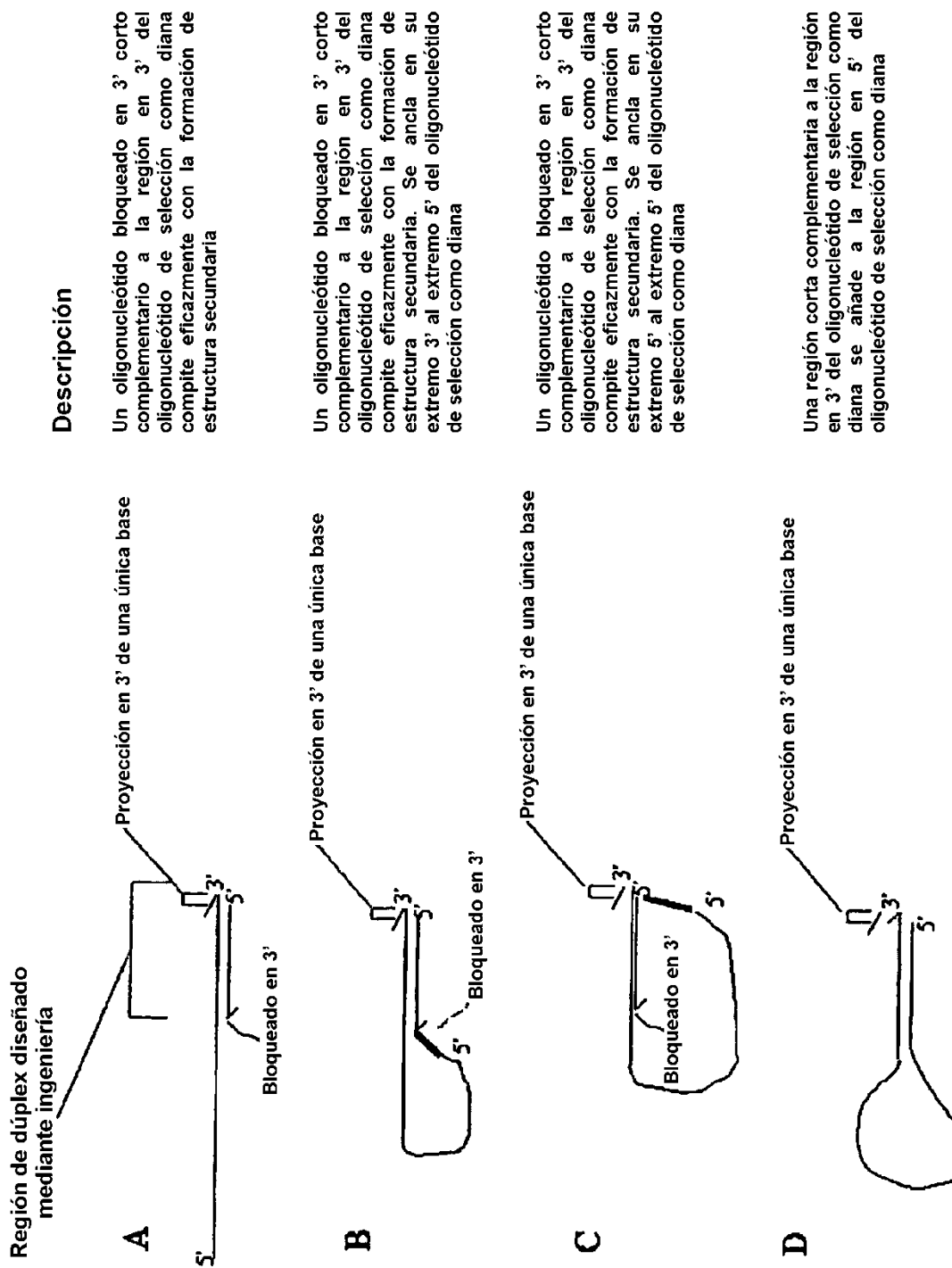


Figura 34

La utilización deliberada de oligonucleótidos de "horquilla" puede conducir al auto-cebado de cadenas desplazadas

