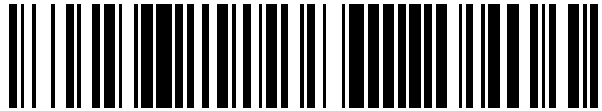


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 697**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2009 E 09745889 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2285988**

54 Título: **Método para sintetizar cadena de ADN**

30 Prioridad:

14.05.2008 FI 20085450

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

04.03.2014

73 Titular/es:

EXPRESSION ANALYTICS OY (100.0%)

Kulmatie 11

02730 Espoo , FI

72 Inventor/es:

ORPANA, ARTO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 445 697 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para sintetizar cadena de ADN

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método de reacción de extensión de cebadores. Más en particular, la presente invención se refiere a un método de reacción de extensión de cebadores como un método de reacción en cadena de polimerasa, capaz de una amplificación independiente de la estructura de ADN difícil de amplificar con alto contenido de nucleótidos de citosina y guanosina, secuencias repetitivas y que forma fuertes estructuras secundarias. La presente invención también se refiere a métodos para diagnosticar trastornos tales como distrofia miotónica de tipo 1, síndrome de X frágil y EPM1 por reacción en cadena de polimerasa. La presente invención también se refiere a un termociclador programado para realizar el método de la invención.

Antecedentes de la invención

La reacción en cadena de polimerasa, PCR, se ha usado por más de dos décadas para crear múltiples copias de un segmento de la plantilla original de ADN, y nuevas aplicaciones y modificaciones surgen a diario.

15 Por ejemplo, el documento US 4 683 202 es uno de los primeros documentos de patente en revelar el método de PCR. Describe un proceso para amplificar al menos una secuencia de ácidos nucleicos específica contenida en un ácido nucleico o una mezcla de ácidos nucleicos, en donde cada ácido nucleico consiste en dos cadenas complementarias separadas, de un tamaño igual o diferente, proceso que comprende: (a) tratar las cadenas con dos cebadores de oligonucleótido, amplificando cada secuencia específica diferente, en condiciones tales que, para cada secuencia diferente que se esté amplificando, se sintetice un producto de extensión de cada cebador que es complementario a cada cadena de ácido nucleico, en donde dichos cebadores se seleccionan de modo de ser suficientemente complementarios de distintas cadenas de cada secuencia específica para hibridarse con ellas, de modo que el producto de extensión sintetizado de un cebador, cuando se separa de su complemento, pueda servir como plantilla para la síntesis del producto de extensión del otro cebador; (b) separar los productos de extensión de cebadores de las plantillas en las que se sintetizaron para producir moléculas monocatenarias; y (c) tratar las moléculas monocatenarias generadas de la etapa (b) con los cebadores de la etapa (a) en condiciones tales que se sintetice un producto de extensión de cebadores usando cada una de las cadenas individuales producidas en la etapa (b) como una plantilla. Desde entonces se siguió desarrollando el método, por ejemplo, también como se describe en los documentos US 4 800 159 y US 4 965 188, pero el principio básico es bien conocido por un experto en la técnica.

30 También los termocicladores para llevar a cabo los métodos de PCR son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el documento US 5 038 852 revela un dispositivo básico de PCR que comprende un recipiente conductor de calor para mantener una mezcla de reacción, medios para calentar, enfriar y mantener dicho recipiente a una o una pluralidad de temperaturas predeterminadas (definidas por el usuario) y que tiene una entrada para recibir una señal de control que controla dichas temperaturas predeterminadas a las que se calienta, se enfría o se mantiene dicho recipiente; y un medio informático, acoplado con la entrada de dicho medio para calentar y enfriar, para generar las señales de control apropiadas para controlar los niveles de temperatura, las rampas de tasa de cambio de temperatura y el tiempo de las incubaciones a determinados niveles de temperatura.

40 A pesar de que parece que los métodos de PCR existen para cada aplicación, aún quedan determinadas plantillas de PCR que no se pueden manipular. La amplificación de fragmentos largos era difícil hasta que se halló que las ADN polimerasas con actividad de corrección de pruebas podían mejorar las amplificaciones largas de PCR (Barnes, W. M. 1994, "PCR amplification of up to 35-kb ADN with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 91, no. 6, pp. 2216-2220; Mukai, H. & Nakagawa, T. 1996, "Long and accurate PCR (LA PCR)", Nippon rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine, vol. 54, no. 4, pp. 917-92). Sin embargo, la eficacia de la amplificación de estas enzimas es relativamente pobre en comparación con las polimerasas estándar no correctoras de pruebas. Por este motivo, muchas empresas lanzaron al mercado mezclas de ADN polimerasas correctoras de pruebas y tradicionales de mayor proceso diseñadas para la amplificación de fragmentos largos y difíciles.

50 Uno de los problemas a los que aún se enfrenta la gente al realizar amplificaciones por PCR es muy frecuentemente cómo amplificar ADN rico en CG que contiene secuencias repetitivas que forman estructuras secundarias fuertes. Los ejemplos de tales estructuras incluyen repeticiones CG, CTG y GCC. Cuando se forman tales estructuras, sólo habrá una extensión parcial porque se asume que la ADN polimerasa colisiona con las estructuras bicatenarias secundarias. Esto da como resultado una extensión incompleta y una pobre eficacia de amplificación general. La extensión incompleta se refiere también a otro fenómeno comúnmente conocido. Si se detiene en la región repetitiva, la nueva cadena de ADN parcialmente extendida tiene en su extremo 3' un estiramiento de la secuencia repetitiva. Se libera en la siguiente etapa de desnaturalización y el extremo 3' se puede alinear en cualquier parte de la repetición, en la posición correcta o no, y se extenderá en la siguiente etapa de extensión. Debido a este mal alineamiento y muchas otras razones relacionadas con las condiciones experimentales, como concentraciones de

ADN polimerasa o plantilla de ADN, etc., los fragmentos terminan siendo de diferente longitud, que se pueden ver como una mancha típica en el gel de agarosa.

La inestabilidad de la repetición que causa la enfermedad es una forma importante y exclusiva de mutación que está ligada a más de 40 trastornos neurológicos, neurodegenerativos y neuromusculares. Estas repeticiones consisten en múltiples, con frecuencia docenas o cientos de copias de unidades de repetición cortas, típicamente de menos de 10 nucleótidos de largo. Las mutaciones de expansión de repetición de ADN son dinámicas e incipientes dentro de los tejidos y a través de generaciones. Los patrones de inestabilidad heredados y específicos de los tejidos son determinados tanto por elementos cis específicos de genes como por proteínas metabólicas del ADN de acción trans. La inestabilidad de la repetición probablemente implica la formación de estructuras de ADN usuales durante la replicación del ADN, la reparación y la recombinación. Avances experimentales para explicar los mecanismos de la inestabilidad de la repetición ampliaron nuestra comprensión de este proceso mutacional. Revelaron vías sorprendentes en las que se pueden impulsar las vías metabólicas o proteger de la inestabilidad de la repetición.

Numerosas enfermedades heredadas comunes son causadas por expansión de secuencias de repetición ricas en CG (Mirkin, S. M. 2007, "Expandable ADN repeats and human disease", *Nature*, vol. 447, no. 21, pp. 932-940; Mirkin, S. M. 2006, "ADN structures, repeat expansions and human hereditary disorders", *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 16, no. 3, pp. 351-358). Las estructuras secundarias formadas en estas repeticiones extendidas ricas en CG fueron consideradas como un mecanismo patológico principal.

Las estructuras secundarias y la dificultad de quedar en un estado monocatenario debido a la elevada temperatura de fusión de un fragmento rico en CG son los mayores obstáculos para bloquear la ADN polimerasa de la extensión durante la extensión de cebadores. Esto da como resultado una ineficaz extensión de cebadores y una pobre eficacia de amplificación.

Las estructuras secundarias se forman a menudo como resultado de las cadenas de ADN autocomplementarias que buscan sus mínimos estados energéticos estructurales. Si una estructura secundaria se puede tomar como un mínimo estado energético, se espera que, en condiciones fijas, el mínimo de energía sea el mismo para cada molécula del amplicón y las moléculas terminen finalmente en una estructura secundaria similar.

Sin embargo, en fragmentos largos y repetitivos, el proceso es más complicado y no es muy probable una única estructura, sino que más bien se hallan múltiples estructuras con estados energéticos mínimos muy similares.

Se pueden realizar análisis de diagnóstico de la longitud de la extensión de la repetición con muchos métodos. Si las expansiones de la repetición esperadas son relativamente cortas, es posible la extensión en estas repeticiones. La amplificación de estas secuencias de repetición seguido por un análisis de fragmentos es un procedimiento rutinario en laboratorios de diagnóstico. Sin embargo, en muchas de las enfermedades, la expansión de las repeticiones es demasiado larga y/o rica en CG para los actuales métodos de PCR.

La identificación confiable de una copia de una repetición rica en CG expandida que causa enfermedades de herencia dominante o hallada en portadores no afectados de una enfermedad de herencia recesiva es especialmente difícil debido a la presencia de una copia de alelo de repetición corto no expandido. En condiciones subóptimas de PCR, este alelo corto de tipo salvaje tiene una eficacia de amplificación mucho mayor y a menudo monopoliza la reacción de amplificación, dando como resultado una pobre amplificación del alelo expandido y un error de diagnóstico. La incapacidad de amplificar de forma confiable segmentos largos ricos en CG forzó a los laboratorios de diagnóstico a usar otras tecnologías, por ejemplo, Southern blotting, para analizar estas expansiones de repetición.

Se han desarrollado determinados métodos para superar el problema de la amplificación de regiones ricas en GC. Se han usado diversos aditivos, codisolventes, incluyendo DMSO, glicerol y betaína, para reducir la elevada temperatura de fusión de los segmentos ricos en CG (Henke, W., Herdel, K., Jung, K., Schnorr, D. & Loening, S. A. 1997, "Betaine improves the PCR amplification of CG-rich DNA sequences", *Nucleic acids research*, vol. 25, no. 19, pp. 3957-3958; Hubé, F., Reverdiau, P., Lochmann, S. & Gruel, Y. 2005, "Improved PCR method for amplification of GC-rich ADN sequences", *Molecular biotechnology*, vol. 31, no. 1, pp. 81-84).

