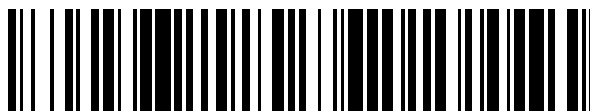


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 419**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 19/00 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2000 E 04002084 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 1431303**

54 Título: **Composiciones para la amplificación isotérmica lineal de secuencias de polinucleótidos**

30 Prioridad:

13.09.1999 US 153604 P

12.01.2000 US 175780 P

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

12.03.2014

73 Titular/es:

NUGEN TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)

201 Industrial Road

San Carlos, CA 94070, US

72 Inventor/es:

KURN, NURITH

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 447 419 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

Composiciones para la amplificación isotérmica lineal de secuencias de polinucleótidos

Campo técnico

5 La invención se refiere al campo de la amplificación de polinucleótidos. Más particularmente, la invención proporciona composiciones y kits para amplificar (es decir, realizar múltiples copias) secuencias de polinucleótidos diana que emplean un único cebador compuesto de ARN/ADN, implicando opcionalmente la amplificación una transcripción.

Antecedentes

10 En los últimos años, el desarrollo de métodos para amplificar ácidos nucleicos y detectar los productos de la amplificación han fomentado la detección, la identificación, la cuantificación y los análisis de la secuencia de secuencias de ácidos nucleicos.

15 El análisis de ácidos nucleicos es útil para detectar e identificar agentes patógenos, detectar una alteración génica que conduce a fenotipos definidos, diagnosticar enfermedades genéticas o la susceptibilidad de una enfermedad, determinar la expresión génica en desarrollo, una enfermedad y como respuesta a estímulos definidos, así como para los diferentes proyectos sobre el genoma. Otras aplicaciones del método de amplificación de ácidos nucleicos, son la detección de células poco comunes, la detección de agentes patógenos y la detección de una expresión génica alterada en el cáncer, y similares. La amplificación de ácidos nucleicos es potencialmente útil para el análisis cualitativo, tal como la detección de la presencia de secuencias de ácidos nucleicos definidas y para la cuantificación de secuencias génicas definidas. Esta última es útil para determinar y cuantificar secuencias patógenas, así como para determinar la multiplicación o la delección génica, que se encuentra frecuentemente en la transformación celular de un tipo de célula normal a maligna.

20 La detección de alteraciones de la secuencia en una secuencia de ácido nucleico, es importante para la detección de genotipos mutantes, que es apropiada para el análisis genético, para la detección de mutaciones que conducen a la resistencia a fármacos, para la farmacogenómica, etc. Diversos métodos para detectar mutaciones específicas incluyen la extensión de un cebador específico de alelo, la ligación de una sonda específica de alelo y la hibridación de una sonda diferencial. Véanse, por ejemplo, los documentos de patentes de EE.UU. nº 5.888.819; 6.004.744; 5.882.867; 5.710.028; 6.027.889; 6.004.745; y WO US88/02746. Los métodos para detectar la presencia de alteraciones de la secuencia en una secuencia definida de ácidos nucleicos, sin un conocimiento específico de la alteración, también están descritos. Algunos de estos métodos se basan en la detección de emparejamientos incorrectos formados por la hibridación de un producto de amplificación del ensayo con un producto de amplificación de referencia. La presencia de emparejamientos incorrectos en tales heterohíbridos se puede detectar empleando proteínas que se unen de forma específica al emparejamiento incorrecto o mediante escisión química o enzimática del emparejamiento incorrecto. Un método para detectar una alteración de la secuencia que se basa en la inhibición de la migración ramificada en estructuras cruciformes de ADN de cuatro hebras, ha sido descrito recientemente. Véase, por ejemplo Lishanski, A. y col. *Nucleic Acids Res* 28(9); E42 (2000). Otros métodos se basan en la detección de configuraciones específicas de productos de la amplificación monocatenarios. La estructura secundaria de un ADN o ARN monocatenario depende de la secuencia específica. Alteraciones de la secuencia en una diana de ácido nucleico para ensayo, en relación con una secuencia de referencia, conducen a una configuración alterada. La configuración alterada de un producto de la amplificación monocatenario se puede detectar por un cambio en la movilidad electroforética del producto de la amplificación del ensayo, comparada con la de un producto de amplificación de referencia. El polimorfismo en la configuración monocatenaria, SSCP, se emplea habitualmente para detectar alteraciones de la secuencia. Véase, por ejemplo, Orita M. y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(8):2766-70 (1989); Suzuki, Y. y col. *Oncogene* 5(7):1037-43 (1990); y el documento de patente de EE.UU. nº 5.871.697. Este método también se emplea en la identificación microbiana que se basa en los cambios definidos en una secuencia específica de ácido nucleico, en especies o cepas diferentes. La detección de mutaciones que emplea los métodos de SSCP, emplea principalmente productos de la amplificación de ADN, sin embargo, también se han descrito métodos de SSCP con ARN. La configuración dependiente de la secuencia de un ARN monocatenario está bien documentada y se mostró que conduce a un patrón definido de movilidad electroforética. Véase, por ejemplo, Sarkar y col. *Nucleic Acid Research* 20(4):871-878 (1992) y Gasparini y col. *Hum. Genet.* 97:492-495 (1996).

50 Aunque la detección de la presencia de una secuencia definida de ácido nucleico y el análisis de su secuencia, se pueden realizar mediante hibridación con sonda, el método carece generalmente de sensibilidad cuando en la muestra del ensayo están presentes pequeñas cantidades de la secuencia del ácido nucleico, tal y como unas pocas moléculas. Una solución para este obstáculo fue el desarrollo de métodos para generar copias múltiples de la secuencia de ácido nucleico definida, que eran adecuadas para un análisis posterior. Los métodos para generar copias múltiples de una secuencia específica de ácido nucleico se definen generalmente como métodos de amplificación de la diana. Otros métodos para incrementar la sensibilidad de la detección de hibridación se basan en la generación de productos múltiples a partir de la sonda hibridada, o las sondas, por ejemplo, escisión de la sonda hibridada para formar múltiples productos o la ligación de sondas adyacentes para formar un solo producto dependiente de hibridación. De forma similar, una sensibilidad incrementada de la reacción de hibridación se consiguió por métodos de amplificación de señales generadas por el suceso de hibridación, tal como el método basado en la hibri-

dación de sondas de ADN ramificado.

Existen muchas variaciones de la amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, amplificación exponencial, amplificación lineal ligada, amplificación basada en la ligación y amplificación basada en la transcripción. Un ejemplo de método de amplificación exponencial de ácidos nucleicos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se ha descrito en numerosas publicaciones. Véase, por ejemplo, Mullis y col. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263-273 (1986); Mullis K., documento EP 201.184; Mullis y col., documento de patente de EE.UU. n° 4.582.788; Erlich y col., documentos EP 50.424, EP 84.796, EP 258.017, EP 237.362; y Saiki R. y col., documento de patente de EE.UU. n° 4.683.194. La amplificación lineal ligada está descrita por Wallace y col. en el documento de patente de EE.UU. n° 6.027.923. Ejemplos de amplificación basada en la ligación son la reacción de amplificación y ligación (LAR), descrita por Wu y col. en *Genomics* 4:560 (1989) y la reacción en cadena de la ligasa, descrita en el documento de solicitud EP n° 0320308B1. En los documentos de patentes de EE.UU. n° 5.766.849 y 5.654.142, se describen diversos métodos de amplificación basada en la transcripción; y también Kwoh y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:1173 (1989) y Ginergeras y col. en el documento WO 88/10315.

El método de amplificación de una diana, empleado más generalmente es la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, que se basa en múltiples ciclos de desnaturalización, hibridación de dos cebadores de oligonucleótidos, cada uno para una cadena opuesta de las cadenas dianas, y la extensión del cebador mediante una polimerasa de nucleótidos para producir copias múltiples bicatenarias de la secuencia diana. Se han descrito muchas variaciones de la PCR y el método se está utilizando para amplificar secuencias de ácido nucleico de ADN o de ARN, para secuenciación, para análisis de mutaciones y otros. Los métodos basados en la termociclación que emplean un cebador aislado, también se han descrito. Véanse, por ejemplo, los documentos de patentes de EE.UU. n° 5.508.178; 5.595.891; 5.683.879; 5.130.238 y 5.679.512. El cebador puede ser un cebador quimérico de ADN/ARN, tal y como se describe en el documento de patente de EE.UU. n° 5.744.308. Otros métodos que dependen de la ciclación térmica son la reacción en cadena de la ligasa (LCR) y la reacción en cadena relacionada con la reparación (RCR, del inglés "related repair chain reaction").

La amplificación de ácidos nucleicos dianas se puede realizar mediante ciclos múltiples de incubaciones a diversas temperaturas, es decir, ciclación térmica, o a una sola temperatura (un procedimiento isotérmico). El descubrimiento de enzimas termoestables que modifican ácidos nucleicos, ha contribuido a los veloces avances en la tecnología de la amplificación de ácidos nucleicos. Véase, Saiki y col. *Science* 239:487 (1988). Las enzimas termoestables que modifican ácidos nucleicos, tales como polimerasas de ADN y de ARN, ligasas, nucleasas y similares, se emplean en ambos métodos dependiendo de los métodos de amplificación con ciclación térmica e isotérmica. Los métodos isotérmicos, tal como la amplificación con desplazamiento de hebra (SDA), está descrito por Fraiser y col. en el documento de patente de EE.UU. n° 5.648.211; Cleuziat y col. en el documento de patente de EE.UU. n° 5.824.517; y Walker y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:392-396 (1992). Otros métodos isotérmicos de amplificación de la diana son los métodos de amplificación basados en la transcripción, en los que una secuencia promotora de polimerasa de ARN se incorpora en los productos de extensión del cebador, en un estado temprano de la amplificación (documento WO 89/01050) y una secuencia diana adicional o una secuencia complementaria de la diana, se amplifica mediante etapas de transcripción y digestión de una hebra de ARN en un producto intermedio híbrido de ADN/ARN. Véanse, por ejemplo, los documentos de patentes de EE.UU. n° 5.169.766 y 4.786.600. Estos métodos incluyen una amplificación mediada por transcripción (TMA), replicación autosostenida de la secuencia (3SR), amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) y variaciones de las mismas. Véanse, por ejemplo, Guatelli y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878 (1990); documentos de patentes de EE.UU. n° 5.766.849 (TMA); y 5.654.142 (NASBA). Otros métodos de amplificación emplean oligonucleótidos conmutadores del molde (TSOs) y oligonucleótidos bloqueantes. Por ejemplo, la amplificación con conmutación del molde, en la que se emplea un cebador de ADN quimérico, está descrita en el documento de patente de EE.UU. n° 5.679.512 y por Patel y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2969-2974 (1996) y los oligonucleótidos bloqueantes están descritos por Laney y col. en el documento de patente de EE.UU. n° 5.679.512.

Los métodos de amplificación isotérmica de la diana no requieren un termociclador y se adaptan de este modo más fácilmente a la plataforma de instrumentación común. Sin embargo, los métodos de amplificación isotérmica de la diana, descritos anteriormente tienen diversos inconvenientes. La amplificación según los métodos SDA, requiere la presencia de sitios para enzimas de restricción definidas, lo que limita su aplicabilidad. Los métodos de amplificación basados en la transcripción, tales como la NASBA y TMA, por el otro lado, están limitados por la necesidad de incorporar la secuencia promotora de la polimerasa en el producto de amplificación mediante un cebador, un procedimiento propenso a dar como resultado una amplificación no específica. Además, el mecanismo de amplificación de una diana de ADN mediante estos métodos de amplificación basados en la transcripción, no está bien establecido.

Otro inconveniente de los métodos actuales de amplificación son las muestras del ensayo potencialmente contaminadas por productos de la amplificación de reacciones de amplificación anteriores, dando como resultado una amplificación no específica de la diana en las muestras. Este inconveniente es un problema bien conocido, que es el resultado del impacto de la tecnología de amplificación de dianas y la formación de productos de la amplificación, que son sustratos para la amplificación. Se han descrito diversos medios para descontaminar muestras de ensayo al final de la reacción de amplificación o antes del inicio de la amplificación de la diana. Además, también se han descrito métodos para contener la solución del ensayo mediante medios físicos. Todas estas soluciones son incómodas y contribuyen a la complejidad del ensayo con ácidos nucleicos en el marco del laboratorio común.

Además, los métodos de amplificación que emplean un procedimiento de termociclación tienen el inconveniente añadido de largos tiempos de latencia requeridos para que el bloque de termociclación alcance la temperatura “di-ana” para cada ciclo. Consecuentemente, las reacciones de amplificación realizadas empleando procedimientos de termociclación, requieren un tiempo significativamente largo para conseguir completarse.