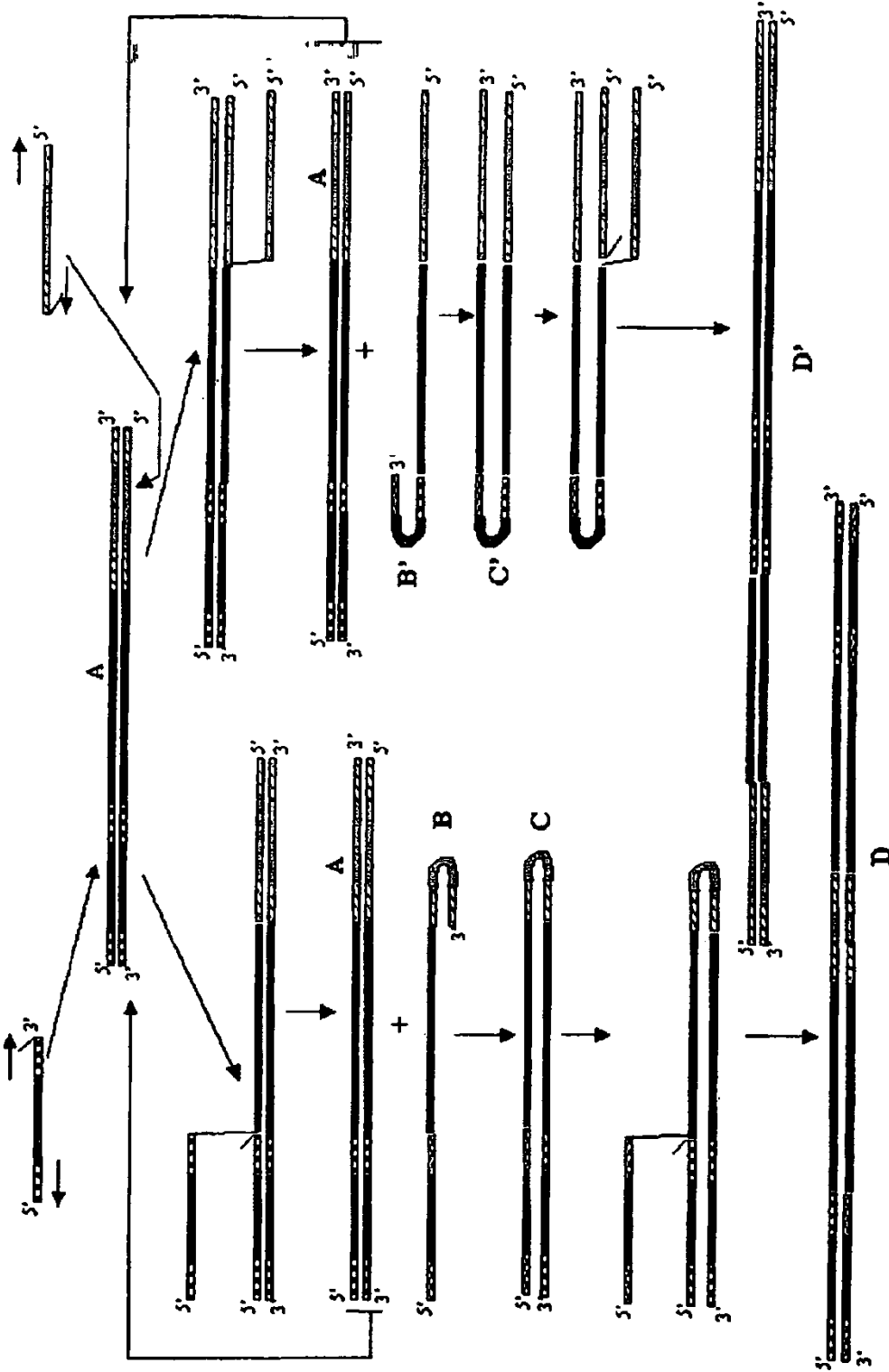


Figura 35

Establecimiento de condiciones para la amplificación sensible libre de ruido

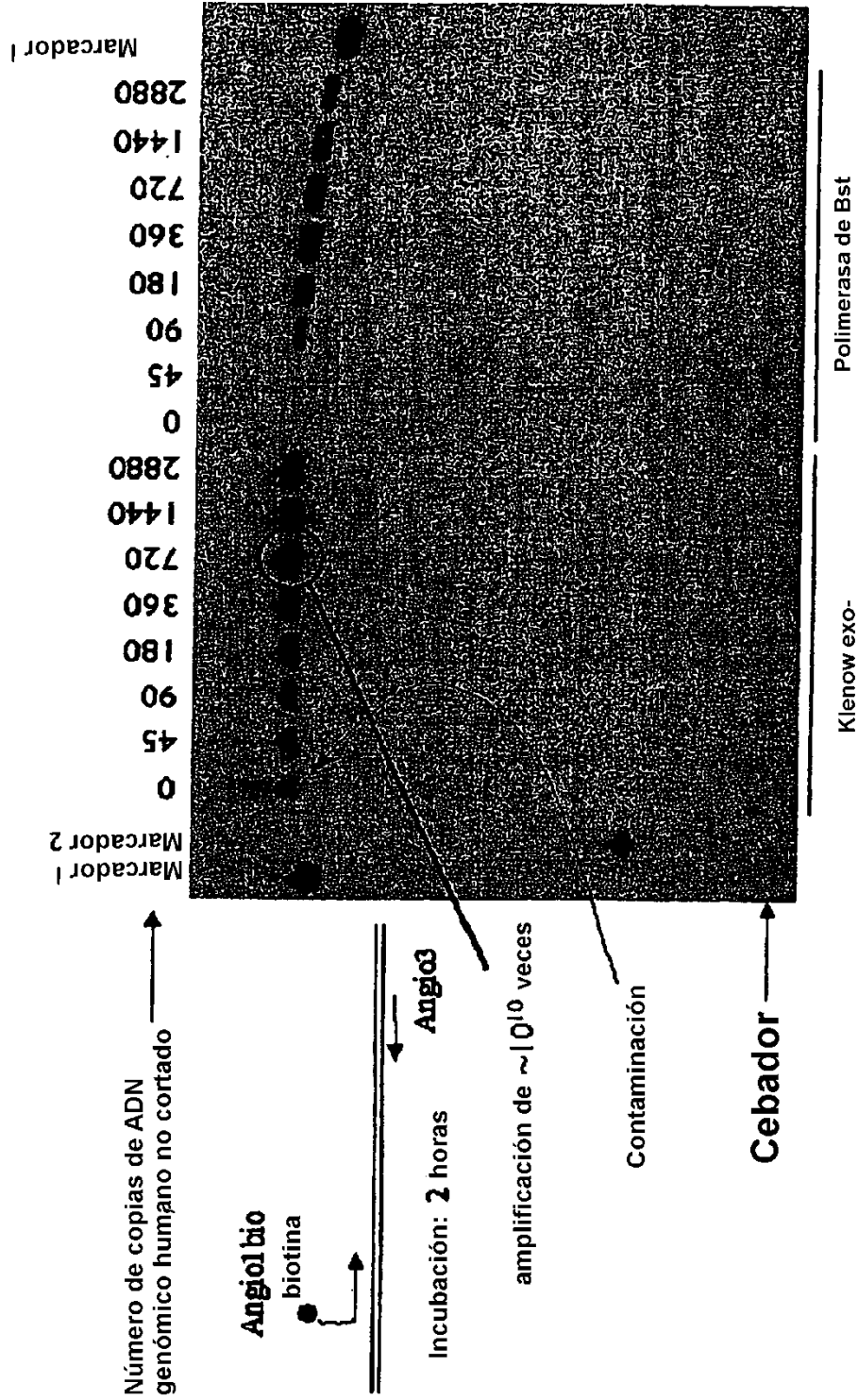


Figura 36

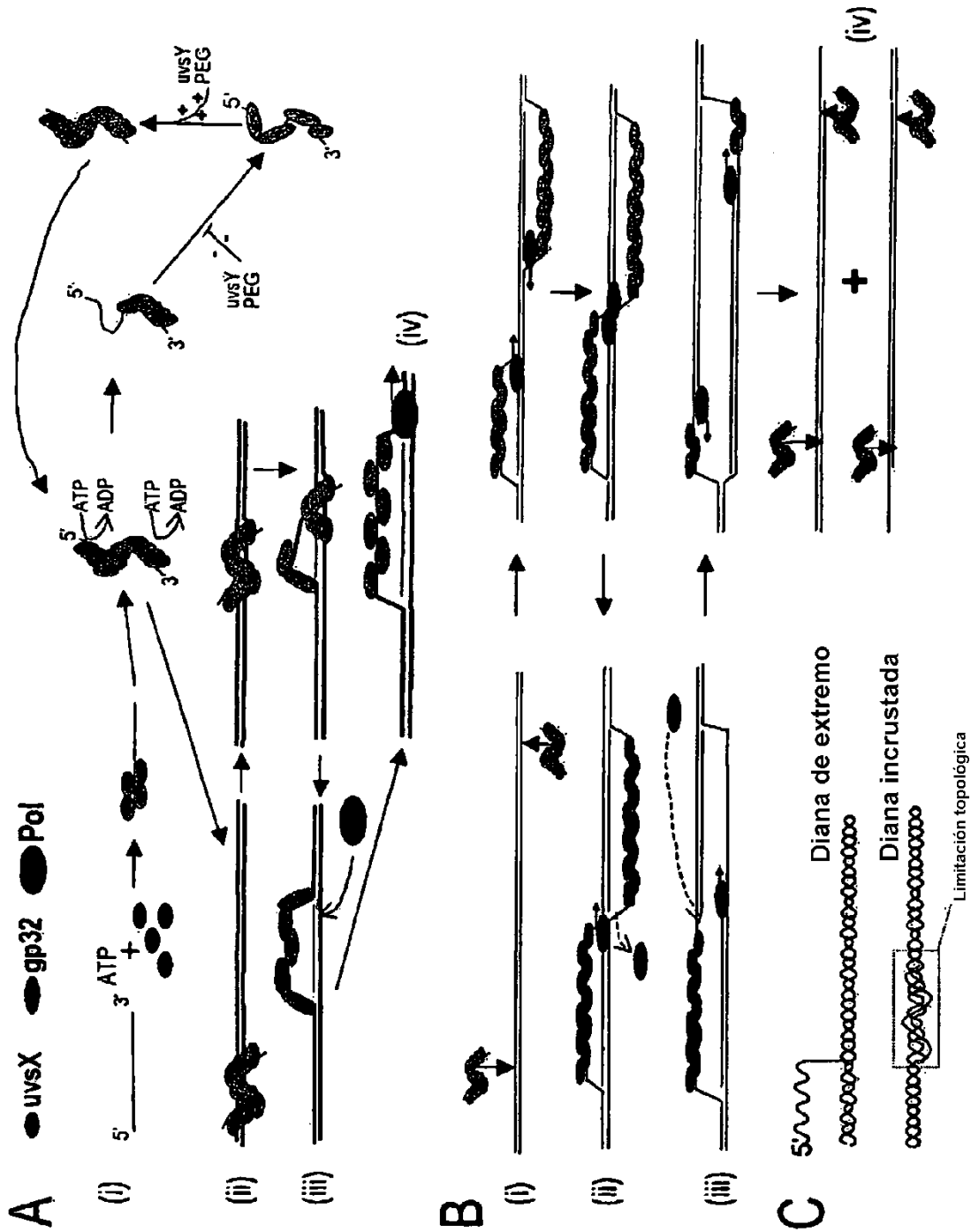


Figura 37

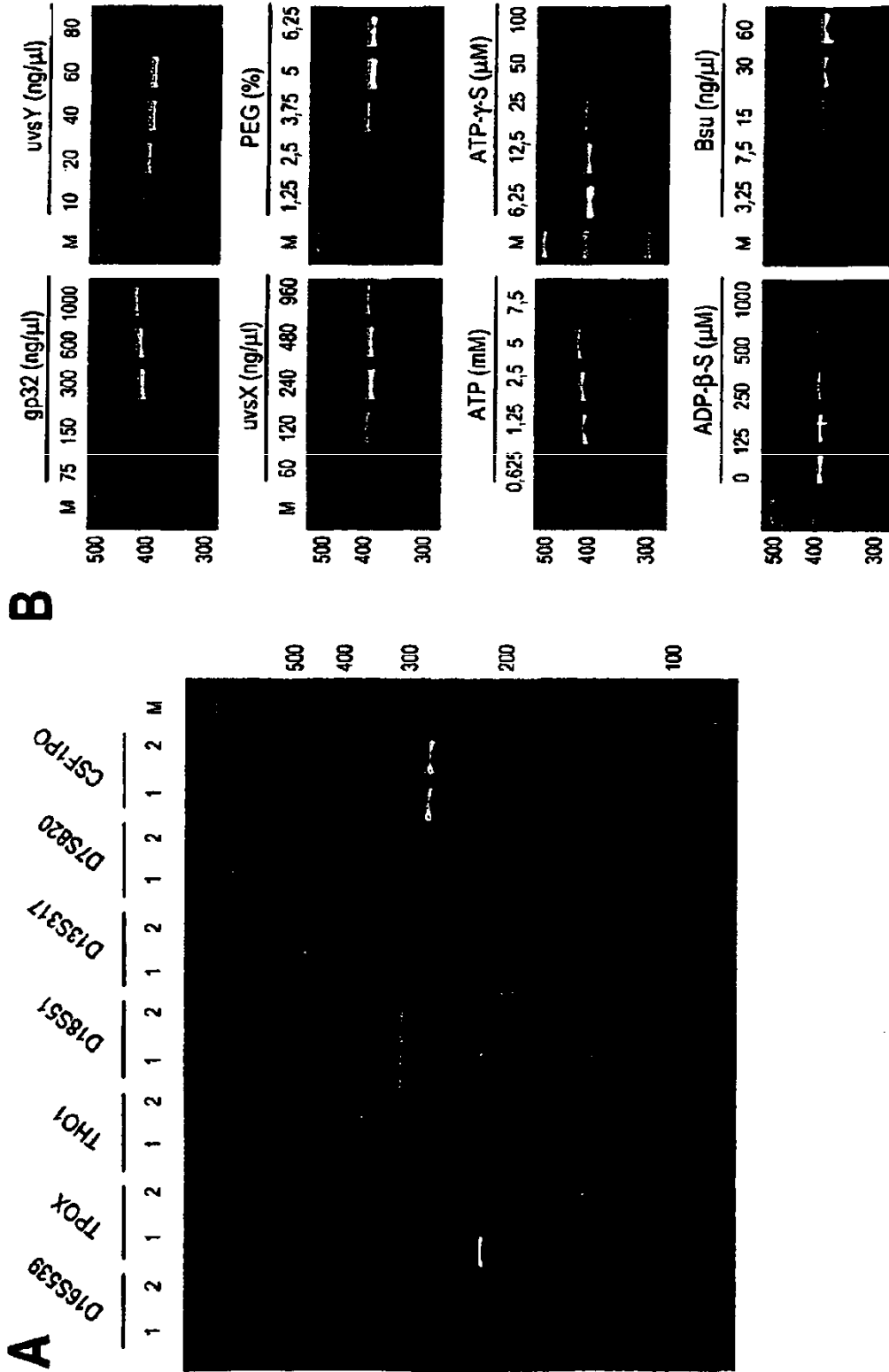


Figura 38

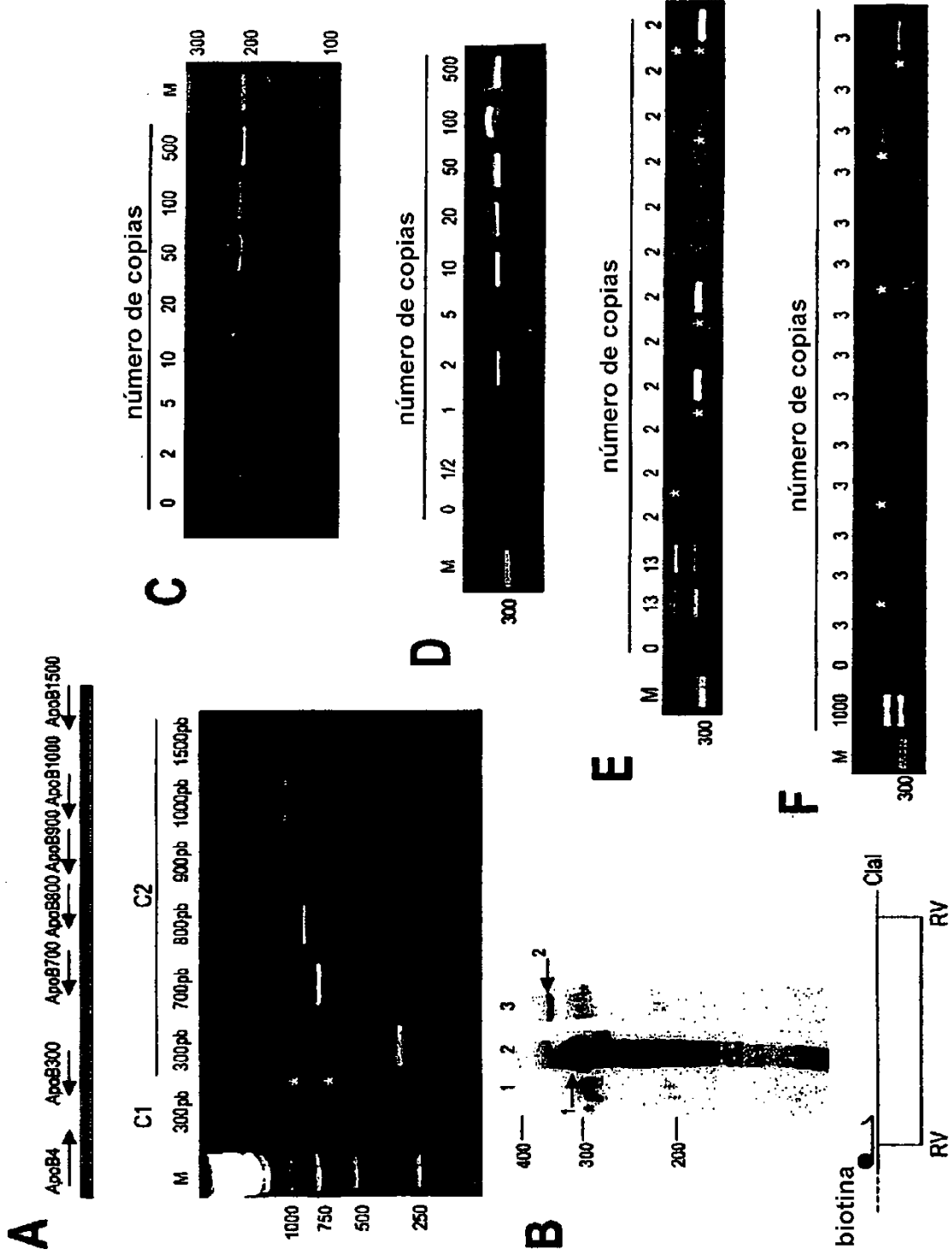


Figura 39

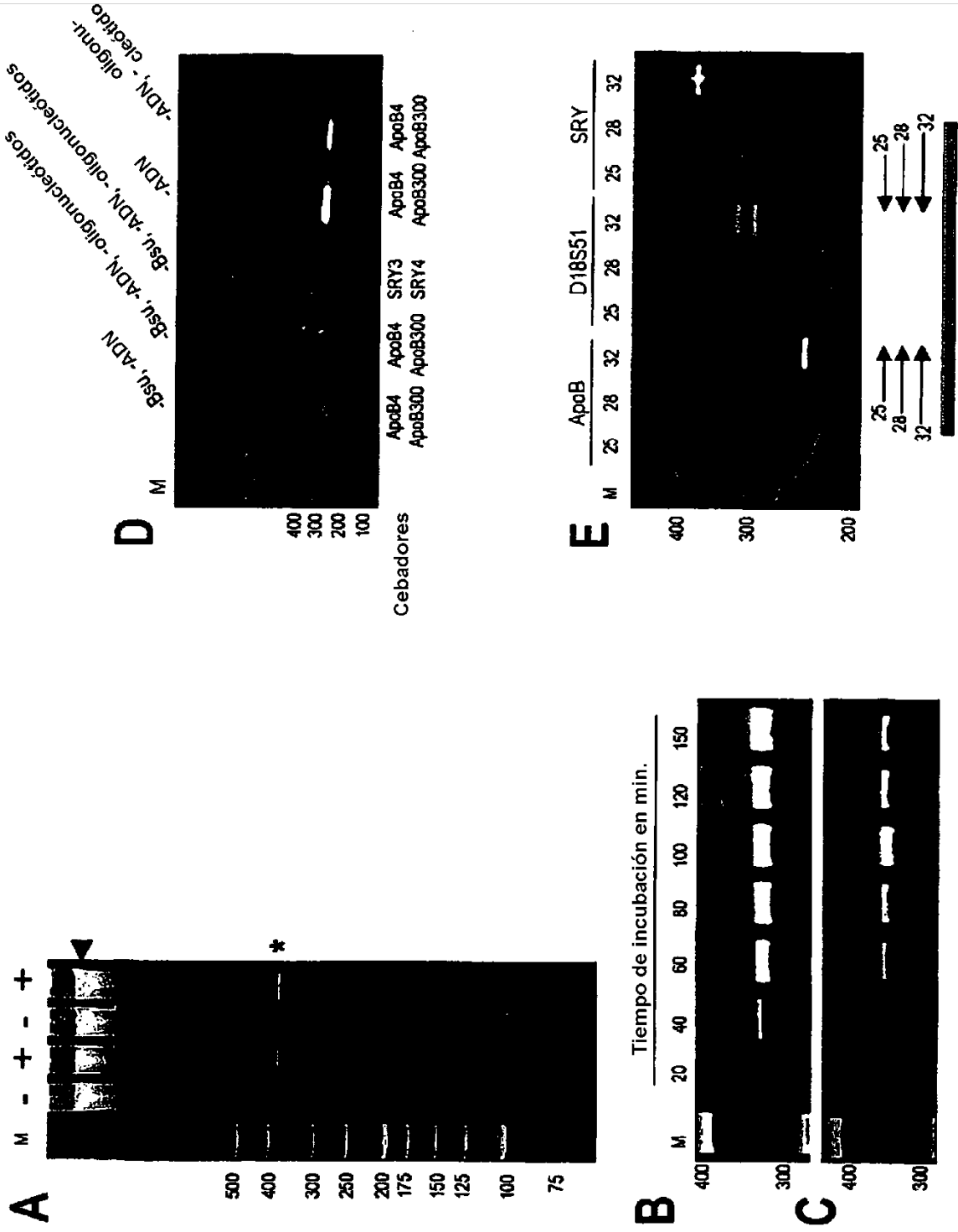
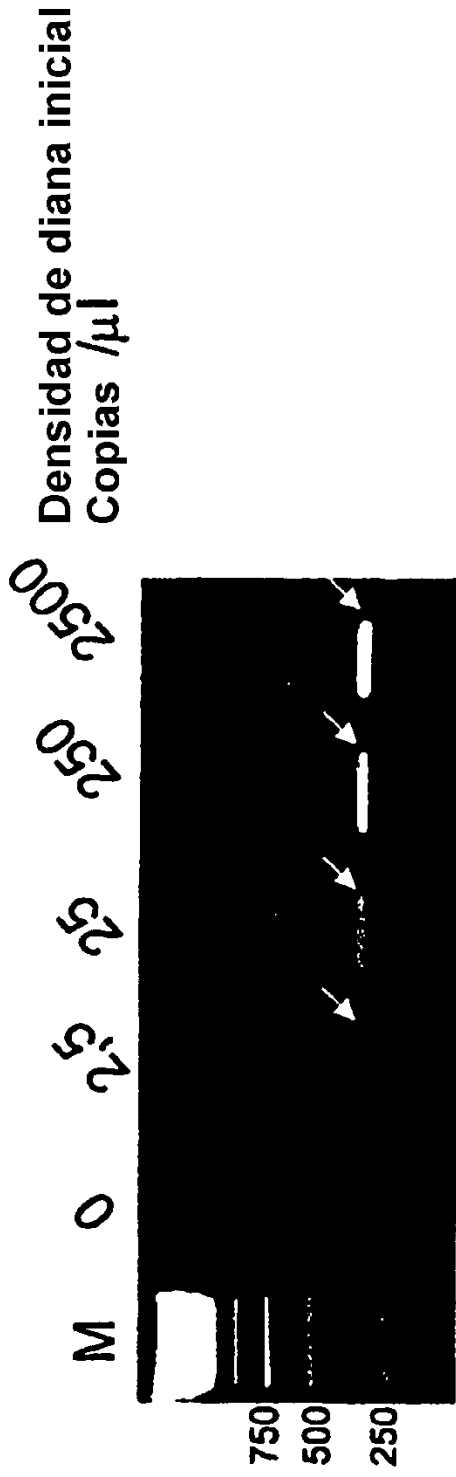


Figura 40



Molde: ADN genómico de *B. subtilis*
Cebadores: BSA1 & BsB3

Fig 41

Prueba de múltiples conjuntos de cebadores en combinación

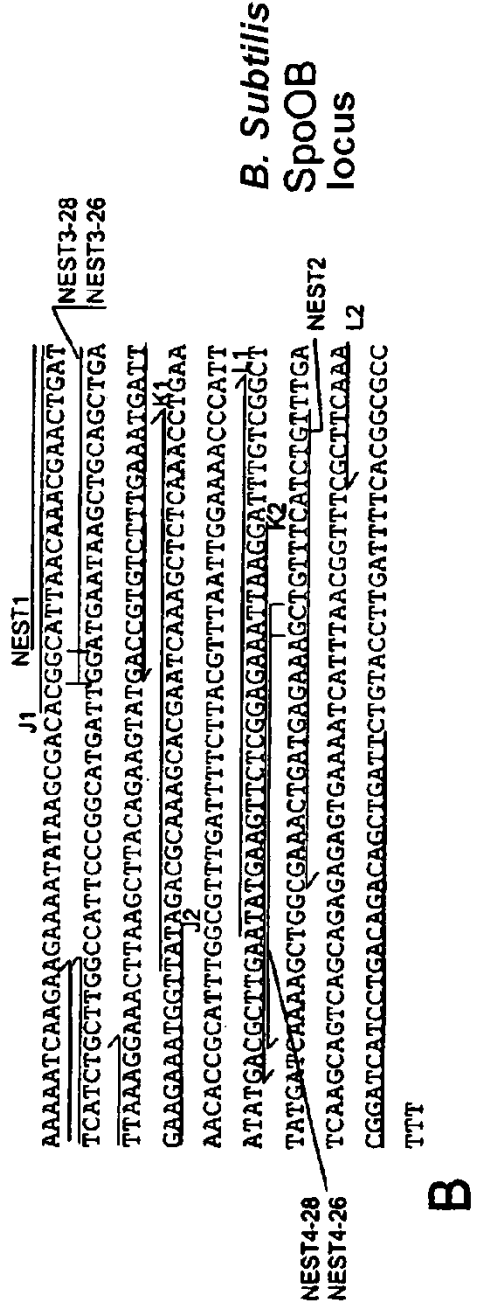
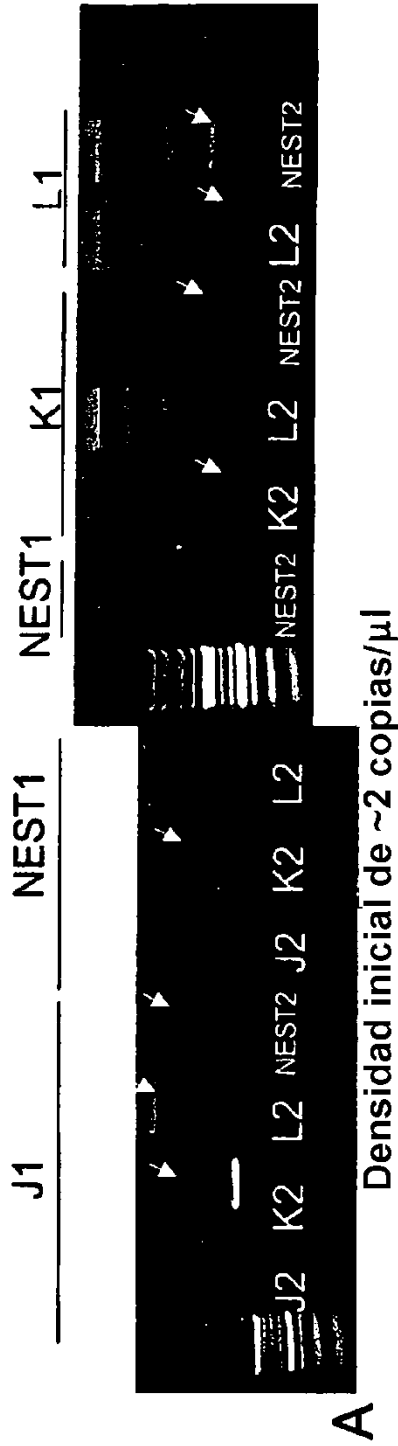
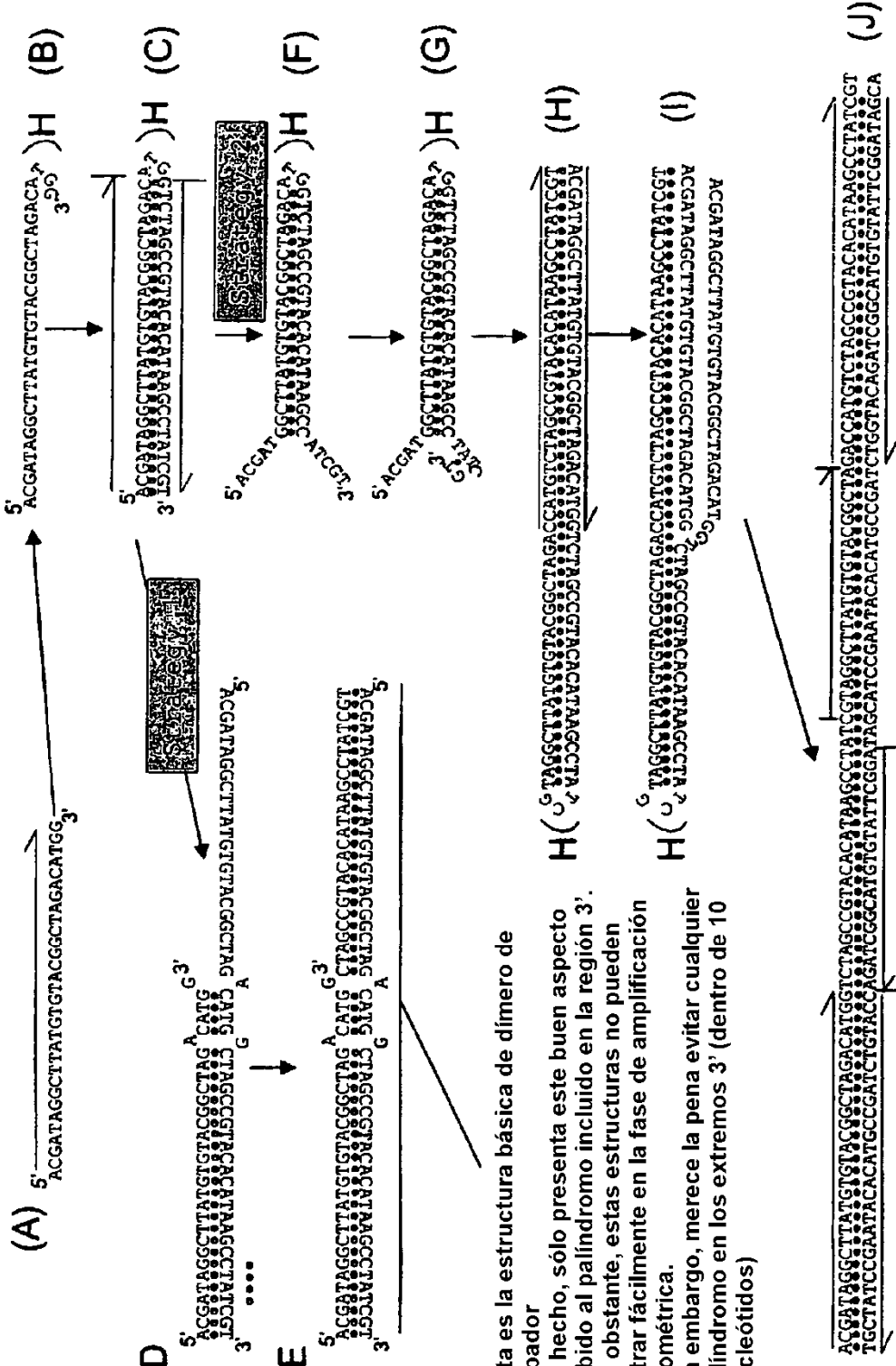