En algunos métodos, se usa un análogo de dGTP. Por ejemplo, el documento US 5 091 310 revela un método para amplificación de ADN independiente de la estructura por reacción en cadena de polimerasa, que comprende: (a) tratar el ADN en condiciones de hibridación con un par de cebadores de oligonucleótidos, una ADN polimerasa, dATP, dCTP, TIP y c7dGTP de modo que se forma un producto de extensión de cada cebador de oligonucleótido que es complementario del ADN, en donde el producto de extensión de un primer cebador de dicho par de cebadores, cuando se separa de su plantilla, puede servir como una plantilla para la síntesis del producto de extensión de un segundo cebador de dicho par; (b) separar los productos de extensión de las plantillas en las que se sintetizaron los productos de extensión; y (c) repetir las etapas (a) y (b) en los productos de extensión producidos en la etapa (b). A pesar de estos aditivos, a menudo fragmentos largos, repetitivos y/o ricos en CG quedaron "no PCRables".

El documento US 6 355 422 B1 revela un método en el que se usan dos temperaturas de extensión constantes diferentes (Liu, Q. & Sommer, S. S. 1998, "Subcycling-PCR for multiplex long-distance amplification of regions with high and low GC content: application to the inversion hotspot in the factor VIII gene", *BioTechniques*, vol. 25, no. 6, pp. 1022-1028). Los autores describen un método de PCR para la amplificación de una gran duplicación que muestra segmentos ricos en GC y pobres en CG. Como el segmento tenía regiones con bajo contenido de GC, usaron menor temperatura de extensión de 60 °C junto con 65 °C más convencional. Una etapa de extensión individual contenía sesiones de 2 minutos a ambas temperaturas.

El documento WO 2005/026376 revela un método de secuenciación de ciclos a base de fluorescencia de una muestra de ADN que comprende (a) preparar una mezcla de reacción que contiene: (i) la muestra de ADN, (ii) un grupo de cebadores complementarios a los sitios de cebadores de ADN que flanquean o se intercalan dentro de la muestra de ADN, en donde la temperatura de disociación (T_d) de los cebadores en el grupo de cebadores está entre aproximadamente 72 °C y 75 °C, (iii) una polimerasa termoestable, (iv) una mezcla de dNTPs y ddNTPs rotulados fluorescentes y (v) un tampón apropiado; (b) disociar la muestra de ADN para crear plantillas monocatenarias, en donde dicha disociación se lleva a cabo por calentamiento del ADN entre aproximadamente 92 °C y 95 °C durante al menos aproximadamente 3 minutos; (c) alinear los cebadores con los sitios de cebadores, en donde dicho alineamiento se lleva a cabo a una temperatura de entre aproximadamente 65 °C y 67 °C durante al menos aproximadamente 30 segundos; (d) extender los cebadores alineados para generar una serie de fragmentos de ácido didesoxinucleico rotulados de forma fluorescente, en donde dicha extensión de cebadores se logra a una temperatura de entre aproximadamente 75 °C y 78 °C durante aproximadamente 3 a 4 minutos; (e) calentar la mezcla de reacción hasta aproximadamente 92 °C y 95 °C a fin de disociar ADN bicatenario; (f) repetir las etapas c a e durante una pluralidad de ciclos; y (g) determinar la secuencia de nucleótidos de la muestra de ADN de la serie de fragmentos de ácido didesoxinucleico rotulado de forma fluorescente presentes en la mezcla de reacción.

Hubé F. et al. (Improved PCR method for amplification of GC-rich ADN sequences, *Molecular Biotechnology* Sep 2005; 81-81, ISSN: 1073-6085) revela un método mejorado de reacción en cadena de polimerasa (peR) para usar para la amplificación exitosa de la región promotora del gen inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI)-2 que exhibe > 70% de contenido de G+C en una secuencia de aproximadamente 300 bp y una región de isla de CpG completa que se extiende al exón 1, los tres sitios de inicio de la transcripción y el sitio de inicio de la traducción. En el método de PCR "touchdown", se usa una temperatura de alineamiento 5-10 °C mayor que la T_m durante los primeros ciclos de PCR.

Esto se puede combinar con el método de PCR "hotstart" en el que se añaden a la reacción componentes adicionales tales como anticuerpos de polimerasa.

El documento WO 02/103044 revela un método para amplificar secuencias de ADN que incluyen polimorfismo de nucleótidos simples en muestra al someter el ADN a ciclos repetidos de amplificación, que incluyen las etapas de desnaturalización, alineamiento y extensión de cebadores correctamente alineados. Dicho método implica amplificar muestra de ADN con un primer grupo de cebadores para proporcionar un producto amplificado, donde la amplificación incluye una primera fase y una segunda fase, donde la primera fase incluye someter la muestra de ADN a una etapa de desnaturalización (DT), etapa de temperatura de alineamiento (AT) y etapa de temperatura de extensión de cebadores correctamente alineados (CT) por orden, seguido por al menos una AT y CT por orden, donde estas etapas se producen antes de la exposición de la muestra de ADN a una posterior DT, donde la segunda fase proporciona uno o más ciclos de DT seguido por AT y una etapa de temperatura de extensión.

El documento US 2003/087237 A1 revela una extensión de cebadores de ciclos enzimáticos a temperaturas inferiores a 80 °C, que comprende mezclar la plantilla de ADN con cebador y ADN polimerasa en solución que contiene glicerol y fluctuar la temperatura de reacción. Dicho método comprende: mezclar la plantilla de ADN con (P) o (PP) y ADN polimerasa natural o modificada moderadamente termoestable, en solución con 10-20% de glicerol y/o etilenglicol, en condiciones tales que la temperatura de reacción fluctúe entre 70 °C y 37 °C.

A pesar de que se secuencian el genoma humano, los proyectos de secuenciación en gran escala luchan con frecuencia con una ineficaz amplificación en áreas con segmentos repetitivos ricos en CG. Este problema es incluso más pronunciado cuando se estudian genomas de otras especies que la humana con mayor contenido de CG. Hay una necesidad de un método de PCR que pueda superar este problema. Tal método de PCR sería valioso también, por ejemplo, para el diagnóstico de enfermedades y trastornos relacionados con tales secuencias, tales como las enfermedades descritas con anterioridad. Una extensión eficaz de cebadores en secuencias ricas en CG también permitiría una secuenciación confiable del ADN en secuencias ricas en CG.

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que convertir la reacción de PCR de la amplificación clásica por PCR usando desnaturalización constante, alineamiento de cebadores y temperaturas de extensión de cebadores (las últimas dos etapas se pueden combinar en PCR de 2 etapas) en un proceso más dinámico mejoró considerablemente la eficacia de la amplificación de las secuencias repetitivas ricas en CG.

La elevación lenta y progresiva a temperaturas de extensión de cebadores mucho mayores que las usadas convencionalmente dio como resultado una extensión en la repetición muy rica en CG. Sin embargo, esto no era

suficiente para permitir una amplificación eficaz en repeticiones ricas en CG autocomplementarias largas que forman estructuras secundarias.

5 Parecía que la extensión en repeticiones largas ricas en CG se podía realizar si la cadena de ADN no se dejaba establecer en una estructura secundaria fija, sino más bien se dejaba en transición cambiando continuamente la temperatura de extensión por pulsos. La temperatura cambiante obliga a las estructuras secundarias a que cambien continuamente e incluso las estructuras secundarias más fuertes se abrirían eventual y al menos temporariamente, permitiendo que la ADN polimerasa se extendiera un paso más. En condiciones experimentales apropiadas, la cadena de ADN que se extiende recién sintetizada mantiene su posición respecto de la cadena de la plantilla, a pesar de que las estructuras secundarias están forzadas a abrirse. La pulsación también da a la ADN polimerasa significativamente más tiempo para realizar la extensión a una temperatura óptima y aumenta la probabilidad de alcanzar la extensión completa.

La razón original para desarrollar el método de la invención, también denominado PCR de Heat-Push, se originó de la necesidad de nuevos métodos de análisis de enfermedades hereditarias causadas por extensiones de secuencias de repetición ricas en CG.

15 Uno de los ensayos más desafiantes para la amplificación por PCR fue la prueba de diagnóstico en la epilepsia mioclónica progresiva 1, también conocida como trastorno EPM1. La mayor mutación hallada en pacientes finlandeses es una expansión de una repetición de dodecámero (CCCCGCCCGCG) en la región 5' no traducida del gen de cistatina B (CSTB). Los alelos normales contienen usualmente dos o tres copias de la repetición de dodecámero, mientras que se informó que los alelos mutantes expandidos contenían entre 30 y 80 copias. Esta expansión altera la función promotora y, en individuos homocigotos, da como resultado la falta de expresión de CSTB y un fenotipo de enfermedad severa. EPM1 se hereda recesivamente; así, los individuos afectados tienen dos alelos expandidos, mientras que los portadores de una mutación no afectados tienen sólo un alelo expandido. La repetición de dodecámero de EPM1 no es simétrica o autocomplementaria, lo que sugiere que no tendría estructuras secundarias tan fuertes como lo hacen las repeticiones simétricas. Así, las dificultades en la amplificación por PCR respecto de la expansión de EPM1 podrían estar más relacionadas con su contenido de CG extremadamente alto (casi 1 kb sólo nucleótidos C o G) que con las estructuras secundarias fuertes.

La distrofia miotónica, de tipo 1 (DM1), es una enfermedad hereditaria causada por una expansión de una repetición de CTG en la región promotora del gen de proteína quinasa de la distrofia miotónica (DMPK). Como en las enfermedades de expansión de repetición de herencia dominante, sólo un alelo está expandido. Los pacientes no afectados llevan 5-34 unidades de repetición mientras que los pacientes afectados muestran más de 50, a veces más de 2000 unidades de repetición. En la forma congénita de DM1, usualmente se halla una gran expansión de repetición de tamaño uniforme. Las expansiones se detectan con facilidad en el ensayo de Southern blotting. El diagnóstico de la forma adulta de DM1 es, por otro lado, a veces complicada por una elevada variabilidad de la longitud celular de las repeticiones expandidas. Si la variabilidad de la longitud individual es grande, en lugar de una banda simple, se ven una mancha y/o múltiples bandas en el Southern blotting, reduciendo severamente la relación de señal a ruido del ensayo.