- 5 El documento de patente de EE.UU. nº 5.824.517 describe cebadores compuestos con una porción de ARN 5' y una porción de ADN 3'.

Por tanto, existe una necesidad de métodos mejorados de amplificación de ácidos nucleicos que superen estos inconvenientes. La invención proporcionada en esta memoria, satisface esta necesidad y proporciona beneficios adicionales.

10 **Descripción de la invención**

La invención proporciona kits y composiciones para la amplificación de polinucleótidos, así como aplicaciones de los métodos de amplificación.

- 15 Por tanto, en una realización, la invención proporciona un kit para amplificar una secuencia de polinucleótidos que comprende un cebador compuesto, en donde el cebador compuesto comprende una porción de ARN y una porción de ADN 3', y en donde la porción de ARN es totalmente complementaria a la secuencia de polinucleótidos y tiene al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 3, 4 o 5 nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 10, 15, 20, 25 o 30 nucleótidos y la porción de ADN 3' es complementaria al menos en un 95% a la secuencia de polinucleótidos y tiene al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 3, 5, 7 o 10 nucleótidos con un límite superior de aproximadamente 10, 12, 15 o 18 nucleótidos.

- 20 En una realización preferida, la porción de ARN consiste en cualquiera de 3 a 30 nucleótidos, 5 a 30 nucleótidos, 3 a 25 nucleótidos, 5 a 25 nucleótidos, 3 a 20 nucleótidos, 5 a 20 nucleótidos, 3 a 18 nucleótidos, 3 a 15 nucleótidos, 5 a 18 nucleótidos, 5 a 15 nucleótidos, 3 a 12 nucleótidos o 5 a 12 nucleótidos.

- 25 Preferentemente, la porción de ADN 3' consiste en cualquiera de 3 a 18 nucleótidos, 3 a 15 nucleótidos, 3 a 12 nucleótidos, 5 a 18 nucleótidos, 5 a 15 nucleótidos, 5 a 12 nucleótidos, 7 a 18 nucleótidos, 7 a 15 nucleótidos, 7 a 12 nucleótidos, 10 a 18 nucleótidos, 10 a 15 nucleótidos o 10 a 12 nucleótidos.

- 30 En una realización relacionada, el cebador compuesto comprende una porción de ARN 5' y una porción de ADN 3', y en donde la porción de ARN 5' tiene al menos aproximadamente cualquiera entre 3, 5, 7, 8 o 10 nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 15, 17, 18 o 20 nucleótidos y la porción de ADN 3' tiene al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 3, 5, 7 o 10 nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 10, 12, 15 o 18 nucleótidos.

Preferiblemente, dicha porción de ARN 5' es adyacente a dicha porción de ADN 3'.

Preferiblemente, la porción de ARN consiste en cualquiera de 3 a 20 nucleótidos, 3 a 18 nucleótidos, 3 a 15 nucleótidos, 5 a 20 nucleótidos, 5 a 18 nucleótidos, 5 a 15 nucleótidos, 10 a 20 nucleótidos, 10 a 18 nucleótidos, 10 a 15 nucleótidos, 7 a 20 nucleótidos, 7 a 18 nucleótidos o 7 a 15 nucleótidos.

- 35 Preferiblemente, la porción de ADN consiste en cualquiera de 3 a 18 nucleótidos, 3 a 15 nucleótidos, 3 a 12 nucleótidos, 3 a 10 nucleótidos, 5 a 18 nucleótidos, 5 a 15 nucleótidos, 5 a 12 nucleótidos, 5 a 10 nucleótidos, 7 a 18 nucleótidos, 7 a 15 nucleótidos, 7 a 12 nucleótidos, 7 a 10 nucleótidos, 10 a 18 nucleótidos, 10 a 15 nucleótidos o 10 a 12 nucleótidos.

En una realización relacionada, el cebador compuesto consiste en la porción de ARN y la porción de ADN.

- 40 En una realización relacionada, un kit comprende adicionalmente una enzima que escinde el ARN a partir de un híbrido de ARN/ADN.

Preferiblemente, la enzima que escinde el ARN a partir del híbrido de ARN/ADN es ARNasaH.

En una realización relacionada, el kit comprende adicionalmente una polimerasa de ADN.

- 45 En una realización relacionada, la porción de ARN es totalmente complementaria a la secuencia de tipo silvestre o a una variante de secuencia de la secuencia de polinucleótidos.

Preferiblemente, la variante de secuencia de la secuencia de polinucleótidos comprende un solo polimorfismo de nucleótidos.

En una realización preferida, la invención proporciona una composición que comprende un cebador compuesto tal como se ha definido de acuerdo con la invención.

- 50 En una realización relacionada, la composición comprende adicionalmente una enzima que escinde el ARN a partir

de un híbrido de ARN/ADN.

Preferiblemente, la enzima que escinde el ARN a partir del híbrido de ARN/ADN es ARNasaH.

Preferiblemente, la composición comprende adicionalmente una polimerasa de ADN.

5 En una realización preferida, la invención proporciona un kit para amplificar una secuencia de polinucleótidos que comprende un cebador compuesto, en donde el cebador compuesto comprende una porción de ARN y una porción de ADN 3', y en donde la porción de ARN comprende una secuencia complementaria a una variante de secuencia de la secuencia de polinucleótidos y tiene al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 3, 4 o 5 nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 10, 15, 20, 25 o 30 nucleótidos y la porción de ADN 3' tiene al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 3, 5, 7 o 10 nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 10, 12, 15 o 18 nucleótidos; y una enzima que escinde el ARN a partir de un híbrido de ARN/ADN.

Preferiblemente, la variante de secuencia de la secuencia de polinucleótidos comprende un solo polimorfismo de nucleótidos.

Breve descripción de los dibujos

15 La FIGURA 1A-C es una representación esquemática de un procedimiento de amplificación isotérmica lineal con un solo cebador compuesto.

La FIGURA 2A-2C es una representación esquemática de un procedimiento de amplificación lineal e isotérmica mejorada de ácidos nucleicos, con un solo cebador que implica transcripción, empleando una secuencia de oligonucleótidos conmutadores del molde.

20 La FIGURA 3A-3D es una representación esquemática de un procedimiento de amplificación lineal e isotérmica mejorada de ácidos nucleicos, con un solo cebador compuesto que implica transcripción, empleando un componente bloqueador de secuencia.

La FIGURA 4 es una representación esquemática de la detección de una mutación en una secuencia molde que emplea el procedimiento de amplificación lineal e isotérmica con un solo cebador. "X" significa una mutación en el ADN diana en un sitio complementario a la porción de ARN del cebador compuesto. Tal y como se muestra, la amplificación del ácido nucleico diana está bloqueada cuando está presente una mutación.

25 La FIGURA 5 describe un gel PAGE teñido con bromuro de etidio de los productos de la amplificación lineal e isotérmica de una diana de ADN sintético.

La FIGURA 6 describe un autorradiograma de análisis por PAGE de la hibridación de los productos de amplificación de ADN con una sonda específica.

30 La FIGURA 7 describe un gel PAGE teñido con bromuro de etidio en el que se compara la eficacia de los productos de la transcripción de ARN_{mc}, generados a partir de la extensión solapada.

La FIGURA 8 describe un gel PAGE teñido con bromuro de etidio en el que se compara la amplificación lineal e isotérmica con y sin PTO bloqueado en 3'.

35 La FIGURA 9 describe un autorradiograma de una sonda hibridada con productos de la amplificación, generados mediante amplificación lineal e isotérmica de una secuencia del gen J, procedente del ADN genómico de *E. coli*.

La FIGURA 10 describe un gel PAGE teñido con bromuro de etidio de productos de ARN amplificados lineal e isotérmicamente, generados empleando tres diseños diferentes del cebador compuesto.

Modos para realizar la invención

40 La invención proporciona composiciones y kits para amplificar secuencias de polinucleótidos. Las composiciones y los kits comprenden generalmente el uso de un cebador compuesto de ARN/ADN, opcionalmente una secuencia de terminación y, en realizaciones en las que se emplea la transcripción, una secuencia de oligonucleótidos de promotor.

45 Como compendio general, los métodos de amplificación funcionan del modo siguiente: un cebador compuesto de ARN/ADN forma la base para la replicación de una secuencia diana. En algunas realizaciones, una secuencia de terminación proporciona la base para un punto final para la replicación, desviando o bloqueando una replicación adicional a lo largo de la hebra diana. Tal y como se describe a continuación, en algunas realizaciones, el polinucleótido que comprende una secuencia de terminación es un oligonucleótido de conmutación del molde (TSO) que contiene secuencias que no son suficientemente complementarias para hibridarse con la hebra molde (además de las secuencias que son suficientemente complementarias para hibridarse); en otras realizaciones, la secuencia de terminación comprende en primer lugar secuencias que son suficientemente complementarias para hibridarse con la hebra molde. La polimerasa de ADN efectúa copias de la secuencia diana a partir del cebador. Una enzima que

corta el ARN de un híbrido de ARN/ADN (tal como una ARNasaH) corta (separa) una secuencia de ARN del híbrido, dejando la secuencia en la hebra molde disponible para la unión con otro cebador compuesto. Otra hebra se produce mediante la polimerasa de ADN que desplaza la hebra previamente replicada, dando como resultado un producto de extensión desplazado. Opcionalmente, un polinucleótido que comprende un propromotor y una región que se hibrida con el producto de extensión del cebador desplazado (que puede ser, por ejemplo, un oligonucleótido conmutador del molde o un oligonucleótido molde propromotor) que contiene secuencias suficientemente complementarias para hibridarse con el extremo 3' del producto de extensión del desplazamiento, se une con el producto de extensión del cebador desplazado. El promotor dirige la transcripción (a través de una polimerasa de ARN dependiente de ADN) para producir productos de ARN transcritos.

5
10
15
20

Por tanto, la invención proporciona composiciones y kits para producir al menos una copia de una secuencia de polinucleótidos diana (generalmente, métodos para amplificar la secuencia de polinucleótidos diana) que comprenden combinar y hacer reaccionar lo siguiente: (a) un polinucleótido diana monocatenario que comprende una secuencia diana; (b) un cebador compuesto que comprende una porción de ARN y una porción de ADN 3'; (c) una polimerasa de ADN; (d) trifosfatos de desoxirribonucleósidos o análogos adecuados; (e) una enzima, tal como ARNasaH, que corta el ARN de un híbrido de ARN/ADN; y (f) generalmente, pero opcionalmente, un polinucleótido que comprende una secuencia de terminación, tal como cualquiera de las descritas en esta memoria que comprende una porción (o región) que se hibrida con el polinucleótido molde. Una secuencia de terminación se emplea si la amplificación basada en la transcripción (véase abajo) también se emplea. La combinación se somete a condiciones adecuadas tales como (a) el cebador compuesto (y, opcionalmente, un polinucleótido que comprende una secuencia de terminación) se hibrida con el molde; (b) la extensión del cebador tiene lugar a partir del cebador compuesto, para formar un híbrido; (c) la ARNasaH corta el ARN del cebador compuesto del híbrido de ARN/ADN; (d) otro cebador compuesto se hibrida con el molde y tiene lugar otra ronda de extensión del cebador (mediada con polimerasa de ADN), desplazando la hebra ya copiada del molde.

25
30

Opcionalmente, lo siguiente también está incluido en la reacción de amplificación (al mismo tiempo que los componentes enumerados anteriormente o añadido separadamente): (e) un polinucleótido que comprende una secuencia de propromotor (que puede estar en cualquiera entre una variedad de formas, tal y como se describe en esta memoria) y una región que se hibrida con el producto de extensión del cebador desplazado; (f) trifosfatos de ribonucleósidos o análogos adecuados; y (g) polimerasa de ARN, bajo unas condiciones tales que puede tener lugar la transcripción de la hebra desplazada. Detalles en relación con los diversos componentes de los métodos de la presente invención, se proporcionan a continuación.

35

En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones y kits para secuenciar ácidos nucleicos (ADN o ARN). Para los métodos de secuenciación, se emplean los dNTPs adecuados (o, cuando se emplean realizaciones que dependen de las amplificaciones basadas en la transcripción, rNTPs adecuados) que pueden estar marcados o sin marcar. Por tanto, la invención proporciona composiciones y kits para secuenciar una secuencia de nucleótidos diana que comprenden los métodos descritos anteriormente, en donde se emplean dNTPs y análogos de dNTPs que son terminadores de la elongación del cebador, que pueden estar marcados o sin marcar, y/o rNTPs y análogos de rNTPs que son terminadores de la elongación del cebador que pueden estar marcados o no, y el producto de la amplificación se analiza para obtener información sobre la secuencia, tal y como se describe a continuación.