Fig 42

B

Consideración teórica del origen de ruido de cebador



Esta es la estructura básica de dímero de cebador. De hecho, sólo presenta este buen aspecto debido al palíndromo incluido en la región 3'. No obstante, estas estructuras no pueden entrar fácilmente en la fase de amplificación geométrica. Sin embargo, merece la pena evitar cualquier palíndromo en los extremos 3' (dentro de 10 nucleótidos)

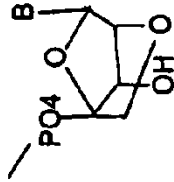
Fig 43

Estrategia de diseño de oligonucleótidos

1. Longitud



2. Inclusión de bases de ANB u otros azúcares modificados



3. Adición de secuencias al extremo 5' de oligonucleótidos

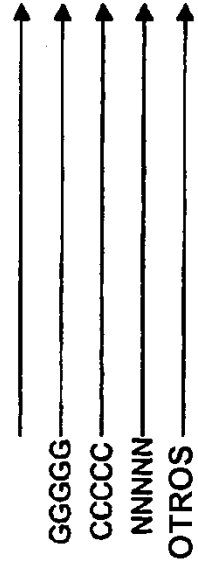
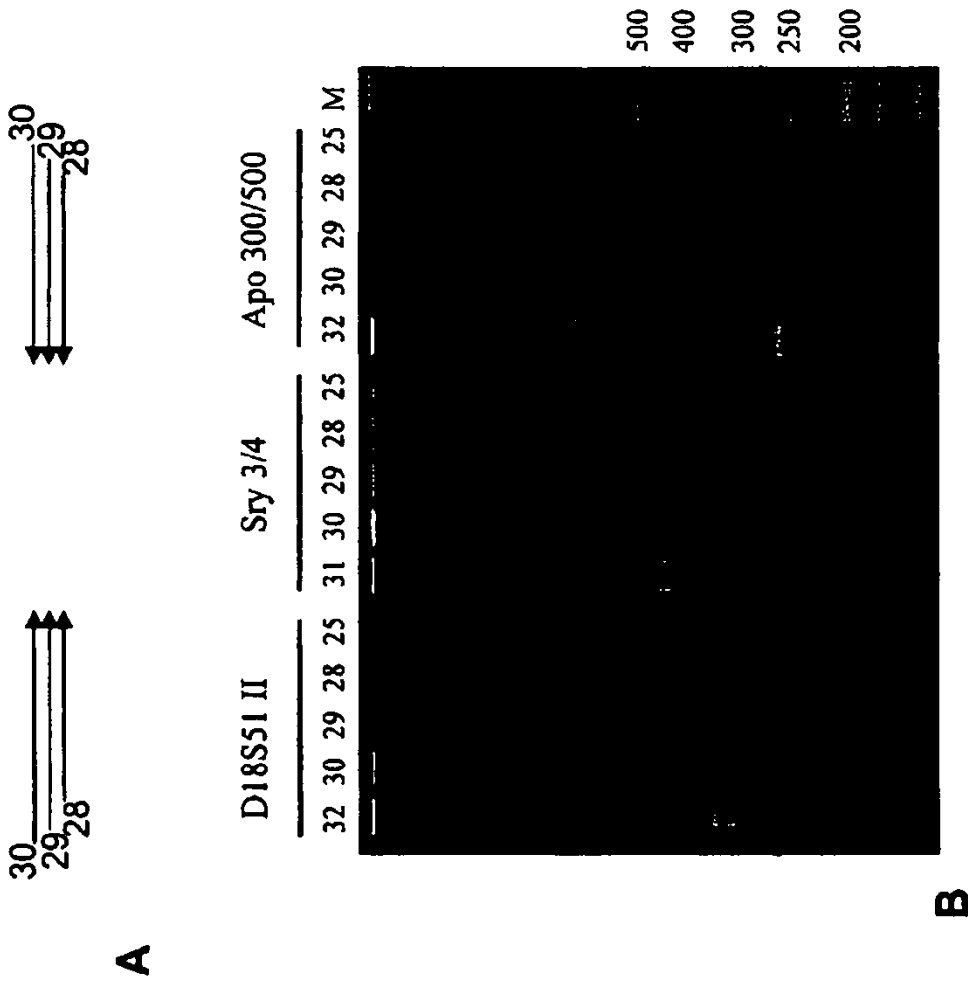


Fig 44



B Densidad de copias inicial de 50 copias/ μ l

Fig 45

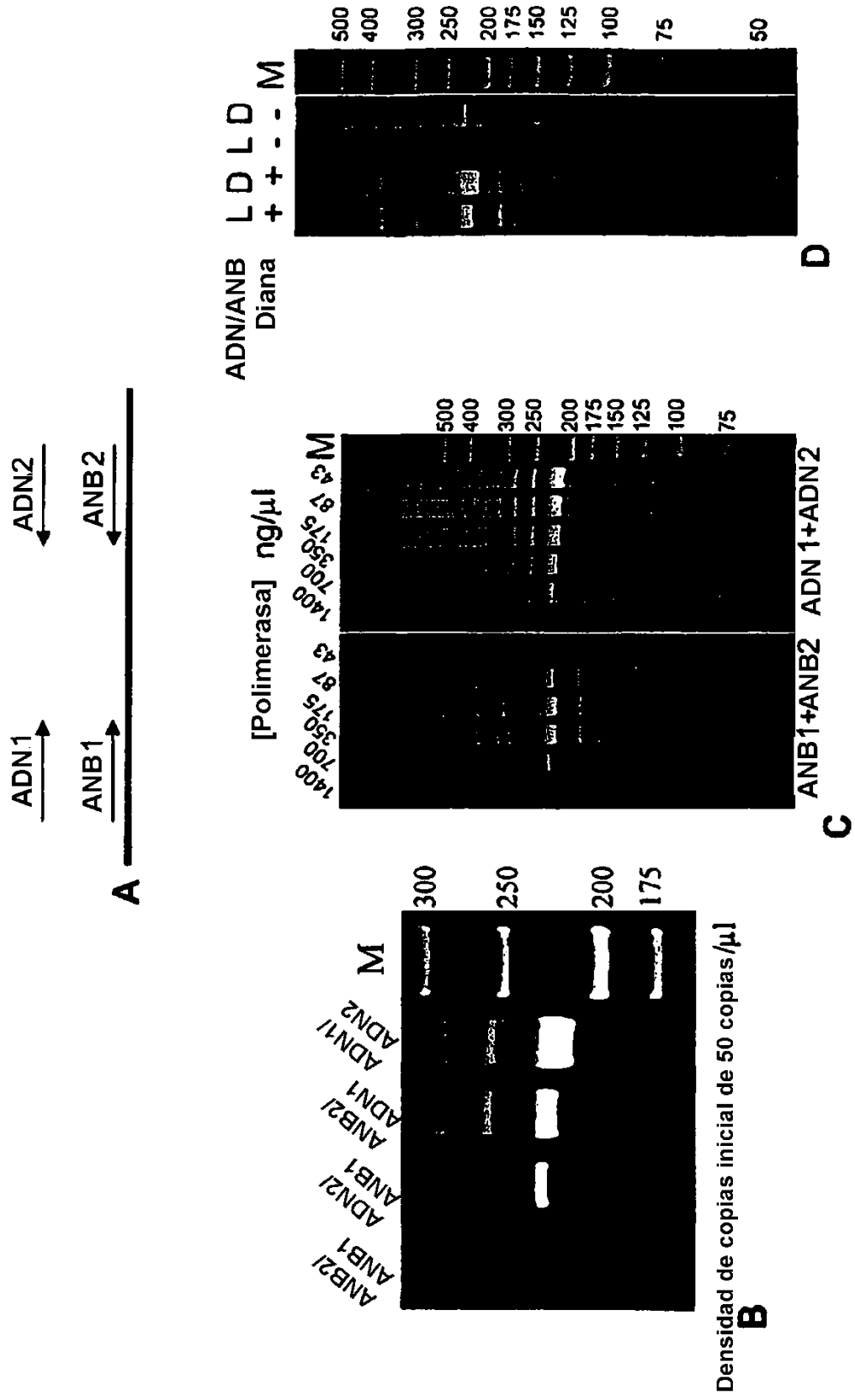


Fig 46

Secuencias heterólogas añadidas en 5' pueden afectar a la actividad de cebador en RPA

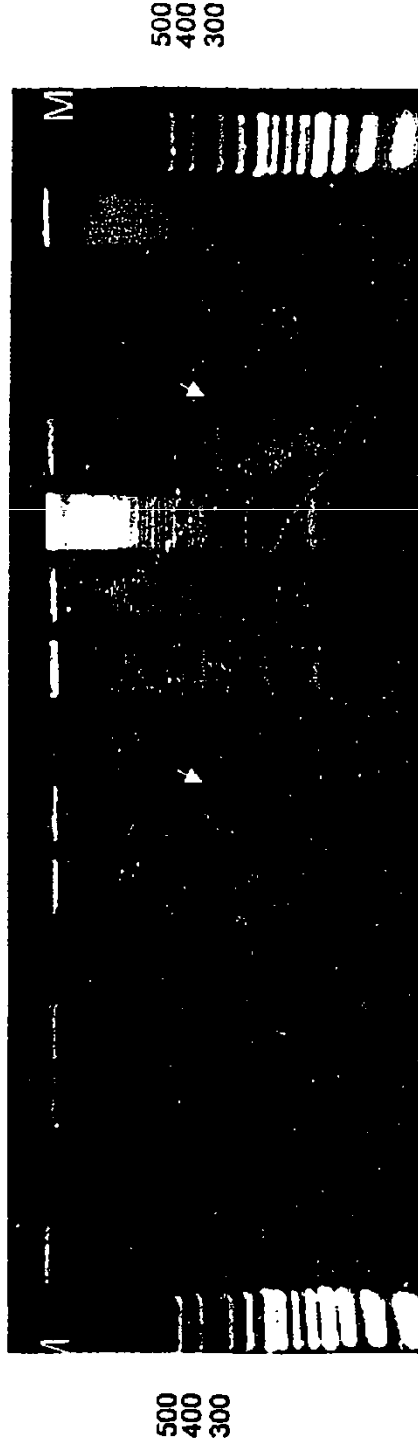
```

J1-      ACGGCATTAAACAACGAACTGATTCATCTGCTTGG
J1C -   CCCCCACGGCATTAAACAACGAACTGATTCATCTGCTTGG
J1G -   GGGGGACGGCATTAAACAACGAACTGATTCATCTGCTTGG

K2 -     CCTTAATTTCTCCGAGAACTTCATATTTCAAGCGTC
K2C -   CCCCCCTTAATTTCTCCGAGAACTTCATATTTCAAGCGTC
K2G -   GGGGGCCTTAATTTCTCCGAGAACTTCATATTTCAAGCGTC
    
```

A

Cebadores J1 J1G J1C K2 K2G K2C J1 J1G J1C J1 J1G J1C K2C J1 J1G J1C J1C



B

Densidad inicial de 1 copia por microlitro

37°C 2 horas

Fig 47

La betaina puede regular la relación señal-ruido

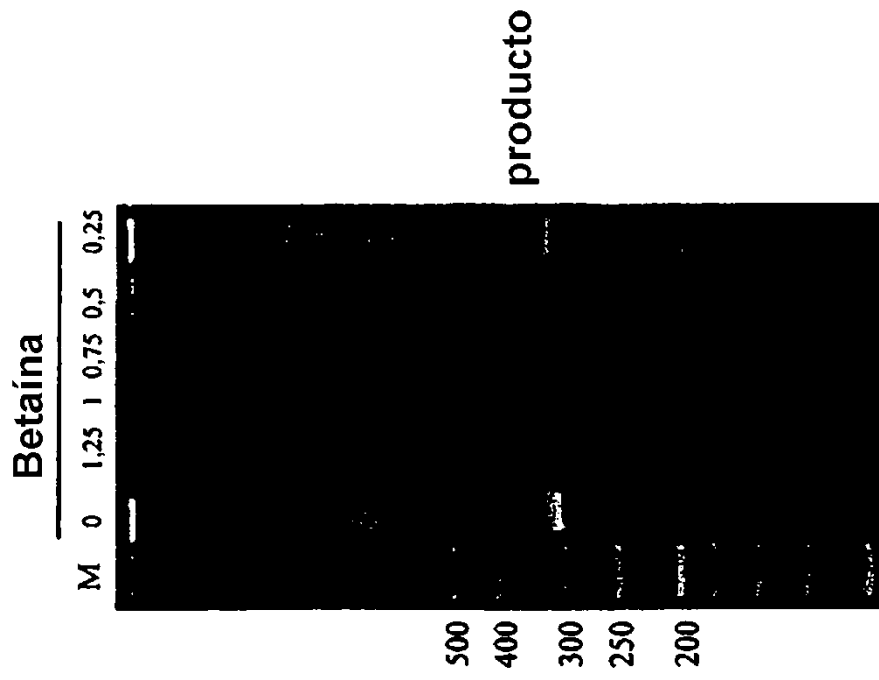
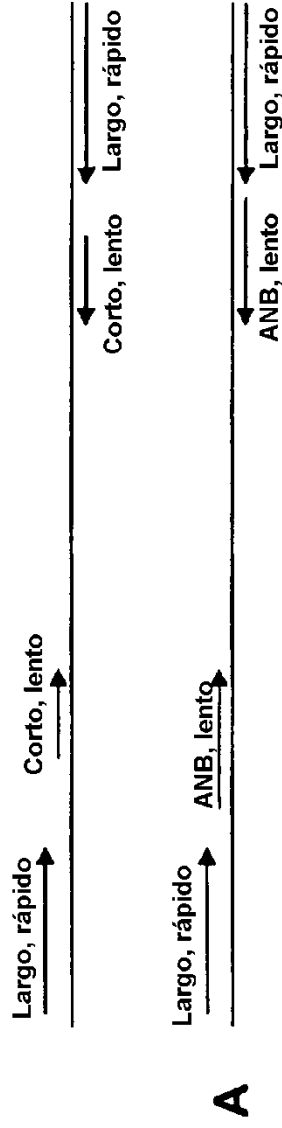


Fig 48

Estrategias de combinación/anidación

Oligonucleótidos rápidos externos, concentración limitada, internos más lentos/más limpios