El síndrome de X frágil (FRAXA) es causado por la expansión de una repetición de CGG en la región 5' no traducida del gen de retraso mental 1 del sitio del cromosoma X frágil 1 (FMR1). La longitud de repetición entre 50 y 200 es considerada una premutación, una expansión de más de 200 unidades de repetición es considerada una mutación total.

La anticipación, la otra expansión de los alelos ligeramente expandidos en la siguiente generación, es un problema común de las enfermedades hereditarias causadas por expansiones de repetición. Esto también vuelve importante la identificación de los portadores asintomáticos de los alelos ligeramente expandidos (Pearson CE, Nichol EK, Cleary JD: Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet.* 2005 Oct; 6(10): 729-42).

45 La heterogeneidad tisular de longitudes repetidas, así como los mosaicismos celulares, obstruyen severamente la detección de alelos expandidos. A veces, sólo una fracción de las células en la muestra porta expansiones grandes y, en esos casos, la amplificación del alelo corto de tipo salvaje puede evitar por completo que los fragmentos expandidos se amplifiquen cuando se usan métodos convencionales.

La distrofia miotónica de tipo 1, DM1, se eligió como el sistema modelo primario para el método de la presente invención por los siguientes motivos:

- Es una enfermedad de herencia dominante, los pacientes afectados tienen un alelo no expandido y un alelo expandido.
- La expansión de las repeticiones de CTG puede tener una longitud de más de 1000 unidades de repetición y, en una muestra, se puede tener múltiples fragmentos expandidos variables.
- 55 - No existen protocolos de PCR para una amplificación eficaz en expansiones de repetición largas.

- El análisis de Southern blotting permitía una estimación directa de la longitud de expansión de las repeticiones y su variabilidad en las muestras original. Así, la eficacia de la amplificación podría ser estimada no sólo entre un alelo expandido y un alelo no expandido, sino también entre múltiples fragmentos expandidos que difieren ligeramente de tamaño.

- 5 Para demostrar la robustez del método de la presente invención, se eligió otra enfermedad hereditaria clínicamente muy importante, el síndrome de X frágil. La repetición de CGG forma fuertes estructuras secundarias y es considerada uno de los fragmentos más difíciles para amplificar.

Breve descripción de la invención

10 La presente invención proporciona un método de reacción de extensión de cebadores, como un método de reacción en cadena de polimerasa (PCR), para la amplificación del ADN independiente de la estructura, que comprende preparar una mezcla de reacción con contenido de la muestra de ADN, cebadores, una o múltiples enzimas capaces de sintetizar una cadena de ácido nucleico complementaria a la cadena de ácido nucleico original, como una ADN polimerasa termoestable, mezcla de dNTPs y un tampón, desnaturalizar el ADN en una etapa de desnaturalización, alinear los cebadores en una etapa de alineamiento, extender los cebadores alineados en una etapa de extensión, 15 en donde en la etapa de extensión, la temperatura primero se eleva de la temperatura de alineamiento a una primera temperatura de extensión inferior en el intervalo de 70-90 °C, luego fluctúa hasta la segunda temperatura de extensión mayor en el intervalo de 75-95 °C y vuelve a la primera temperatura de extensión durante una pluralidad de ciclos para desestabilizar las estructuras secundarias en el ADN para permitir la extensión. Este cambio pulsado hacia arriba y hacia abajo en la temperatura de extensión se puede llevar a cabo usando ciclos repetidos entre dos o 20 más temperaturas. En una realización, las etapas se repiten durante una pluralidad de ciclos para obtener ADN amplificado. La presente invención también proporciona un termociclador programado para realizar el método de la presente invención. Con preferencia, dicho termociclador se puede programar para realizar una gran cantidad de pulsos, por ejemplo, 100 o más.

25 La presente invención también proporciona un medio de almacenamiento de datos legibles por ordenador que tiene un código de programa ejecutable por ordenador almacenado operativo para realizar el método de la presente invención.

La presente invención también proporciona métodos para diagnosticar enfermedades o trastornos relacionados con el ADN que contiene secuencias repetidas que forman estructuras secundarias, en las que se usa el método de extensión de cebadores de la invención para amplificar dicho ADN con fines diagnósticos.

30 La presente invención también proporciona un método para diagnosticar epilepsia mioclónica progresiva 1 (EPM1), en donde el método de la invención se usa para amplificar el ADN específico de EPM1 para permitir el análisis de la cantidad de unidades de repetición en dicho ADN para realizar una diagnosis.

35 La presente invención también proporciona un método para diagnosticar el síndrome de X frágil, en donde el método de la invención se usa para amplificar el ADN específico del síndrome de X frágil para permitir el análisis de la cantidad de unidades de repetición en dicho ADN para hacer una diagnosis.

La presente invención también proporciona un método para diagnosticar distrofia miotónica de tipo 1, en donde el método de la invención se usa para amplificar el ADN específico de la distrofia miotónica de tipo 1 para permitir el análisis de la cantidad de unidades de repetición en dicho ADN para hacer una diagnosis.

40 El método de la presente invención mostraba una mejor eficacia de amplificación para amplificar los fragmentos respecto de la longitud de los segmentos repetitivos ricos en CG que demuestran su utilidad en la amplificación equilibrada y eficaz de secuencias de repetición largas y ricas en CG.

45 Es la ventaja de la presente invención que las secuencias de ADN que tienen una elevada temperatura de fusión y/o estructuras secundarias problemáticas se pueden amplificar ahora de manera eficaz. Esto hará posible amplificar determinadas secuencias de ADN que eran imposibles o muy difíciles para amplificar con anterioridad. Esto también permite métodos de diagnóstico sofisticados que usan métodos de PCR y, así, también el diagnóstico de determinadas enfermedades y trastornos que eran muy difíciles de diagnosticar o reconocer con anterioridad.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un gel de agarosa de los resultados de un análisis de PCR de la etapa de calentamiento simple de muestras de EPM1. - = tipo salvaje, + = repetición de dodecámero expandida.

50 La Figura 2 muestra un gel de agarosa de los resultados de un análisis de PCR de la etapa de calentamiento simple de muestras de DM1. La cantidad de unidades de repetición (CTG) detectadas en el análisis de Southern blotting se muestra en el eje X. Se ve manchas severas.

La Figura 3 muestra un resultado de Southern blotting (izquierda) de muestras de DM1. La muestra de ADN no amplificada del paciente con la forma adulta (pero no con la forma congénita) de DM1 contenía múltiples fragmentos

con longitudes de expansión de CTG ligeramente diferentes. Estos fragmentos se amplificaron usando el método Heat-Push, que da como resultado un perfil muy similar en gel de agarosa (derecha). WT = tipo salvaje, C = DM1 congénita, A = DM1 adulta. Las manchas son despreciables.

5 La Figura 4 muestra un gel de agarosa de los resultados de una comparación simultánea de la PCR de la etapa de calentamiento simple y el método de la invención. Análisis de las muestras de DM1. ~n se refiere a la cantidad de unidades de repetición (CTG), C = DM1 congénita, A = DM1 adulta. En cada muestra diferente, la primera línea corresponde a los resultados de la etapa de calentamiento simple (SH) y la segunda línea, a los resultados de Heat-Push (HP). Las manchas son despreciables en muestras amplificadas con PCR Heat-Push.

10 La Figura 5 muestra un gel de agarosa de los resultados de muestras de ADN amplificadas usando el método de Heat-Push de DM1. El número recuadrado en el eje X muestra el tamaño esperado del producto de PCR calculado usando el tamaño de repetición detectado por Southern blotting.

La Figura 6 muestra un gel de agarosa de los resultados de un experimento de series de diluciones. Las diluciones de una muestra de ADN con una gran expansión de repetición de CTG de DM1 se amplificaron usando el método Heat-Push de DM1. Demasiada plantilla de ADN evita que el alelo expandido se amplifique.

15 La Figura 7 muestra un gel de agarosa de los resultados de la amplificación por Heat-Push (HP) de muestras de ADN de hombres con diversas cantidades de unidades de repetición de X frágil (CGG). Aq = blanco, - = tipo salvaje, + = repetición expandida (CGG).

20 La Figura 8 muestra un gel de agarosa de los resultados de la amplificación por Heat-Push (HP) de muestras de ADN de X frágil (CGG) de un hombre (repeticiones expandidas) y una mujer (múltiples repeticiones expandidas y una repetición no expandida).

25 La Figura 9 muestra una vista esquemática de un ejemplo del método Heat-Push de la presente invención. Las etapas de desnaturalización inicial y de extensión final no se muestran. En primer lugar, en la etapa de desnaturalización, la temperatura se eleva hasta una temperatura de desnaturalización, por ejemplo, a aproximadamente 95 °C durante 45 segundos y luego a aproximadamente 98 °C durante 10 segundos. Luego la temperatura se reduce a aproximadamente 68 °C durante 45 segundos en la etapa de alineamiento. Después de ello, comienza la etapa de extensión característica de la invención. La temperatura de extensión fluctúa entre la primera temperatura de extensión (aquí, aproximadamente 78 °C) y la segunda temperatura de extensión (aquí, aproximadamente 83 °C) una pluralidad de veces. Todo el ciclo se repite varias veces.

30 La Figura 10 muestra una vista esquemática de un ejemplo del método de PCR de la etapa de calentamiento simple de la presente invención. Las etapas de desnaturalización inicial y de extensión final no se muestran. En primer lugar, en la etapa de la desnaturalización, la temperatura se eleva hasta una temperatura de desnaturalización, como de aproximadamente 96 °C durante 45 segundos. Luego, la temperatura se reduce a aproximadamente 69 °C durante 45 segundos en la etapa de alineamiento. Después de ello, comienza la etapa de extensión característica de la invención. La temperatura de extensión se eleva muy lentamente hasta la temperatura de extensión primera y final (aquí, aproximadamente 79 °C). Todo el ciclo se repite varias veces.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

40 La expresión "repetición rica en CG" se refiere a un segmento de genoma que comprende una unidad de repetición corta (en general, <20 nucleótidos de largo), en donde más del 60% son C o G. Esta unidad de repetición se replica, en general, de forma ininterrumpida más de tres veces, a menudo, decenas o cientos de veces.