40
45

En otras realizaciones, la invención proporciona composiciones y kits para detectar mutaciones de secuencias de ácidos nucleicos y/o para caracterizar secuencia(s) diana. En una realización, la presencia o ausencia de una mutación en un polinucleótido diana, se detecta basándose en la capacidad para amplificar el polinucleótido diana que emplea un cebador compuesto cuya porción de ARN contiene la secuencia mutada o carece de ella, empleando los métodos de la invención. En otra realización, los productos amplificados se emplean para detectar mutaciones mediante hibridación con sondas específicas. En aún otras realizaciones, los productos amplificados se emplean para detectar y/o identificar polimorfismos en la configuración monocatenaria de un polinucleótido diana.

En aún otras realizaciones, la invención proporciona composiciones y kits para generar micromatrices de ácidos nucleicos (ADN o ARN) que emplean los productos amplificados de los métodos de amplificación de ácidos nucleicos lineales o lineales mejorados de la presente invención.

50

Otras composiciones y kits que usan los productos amplificados descritos en esta memoria se proporcionan a continuación.

Ventajas de los métodos de amplificación de la descripción

55

Los métodos de amplificación de la descripción proporcionan diversas ventajas significativas sobre otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos. La formación del molde cebado, la extensión del cebador y el desplazamiento del producto de extensión generado previamente, depende del corte de la porción de ARN del cebador hibridado, mediante una actividad ribonucleasa. Por tanto, el producto de la extensión del cebador carece de la porción más 5' del cebador. Consecuentemente, el producto de la transcripción del ARN generado a partir del complejo del producto de extensión y el oligonucleótido conmutador del molde, o el oligonucleótido molde promotor, no contiene en su extremo 3' la secuencia complementaria a esta porción del cebador. Por tanto, los productos de la amplificación no son capaces de hibridarse con el cebador para tener una amplificación productiva, volviéndose los métodos de amplifi-

5 cación de la invención resistentes a una amplificación no específica, debida a la contaminación con productos generados por reacciones de amplificación anteriores. Esta característica lo distingue claramente de otros métodos conocidos de amplificación de la diana, tales como PCR, NASBA y similares, y torna adecuados los métodos de la invención para plataformas en tubo abierto, empleadas normalmente en laboratorios clínicos, sitios de ensayo de alto rendimiento y similares.

10 El único requerimiento de corte de la porción de ARN del cebador compuesto en la forma hibridada y extendida, mediante una ribonucleasa tal como ARNasaH, para una progresión adicional de la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana, da como resultado la amplificación exclusiva de la diana de ADN. Por tanto, es posible emplear los métodos de la invención para amplificar las dianas de ADN genómico en presencia de ARNm en exceso. Esta característica es útil para la cuantificación precisa de la dosificación génica. Cuando la secuencia de ácido nucleico diana del ensayo es ARN, la diana se transcribe en primer lugar para producir ADNc que se puede amplificar empleando los métodos de la invención.

15 Los métodos de la descripción también proporcionan la amplificación de ácidos nucleicos diana con alta precisión en relación con el molde. Cada producto de la amplificación es una copia directa de la secuencia diana en el ADN molde de aportado (en los métodos de amplificación lineal) o el ADN molde aportado y los productos de extensión del cebador del ADN molde aportado (en los métodos de amplificación lineal mejorada).

20 Los métodos de la descripción no requieren la termociclación ya que la amplificación se puede realizar de forma isotérmica. Esta característica proporciona numerosas ventajas que incluyen facilitar la automoción y la adaptación para una amplificación de alto rendimiento y/o el análisis de ácidos nucleicos. Por ejemplo, los métodos de secuenciación basados en los métodos de amplificación de la invención, se simplifican por la capacidad de realizar reacciones de forma isotérmica. Otros métodos que se han descrito requieren la ciclación térmica para separar los productos de extensión del cebador de la secuencia diana. La reacción isotérmica es más rápida que la proporcionada por la ciclación térmica y es adecuada para realizar la secuenciación de un ácido nucleico diana en dispositivos en miniatura.

25 Otra ventaja de los métodos de la descripción es que sólo es necesario un cebador aislado. Un cebador aislado se utiliza para proporcionar una extensión del cebador unidireccional que da como resultado la amplificación del ácido nucleico molde. Esto evita los diversos inconvenientes asociados con el uso de parejas de cebadores, por ejemplo, el coste del diseño y la preparación de dos grupos de cebadores, la necesidad de tener un conocimiento previo de una región adicional de la secuencia dentro del ácido nucleico del molde y el incremento de la posibilidad de que los productos amplificados sean el resultado de un cebado no específico.

30 Los métodos de amplificación isotérmica y lineal de la descripción son también adecuados para emplear en la detección de dianas de ácido nucleico, la cuantificación de secuencias definidas de ácido nucleico y la producción de sondas para secuencias de ácido nucleico definidas. Los métodos de la descripción son útiles para la detección cualitativa de una secuencia de ácido nucleico, la determinación cuantitativa de la cantidad de secuencia de ácido nucleico diana, la detección de la presencia de alteraciones definidas de la secuencia, tal y como son necesarios para el genotipado y la secuenciación. Los productos de la amplificación de acuerdo con los métodos de la invención son monocatenarios y se detectan fácilmente por métodos diversos conocidos de detección de ácidos nucleicos.

35 Los métodos de la descripción son útiles adicionalmente para múltiples análisis de secuencias de ácidos nucleicos. Es decir, diversas secuencias diana se pueden amplificar simultáneamente en una sola mezcla de reacción. Las diversas secuencias diana pueden formar parte de un ADN genómico aislado o pueden representar secuencias específicas de diversas dianas de ácidos nucleicos, que pueden estar presentes en una sola muestra del ensayo. Por ejemplo, los métodos de la descripción son útiles para detectar la presencia de diversos agentes patógenos en una sola muestra biológica. De forma similar, la determinación de diversos sitios polimórficos en una sola muestra de ADN genómico, se puede determinar simultáneamente en una sola reacción.

40 Se entiende que, en relación con todas las realizaciones descritas en esta memoria, como componentes o aspectos "comprendidos" generalmente, la invención también incluye realizaciones que "constan esencialmente de" estos componentes o aspectos. La invención también incluye realizaciones que "constan de" estos componentes o aspectos. Esto se aplica a todas las realizaciones descritas en esta memoria.

Técnicas Generales

45 La puesta en práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (que incluyen técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de los conocimientos de un experto en la técnica. Tales técnicas se explican con más detalle en la bibliografía, tal como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook y col., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, compilador, 1984); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, compilador, 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel y col., compiladores, 1987, y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis y col., compiladores, 1994).

Los cebadores, los oligonucleótidos y los polinucleótidos empleados en la presente invención se pueden generar

empleando técnicas convencionales conocidas en la técnica.

Definiciones

Una "secuencia diana", tal y como se emplea en esta memoria, es una secuencia de polinucleótidos de interés, que se desea amplificar. La secuencia diana puede ser conocida o desconocida, desde el punto de vista de su secuencia real. Generalmente, un "molde", tal y como se emplea en esta memoria, es un polinucleótido que contiene la secuencia de nucleótidos diana. En algunos ejemplos, las expresiones "secuencia diana", "ADN molde", "polinucleótido molde", "ácido nucleico diana", "polinucleótido diana" y sus variaciones, se emplean indistintamente.

"Amplificación", tal y como se emplea en esta memoria, se refiere en general al procedimiento de producir copias múltiples de una secuencia deseada. "Copias múltiples" significa al menos 2 copias. Una "copia" no significa necesariamente una complementariedad o identidad perfecta de la secuencia con la secuencia molde. Por ejemplo, las copias pueden incluir análogos de nucleótidos tales como desoxiinosina, alteraciones intencionadas de la secuencia (tal como alteraciones de la secuencia introducidas mediante un cebador que comprende una secuencia que se puede hibridar, pero no es complementaria, con el molde), y/o errores de la secuencia que tienen lugar durante la amplificación.

"Polinucleótido" o "ácido nucleico", tal y como se emplea indistintamente en esta memoria, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificadas, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se puede incorporar en un polímero mediante una polimerasa de ADN o de ARN. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si están presentes, la modificación de la estructura del nucleótido puede ser impartida antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente después de la polimerización, mediante la conjugación con un componente marcador. Otros tipos de modificación incluyen, por ejemplo, "caperuzas", sustitución de uno o de varios de los nucleótidos presentes en la naturaleza por un análogo, modificaciones entre nucleótidos, tales como por ejemplo, con enlaces no cargados (p. ej., fosfonatos de metilo, fosfortriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (p. ej., fosfortioatos, fosforoditioatos, etc.), las que contienen restos colgantes, tales como por ejemplo, proteínas (p. ej., nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, ply-L-lisina, etc.), con intercaladores (p. ej., acridina, psolaren, etc.) las que contienen quelatos (p. ej., metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), las que contienen alquiladores, las que tienen enlaces modificados (p. ej., ácidos nucleicos alfaanómicos, etc.), así como formas no modificadas de polinucleótido(s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo presentes generalmente en los azúcares puede ser reemplazado, por ejemplo, por grupos fosfonatos, grupos fosfatos, pueden estar protegidos mediante grupos protectores convencionales o activados para preparar enlaces adicionales con nucleótidos adicionales o pueden estar conjugados con soportes sólidos. El OH 5' y 3' terminal se puede fosforilar o sustituir con aminas o restos de grupos formadores de caperuzas orgánicas de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también se pueden derivatizar para formar grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que se conocen generalmente en la técnica que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metil-ribosa, 2'-O-alil-ribosa, 2'-fluoro-ribosa o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclico, azúcares α -anómicos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos abásicos de nucleósidos, tales como metilribósido. Uno o varios enlaces fosfodiéster pueden estar reemplazados por grupos de enlaces alternativos. Estos grupos de enlaces alternativos incluyen, pero no están limitados a realizaciones en donde un fosfato está reemplazado por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("dilitioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en donde cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido, que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido tienen que ser idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos mencionados en esta memoria, incluyendo ARN y ADN.

"Oligonucleótido", tal y como se emplea en esta memoria, se refiere generalmente a polinucleótidos cortos, generalmente monocatenarios y sintéticos que tienen generalmente, pero no necesariamente, una longitud menor de aproximadamente 200 nucleótidos. Los oligonucleótidos en la presente invención incluyen un cebador compuesto, TSO, PTO y una secuencia de bloqueo. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no se excluyen entre sí. La descripción anterior de los polinucleótidos es igual y totalmente aplicable a los oligonucleótidos.

Un "cebador" es generalmente un polinucleótido monocatenario corto aislado, en general con un grupo 3'-OH libre, que se une a una diana presente potencialmente en una muestra de interés, mediante hibridación con una secuencia diana y que a continuación favorece la polimerización de un polinucleótido complementario a la diana.

Una "secuencia de polinucleótidos de terminación" o "secuencia de terminación", tal y como se usa en esta memoria de forma intercambiable, es una secuencia de polinucleótidos que produce el cese de la replicación del ADN con la polimerasa de ADN, en relación con el molde que comprende la secuencia diana. Una secuencia de terminación comprende una porción (o región) que se hibrida generalmente con el molde en la posición 5' del punto (sitio) de terminación. La porción hibridable puede comprender o no la secuencia de terminación completa. Ejemplos de secuencias adecuadas de polinucleótidos de terminación (tales como secuencias de bloqueo y TSOs) se proporcionan en esta memoria.