Uno corto o ANB, uno normal

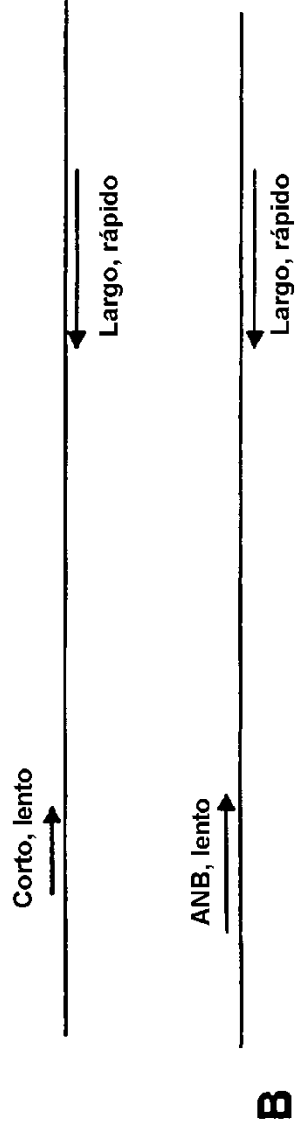


Fig 49

Estrategias de detección

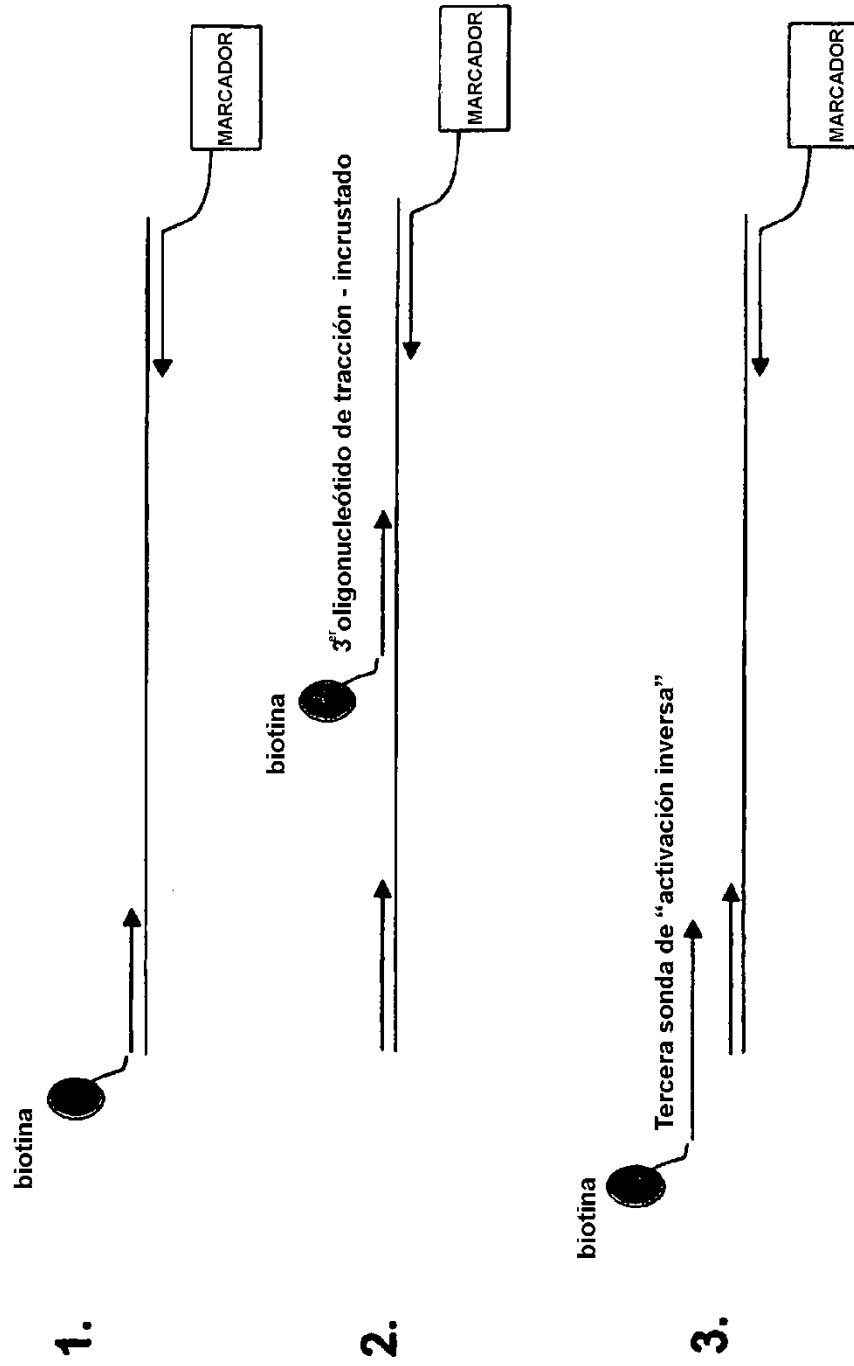


Fig 50

Captura de perlas: Diseño

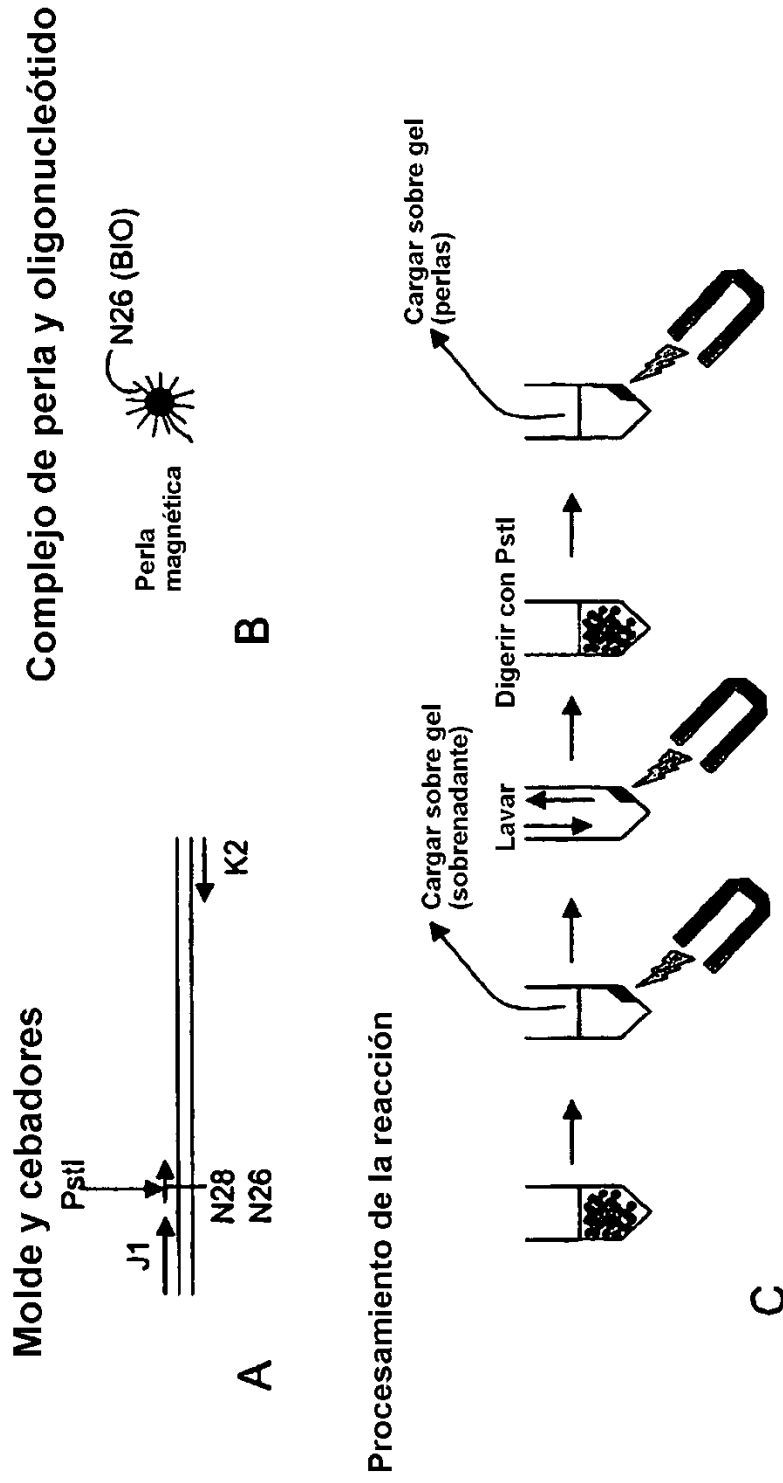


Fig 51

Captura de perlas: Resultados

- Puede utilizarse un oligonucleótido corto para la captura pero no soporta una amplificación eficaz

- Se capturan cantidades significativas de productos específicos sobre perlas

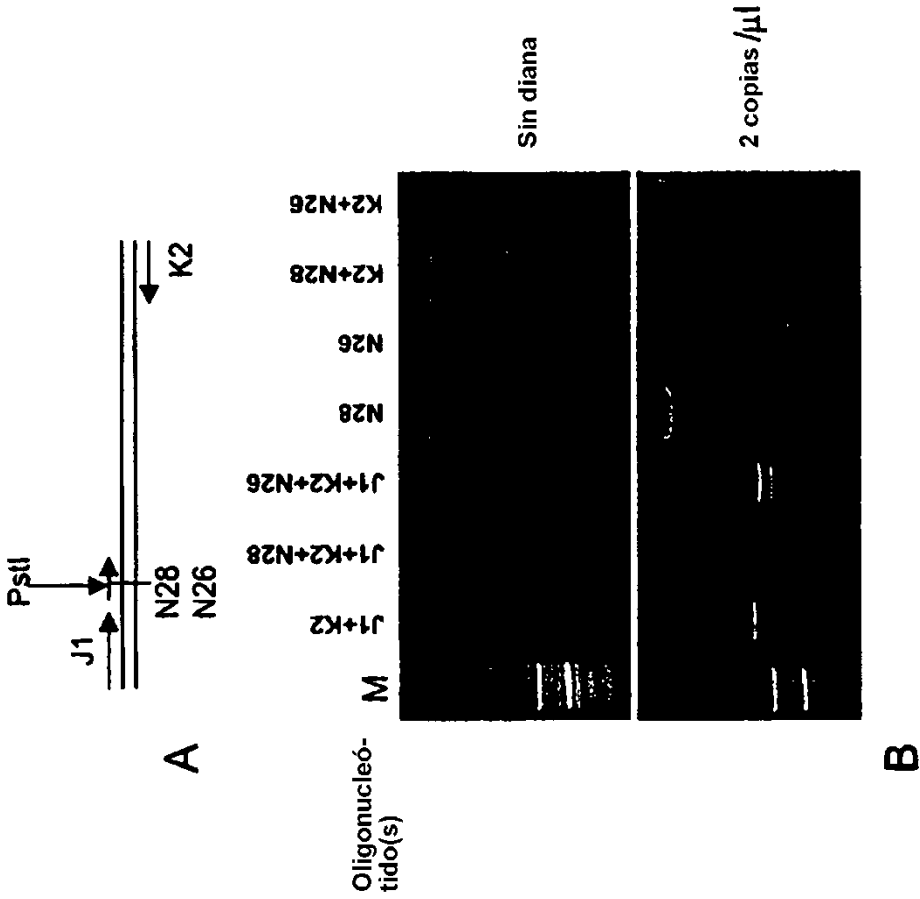
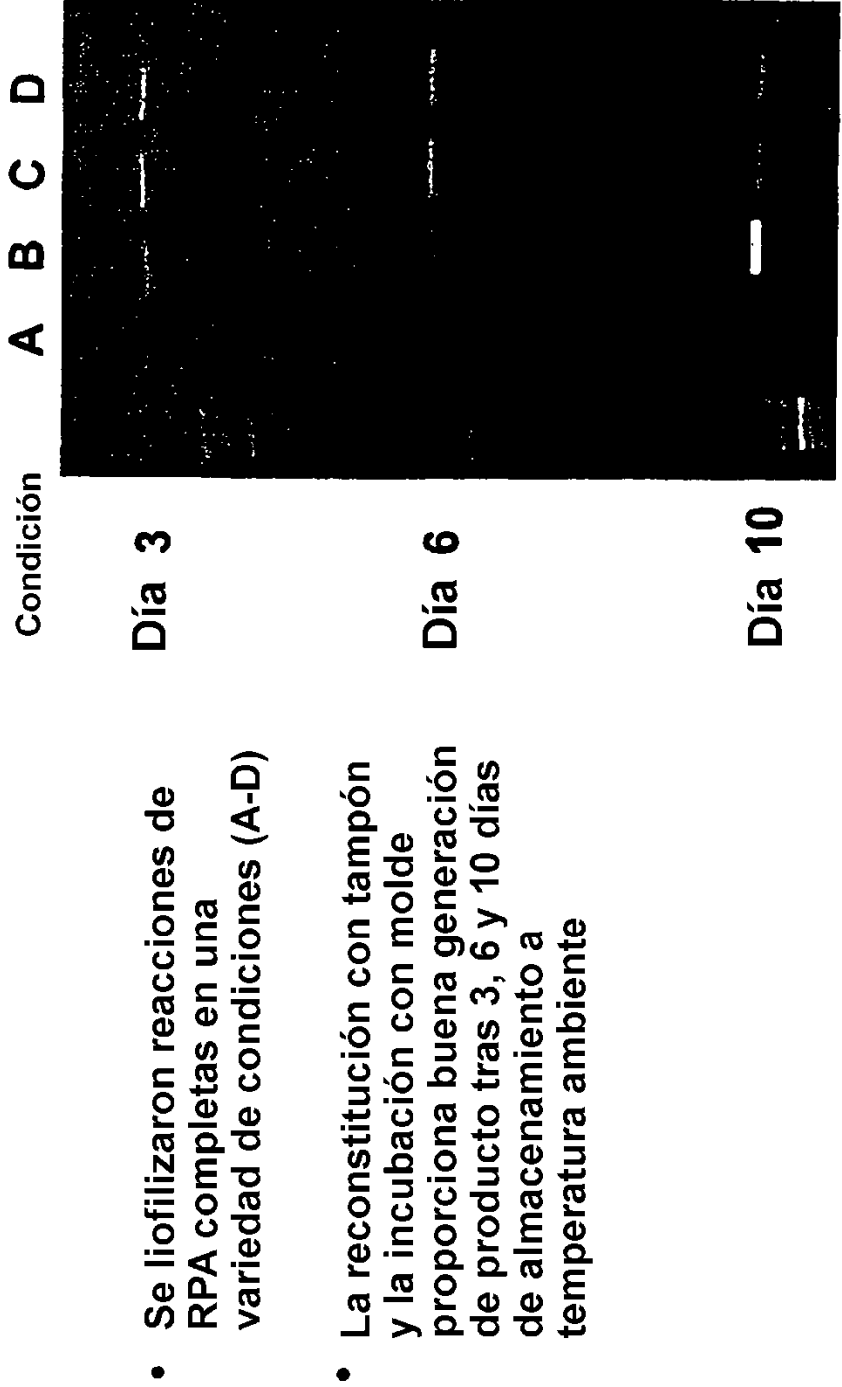


Fig 52

Liofilización



- Se liofilizaron reacciones de RPA completas en una variedad de condiciones (A-D)
- La reconstitución con tampón y la incubación con molde proporciona buena generación de producto tras 3, 6 y 10 días de almacenamiento a temperatura ambiente