La expresión "repetición expandida" significa que una unidad de repetición se replica de forma ininterrumpida más de tres veces, a menudo, decenas o cientos de veces. La cantidad de repeticiones en individuos afectados es mayor que la halla en la población general. Puede ser una premutación o una mutación total.

45 La expresión "Heat-Push" significa que la temperatura fluctúa varias veces entre la primera y la segunda temperatura de extensión. La tasa de calentamiento y de enfriamiento puede diferir, y puede haber puntos de cambio de temperatura adicionales entre la primera y la segunda temperatura de extensión. Esta fluctuación de temperatura entre la primera y la segunda temperatura de extensión se replica varias veces, en general, más de tres veces, por ejemplo, 20-40 veces, hasta cientos de veces durante un ciclo de PCR. Según las condiciones objeto y experimentales, se debe optimizar el uso de la menor cantidad de pulsos con tasas de calentamiento más lentas o
50 una mayor cantidad de pulsos más rápidos.

El término "temperatura" se refiere al valor de la temperatura programada en el software del termociclador. Los termocicladores transfieren la temperatura formando un gradiente de temperatura entre el bloque y el líquido en el recipiente. Depende del instrumento y la tasa de aceleración predicha. También el valor del volumen de reacción programado afecta la formación de estos gradientes térmicos. Al programar el volumen de reacción más pequeño,
55 en cierta forma, es posible reducir esta característica.

Estructuras secundarias de expansiones de repeticiones ricas en CG

En general, se asume que las estructuras secundarias de la plantilla monocatenaria con repetición rica en CG detendrán la ADN polimerasa y evitarán que la reacción de extensión de cebadores llegue al final de la cadena de la plantilla. La ADN polimerasa es capaz de entender sólo una parte de esta región de repetición rica en CG antes de ser detenida por las fuertes estructuras secundarias. En la etapa de desnaturalización del siguiente ciclo de una reacción de PCR convencional, las cadenas parcialmente extendidas y de la plantilla se disocian. Durante la siguiente etapa de alineamiento, esta cadena parcialmente extendida se alineará con una plantilla de ADN monocatenario. Esto, sin embargo, tiene dos problemas mayores. Si la extensión alcanzó la región de repetición, el realineamiento del extremo 3' puede tener lugar en cualquier lugar en la región de repetición, en especial si la región de repetición tiene cientos de bases de longitud. Este desplazamiento a lo largo de la cadena de la plantilla da como resultado la variabilidad de la longitud de las cadenas recién sintetizadas. La variabilidad se volverá más fuerte durante los siguientes ciclos de PCR, ya que las cadenas con una variabilidad de la longitud de las repeticiones servirán como plantillas para los posteriores ciclos de PCR. Se ven manchas y tartamudeo cuando los productos de amplificación se analizan en electroforesis en gel y la exacta estimación de las longitudes de las repeticiones originales se vuelve muy difícil.

Expansiones cortas se amplifican con mayor eficacia que las largas

Otro problema se refiere a la pobre eficacia de amplificación si se necesitan múltiples ciclos de PCR antes de alcanzar una extensión completa. A veces, se forma el producto de PCR de una expansión de repetición rica en CG, pero con una eficacia muy pobre si el alelo expandido está presente solo. En muestras heterocigotas o mosaico, que también tienen plantillas de ADN más cortas, la expansión de tamaño similar no se amplifica. La razón de ello es que un alelo con una región de repetición muy corta se amplifica con una eficacia de amplificación significativamente mayor, y el alelo corto monopoliza la reacción de amplificación. El alelo expandido se amplificará de forma muy pobre. Debido a la pobre eficacia de amplificación, se usó Southern blotting para la detección del producto de PCR a partir de alelos expandidos (Gennarelli, M., Pavoni, M., Amicucci, P., Novelli, G. & Dallapiccola, B. 1998, "A single polymerase chain reaction-based protocol for detecting normal and expanded alleles in myotonic dystrophy", *Diagnostic molecular pathology: The American journal of surgical pathology, parte B*, vol. 7, no. 3, pp. 135-137, Brugnoli R, Morandi L, Briscioli V, Cornelio F, Mantegazza R: A new non-radioactive method for the screening and prenatal diagnosis of myotonic dystrophy patients. *J Neurol* (1998) 245:289-93).

Amplificación de secuencias ricas en CG por PCR de la etapa de calentamiento simple

El alto contenido de nucleótidos C y G eleva la temperatura de fusión del ADN bicatenario. El alto contenido de CG ha sido un problema común y bien conocido de la amplificación por PCR desde su comienzo. Obviamente, usar simplemente una mayor temperatura de extensión sola no tiene éxito; por el contrario, la amplificación de secuencias ricas en CG sería una simple rutina en la actualidad.

En una realización de la presente invención que contiene una PCR de la etapa de calentamiento simple, la temperatura de extensión de los cebadores aumenta de forma continua, muy lentamente, siendo la temperatura final mayor que la usada en la PCR convencional, de hasta 80 °C. Como resultado de este calentamiento progresivo, la ADN polimerasa es capaz de extenderse sobre la repetición del dodecámero expandido de EPM1, casi 1000 bases con 100% de contenido de CG y los productos de PCR se detectan por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Figura 1). La eficacia de la amplificación era tan alta que el alelo expandido se amplificó en presencia de un alelo corto no expandido. Como la repetición del dodecámero no es autocomplementaria, las dificultades relacionadas con la amplificación por PCR de la repetición de EPM1 son causadas meramente por el elevado contenido de CG y no por fuertes estructuras secundarias. La amplificación sobre la repetición expandida de DM1 en condiciones comparables da como resultado manchas severas en geles de agarosa (Figura 2).

Mayor eficacia de amplificación con PCR de Heat-Push

El método Heat-Push de la presente invención corrige de modo significativo esta diferencia en eficacias de amplificación en repeticiones cortas y largas ricas en CG que forman estructuras secundarias.

A diferencia, en la extensión de temperatura constante convencional, o en una PCR de etapa de calentamiento simple, la pulsación térmica de Heat-Push de PCR provoca que la cadena parcialmente extendida recién sintetizada se disocie ligeramente de forma continua y se realinee con la plantilla, pero de tal forma que todo el tiempo haya una unión entre la plantilla y la cadena sintetizada, evitando que la cadena se deslice y pierda su posición. Durante la pulsación entre las fases de temperatura inferior y superior, la ADN polimerasa es capaz de extenderse sobre el siguiente segmento monocatenario libre disponible, hasta que se vuelva a ser detenido por la siguiente estructura secundaria. Al elevar la temperatura otra vez lentamente, se funde su estructura de tapón y la extensión puede continuar un tiempo. Esto se repite varias veces durante una etapa de extensión de cebadores simple, y, como resultado, una gran proporción de estas extensiones, paso a paso, alcanzan su longitud de extensión completa. Es de suma importancia que las cadenas no se separen demasiado durante la extensión, ya que, cuando la cadena recién sintetizada no pierde su posición respecto a la cadena de la plantilla, se crea una copia completa y exacta de

la cadena de la plantilla. Esto da como resultado una elevada eficacia de amplificación y parece permitir una amplificación simultánea eficaz de las repeticiones tanto cortas como largas ricas en CG.

A pesar de los años de experimentación, ninguno de los clásicos métodos de PCR ha sido capaz de amplificar de forma eficaz las repeticiones ricas en CG que forman fuertes estructuras secundarias. Estos métodos clásicos, sin embargo, son muy diferentes de la presente invención, en la que la temperatura de extensión fluctúa entre las temperaturas de extensión inferiores y superiores (por ejemplo, entre 76 °C y 83 °C) virtualmente sin incubación a temperaturas constantes. Este ciclado rápido se repite preferentemente >20 veces (actualmente limitado por la memoria del modelo de termociclador usado) durante una "etapa de extensión" simple. En cada caso, se debe hallar un equilibrio apropiado entre la tasa de calentamiento (que aumenta el tiempo necesario para alcanzar la segunda temperatura de extensión) y la cantidad de pulsos de extensión. Ambos factores afectan el tiempo de ensayo general.

Estudios previos han tratado de usar diferentes temperaturas de extensión para amplificaciones de regiones a larga distancia con alto y bajo contenido de CG. En el método de subciclado, descrito en el documento US 6 355 422 (Liu, Q. & Sommer, S.S. 1998, "Subcycling-PCR for multiplex long-distance amplification of regions with high and low GC content: application to the inversion hotspot in the factor VIII gene", *BioTechniques*, vol. 25, no. 6, pp. 1022-1028), se usaron dos diferentes temperaturas de extensión, 60 °C y 65 °C, 2 minutos cada una. Permitted la extensión sobre los segmentos ricos en CG y ricas en AT de la duplicación por inversión del intrón 22 del gen del factor VIII del cromosoma X. Esta estructura genómica no es una repetición autocomplementaria rica en CG que forma fuertes estructuras secundarias.

Las comparaciones con métodos existentes han sido obstaculizadas por una laguna casi completa de publicaciones acerca de la amplificación eficaz de repeticiones largas ricas en CG usando PCR convencional. La razón de ello puede ser que la actividad de reemplazo de cadenas de las actuales ADN polimerasas no es capaz de amplificar las estructuras de repetición ricas en CG que forman fuertes estructuras secundarias.

El método de la presente invención proporciona, así, un método de reacción de extensión de cebadores, como un método de reacción en cadena de polimerasa (PCR), con mayor independencia de estructuras para la amplificación del ADN. El método permite en especial la amplificación del ADN que contiene secuencias o segmentos que tienen un contenido de GC muy alto y/o que causa la formación de estructuras secundarias de ADN. Los ejemplos no limitativos de tales estructuras incluyen repeticiones ricas en CG, CTG y GCC.