- 5 “Secuencia de bloqueo” o “secuencia bloqueante”, tal y como se emplean indistintamente en esta memoria, es un ejemplo de una secuencia de terminación y se refiere a un oligonucleótido que se une, generalmente con alta afinidad, al ácido nucleico molde, en una posición 5' en relación con el sitio de terminación y que produce el cese de la replicación del ADN con la polimerasa de ADN, en relación con el molde, que comprende la secuencia diana. Su extremo 3' puede estar bloqueado o no para la extensión con una polimerasa de ADN.
- 10 “Sitio de terminación” o “punto de terminación”, tal y como se emplea en esta memoria de forma indistinta, se refiere al sitio, punto o región del molde que se replica en último lugar por la polimerasa de ADN, antes de terminar la polimerización (generalmente, extensión del cebador) o la conmutación del molde. Por ejemplo, en relación con un TSO, es la posición o región en la secuencia diana que es complementaria al extremo 3' del producto de extensión del cebador, antes de conmutar el molde desde el polinucleótido molde con la porción no hibridada del TSO.
- 15 “Secuencia protopromotora” y “secuencia propromotora”, tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a una región de la secuencia de ADN monocatenario que, en forma bicatenaria, es capaz de mediar en la transcripción del ARN. En algunos contextos, “secuencia protopromotora”, “protopromotor”, “secuencia propromotora”, “propromotor”, “secuencia promotora” y “promotor” se usan indistintamente.
- 20 “Oligonucleótido conmutador del molde (TSO)”, tal y como se usa en esta memoria, se refiere a un oligonucleótido que comprende una porción (o región) que es hibridable con un molde en una posición 5' en relación con el sitio de terminación de la extensión del cebador y que es capaz de efectuar una conmutación del molde en el proceso de extensión del cebador, mediante una polimerasa de ADN. Los TSOs se conocen en general en la técnica. “Conmutación del molde” se refiere a un cambio en el ácido nucleico del molde, generalmente del ácido nucleico diana de la porción no hibridada de un TSO, durante el transcurso de una ronda aislada de extensión del cebador.
- 25 “Oligonucleótido molde propromotor (PTO)”, tal y como se usa en esta memoria, se refiere a un oligonucleótido que comprende una secuencia propromotora y una porción, generalmente una porción 3', que es hibridable con la región 3' de un producto de extensión del cebador. La secuencia propromotora y la porción hibridable pueden ser nucleótidos iguales, distintos o solapantes de un oligonucleótido.
- Una primera secuencia que se “corresponde” con una segunda secuencia, tal como una porción de ARN de un cebador compuesto, significa que la primera secuencia tiene una identidad de secuencia significativa en relación con la segunda secuencia. Este término se emplea generalmente en el contexto de detectar mutaciones o caracterizar secuencias de una diana.
- “Inhibir” es disminuir o reducir una actividad, función y/o cantidad, comparada con una referencia.
- 30 Un “complejo” es un conjunto de componentes. Un complejo puede ser o no estable y se puede detectar directa o indirectamente. Por ejemplo, tal y como se describe en esta memoria, dados ciertos componentes de una reacción y el tipo de producto(s) de la reacción, se puede deducir la existencia de un complejo. Para fines de la invención, un complejo es generalmente un producto intermedio en relación con el(los) producto(s) de amplificación final.
- 35 Una “porción” o una “región”, empleadas de forma indistinta en esta memoria, de un polinucleótido u oligonucleótido, es una secuencia contigua de 2 o más bases. En otras realizaciones, una región o porción tiene al menos aproximadamente cualquiera entre 3, 5, 10, 15, 20, 25 nucleótidos contiguos.
- Una región, porción o secuencia que es “adyacente” a otra secuencia, termina directamente en esta región, porción o secuencia. Por ejemplo, una porción de ARN que es adyacente a una porción de ADN 5' de un cebador compuesto, termina directamente en esta región. Para una ilustración de este ejemplo, véase la Figura 1A-C.
- 40 Una “mezcla de reacción” es un conjunto de componentes que, bajo condiciones adecuadas, reacciona para formar un complejo (que puede ser un intermedio) y/o un(os) producto(s).
- “Un”, “uno” y “el” y similares, a no ser que se indique de otro modo, incluyen las formas plurales.
- “Que comprende” significa que incluye.
- 45 Las condiciones que “permiten” que tenga lugar un acontecimiento o las condiciones que son “adecuadas” para que tenga lugar un acontecimiento, tal como hibridación, extensión de la hebra y similares, o las condiciones “adecuadas”, son condiciones que no impiden que tengan lugar tales acontecimientos. Por tanto, estas condiciones permiten, mejoran, facilitan y/o conducen al acontecimiento. Tales condiciones, conocidas en la técnica y descritas en esta memoria, dependen de, por ejemplo, la naturaleza de la secuencia de nucleótidos, la temperatura y las condiciones del tampón. Estas condiciones también dependen de qué acontecimiento se desea, tal como hibridación, corte, extensión de la hebra o transcripción.
- 50 “Mutación” de la secuencia, tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a cualquier alteración de la secuencia en una secuencia de interés, en comparación con una secuencia de referencia. Una secuencia de referencia puede ser una secuencia de tipo silvestre o una secuencia con la que se desea comparar una secuencia de interés. Una mutación de la secuencia incluye cambios aislados de nucleótidos o alteraciones de más de un nucleótido en una

secuencia, debido a mecanismos tales como sustitución, deleción o inserción. Un polimorfismo de un nucleótido aislado (SNP), tal y como se emplea en esta memoria, también es una mutación de la secuencia.

5 “Polimorfismo en la configuración monocatenaria” y “SSCP”, tal y como se emplea en esta memoria, se refiere generalmente a la configuración específica de un ácido nucleico monocatenario que está afectado por su secuencia específica de ácidos nucleicos. Una alteración de la secuencia del polinucleótido monocatenario, tal como una sustitución de un nucleótido aislado, deleciones o inserciones, dan como resultado un cambio o polimorfismo en la configuración del polinucleótido monocatenario. La configuración del polinucleótido es generalmente detectable, identificable y/o visible empleando métodos conocidos en la técnica, tales como movilidad electroforética, medida mediante electroforesis en gel, electroforesis capilar y/o susceptibilidad a la digestión con endonucleasas.

10 “Micromatriz” y “matriz”, tal y como se emplean en esta memoria, se refieren a una disposición de una colección de secuencias de nucleótidos en una localización centralizada. Las formaciones pueden estar sobre un sustrato sólido, tal como un portaobjetos de vidrio o sobre un sustrato semisólido, tal como una membrana de nitrocelulosa. Las secuencias de nucleótidos pueden ser de ADN, ARN o cualquier permutación de las mismas.

15 El término “3” se refiere en general a una región o una posición en un polinucleótido u oligonucleótido 3’ (aguas abajo) de otra región o posición en el mismo polinucleótido u oligonucleótido.

El término “5” se refiere generalmente a una región o una posición en un polinucleótido u oligonucleótido 5’ (aguas arriba) de otra región o posición en el mismo polinucleótido u oligonucleótido.

20 Las expresiones “porción de ADN 3”, “región de ADN 3”, “porción de ARN 3” y “región de ARN 3”, se refieren a la porción o a la región de un polinucleótido o un oligonucleótido localizado hacia el extremo 3’ del polinucleótido u oligonucleótido y puede incluir o no el(los) nucleótido(s) o restos más 3’, fijados al nucleótido más 3’ del mismo polinucleótido u oligonucleótido. El(los) nucleótido(s) más 3’ puede tener preferentemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20, más preferentemente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 18, incluso más preferentemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 15 nucleótidos.

25 Las expresiones “porción de ADN 5”, “región de ADN 5”, “porción de ARN 5” y “región de ARN 5”, se refieren a la porción o a la región de un polinucleótido o un oligonucleótido localizado hacia el extremo 5’ del polinucleótido u oligonucleótido y puede incluir o no el(los) nucleótido(s) o restos más 5’, fijados al nucleótido más 5’ del mismo polinucleótido u oligonucleótido. El(los) nucleótido(s) más 5’ puede tener preferentemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20, más preferentemente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 18, incluso más preferentemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 15 nucleótidos.

30 “Detección” incluye cualquier medio de detección, incluyendo la detección directa e indirecta. Por ejemplo, productos “menos detectables” se pueden observar directa o indirectamente y la expresión indica cualquier reducción (que incluye ausencia de productos). De forma similar, producto “más detectable”, significa cualquier incremento, observado directa o indirectamente.

Componentes y condiciones de reacción empleados en los métodos de la descripción

35 Ácido nucleico molde

La diana de ácido nucleico (AN) que se va a amplificar incluye ácidos nucleicos procedentes de cualquier fuente en forma purificada o no purificada, que pueden ser de ADN (ADNbc y ADNmc) o ARN, incluyendo ARNt, ARNm, ARNr, ADN y ARN mitocondrial, ADN y ARN de cloroplastos, híbridos de ADNARN o mezclas de los mismos, genes, cromosomas, plásmido, los genomas de material biológico, tales como microorganismos, p. ej., bacterias, levaduras, virus, viroides, mohos, hongos, vegetales, animales, seres humanos y fragmentos de los mismos. Para la obtención y purificación de los ácidos nucleicos se emplean métodos convencionales en la técnica. La amplificación de una diana de ARN requerirá una síntesis inicial de ADNc, tal y como se conoce en la técnica. La amplificación de un híbrido de ADNARN requerirá la desnaturalización del híbrido para obtener un ADNmc o la desnaturalización seguida de transcripción inversa para obtener un ADNc. El ácido nucleico diana puede ser sólo una fracción menor de una mezcla compleja, tal como una muestra biológica y se puede obtener a partir de diverso material biológico mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

50 La etapa inicial de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana es convertir la diana en monocatenaria. Si el ácido nucleico diana es un ADN(bc) bicatenario, la etapa inicial es la desnaturalización de la diana. La etapa de desnaturalización puede ser desnaturalización térmica o cualquier otro método conocido en la técnica, tal como tratamiento alcalino. Si la diana es de ARN, la etapa inicial puede ser la síntesis de un ADNc monocatenario. Las técnicas para la síntesis de ADNc a partir de ARN son conocidas en la técnica.

Cebador compuesto

Los métodos de amplificación de la descripción emplean un cebador compuesto aislado que está compuesto de porciones de ARN y de ADN. El diseño compuesto del cebador es decisivo para un desplazamiento posterior del producto de extensión del cebador mediante la unión de un nuevo (adicional) cebador compuesto y la extensión del

55

nuevo cebador con la polimerasa. Además, la escisión de la porción de ARN del producto de extensión del cebador produce la generación de un producto de la amplificación que no es un sustrato para la amplificación con un cebador compuesto, tal y como se describe a continuación.

5 Los cebadores compuestos para uso en los kits y en las composiciones de la presente invención comprenden al menos una porción de ARN que es capaz de (a) unirse (hibridarse) a una secuencia en el ácido nucleico diana (molde) independientemente de la hibridación de la(s) porción(es) de ADN con una secuencia en el ácido nucleico diana; y (b) de ser cortada con una ribonucleasa cuando se hibrida con el ADN de la diana. Los cebadores compuestos se unen al ácido nucleico de la diana para formar un heterohíbrido parcial en el que sólo la porción del ARN del cebador es cortada después de entrar en contacto con una ribonucleasa, tal como ARNasaH, mientras que la hebra diana permanece intacta, permitiendo de este modo la reasociación de otro cebador compuesto.

10 Los cebadores compuestos también comprenden una porción de ADN 3' que es capaz de hibridarse con una secuencia del ácido nucleico diana (molde) de modo que favorece su hibridación con la secuencia diana (molde) sobre la de la hebra de ácido nucleico que es desplazado del ácido nucleico diana mediante la polimerasa de ADN. Tales cebadores se pueden diseñar racionalmente basándose en factores bien conocidos que influyen en la afinidad de la unión del ácido nucleico, tal como la longitud de la secuencia y/o la identidad, así como las condiciones de hibridación. En una realización preferida, la hibridación de la porción de ADN 3' del cebador compuesto con su secuencia complementaria en el ácido nucleico diana, es favorecida sobre la hibridación de la secuencia homóloga en el extremo 5' de la hebra desplazada con el ácido nucleico diana.

20 La generación de cebadores adecuados para la extensión mediante polimerización, es bien conocida en la técnica, tal y como se describe en el documento PCT nº de pub. WO99/42618 (y las referencias citadas en la memoria). El cebador compuesto comprende una combinación de ARN y ADN (véase la definición anterior), siendo el nucleótido del extremo 3' un nucleótido adecuado para la extensión de ácido nucleico. El nucleótido del extremo 3' puede ser cualquier nucleótido o análogo que cuando está presente en un cebador, se puede extender gracias a una polimerasa de ADN. Generalmente, el nucleótido del extremo 3' tiene un OH 3'. Los cebadores adecuados incluyen los que comprenden al menos una porción de ARN y al menos una porción de ADN. Tal y como se muestra en el Ejemplo 5 (que muestra el comportamiento relativo de diversos cebadores empleados para la amplificación del gen J de *E. coli*), para un gen, los cebadores compuestos pueden comprender una porción de ARN 5' y una porción de ADN 3' (en donde la porción de ARN es adyacente a la porción de ADN 3'); o porciones de ADN 5' y 3' con una porción de ARN intercalado. Por tanto, en una realización, el cebador compuesto comprende una porción de ARN 5' y una porción de ADN 3', preferentemente en donde la porción de ARN es adyacente a la porción de ADN 3'. En otra realización, el cebador compuesto comprende porciones de ADN 5' y 3' con al menos una porción de ARN intercalado (es decir, una porción de ARN entre las dos porciones de ADN). En todavía otra realización, el cebador compuesto de la presente invención comprende una porción de ADN 3' y al menos una porción de ARN intercalado (es decir, una porción de ARN entre las porciones de ADN).