Fig 53

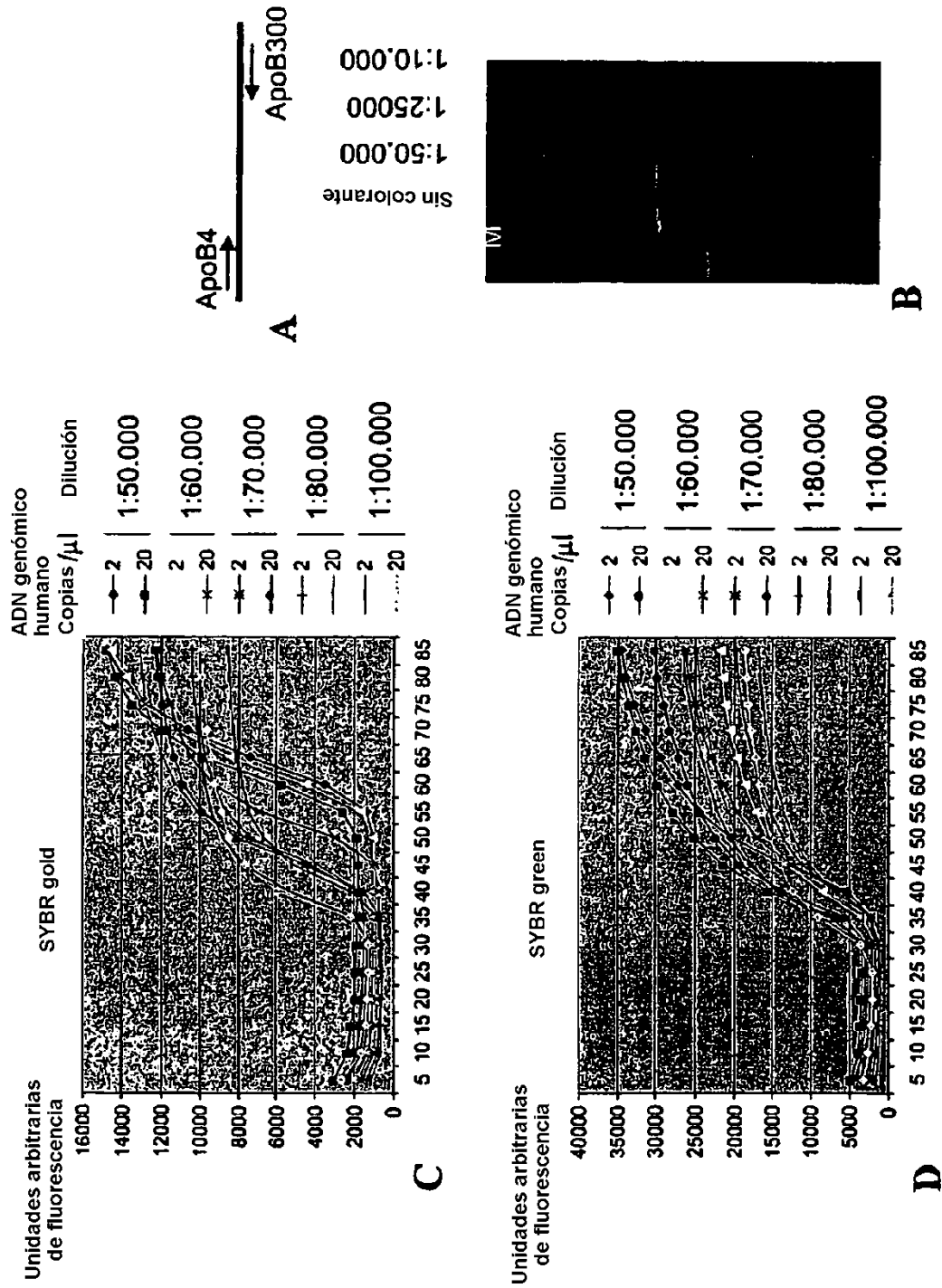


Fig 54

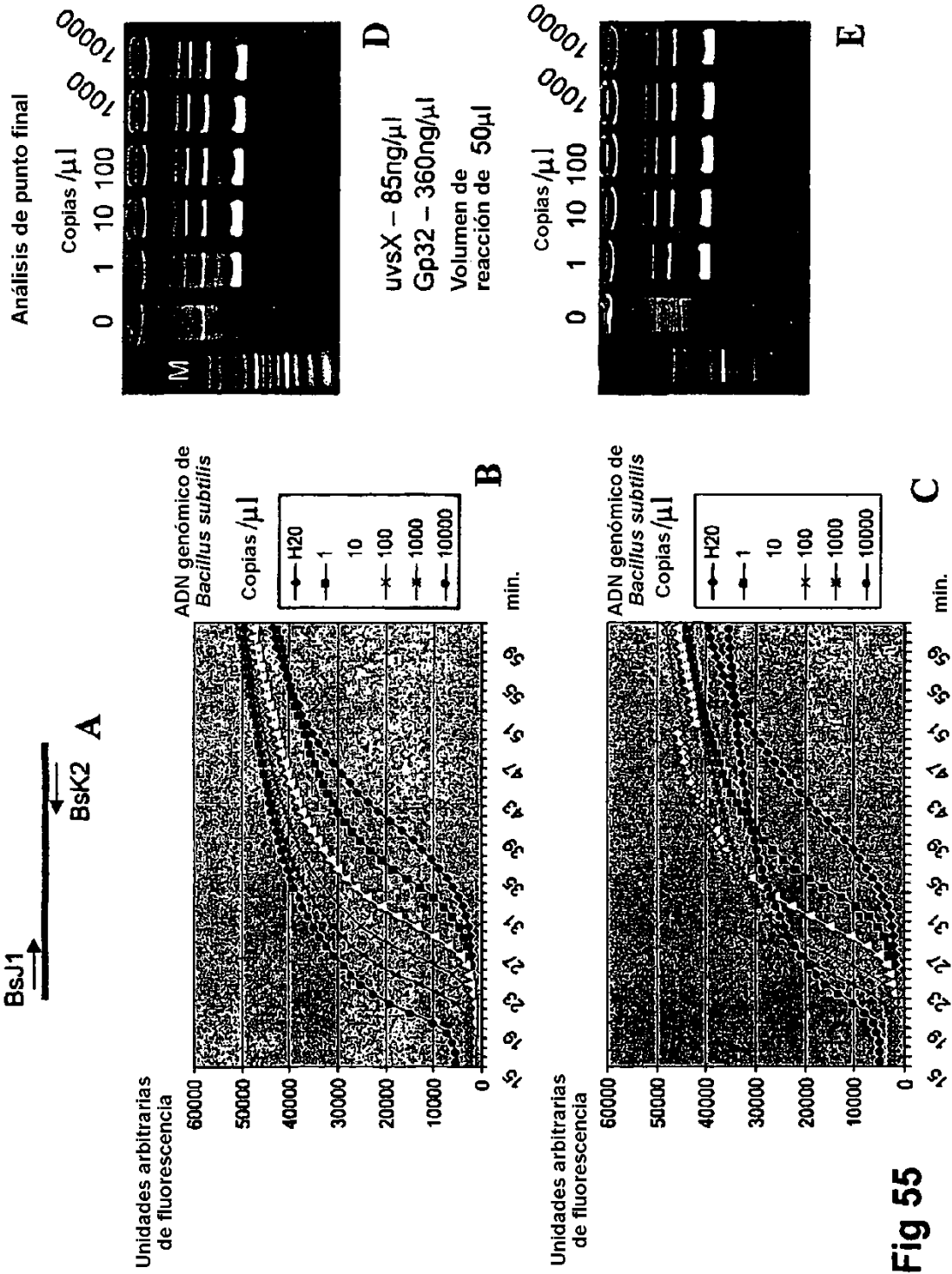


Fig 55

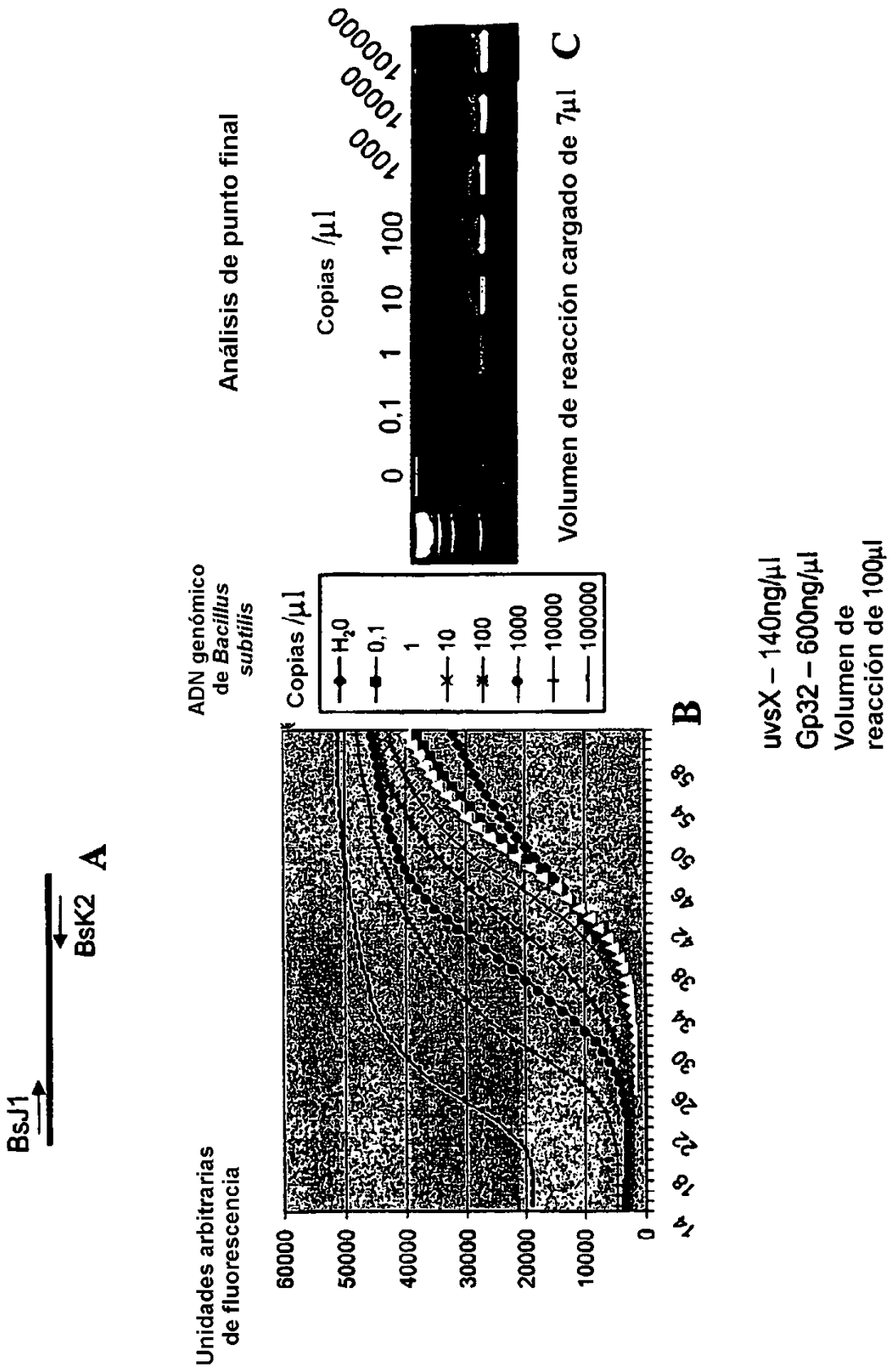


Fig 56

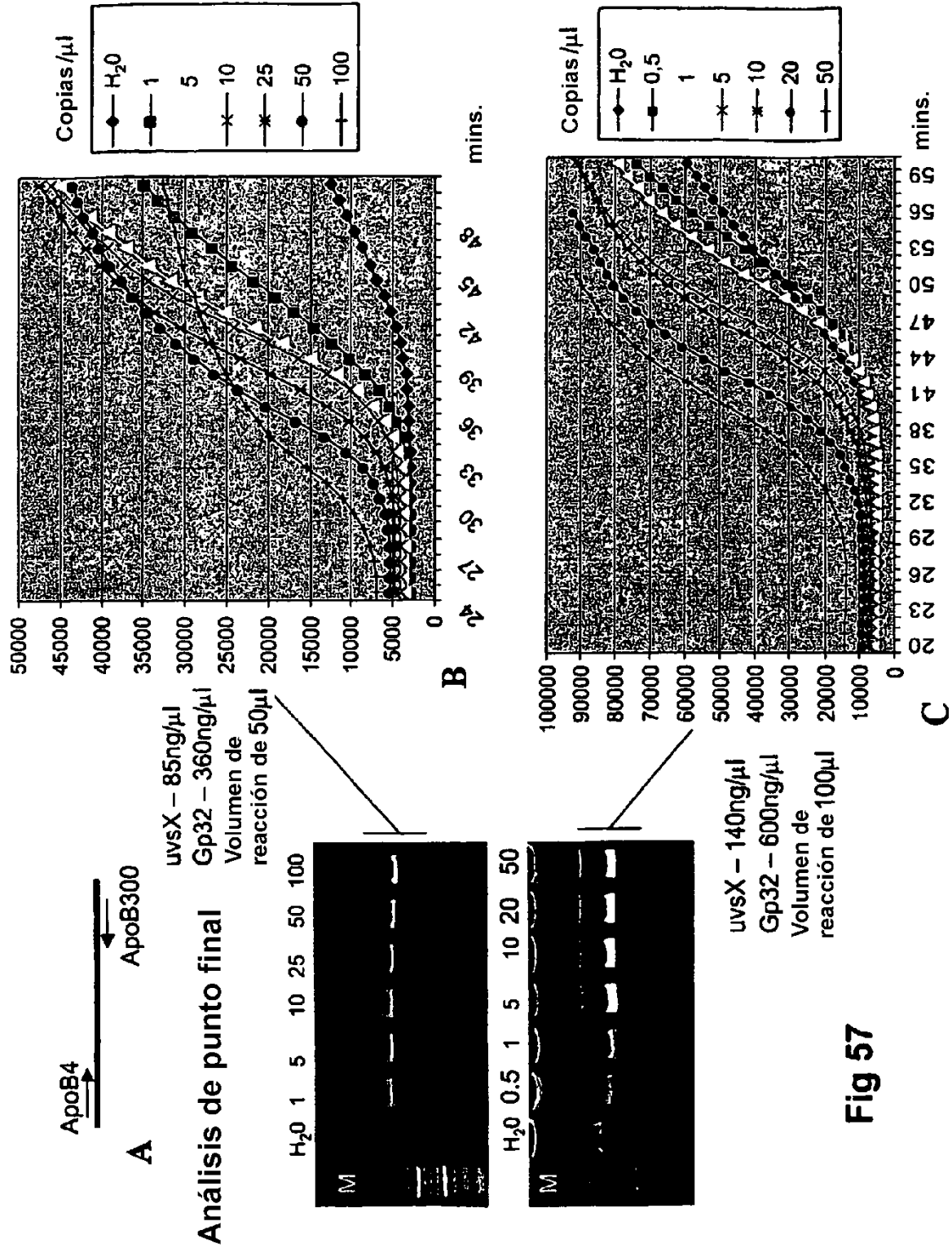


Fig 57

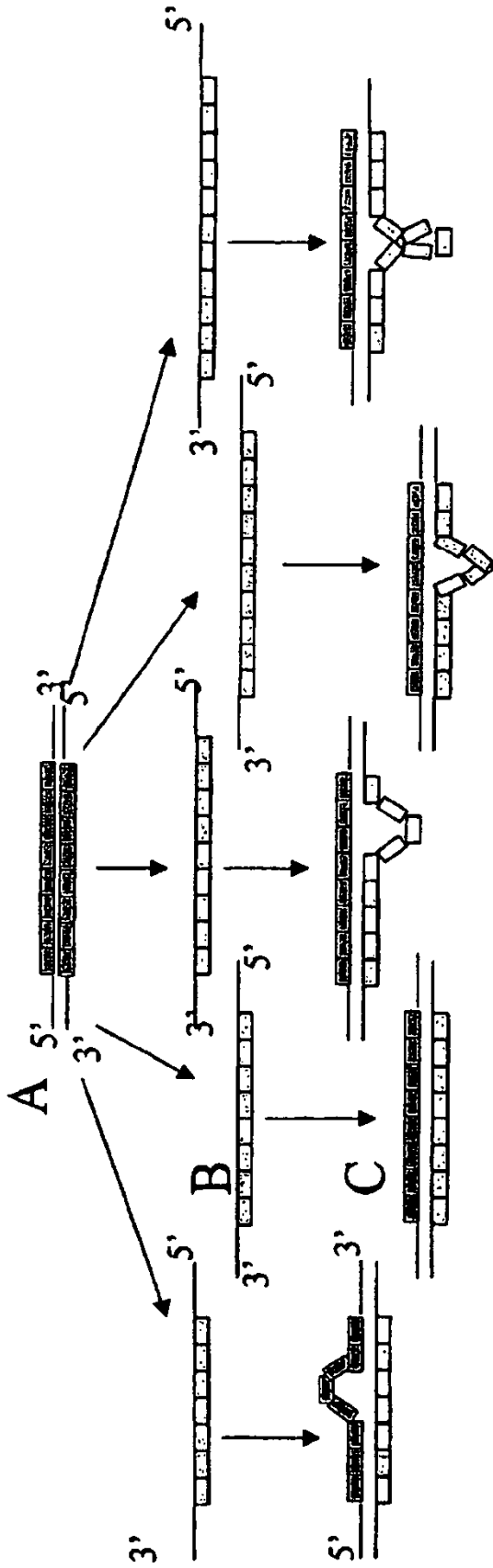


Fig 58

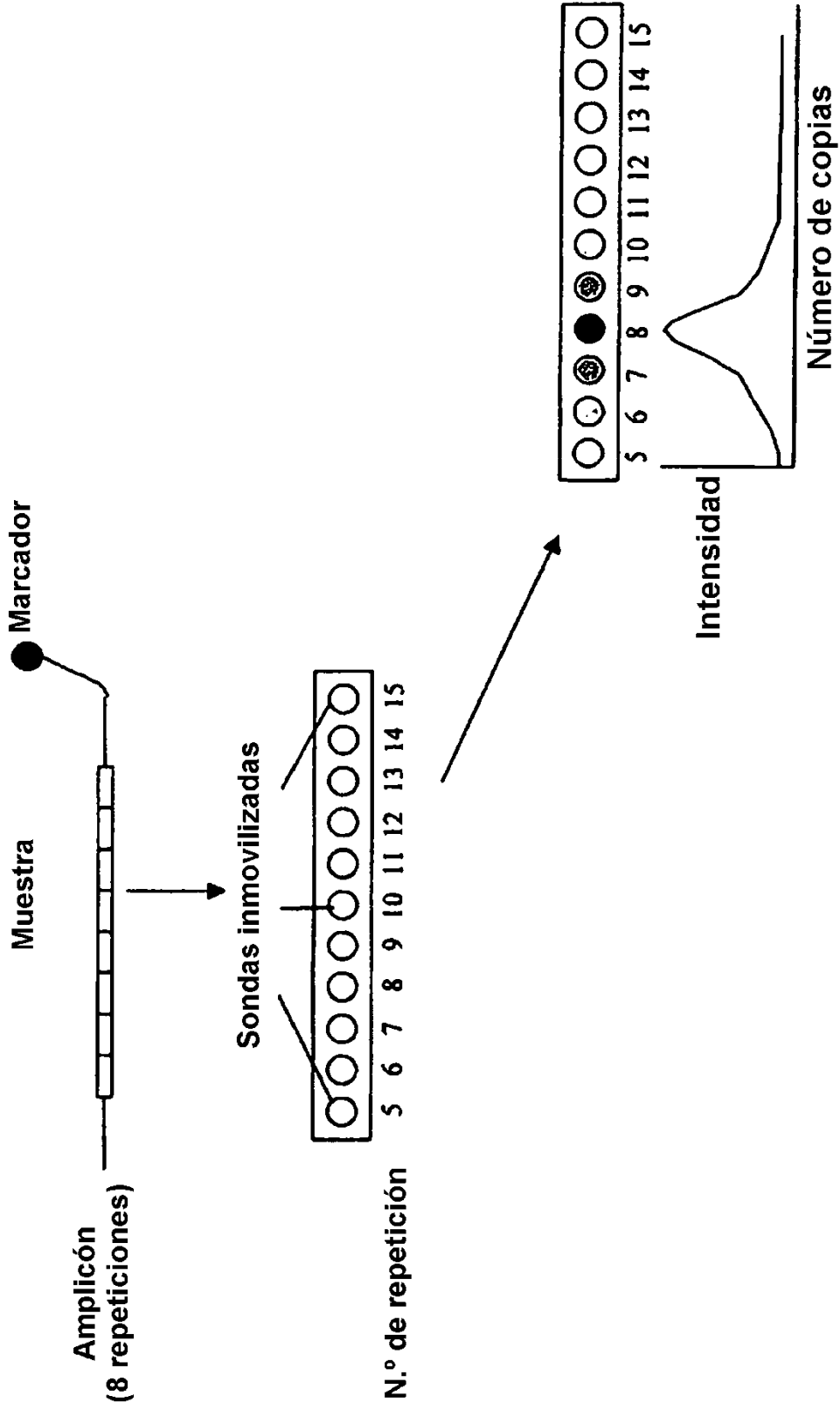


Fig 59

RT-RPA en un único tubo

Resultados preliminares con cebadores no optimizados

	Copias/ μ l						
ARN	-	-	10^4	10^4	10^3	10^2	10^1
ADN	-	10^3	-	-	-	-	-
RT	-	-	-	+	+	+	+

ARN – MS2



ARN añadido a un único tubo que contiene mezcla de RPA con transcriptasa inversa de Mu-MLV