La invención se describe en la presente principalmente haciendo referencia a un método de PCR en el que hay una pluralidad de ciclos de amplificación. Sin embargo, todos estos métodos que tienen uno o varios de estos ciclos están en el alcance de la invención. Además del método de PCR, en una realización, la presente invención proporciona un método para secuenciar ADN usando la reacción de extensión de cebadores de la invención. En otra realización, la presente invención proporciona un método para preparar fragmentos de ADN rotulados para ensayos de hibridación usando la reacción de extensión de cebadores de la invención.

En el método de la presente invención, se puede utilizar una mezcla de reacción de extensión de cebadores convencional que, en general, contiene al menos la muestra de ADN, cebadores, una o múltiples enzimas capaces de sintetizar una cadena de ácido nucleico complementaria de la cadena de ácido nucleico original, como una ADN polimerasa termoestable, mezcla de dNTPs, un tampón y posiblemente codisolventes, y similares. La preparación de tales mezclas de reacción es bien conocida por un experto en la técnica.

El método de la presente invención comprende la desnaturalización de ADN en una etapa de desnaturalización, alineamiento de los cebadores en una etapa de alineamiento, extensión de los cebadores alineados en una etapa de extensión y, en el caso de PCR, repetición de las etapas durante una pluralidad de ciclos para obtener ADN amplificado. Además, estas etapas están incluidas en la mayoría de los métodos de PCR convencionales y son conocidas por los expertos en la técnica.

Es característico del método de la presente invención que, en la etapa de extensión después de que la temperatura se haya elevado de la temperatura de alineamiento progresivamente a la primer temperatura de extensión mínima, luego fluctúe gradualmente hasta una segunda o más temperaturas de extensión más altas y regrese a la primera temperatura de extensión más baja durante una pluralidad de ciclos para desestabilizar las estructuras secundarias en el ADN para permitir la extensión. En la práctica, sustancialmente no hay incubación a temperaturas constantes durante la extensión. Esta fluctuación de la temperatura de extensión se puede llevar a cabo usando dos o más temperaturas y tasas de calentamiento o enfriamiento. También se puede omitir la etapa separada de alineamiento.

La diferencia entre la temperatura de extensión más abajo y la temperatura de extensión más alta debería ser suficiente para mantener el alineamiento de la nueva cadena de ADN que se extiende y debería evitar que la plantilla de ADN se deposite en una estructura secundaria fija fuerte cuando la temperatura fluctúa hacia arriba y hacia abajo. Esto también puede depender de la tasa de fluctuación. Típicamente, la primera temperatura de extensión más baja puede estar en el intervalo de 70-90 °C. En una realización, la temperatura de extensión más baja está en el intervalo de 70-78 °C. En otra realización, la temperatura de extensión más baja está en el intervalo de 76-78 °C. La segunda temperatura de extensión más alta (más alta que la primera temperatura de extensión)

puede estar en el intervalo de 75-95 °C. En una realización, la temperatura de extensión más alta está en el intervalo de 80-83 °C. En general, la diferencia entre la primera y la segunda temperatura de extensión está en el intervalo de 1-20 °C, con preferencia, de 3-10 °C. También puede haber otras temperaturas bajas y altas usadas entre dichas temperaturas mínimas y máximas.

5 El ciclo de fluctuación entre las temperaturas de extensión más bajas y más altas se repite más de 3 veces en cada etapa de extensión. El equilibrio entre la tasa de calentamiento óptima y la cantidad de pulsos de extensión depende de las condiciones experimentales. En general, se usan 20-40 ciclos, pero según la capacidad del dispositivo de PCR, incluso son posibles cientos de ciclos.

10 En una realización, en la etapa de extensión, las tasas de calentamiento y de enfriamiento están en el intervalo de 0,01-10 °C/s, con preferencia, en el intervalo de 0,01-1 °C/s, como aproximadamente 0,1 °C/s. En una realización, esta tasa de calentamiento controlada se usa cuando se eleva la temperatura y el enfriamiento se lleva a cabo lo más rápido posible.

15 En una realización, la mezcla de reacción contiene codisolventes, tales como DMSO, glicerol o betaína. Al añadir un codisolvente, como betaína, se pueden usar menores temperaturas de extensión. De modo usual, se usaron aproximadamente 1,8 mol/l de betaína en los experimentos, pero la cantidad puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0-3 mol/l, en general, de 1-2 mol/l.

20 La presente invención también proporciona un termociclador programado para llevar a cabo el método de la presente invención. El termociclador puede ser cualquier termociclador apropiado que contiene los elementos esenciales de un dispositivo de PCR como se conoce en la técnica, como medios informáticos para generar las señales de control apropiadas para controlar los niveles de temperatura, rampas de tasa de cambio de la temperatura y la duración de las incubaciones en determinados niveles de temperatura. Los medios informáticos pueden estar integrados en el ciclador.

25 La presente invención también proporciona un medio de almacenamiento de datos legibles por ordenador que tiene un código de programa ejecutable por ordenador almacenado operativo para llevar a cabo el método de la presente invención. Este medio de almacenamiento de datos se puede usar para proporcionar el programa a los medios informáticos de un termociclador para operar el ciclador en un método de PCR.

30 En general, la presente invención proporciona métodos de diagnóstico de enfermedades o trastornos relacionados con ADN que contienen secuencias de repetición extendidas ricas en CG que forman estructuras secundarias en donde el método de PCR de la invención se usa para amplificar dicho ADN para fines diagnósticos. En una realización, el método diagnóstico es análisis electroforético de fragmentos. Además, se pueden usar otros métodos para preparar diagnosis u otros métodos no diagnósticos que implican la amplificación del ADN, como métodos de secuenciación, PCR cuantitativa (qPCR), PCR por transcripción inversa (RT-PCR), o similares. En una realización, dicha PCR usa un ADN complementario como plantilla. Un experto en la técnica conoce estos métodos y puede aplicar el método de la invención a ello.

35 En una realización, la presente invención también proporciona un método para diagnosticar epilepsia mioclónica progresiva 1 (EPM1). En una realización, el método de PCR de la invención se usa para amplificar el ADN específico de EPM1 para permitir el análisis de una cantidad de unidades de repetición en dicho ADN para hacer una diagnosis.

40 En otra realización, la presente invención también proporciona un método para diagnosticar síndrome de X frágil. En una realización, el método de PCR de la invención se usa para amplificar el ADN específico del síndrome de X frágil para permitir el análisis de la cantidad de unidades de repetición en dicho ADN para hacer una diagnosis.

En otra realización más, la presente invención también proporciona un método para diagnosticar distrofia miotónica. En una realización, el método de PCR de la invención se usa para amplificar el ADN específico de la distrofia miotónica para permitir el análisis de la cantidad de unidades de repetición en dicho ADN para hacer una diagnosis.

45 EJEMPLOS

Diseño de PCR

50 Es importante no posicionar los cebadores usados en la presente invención demasiado cerca de la repetición real. De ser posible, los cebadores se deberían ubicar de modo que algunas extensiones ricas en CG también estén incluidas en el alelo corto de tipo salvaje para equilibrar las eficacias de amplificación. Los cebadores son más largos que lo usual y están ubicados en segmentos relativamente ricos en CG, lo que da como resultado condiciones en las que los cebadores se alinean a una temperatura relativamente alta, de modo que la ADN polimerasa iniciará la extensión de los cebadores de inmediato. En una realización, el aditivo de PCR betaína se incluye en la PCR.

Programa de PCR de etapa de calentamiento simple

Se halló que las repeticiones relativamente cortas ricas en CG (< 1 kb) se podían amplificar con una etapa de extensión de calentamiento muy lenta simple. La temperatura de extensión se fijó para elevarse de forma gradual y muy lentamente desde la temperatura de alineamiento hasta 80 °C.

5 En la presencia de 1,8 M de betaína, se podía lograr la extensión completa de los alelos de EPM1 tanto cortos de tipo salvaje como expandidos con 80 repeticiones de dodecámeros durante una etapa de calentamiento progresiva lenta simple. En tal concentración elevada de betaína, el empuje con calor durante la extensión aparentemente fue capaz de abrir todas las estructuras secundarias que habían evitado la amplificación convencional por PCR de los alelos de expansión (Figura 1).

10 Cuando se usaron similares condiciones de PCR para la amplificación de largas repeticiones de DM1, se observaron tartamudeo y deslizamiento de la polimerasa, lo que dio como resultado manchas en los productos de amplificación en geles de agarosa. No se pudieron amplificar expansiones largas de DM1 (Figura 2).

Programa de PCR de Heat-Push de la presente invención

15 A diferencia de PCR convencionales, donde la temperatura de extensión queda constante durante toda la etapa de extensión, en el método de PCR de Heat-Push de la presente invención, la temperatura de extensión fluctúa de forma continua. En un experimento no limitativo (ver la Figura 9), la etapa de desnaturalización programada era primero de 45 seg a 95 °C, luego 98 °C durante 10 seg. La etapa de alineamiento era de 68 °C durante 30 seg, luego la extensión se inició por calentamiento hasta 78 °C seguido por múltiples etapas de calentamiento y enfriamiento progresivas. Los pulsos de empuje de calor comprendían una lenta elevación (aproximadamente 0,1 °C/s.) de 78 °C a 83 °C y luego una rápida caída a 78 °C. Estos pulsos de calentamiento se repitieron 21 veces
20 durante un único ciclo de PCR. La cantidad de pulsos de empuje de calor estaba limitada por la memoria del termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems), lo que restringe la cantidad de etapas de programa programables para un ciclo.