35 La longitud de una porción de ARN en un cebador compuesto que comprende una porción de ADN 3' y una porción de ARN, puede tener preferentemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 25, más preferentemente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 20, incluso más preferentemente desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 15 y lo más preferido desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 10 nucleótidos. En algunas realizaciones de un cebador compuesto que comprende una porción de ADN 3' y una porción de ARN, una porción de ARN puede tener al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 3, 4 y 5 nucleótidos con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 10, 15, 20, 25, 30 nucleótidos.

45 La longitud de la porción de ARN 5' en un cebador compuesto que comprende una porción de ARN 5' y una porción de ADN 3', puede tener preferentemente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 25 nucleótidos, más preferentemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 20 nucleótidos, incluso más preferentemente desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 18 nucleótidos, preferentemente desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 17 nucleótidos y lo más preferido desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 15 nucleótidos. En otras realizaciones de un cebador compuesto que comprende una porción de ARN 5' y una porción de ADN 3', la porción de ARN 5' puede tener al menos aproximadamente cualquiera entre 3, 5, 7, 8 y 10 nucleótidos con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 15, 17, 18, 20 nucleótidos.

50 En realizaciones de un cebador compuesto que comprende una porción de ARN 5' y una porción de ADN 3', que comprende adicionalmente una(s) porción(es) de ARN no 5', una porción de ARN no 5' puede tener preferentemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 7 nucleótidos, más preferentemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 6 nucleótidos y lo más preferible desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 5 nucleótidos. En ciertas realizaciones de un cebador compuesto que comprende una porción de ARN 5' y una porción de ADN 3', que comprende adicionalmente una(s) porción(es) de ARN no 5', una porción de ARN no 5' puede tener al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 2, 3, 5 con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 5, 6, 7, 10 nucleótidos.

60 En las realizaciones en las que un cebador compuesto que comprende una porción de ARN 5' y una porción de ADN 3', en donde la porción de ARN 5' es adyacente a la porción de ADN 3', la longitud de la porción de ARN 5' puede ser preferentemente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 25 nucleótidos, más preferentemente desde

aproximadamente 5 hasta aproximadamente 20 nucleótidos, incluso más preferentemente desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 18 nucleótidos, preferentemente desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 17 nucleótidos y lo más preferido desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 15 nucleótidos. En ciertas realizaciones de un cebador compuesto que comprende una porción de ARN 5' y una porción de ADN 3', en donde la porción de ARN 5' es adyacente a la porción de ADN 3', la porción de ARN 5' puede tener al menos aproximadamente cualquiera entre 3, 5, 7, 8, 10 nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 15, 17, 18, 20 nucleótidos.

La longitud de una porción de ARN intercalado en un cebador compuesto que comprende porciones de ADN 5' y 3', con al menos una porción de ARN intercalado, puede ser preferentemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 7 nucleótidos, más preferentemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 6 nucleótidos y lo más preferido desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 5 nucleótidos. En algunas realizaciones de un cebador compuesto que comprende porciones de ADN 5' y 3' con al menos una porción de ARN intercalado, una porción de ARN intercalado puede tener al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 2, 3, 5 nucleótidos con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 5, 6, 7, 10 nucleótidos. La longitud de una porción de ARN intercalado en un cebador compuesto que comprende una porción de ADN 3' y al menos una porción de ARN intercalado, puede ser preferentemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 7 nucleótidos, más preferentemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 6 nucleótidos y lo más preferido desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 5 nucleótidos. En algunas realizaciones de un cebador compuesto que comprende una porción de ADN 3' y al menos una porción de ARN intercalado, una porción de ARN intercalado puede tener al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 2, 3, 5 nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 5, 6, 7, 10 nucleótidos. En un cebador compuesto que comprende una porción de ADN 3' y al menos una porción de ARN intercalado, que comprende adicionalmente una porción de ARN 5', la porción de ARN 5' puede tener desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 25 nucleótidos, más preferentemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 20 nucleótidos, incluso más preferentemente desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 18 nucleótidos, preferentemente desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 17 nucleótidos y lo más preferido desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 15 nucleótidos. En algunas realizaciones de un cebador compuesto que comprende una porción de ADN 3' y al menos una porción de ARN intercalado, que comprende adicionalmente una porción de ARN 5', la porción de ARN 5' puede tener al menos aproximadamente cualquiera entre 3, 5, 7, 8, 10 nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 15, 17, 18, 20 nucleótidos.

La longitud de la porción de ADN 3' en un cebador compuesto que comprende una porción de ADN 3' y una porción de ARN, puede ser preferentemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20, más preferentemente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 18, incluso más preferentemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 15 y lo más preferido entre aproximadamente 7 hasta aproximadamente 12 nucleótidos. En algunas realizaciones de un cebador compuesto que comprende una porción de ADN 3' y una porción de ARN, la porción de ADN 3' puede tener al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 3, 5, 7, 10 nucleótidos con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 10, 12, 15, 18, 20, 22 nucleótidos.

La longitud de la porción de ADN 3' en un cebador compuesto que comprende una porción de ARN 5' y una porción de ADN 3', puede ser preferentemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 nucleótidos, más preferentemente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 18 nucleótidos, incluso más preferentemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 15 nucleótidos y lo más preferido desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 12 nucleótidos. En algunas realizaciones de un cebador compuesto que comprende una porción de ARN 5' y una porción de ADN 3', la porción de ADN 3' puede tener al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 3, 5, 7, 10 nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 10, 12, 15, 18, 20, 22 nucleótidos.

En realizaciones de un cebador compuesto que comprende una porción de ARN 5' y una porción de ADN 3' que comprende adicionalmente porción(es) de ADN no 3', una porción de ADN no 3' puede ser preferentemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 nucleótidos, más preferentemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 8 nucleótidos y lo más preferido desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 6 nucleótidos. En algunas realizaciones de un cebador compuesto que comprende una porción de ARN 5' y una porción de ADN 3' que comprende adicionalmente porción(es) de ADN no 3', una porción de ADN no 3' puede tener al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 2, 3, 5, nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 6, 8, 10, 12 nucleótidos.

En realizaciones de un cebador compuesto que comprende una porción de ARN 5' y una porción de ADN 3', en la que la porción de ARN 5' es adyacente a la porción de ADN 3', la longitud de la porción de ADN 3' puede ser preferentemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 nucleótidos, más preferentemente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 18 nucleótidos, incluso más preferentemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 15 nucleótidos y lo más preferido desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 12 nucleótidos. En ciertas realizaciones del cebador que comprende una porción de ARN 5' y una porción de ADN 3', en donde la porción de ARN 5' es adyacente a la porción de ADN 3', la porción de ADN 3' puede tener al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 3, 5, 7, 10 nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 10, 12, 15, 18, 20, 22 nucleótidos.

La longitud de una porción de ADN no 3' en un cebador compuesto que comprende porciones de ADN 5' y 3' con al menos una porción de ARN intercalado, puede ser preferentemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 nucleótidos, más preferentemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 8 nucleótidos y lo más preferido desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 6 nucleótidos. En algunas realizaciones de un cebador que comprende porciones de ADN 5' y 3' con al menos una porción de ARN intercalado, una porción de ADN no 3' puede tener al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 2, 3, 5 nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 6, 8, 10, 12 nucleótidos.

La longitud de la porción de ADN 3' en un cebador compuesto que comprende porciones de ADN 5' y 3', con al menos una porción de ARN intercalado, puede ser preferentemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 nucleótidos, más preferentemente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 18 nucleótidos, incluso más preferentemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 15 nucleótidos y lo más preferido desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 12 nucleótidos. En algunas realizaciones de un cebador compuesto que comprende porciones de ADN 5' y 3' con al menos una porción de ARN intercalado, la porción de ADN 3' puede tener al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 3, 5, 7, 10 nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 10, 12, 15, 18, 20, 22 nucleótidos.

La longitud de una porción de ADN no 3' (es decir, cualquier porción de ADN distinta de la porción de ADN 3') en un cebador compuesto que comprende una porción de ADN 3' y al menos una porción de ARN intercalado, puede ser preferentemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 nucleótidos, más preferentemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 8 nucleótidos y lo más preferido desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 6 nucleótidos. En algunas realizaciones de un cebador compuesto que comprende una porción de ADN 3' y al menos una porción de ARN intercalado, una porción de ADN no 3' puede tener al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 3, 5, 7, 10 nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 6, 8, 10, 12 nucleótidos. La longitud de la porción de ADN 3' en un cebador compuesto que comprende una porción de ADN 3' y al menos una porción de ARN intercalado, puede ser preferentemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 nucleótidos, más preferentemente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 18 nucleótidos, incluso más preferentemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 15 nucleótidos y lo más preferido desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 12 nucleótidos. En algunas realizaciones de un cebador compuesto que comprende una porción de ADN 3' y al menos una porción de ARN intercalado, la porción de ADN 3' puede tener al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 3, 5, 7, 10 nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 10, 12, 15, 18, 20, 22 nucleótidos. Se entiende que las longitudes de las porciones diversas pueden ser mayores o menores, según sea adecuado con las condiciones de reacción de los métodos de esta invención.

En algunas realizaciones, la porción de ADN 5' de un cebador compuesto incluye el nucleótido más 5' del cebador. En algunas realizaciones, la porción de ARN 5' de un cebador compuesto incluye el nucleótido más 5' del cebador. En otras realizaciones, la porción de ADN 3' de un cebador compuesto incluye el nucleótido más 3' del cebador. En otras realizaciones, la porción de ADN 3' es adyacente a la porción de ARN 5' e incluye el nucleótido más 3' del cebador (y la porción de ARN 5' incluye el nucleótido más 5' del cebador).

La longitud total del cebador compuesto puede ser preferentemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 40 nucleótidos, más preferentemente desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30 nucleótidos y lo más preferible desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 25 nucleótidos. En algunas realizaciones, la longitud puede ser al menos aproximadamente cualquiera entre 10, 15, 20, 25 nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 25, 30, 40, 50 nucleótidos. Se entiende que la longitud puede ser mayor o menor, según sea apropiado con las condiciones de reacción de los métodos de esta invención.

Para conseguir la hibridación (que, como se conoce bien en la técnica, depende de otros factores tales como, por ejemplo, fuerza iónica y temperatura), los cebadores compuestos para usar en los métodos y las composiciones de la presente invención, tienen preferentemente al menos aproximadamente 60%, más preferentemente al menos aproximadamente 75%, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 90% y lo más preferible al menos aproximadamente 95% de complementariedad con el ácido nucleico diana. Las porciones de ADN y ARN individuales de los cebadores compuestos tienen preferentemente al menos aproximadamente 60%, más preferentemente al menos aproximadamente 75%, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 90% y lo más preferible al menos aproximadamente 95% de complementariedad con el ácido nucleico diana.

Tal y como se ha descrito en esta memoria, se pueden utilizar uno o varios cebadores compuestos en una reacción de amplificación.

Un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótidos de terminación

En algunas realizaciones de los métodos de la presente descripción, especialmente si se emplea una amplificación basada en la transcripción, se incluye un polinucleótido que comprende una secuencia de terminación, cuyos ejemplos se proporcionan a continuación.

Oligonucleótido conmutador del molde

Un segundo oligonucleótido que se puede utilizar en los métodos de amplificación de la invención, es un oligonucleótido conmutador de la terminación (TSO). En una realización, el TSO actúa como una secuencia de terminación. En otra realización, el TSO actúa como una secuencia de terminación y proporciona una secuencia propromotora.

En métodos de amplificación descritos previamente, basados en un oligonucleótido conmutador del molde, se redujo la concentración de este oligonucleótido debido a la inhibición de la hibridación del segundo cebador o de la segunda etapa de hibridación del mismo cebador, cuando el método se diseña para utilizar una especie única de cebador. Los métodos de la invención están exentos de esta limitación. En contraposición con métodos descritos previamente que emplean TSOs, el oligonucleótido conmutador del molde se puede utilizar con una concentración elevada para amplificar, según los métodos de la presente invención. Esta característica asegura una hibridación eficaz del oligonucleótido con la hebra diana y maximiza el rendimiento del complejo trimolecular, el sustrato para la extensión del cebador y la conmutación del molde. Un atributo adicional a esta característica es la eficacia de la hibridación del producto de extensión del cebador desplazado con el oligonucleótido conmutador del molde, para formar un sustrato para la polimerasa de ARN, tal y como se ha descrito.