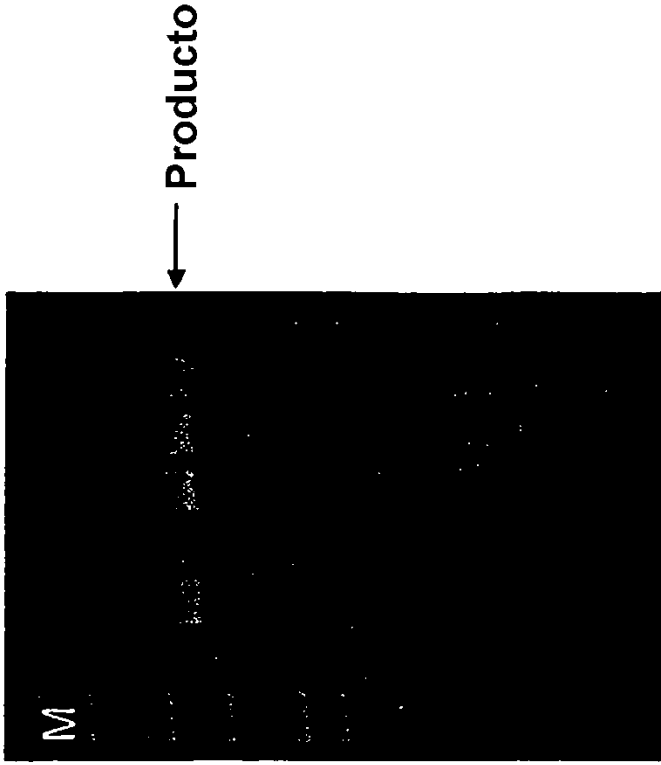


Fig 60

La RPA es compatible con dUTP

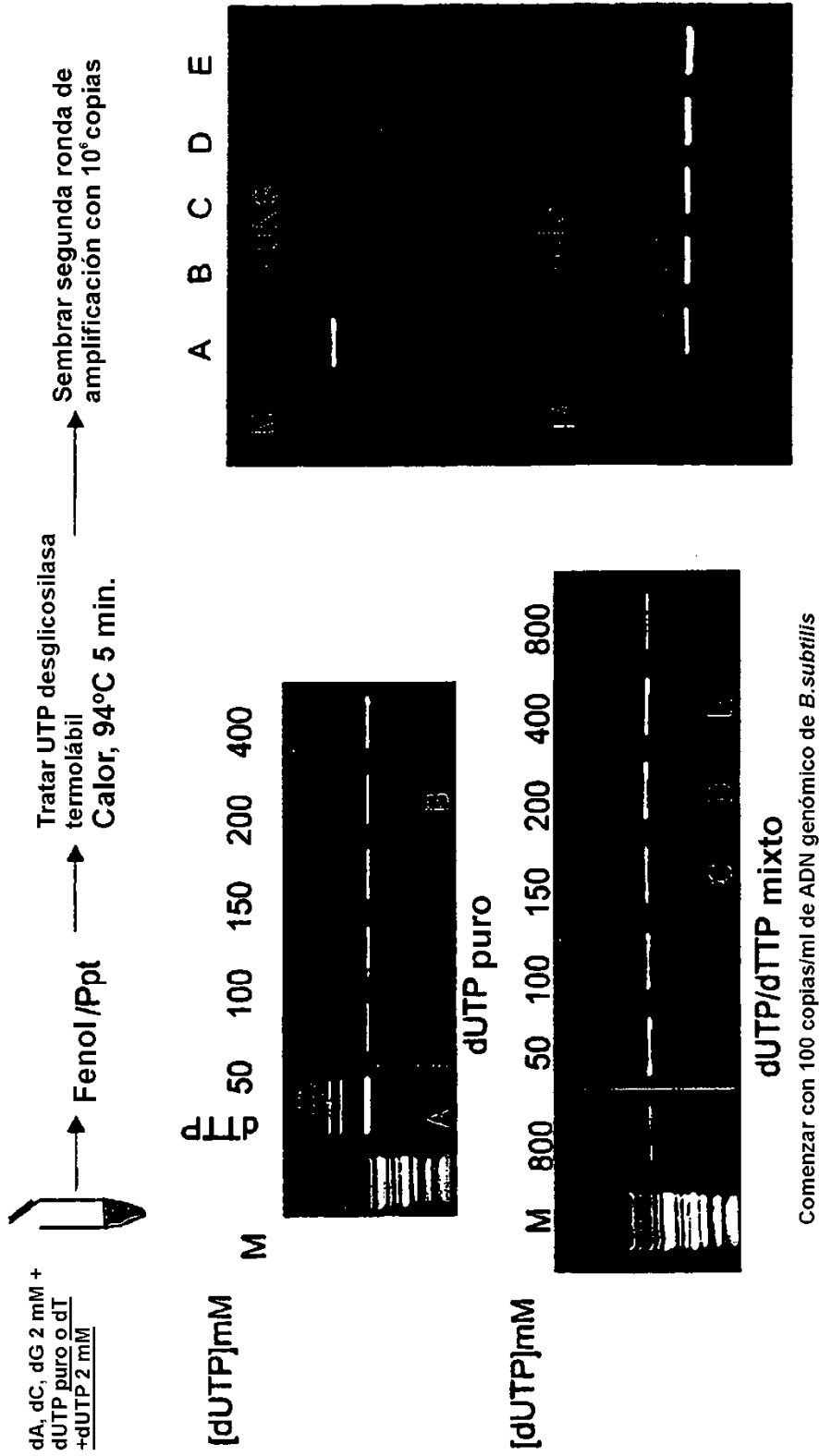


Fig 61

Control de contaminación cruzada en RPA

Utilización de inhibidor de UNG en la iniciación de la reacción

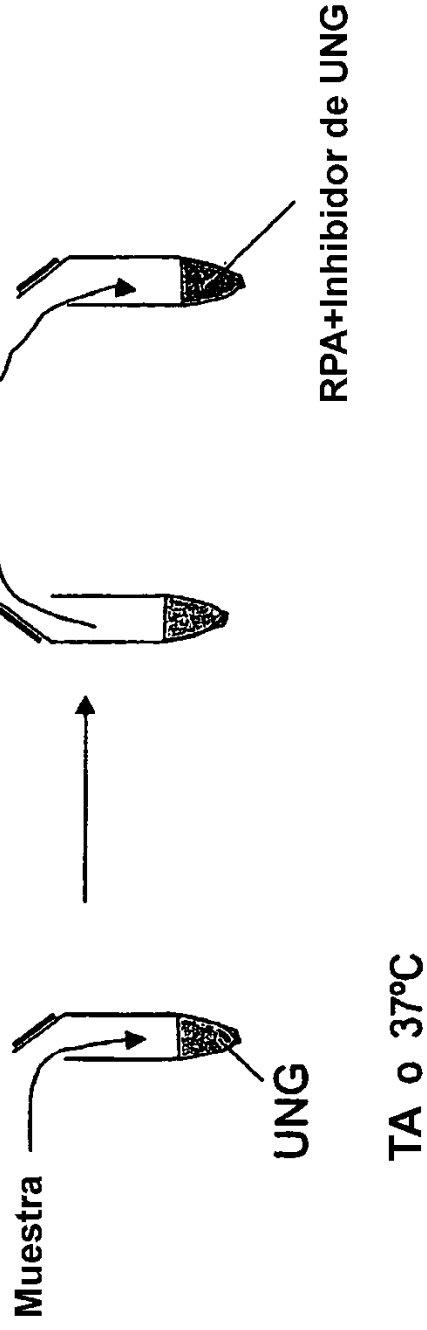


Fig 62

Ensayo independiente de tira reactiva de sí/no

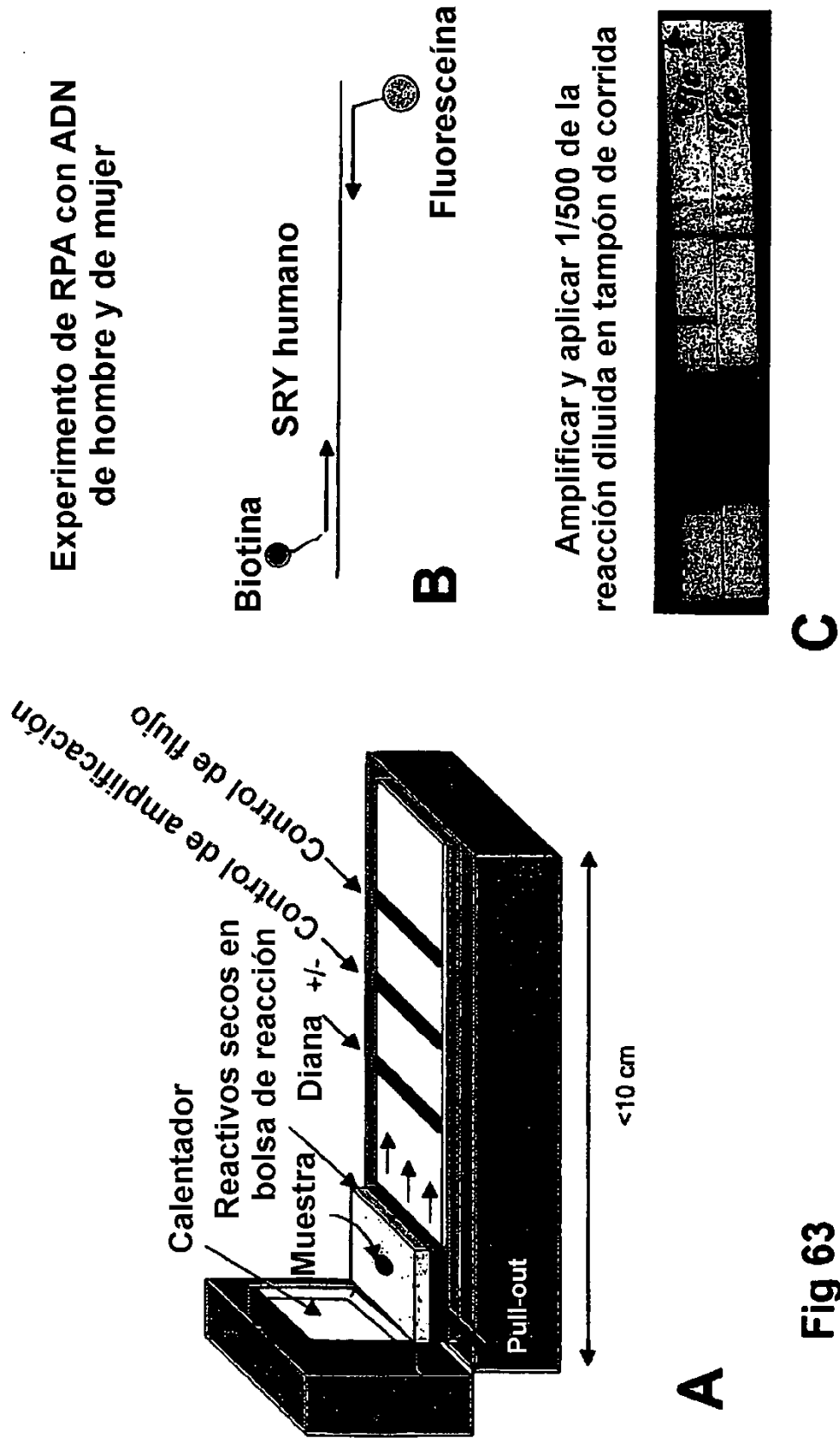


Fig 63

La RPA no se ve inhibida por la sangre

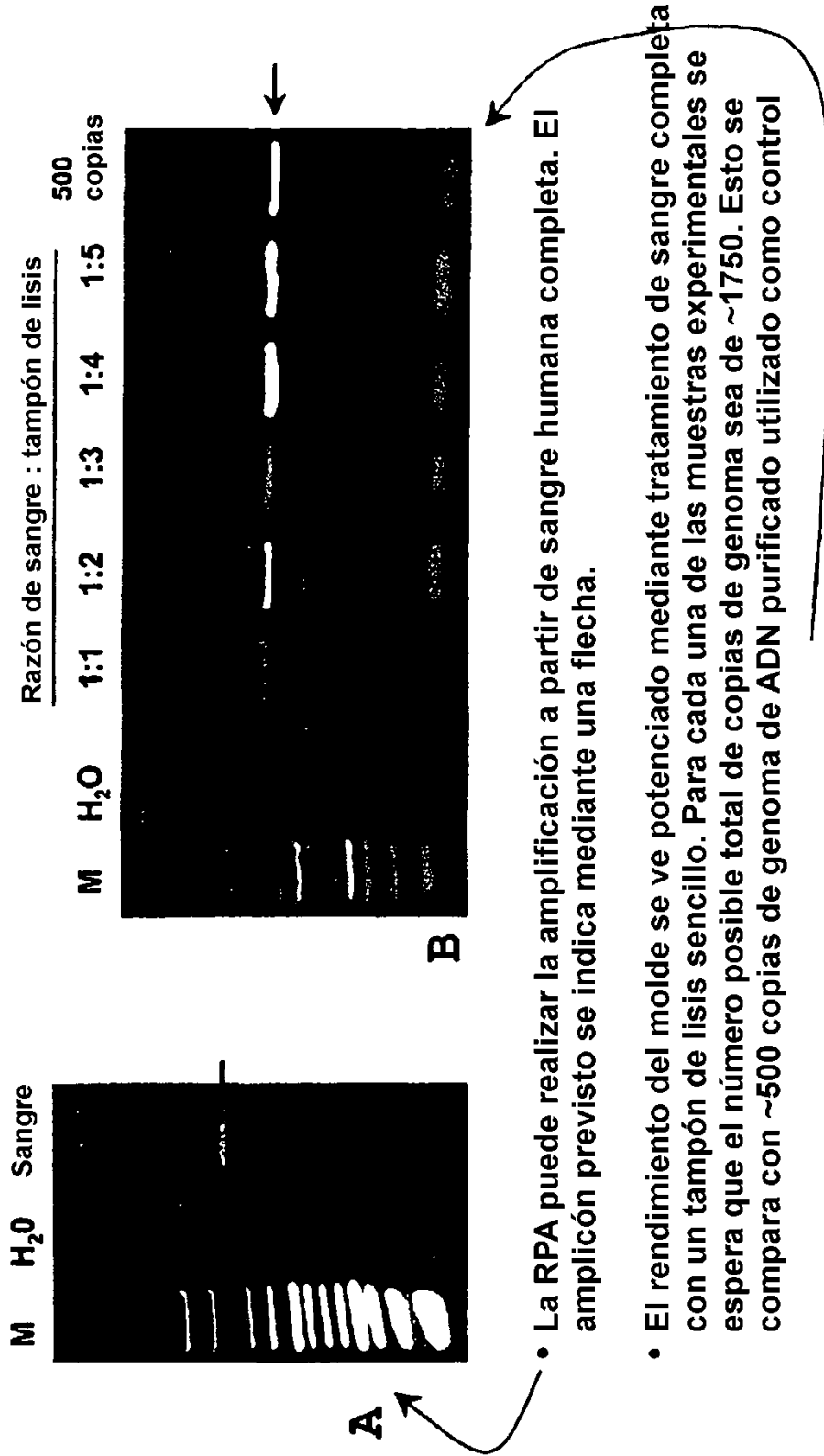
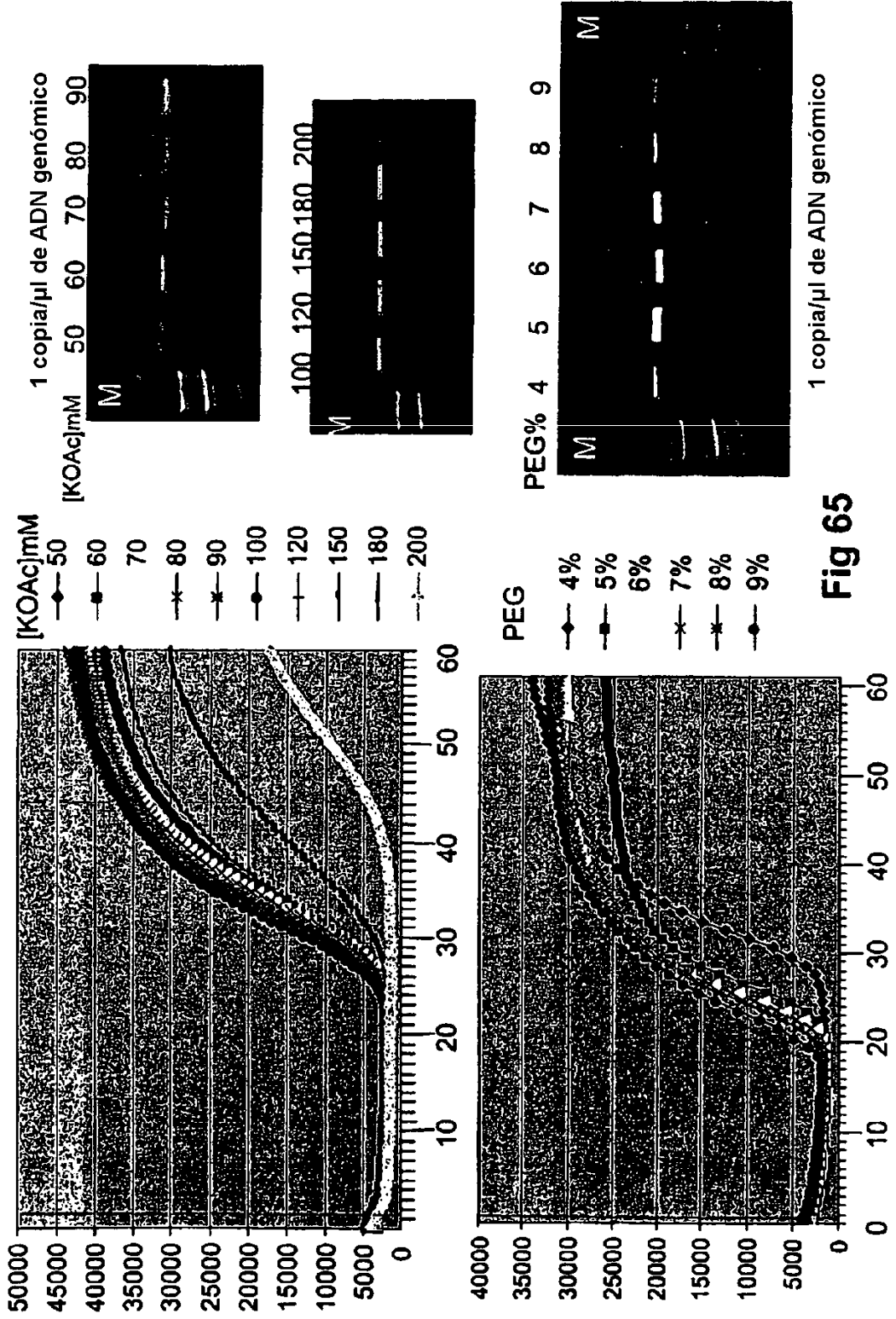


Fig 64

Optimizaciones: Sal y PEG



Optimización: [Magnesio]