25 La desestabilización de las estructuras secundarias de ADN por pulsación continua de la temperatura de extensión hace posible extenderse sobre las repeticiones largas ricas en CG. Aparentemente, una temperatura inferior periódica conservó un suficiente alineamiento del fragmento extendido con la plantilla, mientras que el pulso de calentamiento desestabilizó las estructuras secundarias de la cadena de la plantilla, lo que permitió la extensión con tartamudeo despreciable. La repetición de esta extensión fluctuante más de 20 veces durante una etapa de extensión de PCR simple dio como resultado una eficacia de extensión tan alta que, en la muestra que contiene un alelo corto de tipo salvaje y un alelo expandido que contiene aproximadamente 1400 repeticiones de CTG, ambos
30 alelos se amplificaron con eficacias de amplificación casi iguales. Como se muestra en el resultado de Southern blotting, la muestra de ADN no amplificada contenía múltiples fragmentos con longitudes de expansión de CTG ligeramente diferentes y estos fragmentos se amplificaron en un perfil muy similar cuando se usó el método de la invención (Figura 3).

35 La diferencia de las eficacias de amplificación entre la PCR de la etapa de calentamiento simple (optimizada lo más posible) y el método de Heat-Push se muestra en la Figura 4. Se analizaron muestras (40 ng) con expansiones de CTG de DM1 pequeñas, medias o grandes. Los productos de amplificación de la PCR de la etapa de calentamiento simple mostraron productos muy similares a partir de la expansión pequeña. Se observa pérdida de eficacia de amplificación, vista como amplificación preferencial del alelo de tipo salvaje y manchas y falta de bandas puntiagudas al analizar la muestra con expansión de tamaño medio. Las manchas se vuelven un problema de
40 importancia si la cantidad de plantillas es mayor (Figura 6) o si la expansión es más larga. La muestra con DM1 congénita grande se diagnosticó mal ya que la PCR de la repetición no tuvo éxito. El método de Heat-Push de la presente invención, por otro lado, mostró un equilibrio significativamente mejorado en la amplificación de expansiones cortas y largas. El producto de amplificación de DM1 adulta de tamaño medio muestra heterogeneidad de tejido, pero se ven bandas distintas. Como se observa en las Figuras 3 y 4, se obtiene un producto de PCR único
45 de casi 5 kb de la muestra de DM1 congénita estudiada.

Las muestras de ADN previamente analizadas respecto de la longitud de la expansión de la repetición de DM1 se analizaron por medio del método de PCR de la presente invención. El tamaño pronosticado de la PCR de Heat-Push se calculó y se mostró en un recuadro debajo de cada producto (Figura 5). En la fase de validación del ensayo, se analizaron 78 muestras y se genotiparon correctamente.

50 El éxito de la amplificación de un alelo expandido depende de la calidad y la cantidad de la plantilla de ADN. Si se usa demasiada plantilla de ADN, el alelo expandido se amplificará pobremente (Figura 6).

El método de la presente invención también se podría usar para el análisis de la expansión de CCG de X frágil, que se considera como una de las estructuras de repetición más difíciles de amplificar por PCR (Figura 7).

55 Las muestras de X frágil tienen una mayor variabilidad en los tamaños de fragmento y la repetición de CCG es muy propensa a las estructuras secundarias y tiene una temperatura de fusión muy alta. Se obtuvieron distintas bandas de hasta casi 3 kb de tamaño a partir de muestras de hombres con sólo un cromosoma X y la presencia de una repetición no expandida en una muestra de una mujer no evitó la amplificación de fragmentos expandidos (Figura 8).

El mosaiquismo, la heterogeneidad de la longitud de expansión y la presencia de alelos cortos de tipo salvaje se hallan todos en las muestras tanto de DM1 como de X frágil. El uso de PCR de Heat-Push mejoró significativamente el equilibrio de amplificación entre las repeticiones cortas y largas.

REIVINDICACIONES

1. Un método de reacción de extensión de cebadores para la amplificación de ADN independiente de la estructura que comprende
 - preparar una mezcla de reacción que contiene la muestra de ADN, cebadores, una o múltiples enzimas capaces de sintetizar una cadena de ácido nucleico complementaria de la cadena de ácido nucleico original, como una mezcla de ADN polimerasa termoestable de dNTP y un tampón,
 - desnaturalizar el ADN en una etapa de desnaturalización,
 - alinear los cebadores en una etapa de alineamiento,
 - extender los cebadores alineados en una etapa de extensión para obtener ADN amplificado,
- 5 10 caracterizado porque en la etapa de extensión, la temperatura primero se eleva de la temperatura de alineamiento a la primer temperatura de extensión en el intervalo de 70-90 °C, luego fluctúa hasta la segunda temperatura de extensión mayor en el intervalo de 75-95 °C y vuelve a la primera temperatura de extensión menor para una pluralidad de ciclos para desestabilizar las estructuras secundarias en el ADN para permitir la extensión.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque las etapas se repiten para una pluralidad de ciclos.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la primera temperatura de extensión está en el intervalo de 70-78 °C, como 76-78 °C.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la segunda temperatura de extensión está en el intervalo de 80-83 °C.
- 20 5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el ciclo de fluctuación entre la primera y la segunda temperatura de extensión se repite al menos 3 veces, con preferencia, 20-30 veces, pero incluso cientos de veces en cada etapa de extensión.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque en la etapa de extensión, la tasa de fluctuación de la temperatura está en el intervalo de 0,01-10 °C/s, con preferencia, 0,01-1 °C/s,
- 25 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el ADN contiene repeticiones ricas en GC, CTG o GCC.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la mezcla de reacción contiene codisolventes, tales como DMSO, glicerol o betaina.
- 30 9. Un método de reacción en cadena de polimerasa, caracterizado porque se usa la reacción de extensión de cebadores de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para amplificar ADN.
10. El método de reacción en cadena de polimerasa de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque es un método de PCR cuantitativo o PCR de transcripción inversa.
11. Un método para diagnosticar enfermedades o trastornos relacionados con el ADN que contiene secuencias de repetición que forman estructuras secundarias, caracterizado porque el método de reacción en cadena de polimerasa de acuerdo con la reivindicación 9 se usa para amplificar dicho ADN para fines de diagnóstico.
- 35 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado porque la enfermedad es síndrome de X frágil.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado porque la enfermedad es distrofia miotónica.
14. Un método de secuenciación de ADN, caracterizado porque se usa el método de reacción de extensión de cebadores de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en la secuenciación.
- 40 15. Un método para preparar fragmentos de ADN rotulados para ensayos de hibridación, caracterizado porque se usa la reacción de PCR de acuerdo con la reivindicación 9 para amplificar ADN.
16. Un termociclador que comprende un código de programa ejecutable por ordenador almacenado operativo para realizar el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15.
- 45 17. Un medio de almacenamiento de datos legibles por ordenador que tiene un código de programa ejecutable por ordenador almacenado operativo para realizar el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15.

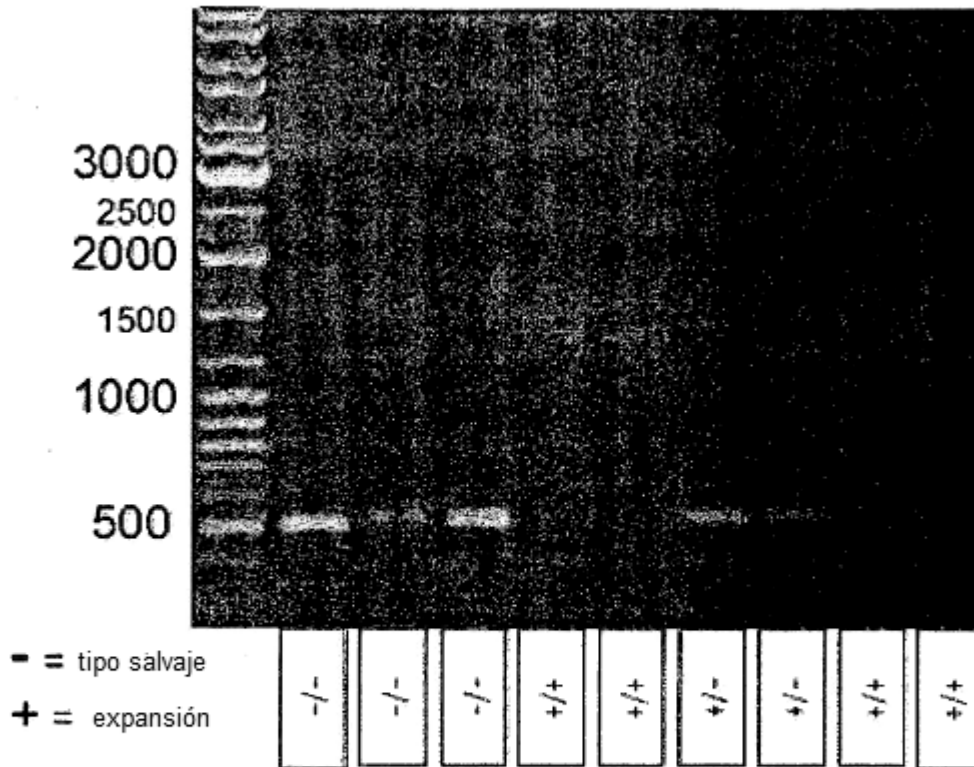
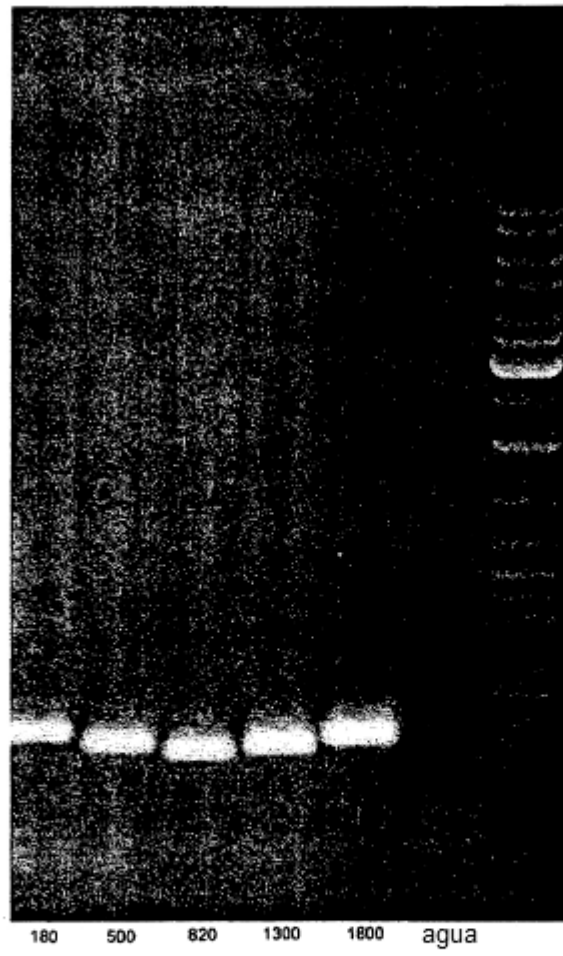