Un TSO comprende una porción 3' que se puede hibridar con la diana y una porción 5' que está diseñada para conmutar la hebra durante la polimerización (véase la Figura 2A-C). El diseño de un TSO que produzca una conmutación de la hebra es conocido en la técnica, tal como ha sido descrito previamente por Patel y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93:2969-2974.

La porción 3' se hibrida con el molde en el lugar 5' con la posición o región en el polinucleótido molde que es complementaria al extremo 3' del producto de extensión del cebador, antes de conmutar el molde del polinucleótido molde con la porción no hibridada del TSO ("sitio de terminación").

En una realización, la conmutación de la hebra se favorece con la presencia de secuencias cortas complementarias entre sí en los segmentos del TSO inmediatamente 5' y 3' a la unión entre las porciones hibridadas y no hibridadas del TSO. Sin tener la intención de estar atado a la teoría, una explicación es que en el acontecimiento en el que el producto de extensión del cebador es extendido en la porción del ácido nucleico diana que se hibrida con el TSO (mediante desplazamiento de la porción hibridada del TSO), el extremo 3' del producto de extensión del cebador podría comprender una secuencia corta que se puede unir con su secuencia corta complementaria en el segmento del TSO que está inmediatamente adyacente a la unión entre las porciones hibridadas y no hibridadas del TSO. Esto incrementa la eficacia de la conmutación del molde, incrementando la probabilidad de que el producto de extensión del cebador pueda conmutar la porción de la cola del TSO como molde. La longitud de las secuencias cortas complementarias es preferentemente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 20 nucleótidos, más preferentemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 15 nucleótidos y lo más preferible, desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 10 nucleótidos. En algunas realizaciones, la longitud es de al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 3, 5, 7, 10 nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 10, 15, 20, 25 nucleótidos. Se entiende que la longitud puede ser mayor o menor, según sea apropiado para las condiciones de reacción de los métodos de esta invención.

En algunas realizaciones, la porción 5' del TSO comprende una secuencia (de aquí en adelante "secuencia propromotora") que se diseña para la formación de un promotor bicatenario de una polimerasa de ARN. Esta realización del TSO funcionaría tanto como secuencia de terminación como para proporcionar un molde promotor. En esta realización, la secuencia propromotora del TSO sirve como molde para incorporar una secuencia propromotora (generalmente complementaria a la secuencia propromotora del TSO molde) en el producto de extensión del cebador. Una hibridación posterior de un TSO que comprende una secuencia propromotora que es hibridable con la secuencia propromotora del producto de extensión del cebador, da como resultado la formación de un promotor bicatenario, capaz de efectuar la transcripción mediante una polimerasa de ARN adecuada. Las secuencias promotoras que permiten la transcripción de un ADN molde, son conocidas en la técnica, como lo son los métodos para obtenerlas y/o prepararlas. Preferentemente, la secuencia promotora se selecciona para proporcionar una actividad transcripcional óptima de la polimerasa de ARN utilizada en particular. Los criterios para tal selección, es decir, una secuencia promotora particular, favorecida particularmente por una polimerasa de ARN particular, también son conocidos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de los promotores para la transcripción mediante una polimerasa de ARN dependiente del ADN de T7 y SP6, son conocidas en la técnica. La secuencia promotora puede ser de origen eucariota o procariota.

En una realización, la secuencia promotora es adyacente a una secuencia que está diseñada para proporcionar una transcripción mejorada u óptima, con la polimerasa de ARN utilizada. En algunas realizaciones, la secuencia no está relacionada (es decir, no se hibrida sustancialmente) con el ácido nucleico diana. Una transcripción mejor tiene lugar cuando la actividad transcripcional de la polimerasa de un promotor que está ligado funcionalmente con dicha secuencia, es mayor que la de un promotor que no está ligado. Los requerimientos de la secuencia para una transcripción óptima son conocidos generalmente en la técnica, tal y como se ha descrito previamente para diversas polimerasas de ARN dependientes de ADN, como en los documentos de patentes de EE.UU. n° 5.766.849 y 5.654.142.

En una realización preferida, un segmento de la porción 3' del TSO (que incluye la porción 3' completa que se hibri-

da con la diana) que se hibrida con el ADN molde, se fija al ADN molde de modo que se inhibe sustancialmente, o al menos suficientemente, el desplazamiento del TSO por la polimerasa que efectúa la extensión del cebador. Métodos adecuados para conseguir tal fijación, incluyen técnicas conocidas en la técnica, tal como el uso de un análogo de citosina que contiene una modificación del heterociclo del gancho G (descrita por Flanagan y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96(7):3513-8); y que encierra ácidos nucleicos (descrito, p. ej., por Kumar y col., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998, 8(16):2219-22; y Wahlestedt y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97(10):5633-8). Otros métodos adecuados incluyen el uso, cuando es apropiado, de secuencias con un alto contenido en GC y/o reticulación. Cualquiera de estos métodos para obtener una fijación mejorada se puede utilizar de forma aislada o en combinación. El desplazamiento del TSO se inhibe sustancial o suficientemente si la polimerasa conmuta el molde de la hebra de ácido nucleico diana de la porción no hibridada del TSO, en al menos aproximadamente 25%, preferentemente al menos aproximadamente 50%, más preferentemente al menos aproximadamente 75% y lo más preferido al menos aproximadamente 90% de los acontecimientos de extensión del cebador. Un desplazamiento del TSO inhibido sustancial o suficientemente también puede estar indicado empíricamente, si los métodos de amplificación conducen a un resultado satisfactorio, en cuanto a cantidad de producto deseado. Generalmente, bajo una serie de condiciones dadas de reacción, el TSO "modificado" se une más estrechamente al molde, que comparado con un TSO no modificado de este modo.

La longitud de la porción del TSO que se hibrida con la hebra de ácido nucleico diana, es preferentemente desde aproximadamente 5 hasta 50 nucleótidos, más preferentemente desde aproximadamente 20 hasta 45 nucleótidos y lo más preferido desde aproximadamente 25 a 40 nucleótidos. En otras realizaciones, la longitud es al menos de aproximadamente cualquiera entre las siguientes: 10, 15, 20, 25, 30; y menos de aproximadamente cualquiera entre las siguientes: 35, 40, 45, 50, 55. Se entiende que la longitud puede ser mayor o menor, según sea apropiado para las condiciones de reacción de los métodos de esta invención. La complementariedad de la porción del TSO que se hibrida con la hebra de ácido nucleico diana es preferentemente de al menos aproximadamente 25%, más preferentemente al menos aproximadamente 50%, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 75% y lo más preferido al menos aproximadamente 90%, con la secuencia a la que se pretende unir en el ácido nucleico diana.

Secuencia de bloqueo

En algunas realizaciones, la secuencia de terminación de la extensión del cebador es proporcionada por una secuencia de bloqueo. La secuencia de bloqueo es un polinucleótido, generalmente un polinucleótido sintético que es monocatenario y que comprende una secuencia que es hibridable, preferentemente complementaria a un segmento de la secuencia de ácido nucleico diana de la posición en la secuencia diana que es complementaria al extremo 3' del producto de extensión del cebador ("sitio de terminación"). El bloqueador comprende nucleótidos que se unen al ácido nucleico diana con una afinidad, preferentemente una alta afinidad, de modo que la secuencia de bloqueo resiste el desplazamiento con la polimerasa de ADN en el transcurso de la extensión del cebador, en preferentemente, más de aproximadamente 30%, más preferentemente más de aproximadamente 50%, incluso más preferentemente más de aproximadamente 75% y lo más preferido, más de aproximadamente 90% de los acontecimientos de extensión del cebador. La longitud y la composición del polinucleótido de bloqueo deben ser tales que se evite una hibridación no específica al azar excesiva, bajo las condiciones de los métodos de la presente invención. La longitud del polinucleótido de bloqueo es preferentemente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 30 nucleótidos, más preferentemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 25 nucleótidos, incluso más preferentemente desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 20 nucleótidos y lo más preferido desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 15 nucleótidos. En otras realizaciones, el polinucleótido de bloqueo tiene al menos aproximadamente cualquiera entre los siguientes: 3, 5, 8, 10, 15; y menos de aproximadamente cualquiera entre los siguientes: 20, 25, 30, 35. Se entiende que la longitud puede ser mayor o menor, según sea apropiado con las condiciones de reacción de los métodos de esta invención. La complementariedad del polinucleótido de bloqueo es preferentemente de al menos aproximadamente 25%, más preferentemente al menos aproximadamente 50%, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 75% y lo más preferido al menos aproximadamente 90% con la secuencia a la que se pretende unir en el ácido nucleico diana.

En una realización, la secuencia de bloqueo que comprende un segmento que se hibrida con el ADN diana está fijada al ADN diana de modo que dicho desplazamiento de la secuencia de bloqueo con la polimerasa que efectúa la extensión del cebador, está inhibido sustancial o al menos suficientemente. Medios adecuados para conseguir dicha fijación y para determinar sustancial o suficientemente la inhibición del desplazamiento, son como los descritos anteriormente para el TSO empleado en los métodos de la presente invención.

En una realización, el polinucleótido de bloqueo no puede actuar de forma eficaz como cebador para la extensión del ácido nucleico (es decir, la extensión de la secuencia de bloqueo está reducida o inhibida). Las técnicas para bloquear la función del cebador del polinucleótido de bloqueo incluyen cualquiera que evite la adición de nucleótidos al extremo 3' del cebador con una polimerasa de ADN. Tales técnicas son conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la sustitución o la modificación del grupo 3' hidroxilo o la incorporación de un nucleótido modificado, tal como un didesoxinucleótido, en la posición más 3' del polinucleótido de bloqueo que no es capaz de anclar la adición de nucleótidos con una polimerasa de ADN.

Polinucleótido que comprende un propromotor y una región que se hibrida con un producto de extensión del cebador desplazado

Algunas realizaciones emplean un polinucleótido que comprende un propromotor y una región que se hibrida con un producto de extensión del cebador desplazado. En algunas realizaciones, el polinucleótido es un TSO que contiene una secuencia propromotora, tal y como se ha descrito anteriormente. En otras realizaciones, la secuencia propromotora está contenida en un PTO, tal y como se describe a continuación.

5 Oligonucleótido molde propromotor

En algunas realizaciones, los métodos de la descripción emplean una secuencia promotora para la transcripción que es proporcionada por un oligonucleótido molde propromotor (PTO).

Un PTO para uso en los kits y en las composiciones de la presente invención es un polinucleótido monocatenario, generalmente ADN, que comprende una secuencia propromotora que está diseñada para la formación de un promotor bc de una polimerasa de ARN y una porción capaz de hibridarse con el extremo 3' del producto de extensión del cebador. En una realización preferida, la secuencia propromotora está localizada en la porción 5' del oligonucleótido y la secuencia que se hibrida está localizada en la porción 3' del oligonucleótido. En una realización, y más típicamente, las secuencias del promotor y las que se hibridan se solapan en identidad de secuencia. En aún otra realización, las secuencias del promotor y las que se hibridan son secuencias diferentes. En otra realización, las secuencias del promotor y las que se hibridan son la misma secuencia y están, por tanto, en la misma posición en el PTO. En las realizaciones en las que la hibridación del PTO con el producto de extensión del cebador, dan como resultado un híbrido que comprende una parte sobresaliente (el extremo 5' del PTO que no se hibrida con el producto de extensión del cebador desplazado, que comprende típicamente toda o parte de la secuencia propromotora), la polimerasa de ADN rellena la parte sobresaliente para crear un promotor bicatenario capaz de efectuar la transcripción mediante una polimerasa de ARN adecuada.

Las secuencias promotoras que permiten la transcripción de un ADN molde, son conocidas en la técnica y se han descrito anteriormente. Preferentemente, la secuencia promotora se selecciona para proporcionar una actividad transcripcional óptima de la polimerasa de ARN particular empleada. Los criterios para dicha selección, es decir, una secuencia promotora particular, favorecida especialmente por una polimerasa de ARN particular, son también conocidos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de los promotores para la transcripción con una polimerasa de ARN dependiente de ADN de T7 y SP6, son conocidas en la técnica. La secuencia promotora puede ser de origen procarionte o eucarionte.