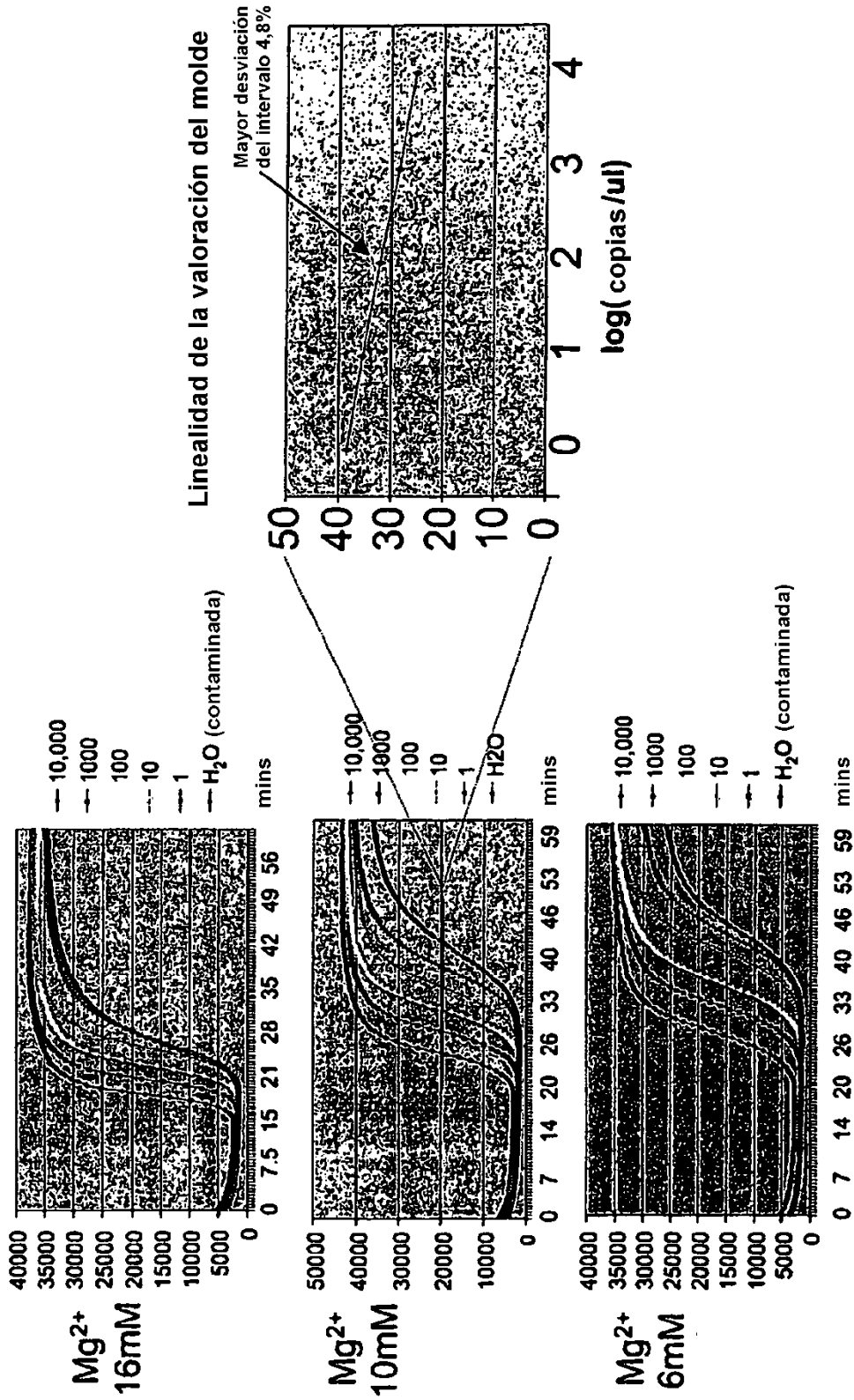
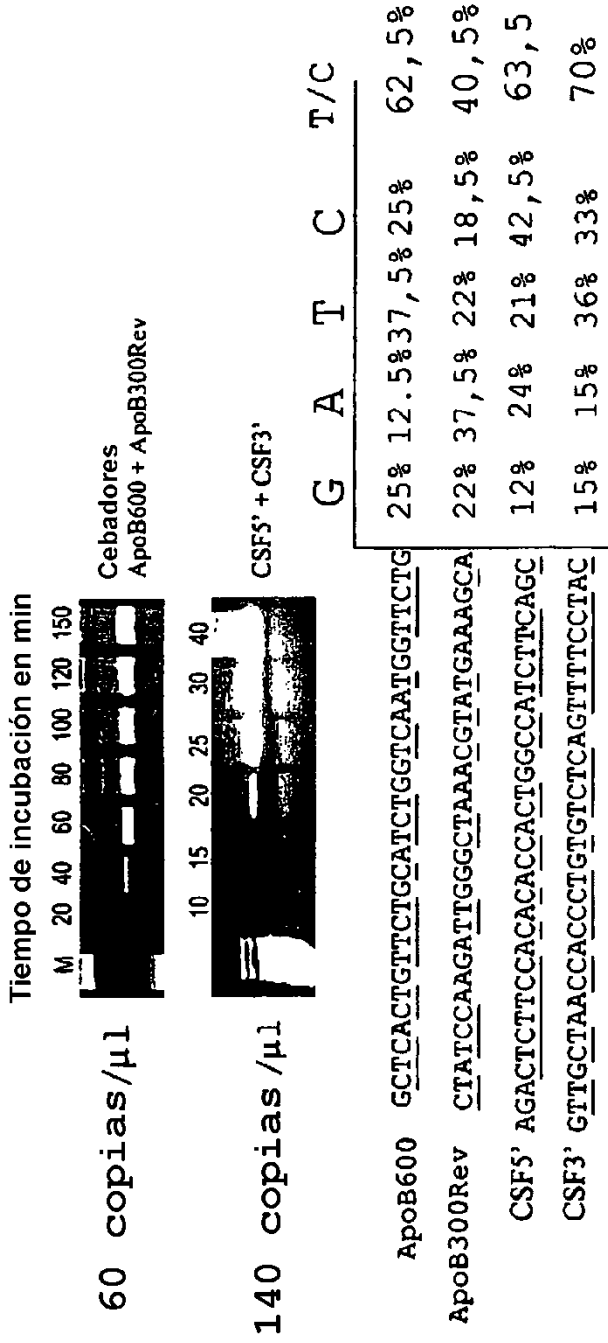


Fig 66

Dependencia del tiempo de reacción, variabilidad del cebador

El tiempo hasta la detección varía (normalmente) desde 20 hasta 40 minutos a partir de niveles traza



Observaciones:

1. El par rápido presenta escasez de G
2. El par rápido presenta un alto contenido en C
3. La correlación del contenido de A/T resulta menos clara

Hipótesis de composición:

1. ¿Alto contenido en pirimidina?
2. ¿Alto contenido en C, bajo contenido en G?
3. ¿Son las características de distribución importantes?

Fig 67

Diseño de extremos en 5' para generar actividad de cebador uniforme y deseada

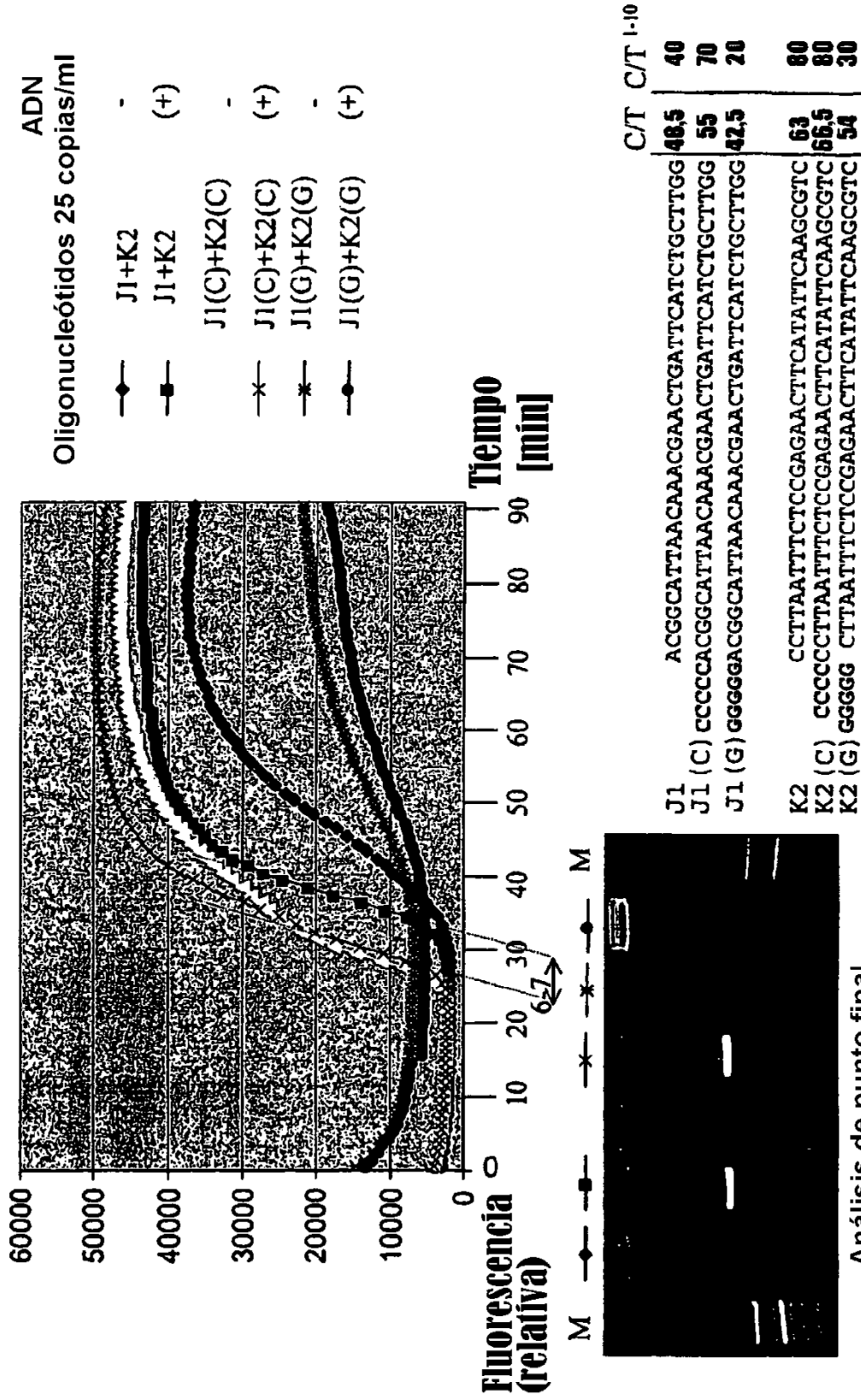


Fig 68 Análisis de punto final

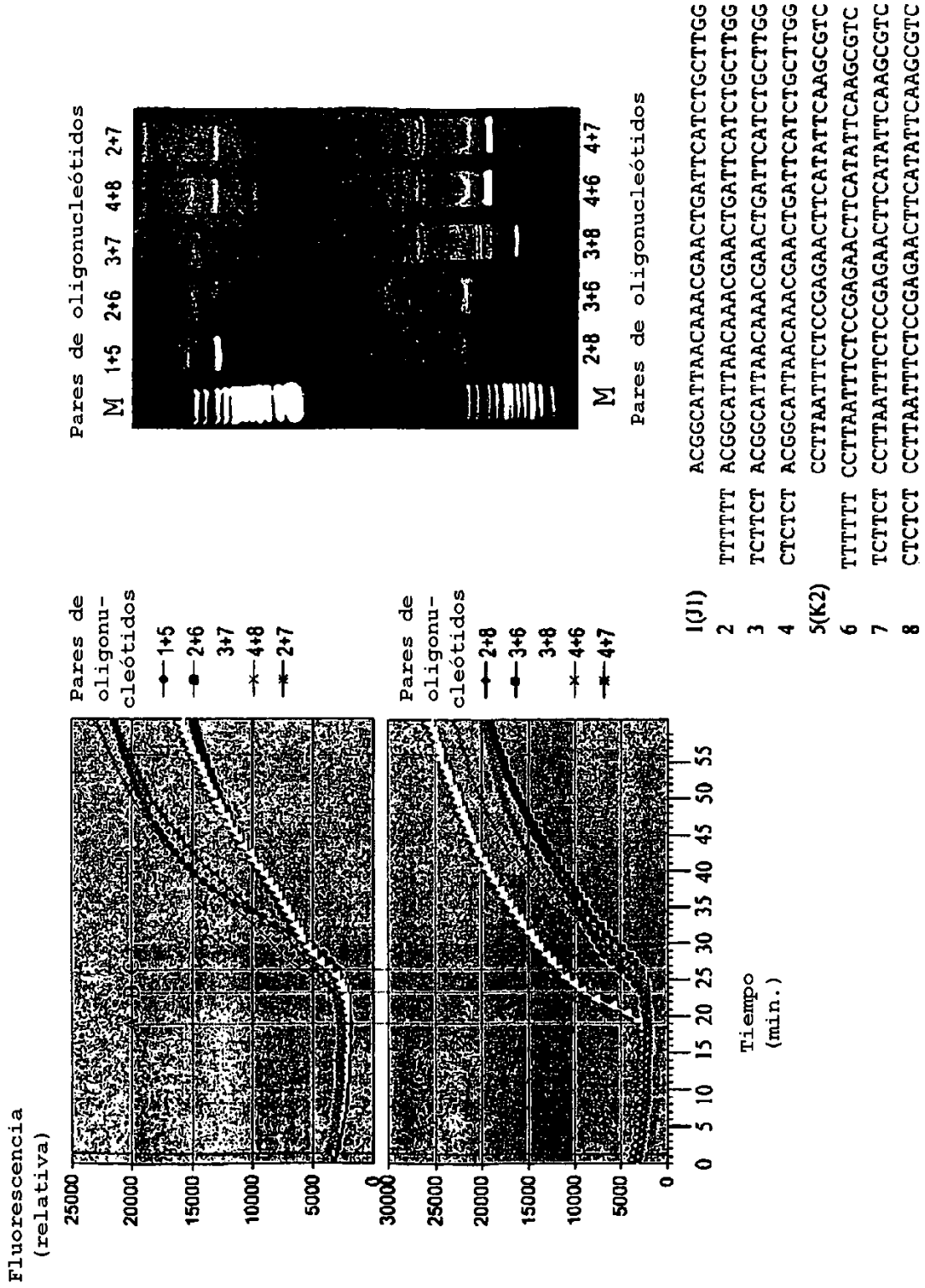
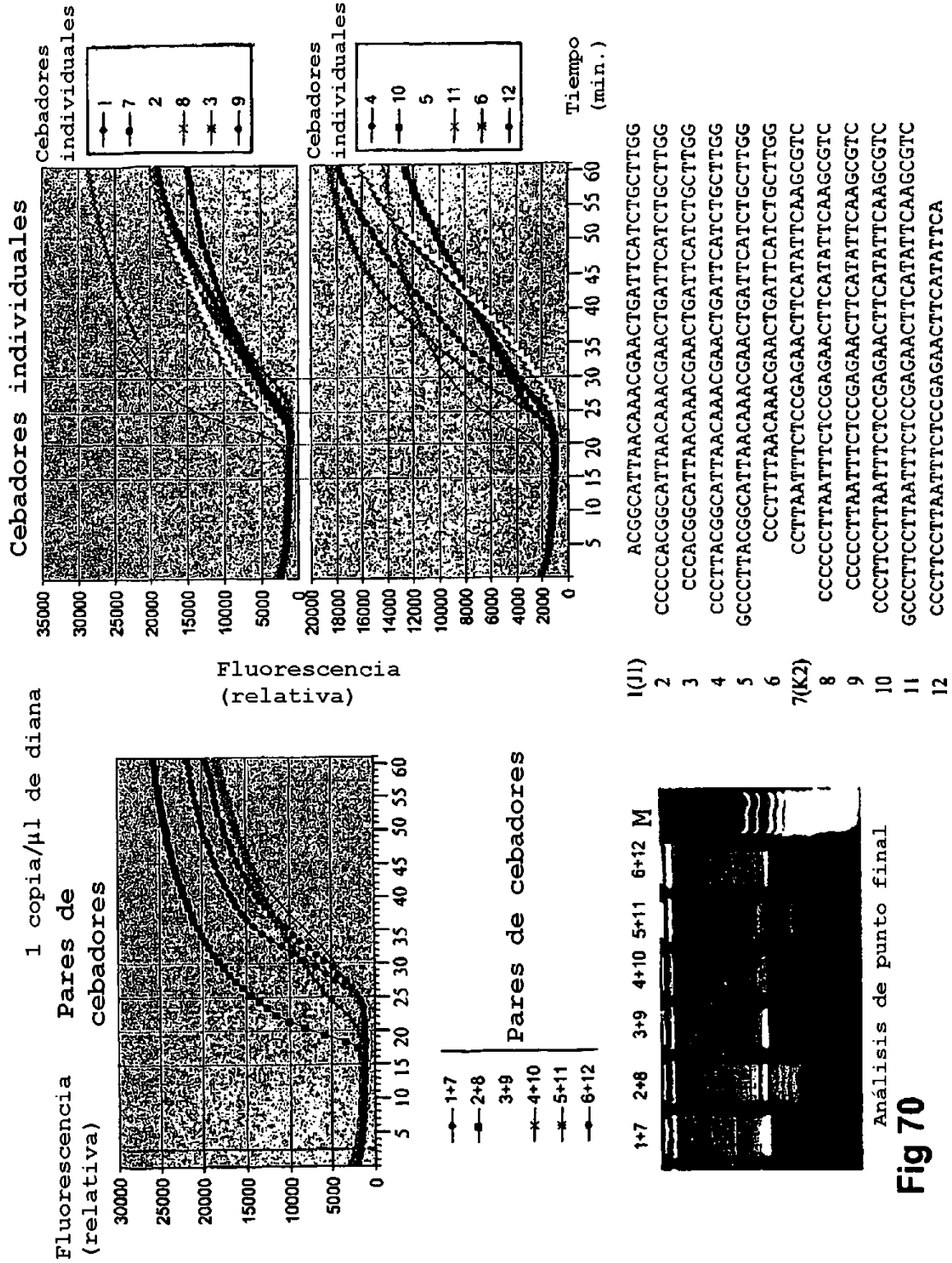
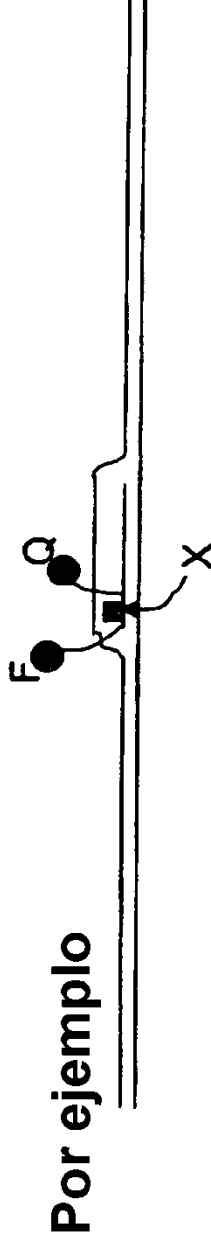


Fig 69



Terceras sondas en tiempo real

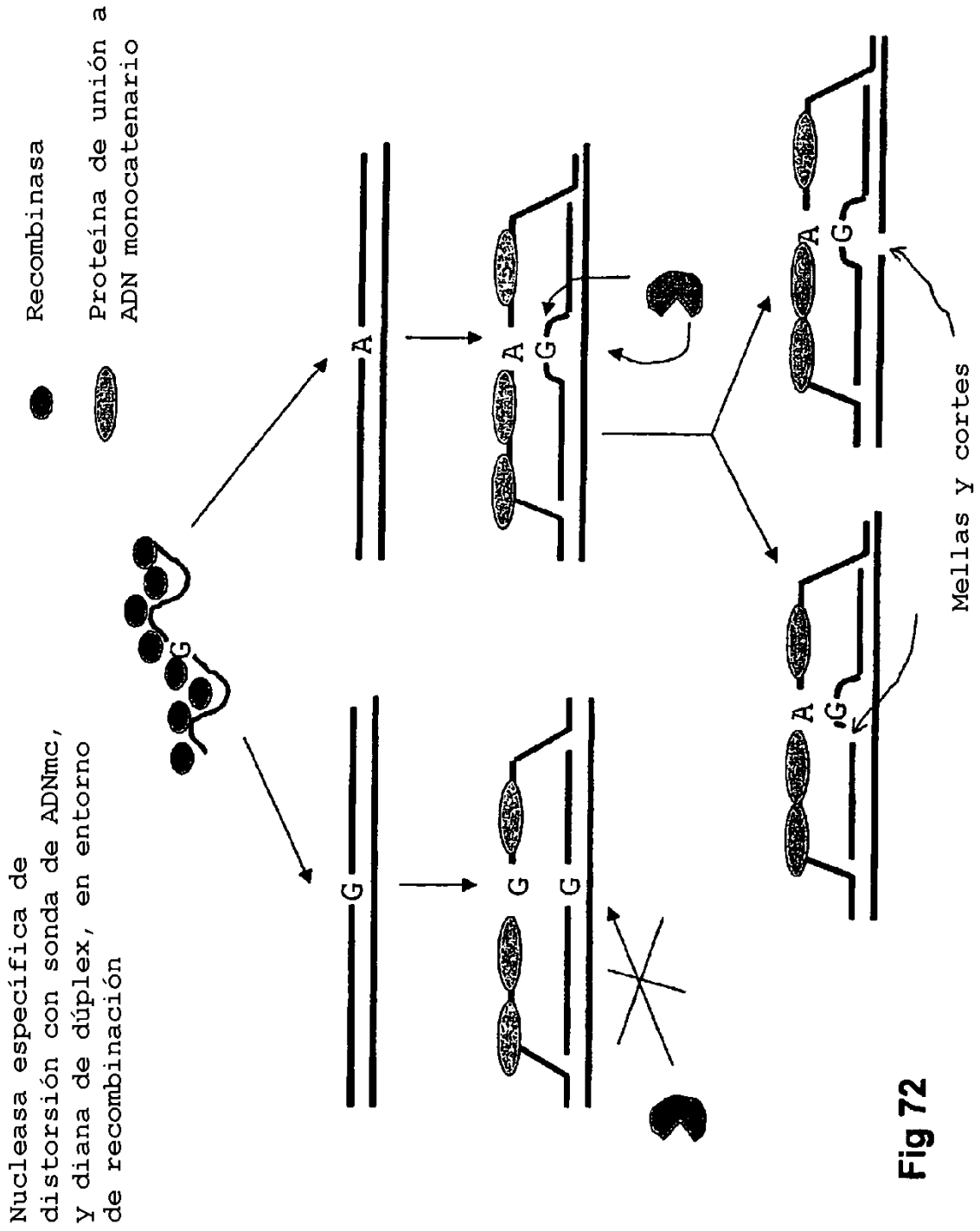
- Utilización de un amplio repertorio de nucleasas que pueden distinguir híbridos de sonda/diana