Fig 1



Muestras de DM1 con 180-1800
unidades de repetición CTG

Fig 2

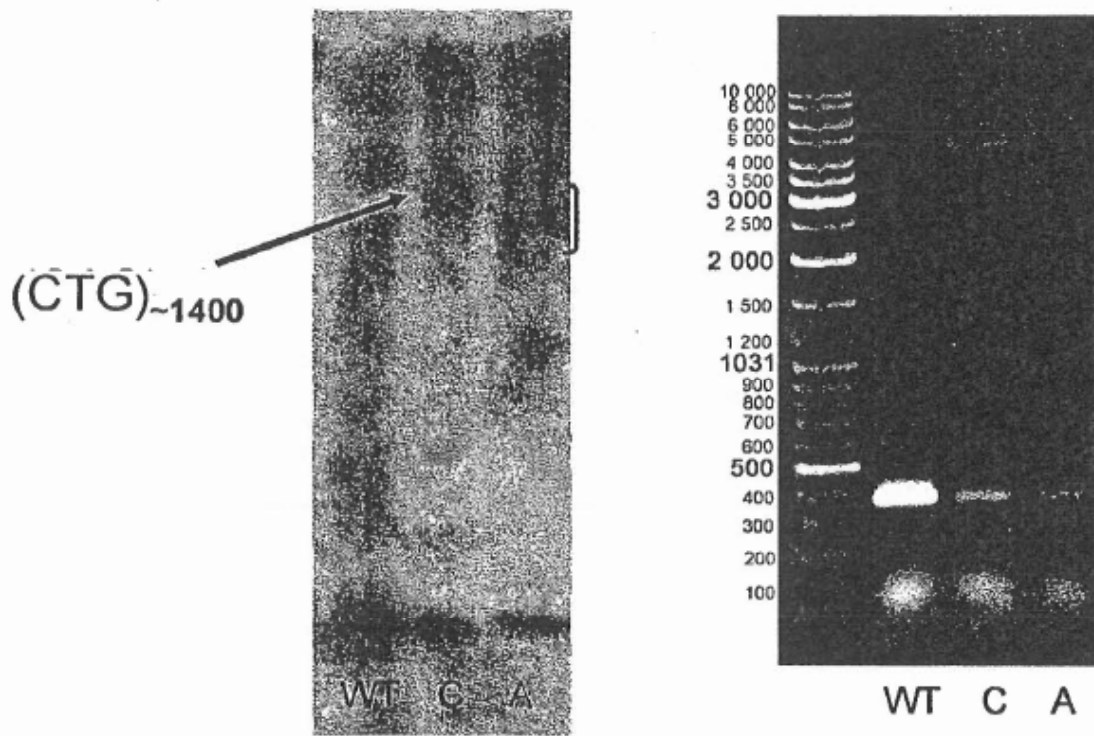
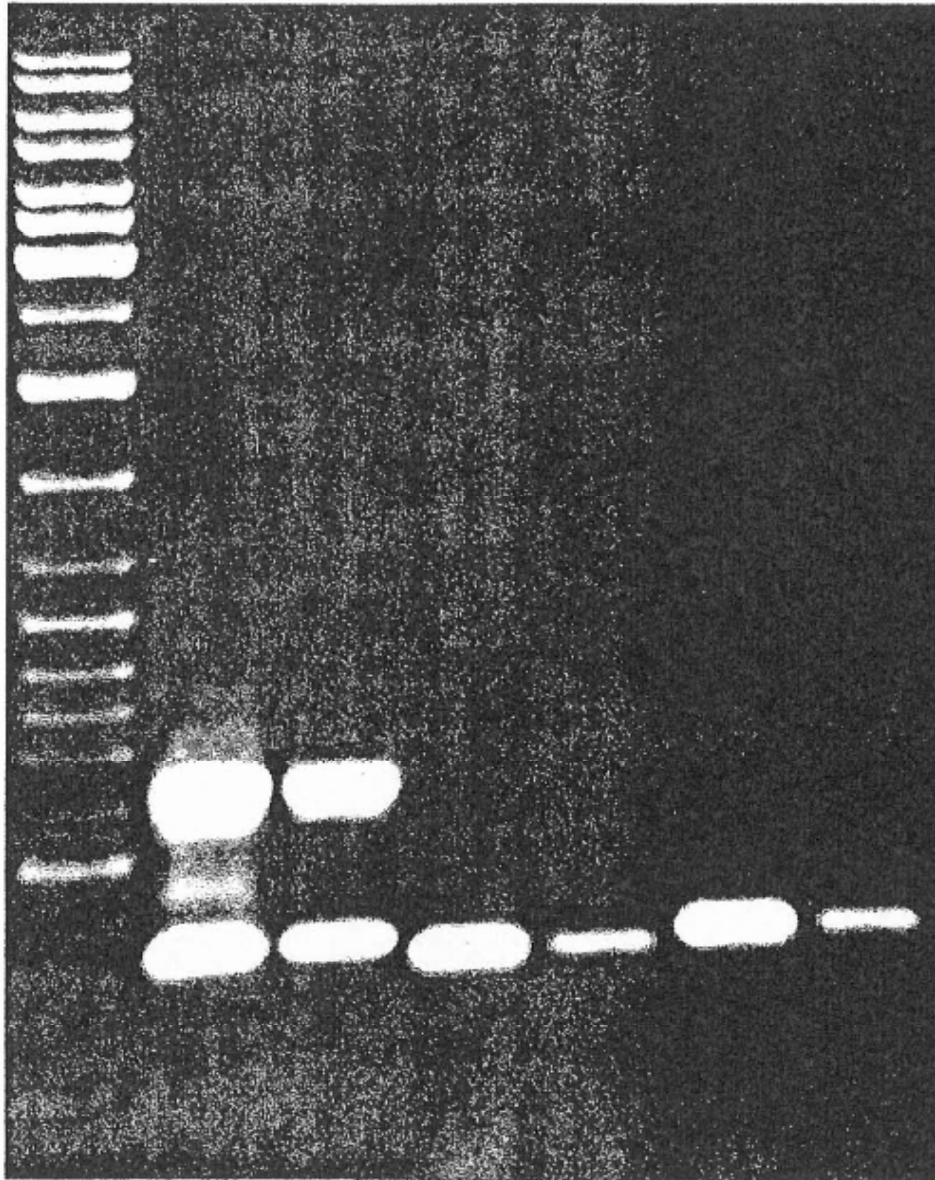