En algunas realizaciones, el PTO comprende una secuencia intercalada entre una secuencia propromotora y una porción capaz de hibridarse con el extremo 3' del producto de extensión del cebador. La longitud adecuada de la secuencia intercalada se puede determinar empíricamente y puede tener al menos aproximadamente 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 nucleótidos. La identidad de secuencia adecuada de la secuencia intercalada, también se puede determinar empíricamente y la secuencia se diseña para mejorar preferentemente, pero no necesariamente, el grado de amplificación, comparado con la omisión de secuencia. En una realización, la secuencia intercalada es una secuencia que está diseñada para proporcionar una transcripción mejorada u óptima, con la polimerasa de ARN empleada. Generalmente, la secuencia no está relacionada (es decir, no se hibrida sustancialmente) con el ácido nucleico di-
ana. Una transcripción óptima tiene lugar cuando la actividad transcripcional de la polimerasa de un promotor que está enlazado funcionalmente con dicha secuencia, es mayor que la de un promotor que no está enlazado. Los requerimientos de la secuencia para una transcripción óptima, se conocen generalmente en la técnica, como se ha descrito previamente para diversas polimerasas de ARN dependientes de ADN, tal como en los documentos de patentes de EE.UU. nº 5.766.849 y 5.654.142, y también se pueden determinar empíricamente.

En otra realización, el PTO comprende una secuencia que está 5' en relación con la secuencia propromotora, es decir, el PTO comprende nucleótidos adicionales (que pueden ser o no secuencias reguladoras de la transcripción) situados 5' de la secuencia propromotora. Generalmente, pero no necesariamente, la secuencia no es hibridable con el producto de extensión del cebador.

En una realización, el PTO no puede actuar eficazmente como cebador para la extensión de ácidos nucleicos. Las técnicas para bloquear la función cebadora del PTO incluyen cualquiera que evite la adición de nucleótidos en el extremo 3' del PTO con una polimerasa de ADN. Tales técnicas son conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la sustitución o la modificación del grupo 3' hidroxilo o la incorporación de un nucleótido modificado, tal como un didesoxinucleótido, en la posición más 3' el PTO que no es capaz de anclar la adición de nucleótidos con una polimerasa de ADN. También es posible bloquear el extremo 3' empleando un marcador o una molécula pequeña que es un miembro de una pareja de unión específica, tal como biotina.

La longitud de la porción del PTO que se hibrida con el producto de extensión del cebador desplazado es preferentemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 50 nucleótidos, más preferentemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 40 nucleótidos, incluso más preferentemente desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 35 nucleótidos y lo más preferido desde aproximadamente 20 a 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, la porción que se hibrida tiene al menos aproximadamente cualquiera entre las siguientes: 3, 5, 10, 15, 20; y menos de aproximadamente cualquiera entre las siguientes: 30, 40, 50, 60. La complementariedad de la porción que se hibrida es preferentemente de al menos aproximadamente 25%, más preferentemente al menos aproximadamente 50%, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 75% y lo más preferido al menos aproxima-

madamente 90% con la secuencia a la que se pretende unir en el ácido nucleico diana.

Polimerasa de ADN, ribonucleasa y polimerasa de ARN

Los métodos de amplificación de la descripción emplean las siguientes enzimas: una polimerasa de ADN, una ribonucleasa tal como ARNasaH y, opcionalmente, una polimerasa de ARN dependiente de ADN.

5 Las polimerasas de ADN para uso en los kits y en las composiciones de la presente invención son capaces de efectuar la extensión del cebador compuesto de acuerdo con los métodos de la presente invención. Por tanto, una polimerasa preferida es una que es capaz de extender un cebador de ácido nucleico a lo largo de un molde de ácido nucleico que está compuesto, al menos predominantemente, por desoxinucleótidos. La polimerasa tiene que ser capaz de desplazar una hebra de ácido nucleico desde el polinucleótido al que está unida la hebra desplazada y, generalmente, es preferible cuando la polimerasa muestra la mayor capacidad de desplazamiento de la hebra (es decir, comparado con otras polimerasas que no tienen mucha capacidad de desplazar la hebra). Preferentemente, la polimerasa de ADN tiene una alta afinidad por la unión con el extremo 3' de un oligonucleótido hibridado con una hebra de ácido nucleico. Preferentemente, la polimerasa de ADN no posee sustancialmente una actividad de corte. Preferentemente, la polimerasa tiene una actividad exonucleasa 5'→3' reducida o inexistente, de modo que se minimiza la degradación del cebador, la terminación o los polinucleótidos de extensión del cebador. Generalmente, esta actividad exonucleasa depende de factores tales como el pH, la concentración salina, de si el molde es mono o bicatenario, etc., todos ellos son conocidos por un experto en la técnica. Las polimerasas de ADN mutantes en las que la actividad exonucleasa 5'→3' ha sido delecionada, son conocidas en la técnica y son adecuadas para los métodos de amplificación descritos en esta memoria. Las polimerasas de ADN adecuadas para el uso en los métodos y las composiciones de la presente invención, incluyen las descritas en los documentos de patente de EE.UU. n° 5.648.211 y 5.744.312, que incluyen exo Vent (New England Biolabs), exo Deep Vent (New England Biolabs), Bst (BioRad), exo Pfu (Stratagene), Bca (Panvera), sequencing grade Taq (Promega) y polimerasas de ADN termoestables procedentes de termoanaerobacter termohidrosulfuricus. Se prefiere que la polimerasa de ADN desplace los productos de extensión del cebador del ácido nucleico molde en al menos aproximadamente 25%, más preferentemente al menos aproximadamente 50%, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 75% y lo más preferible al menos aproximadamente 90% de la incidencia de contacto entre la polimerasa y el extremo 5' del producto de extensión del cebador. En algunas realizaciones, se prefiere el uso de polimerasas de ADN termoestables con actividad de desplazamiento de la hebra. Tales polimerasas se conocen en la técnica, tal y como se describe en el documento de patente de EE.UU. n° 5.744.312 (y referencias citadas en la memoria). Preferentemente, la polimerasa de ADN tiene una actividad reducida o no tiene actividad de corrección de pruebas.

La ribonucleasa para uso en los kits y las composiciones de la presente invención es capaz de cortar ribonucleótidos en un híbrido de ARN/ADN. Preferentemente, la ribonucleasa corta ribonucleótidos sin tener en cuenta la identidad y el tipo de nucleótidos adyacentes al ribonucleótido que se va a cortar. Se prefiere que la ribonucleasa corte independientemente de la identidad de secuencia. Ejemplos de ribonucleasas adecuadas para los métodos y las composiciones de la presente invención, son bien conocidos en la técnica, incluyendo la ribonucleasa H (ARNasaH).

Las polimerasas de ARN dependientes de ADN para usar en los kits y las composiciones de la presente invención, son conocidas en la técnica. Se pueden utilizar polimerasas eucariotas o procariotas. Los ejemplos incluyen polimerasas de ARN de T7, T3 y SP6. Generalmente, la polimerasa de ARN seleccionada es capaz de transcribir desde la secuencia promotora proporcionada por el TSO o el PTO, tal y como se ha descrito en esta memoria. Generalmente, la polimerasa de ARN es una polimerasa dependiente de ADN que es preferentemente capaz de transcribir a partir de un molde de ADN monocatenario mientras que la región del promotor sea bicatenaria.

En general, las enzimas empleadas incluidas en los métodos y las composiciones de la presente invención, no deben producir una degradación sustancial de los componentes de ácido nucleico de dichos métodos y composiciones.

Condiciones de reacción y detección

45 Los medios de reacción y las condiciones adecuadas para llevar a cabo los métodos de la presente descripción, son los que permiten la amplificación de ácidos nucleicos según los métodos de la presente descripción. Tales medios y condiciones son conocidos por personas expertas en la técnica y se describen en diversas publicaciones, tales como los documentos de patentes de EE.UU. n° 5.679.512 y PCT n° de pub. WO99/42618. Por ejemplo, un tampón puede ser tampón Tris, aunque también se pueden utilizar otros tampones, mientras que los componentes del tampón no inhiban los componentes enzimáticos de los métodos de la invención. El pH es preferentemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 11, más preferentemente desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 10, incluso más preferible desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 9 y lo más preferible desde aproximadamente 7,5 hasta aproximadamente 8,5. El medio de reacción también puede incluir iones metálicos bivalentes, tales como Mg²⁺ o Mn²⁺, con una concentración final de iones libres que está dentro del intervalo desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 10 mM y lo más preferible desde aproximadamente 1 hasta 5 mM. El medio de reacción también puede incluir otras sales, tales como KCl que contribuye a la fuerza iónica total del medio. Por ejemplo, el intervalo de una sal tal como KCl, es preferentemente desde aproximadamente 0 hasta aproximadamente 100 mM, más preferentemente desde aproximadamente 0 hasta aproximadamente 75 mM y lo más preferible desde aproximadamente 0 hasta aproximadamente 50 mM. El medio de reacción puede incluir adicionalmente aditivos que

podrían afectar a la realización de las reacciones de amplificación, pero que no son constituyentes de la actividad de los componentes enzimáticos de los métodos. Tales aditivos incluyen proteínas tales como BSA y detergentes no iónicos tales como NP40 o Triton. Los reactivos, tales como DTT, que son capaces de mantener actividades enzimáticas, también se pueden incluir. Tales reactivos son conocidos en la técnica. Si es adecuado, se puede incluir un inhibidor de ARNasa (tal como ARNasina) que no inhibe la actividad de la ARNasa empleada en el método. Cualquier aspecto de los métodos de la presente descripción puede tener lugar a la misma temperatura o a temperaturas diversas. Preferentemente, las reacciones se realizan isotérmicamente, lo que evita el complicado proceso de termociclado. La reacción de amplificación se realiza a una temperatura que permite la hibridación de los oligonucleótidos (cebador, TSO, secuencia de bloqueo y/o PTO) de la presente invención con el polinucleótido molde y que no inhibe sustancialmente la actividad de las enzimas empleadas. La temperatura puede estar en el intervalo de preferentemente aproximadamente 25°C hasta aproximadamente 85°C, más preferentemente aproximadamente 30°C hasta aproximadamente 75°C y lo más preferible aproximadamente 37°C hasta aproximadamente 70°C. En algunas realizaciones que incluyen la transcripción de ARN, la temperatura para las etapas de la transcripción es menor que la(s) temperatura(s) de las etapas precedentes. En estas realizaciones, la temperatura de las etapas de transcripción pueden estar en el intervalo de preferentemente aproximadamente 25°C hasta aproximadamente 80°C, más preferentemente aproximadamente 30°C hasta aproximadamente 75°C y lo más preferible aproximadamente 37°C hasta aproximadamente 70°C.

El nucleótido y/o análogos de nucleótidos, tales como trifosfatos de desoxirribonucleósidos que se pueden emplear para la síntesis de los productos de extensión del cebador en los métodos de la descripción, se proporcionan en una cantidad desde preferentemente aproximadamente 50 hasta aproximadamente 2500 μM , más preferentemente aproximadamente 100 hasta aproximadamente 2000 μM , incluso más preferentemente aproximadamente 500 hasta aproximadamente 1700 μM , y lo más preferido aproximadamente 800 hasta aproximadamente 1500 μM . En algunas realizaciones, se incluye un nucleótido o un análogo de nucleótido cuya presencia en la hebra de extensión del cebador mejora el desplazamiento de la hebra (por ejemplo, provocando un emparejamiento de bases que es más débil que el emparejamiento convencional de bases AT, CG). Tal nucleótido o análogos de nucleótidos incluye desoxiinosina y otras bases modificadas, todas ellas conocidas en la técnica. Los nucleótidos y/o análogos, tales como trifosfatos de ribonucleósidos, que se pueden emplear para la síntesis de los transcritos de ARN en los métodos de la descripción, se proporcionan en una cantidad desde preferentemente aproximadamente 0,25 hasta aproximadamente 6 mM, más preferentemente aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 5 mM, incluso más preferentemente aproximadamente 0,75 hasta aproximadamente 4 mM y lo más preferible aproximadamente 1 hasta aproximadamente 3 mM.

Los componentes oligonucleótidos de las reacciones de amplificación de la invención están generalmente en exceso para la cantidad de secuencia de ácidos nucleicos diana que se va a amplificar. Se pueden proporcionar en una forma que se multiplique aproximadamente o al menos por cualquiera de las siguientes: 10, 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 , 10^{10} , 10^{12} veces la cantidad de ácido nucleico diana. Los cebadores compuestos, TSO, PTO y la secuencia de bloqueo se pueden proporcionar cada uno con aproximadamente o al menos cualquiera de las siguientes concentraciones: 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1000 nM, 2500 nM, 5000 nM.