En el que la sonda es ADN y X= 8-oxoguanina y se corta por fpg, timinaglicol y se corta por Nth, compuesto mimético abásico (tetrahidrofurano) y se corta por Nfo

o la sonda es ARN y se emplea ARNasa H o los cebadores de amplificación están protegidos con ANB en 5' y se utiliza exo de T7 o se utiliza una sonda de "activación inversa" y se utiliza endonucleasa de restricción

Fig 71



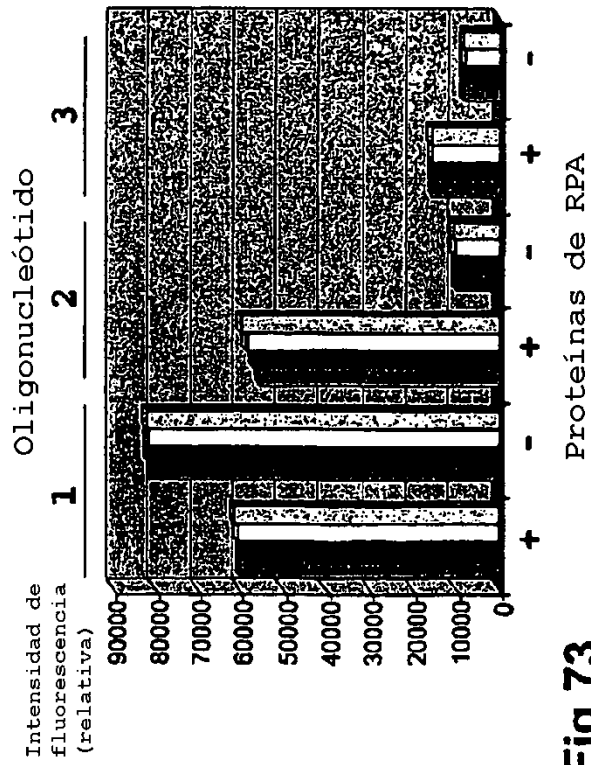
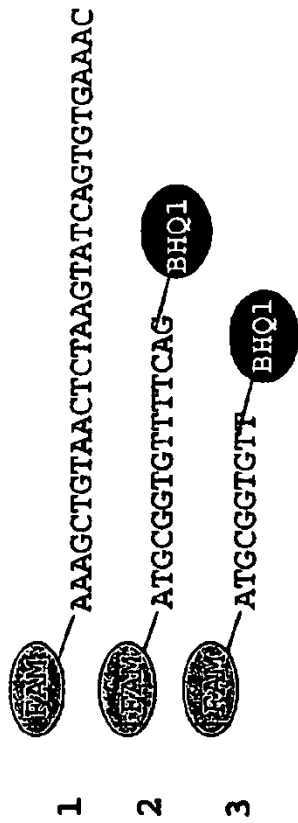
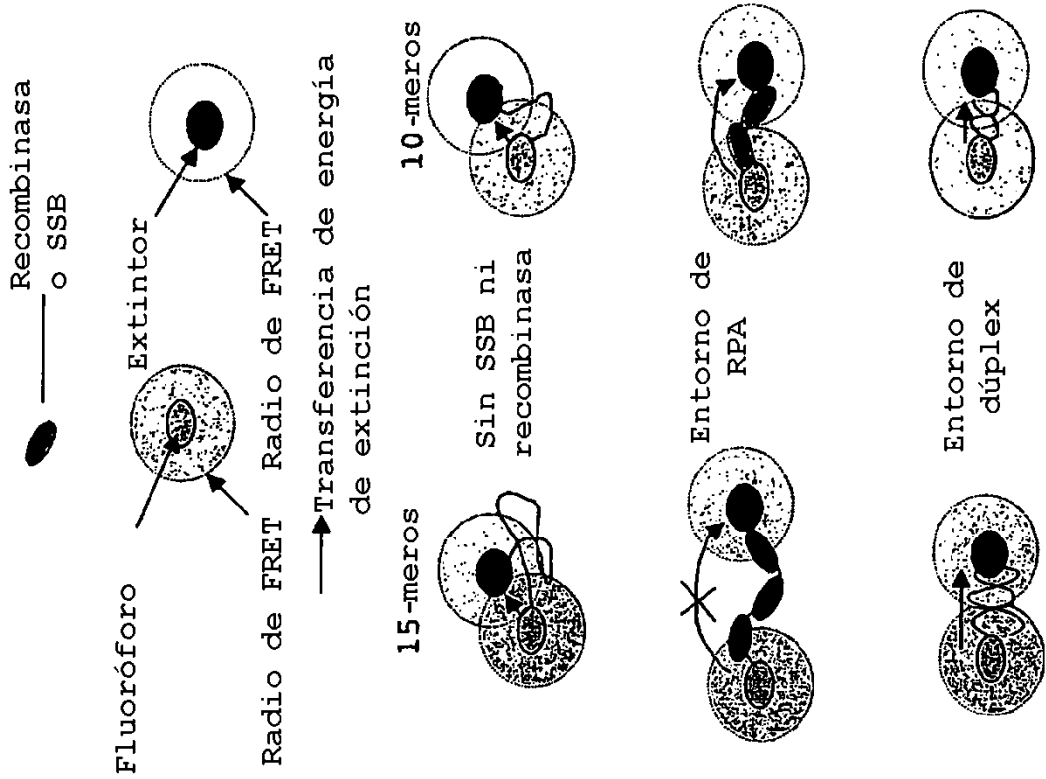
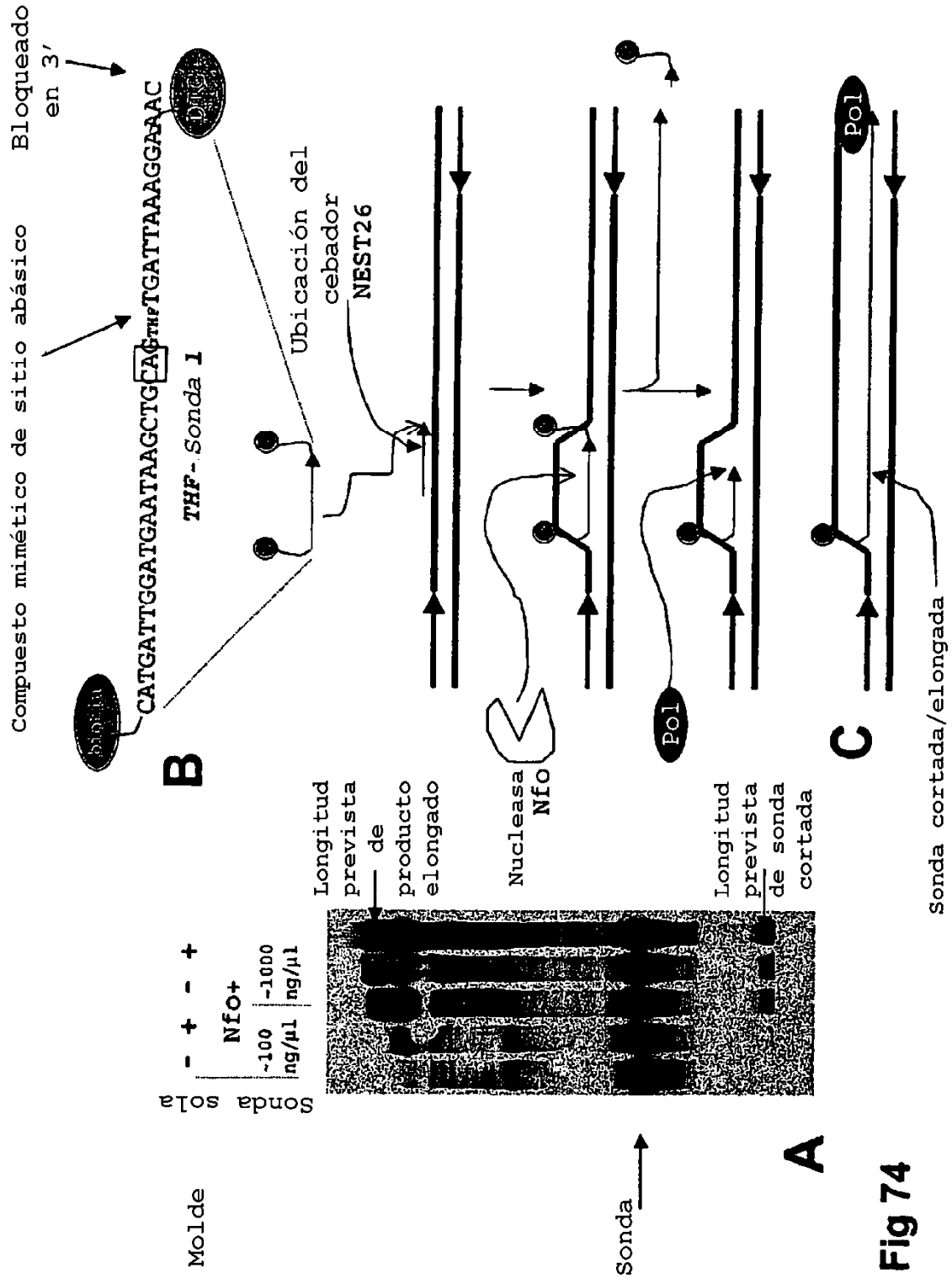
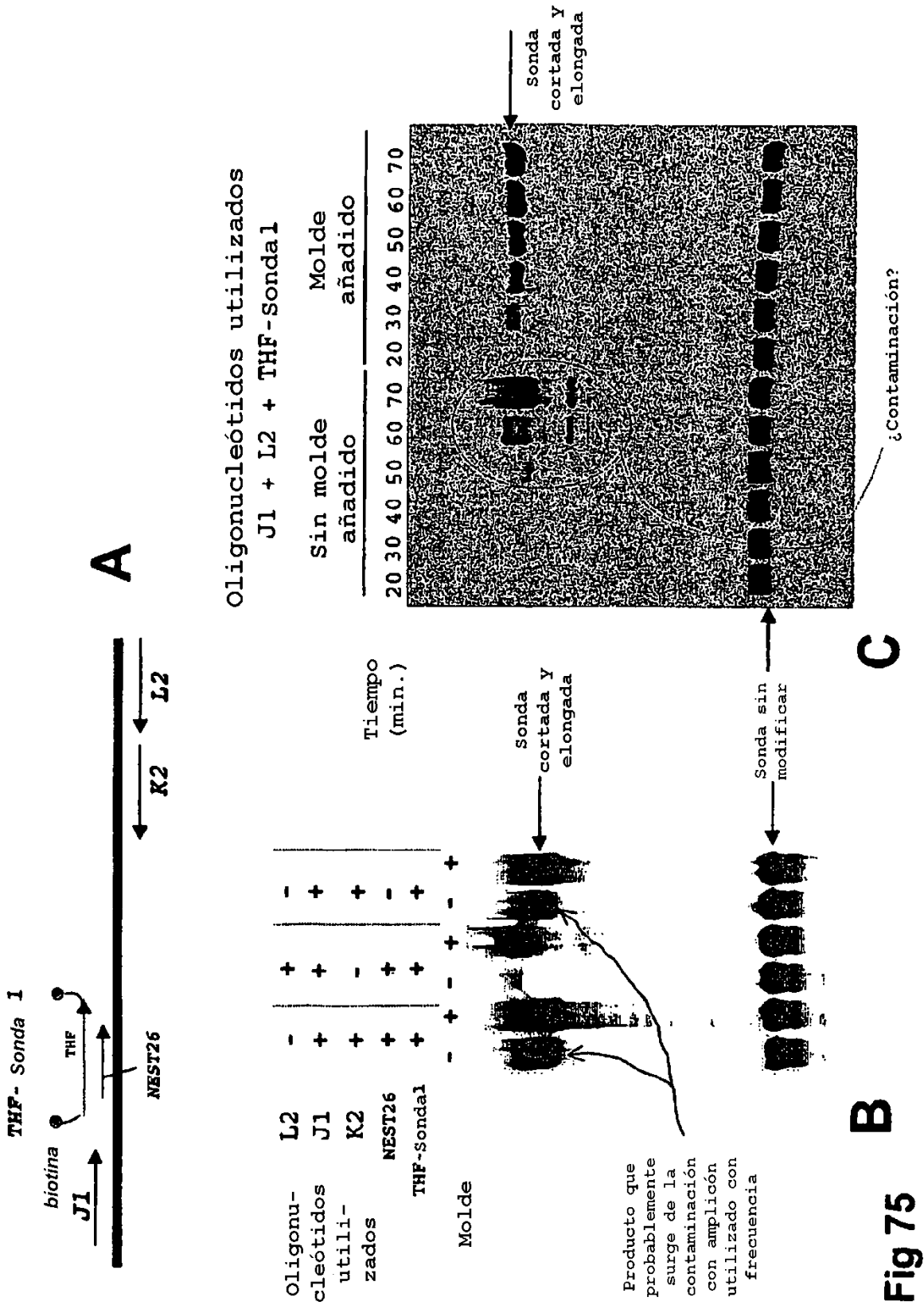


Fig 73





Oligonucleótidos utilizados
J1 + L2 + THF-Sonda1

Sin molde añadido Molde añadido

20 30 40 50 60 70 20 30 40 50 60 70

Sonda cortada y elongada

¿Contaminación?

Ejemplo de sondas para RPA utilizando corte con enzima Nfo

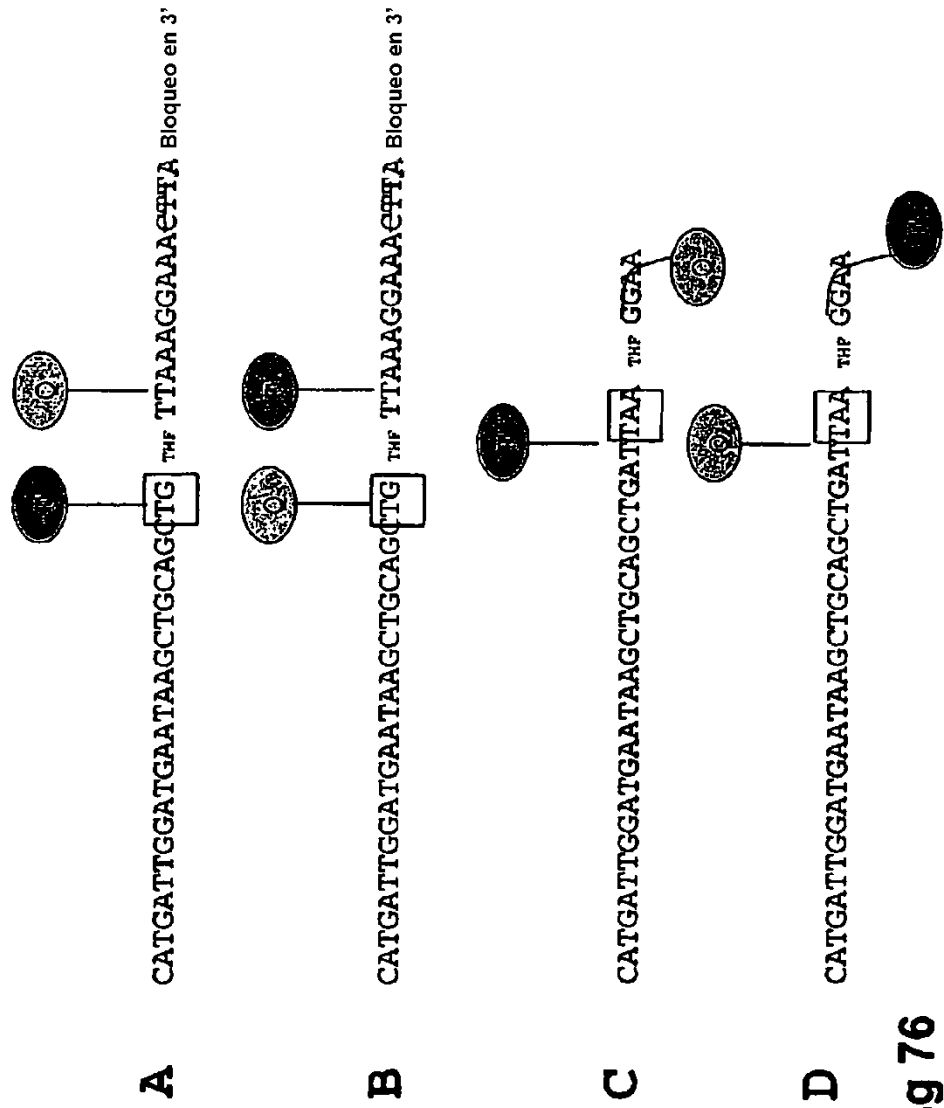


Fig 76