Fig 3



~90
A

~800
A

~1400
C

Fig 4

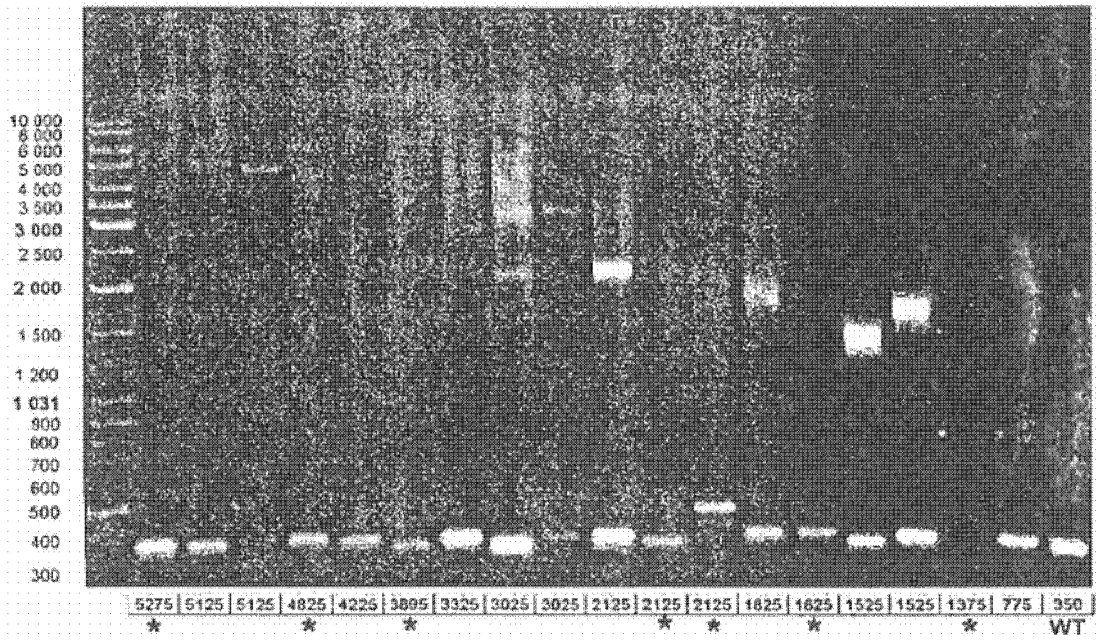


Fig 5

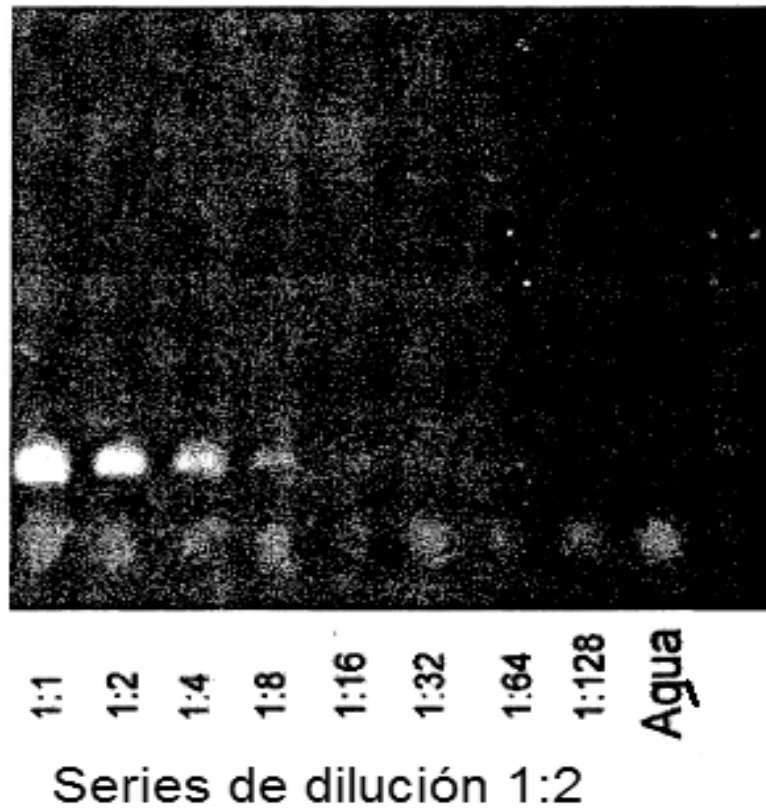


Fig 6

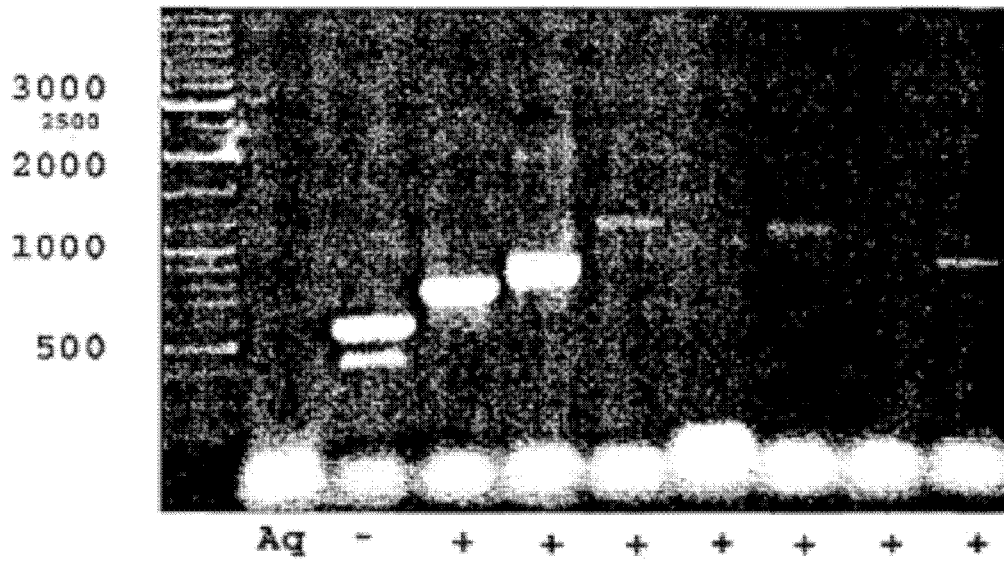


Fig 7

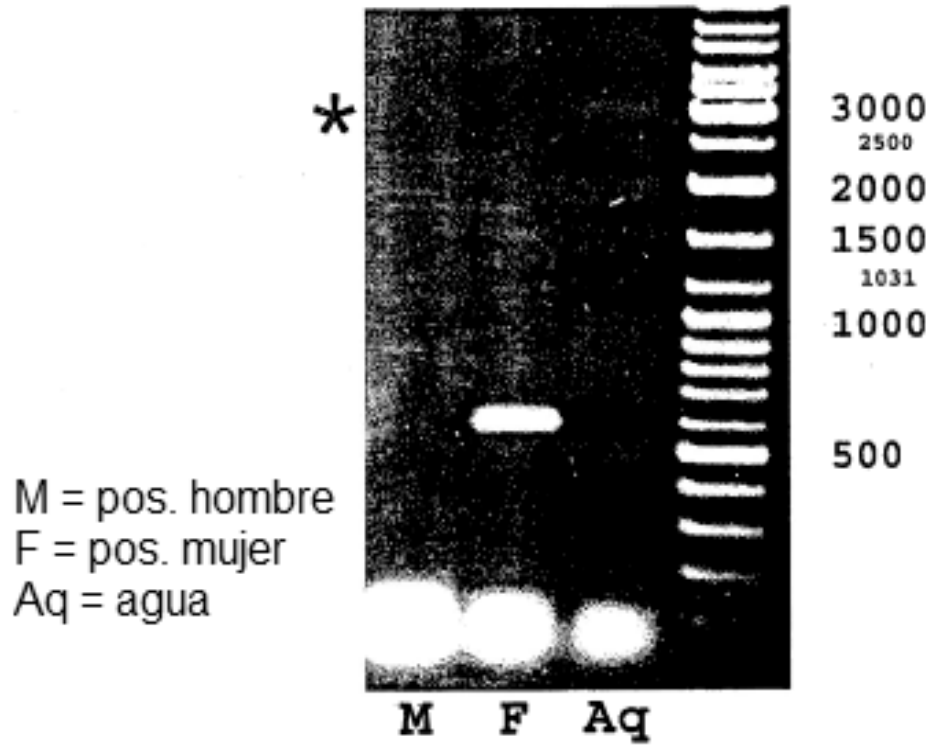


Fig 8

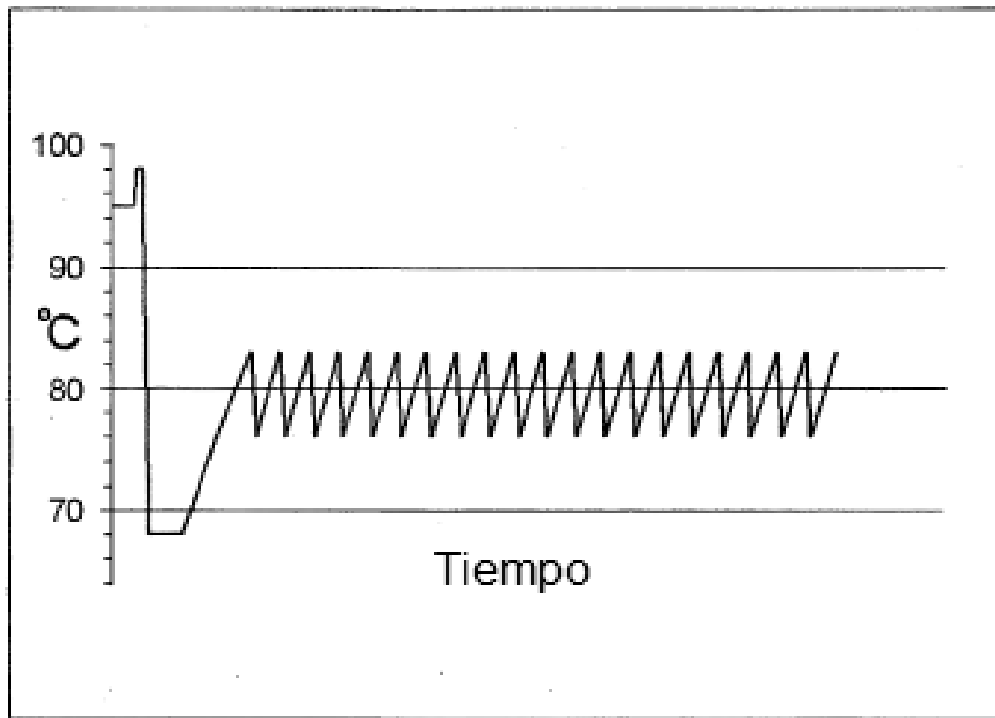


Fig 9

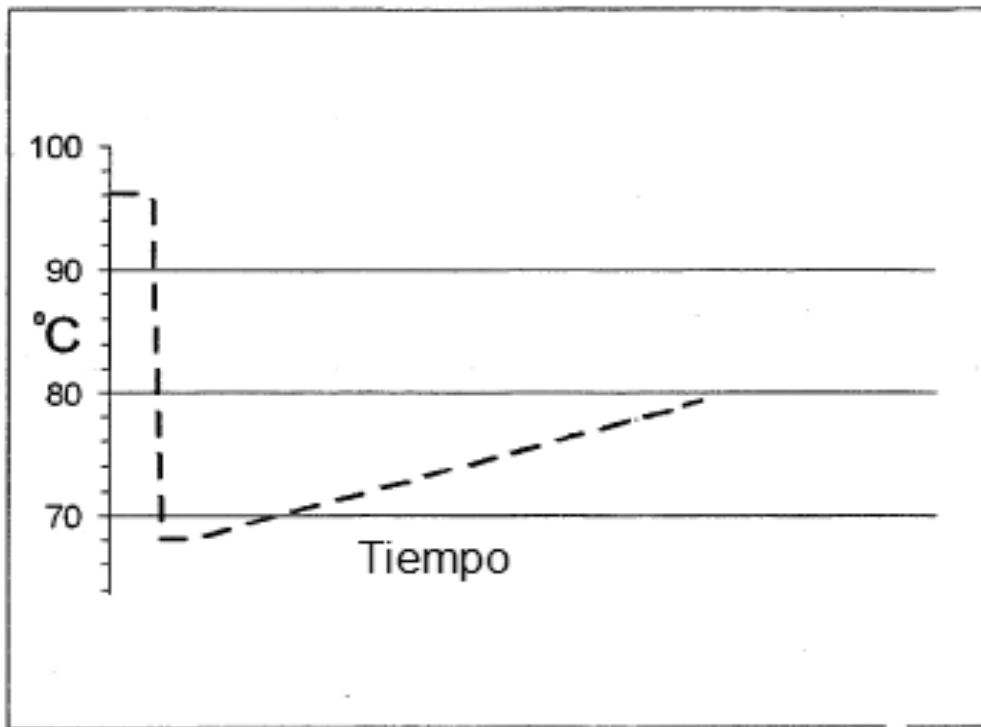


Fig 10