En una realización, los componentes anteriores se añaden simultáneamente al comienzo del proceso de amplificación. En otra realización, los componentes se añaden con cualquier orden, antes o después de los momentos adecuados durante el proceso de amplificación, según sea necesario y/o esté permitido por la reacción de amplificación. Tales momentos, algunos de los cuales se indican a continuación, pueden ser identificados fácilmente por un experto en la técnica. Las enzimas empleadas para la amplificación de ácidos nucleicos según los métodos de la presente descripción, se pueden añadir a la mezcla de reacción antes de la etapa de desnaturalización del ácido nucleico, después de la etapa de desnaturalización o después de la hibridación del cebador y/o la secuencia de bloqueo con el ADN diana, tal y como se determina por su estabilidad térmica y/o otras consideraciones conocidas por el experto en la técnica.

Las reacciones de amplificación se pueden detener en diversos momentos y reanudar un tiempo después. Dichos momentos pueden ser identificados fácilmente por un experto en la técnica. Los métodos para detener las reacciones son conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, enfriar la mezcla de reacción a una temperatura que inhibe la actividad enzimática. Métodos para reanudar las reacciones son también conocidos en la técnica, por ejemplo, aumentar la temperatura de la mezcla de reacción hasta una temperatura que permita la actividad enzimática. En algunas realizaciones, uno o varios de los componentes de las reacciones se reponen antes, durante o después de la reanudación de las reacciones. Alternativamente, la reacción se puede dejar transcurrir la reacción (es decir, desde el comienzo hasta el final) sin interrupciones.

La detección del producto de amplificación es indicativa de la presencia de la secuencia diana. También es viable un análisis cuantitativo. Los métodos de detección directa o indirecta (incluyendo cuantificación) son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, comparando la cantidad de producto amplificado de una muestra del ensayo que contiene una cantidad desconocida de un polinucleótido que contiene una secuencia diana con el producto de la amplificación de una muestra de referencia, que tiene una cantidad conocida de un polinucleótido que contiene la secuencia diana, se puede determinar la cantidad de secuencia diana en la muestra del ensayo. Los métodos de amplificación de la presente invención también se pueden extender al análisis de alteraciones de la secuencia y secuenciación del ácido nucleico diana. Además, la detección podría realizarse, por ejemplo, mediante el examen de los productos de

la traducción de los productos de la amplificación del ARN.

Métodos de amplificación de la presente descripción

Lo siguiente son ejemplos de los métodos de amplificación de la descripción. Se entiende que se pueden poner en práctica otras realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente. Por ejemplo, la referencia al uso de un cebador compuesto, significa que se puede utilizar cualquiera de los cebadores compuestos descritos en esta memoria.

En un aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para amplificar una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos diana. En este método, se consigue una amplificación isotérmica y lineal de la secuencia de ácidos nucleicos. En otro aspecto, se describe un método para amplificar una secuencia de polinucleótidos diana, en donde el producto amplificado es un ARN transcrito, al que se hace referencia a veces en esta memoria como método de amplificación lineal "mejorado". En una realización, se describe un método para amplificar de forma mejorada, lineal e isotérmicamente una secuencia de ácidos nucleicos que se basa en TSO (de aquí en adelante "Método 1"). En otra realización, se describe un método de amplificación mejorada, isotérmica y lineal de la secuencia de ácidos nucleicos que se basa en la secuencia de bloqueo y en un PTO (de aquí en adelante, "Método 2").

Amplificación lineal de la secuencia de ácidos nucleicos que da como resultado un producto de ADN complementario

Cuando no está ligado a la transcripción, el método de amplificación de la descripción proporciona una amplificación isotérmica lineal de una secuencia de ácidos nucleicos diana. El método utiliza un solo cebador compuesto. En una realización, el método también emplea una secuencia de terminación, tal como una secuencia de bloqueo como la descrita en el Método 2 o un TSO, como se describe en el Método 1. Los Métodos 1 y 2 se describen a continuación. Mientras que la amplificación lineal no esté ligada a la transcripción, los componentes y las etapas que conducen a la formación de un complejo que comprende una secuencia promotora para una polimerasa de ARN dependiente de ADN, no están incluidos.

La secuencia de terminación (TSO o el componente de secuencia de bloqueo, si se emplea) se añade para producir un producto con extremo 3' definido. En algunas realizaciones, una(s) secuencia(s) natural dentro del molde 5' del sitio de unión del cebador, inhibe la polimerización del ácido nucleico de modo que se consigue la terminación de la extensión del cebador. Tales secuencias naturales son conocidas en la técnica, por ejemplo, secuencias ricas en GC o se pueden determinar empíricamente. El uso de una secuencia de terminación es particularmente beneficioso cuando se amplifica ADN genómico, de modo que se proporciona un extremo definido de la extensión del cebador. Cuando no se desea esta característica, la amplificación lineal e isotérmica de acuerdo con los métodos de la descripción, se puede realizar sin una secuencia de terminación. La amplificación isotérmica y lineal utiliza adicionalmente dos enzimas, una polimerasa de ADN y una ribonucleasa tal como una ARNasaH. La descripción esquemática de la amplificación lineal e isotérmica de ácidos nucleicos de la invención, se muestra en la Figura 1A-C.

De forma similar a los Métodos 1 y 2, tal y como se describe a continuación, el método de amplificación lineal se diseña para amplificar una diana de ADN monocatenario. Cuando la diana que se va a amplificar es ADNbc, la diana se desnaturaliza en primer lugar para producir una diana monocatenaria. La desnaturalización de la diana se puede realizar empleando métodos conocidos en la técnica, tal como tratamiento térmico o alcalino. Cuando la diana es un ARN monocatenario, tal como ARNm o ARN vírico, la diana se transcribe en primer lugar para producir diana de ADNc, según métodos conocidos en la técnica.

Tal y como se muestra en la Figura 1A-C, el método de amplificación lineal e isotérmico de la invención comprende etapas similares a las etapas iniciales de los métodos de amplificación lineal mejorada (Métodos 1 y 2) descritos a continuación y en las Figuras 2A-C y 3A-D. El ácido nucleico diana se combina con un cebador compuesto, una polimerasa de ADN, una ribonucleasa tal como ARNasaH y, opcionalmente, con un componente de secuencia de bloqueo o TSO, tal y como se ha descrito anteriormente. En una realización, cada reacción de amplificación incluye cebadores compuestos de una secuencia idéntica. En otra realización, cada reacción de amplificación incluye una mezcla de variantes de cebador compuesto, en donde las variantes representan dos o más secuencias homólogas pero no idénticas y en donde todas son capaces de hibridarse con la misma secuencia de ácido nucleico diana. La complementariedad es preferentemente de al menos aproximadamente 50%, más preferentemente al menos aproximadamente 75% y lo más preferible al menos aproximadamente 90%. Las ventajas de esta realización incluyen la capacidad de introducir diferentes secuencias de interés en los productos de extensión del cebador. En aún otra realización, cada reacción de amplificación incluye una mezcla de cebadores compuestos, en donde los cebadores representan dos o más secuencias no idénticas que tienen poca o ninguna homología, y en donde los cebadores se hibridan preferentemente con diferentes secuencias de ácido nucleico diana o sitios diferentes a lo largo de la misma hebra de ácido nucleico diana. Las ventajas de esta realización incluyen la detección múltiple y/o el análisis de ácidos nucleicos diana a través de la amplificación de una variedad de especies de ácido nucleico diana en una sola reacción de amplificación.

La Figura 1A-C ilustra una realización que incluye una secuencia de terminación. El cebador compuesto y la secuencia de terminación (TSO o componente de secuencia de bloqueo) se hibridan con la misma hebra de la diana,

para formar un complejo trimolecular, XX (Figura 1A-C). El extremo 3' del cebador compuesto se extiende a lo largo de la hebra diana mediante la polimerasa, hasta el sitio de hibridación del TSO o del componente de la secuencia de bloqueo, para obtener un complejo XXI (Figura 1A-C). Una ribonucleasa, tal como ARNasaH, corta el ARN, generalmente la porción de ARN 5' del cebador extendido del complejo XXI (Figura 1A-C) para producir el complejo XXII (Figura 1A-C). Un segundo cebador compuesto se une con el complejo XXII (Figura 1A-C) mediante hibridación de la porción de ARN, generalmente la porción de ARN 5', para producir el complejo XXIII (Figura 1A-C). La porción 3' libre del cebador compuesto unido desplaza entonces el extremo 5' del producto de extensión del cebador y se hibrida con la diana para formar el complejo XXIV (Figura 1A-C). La hibridación del extremo 3' del cebador compuesto con la diana está favorecida generalmente sobre la hibridación del extremo 5' del producto de extensión del cebador, puesto que el extremo 3' hibridado del cebador es un sitio de unión de la polimerasa de ADN que extenderá entonces el extremo 3' del cebador a lo largo de la diana. La extensión del cebador da como resultado el desplazamiento del primer producto de extensión del cebador para producir el complejo XXV (Figura 1A-C). El procedimiento se repite para conseguir múltiples productos de desplazamiento del ADN monocatenario que son generalmente complementarios a la secuencia diana.

El ADN monocatenario (es decir, los productos de extensión del cebador desplazados) del método de amplificación lineal e isotérmica, se detectan fácilmente mediante cualquiera de los numerosos métodos de detección conocidos en la técnica. Se han descrito previamente diversos métodos de detección homogéneos y heterogéneos, adecuados para la detección de moléculas de ácido nucleico monocatenario, incluyendo la identificación por el tamaño y/o propiedades de migración en electroforesis en gel, o por hibridación de sondas específicas de la secuencia.

La detección del producto de amplificación es indicativa de la presencia de la secuencia diana. El análisis cuantitativo también es posible. Por ejemplo, comparando la cantidad de producto amplificado de una muestra del ensayo que contiene una cantidad desconocida de un polinucleótido que contiene una secuencia diana, con el producto de amplificación de una muestra de referencia que tiene una cantidad conocida de un polinucleótido que contiene la secuencia diana, se puede determinar la cantidad de secuencia diana en la muestra del ensayo. Los métodos de amplificación de la presente descripción también se puede extender al análisis de alteraciones de la secuencia y a la secuenciación del ácido nucleico diana.

Se puede esperar la producción de al menos 1, al menos 10, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 1000, al menos aproximadamente 10^5 , al menos aproximadamente 10^7 , al menos aproximadamente 10^9 , al menos aproximadamente 10^{12} copias complementarias de cada copia del polinucleótido molde, conduciendo, por tanto, hasta al menos 1, al menos 10, al menos 100, al menos 1000, al menos aproximadamente 10^5 , al menos aproximadamente 10^7 , al menos aproximadamente 10^9 , al menos aproximadamente 10^{12} veces una mejora en relación con cada copia del polinucleótido molde.

Amplificación lineal mejorada que da como resultado un producto de ARN transcrito

La presente descripción también proporciona métodos para amplificar una secuencia de polinucleótidos diana, en donde el producto amplificado es ARN que contiene la secuencia transcrita (es decir, la misma secuencia que la diana). La amplificación de un ácido nucleico diana de acuerdo con el Método 1, que da como resultado la generación de un único producto de amplificación intermedio que comprende la diana y porciones relacionadas con el oligonucleótido conmutador del molde (TSO), proporciona el acoplamiento de la amplificación lineal con la transcripción. El complejo formado por la hibridación del oligonucleótido conmutador del molde y el producto de extensión del cebador desplazado es un sustrato para la transcripción con la polimerasa de ARN, que genera un producto de ARN transcrito igual que la secuencia diana inicial. De forma similar, la amplificación de la diana de ácido nucleico según el Método 2, da como resultado la formación de un producto de extensión del cebador desplazado que, cuando se hibrida con el oligonucleótido molde del promotor, forma un complejo que es un sustrato para la polimerasa de ARN. Como en el Método 1, este procedimiento da como resultado el acoplamiento de la amplificación lineal con la transcripción. Se espera que la producción sea preferentemente al menos aproximadamente 1, más preferentemente al menos aproximadamente 50, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 75, aún más preferentemente al menos aproximadamente 100 y lo más preferible al menos aproximadamente 1000 productos transcritos de ARN a partir de cada producto de extensión del cebador, conduciendo, por tanto, a preferentemente al menos aproximadamente 1, más preferentemente al menos aproximadamente 50, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 75, todavía más preferentemente al menos aproximadamente 100 y lo más preferido al menos aproximadamente 1000 veces una mejora en relación con los métodos de amplificación no relacionados con la transcripción.

A continuación hay dos métodos a modo de ejemplo.

Método 1 - Amplificación lineal mejorada de ácidos nucleicos basada en TSO

En una realización, el método de amplificación lineal basada en TSO de la presente descripción está ligado a la transcripción de los productos de extensión del cebador para proporcionar una amplificación mejorada de los ácidos nucleicos. Una descripción esquemática de este nuevo método de amplificación, Método 1, se muestra en la Figura 2A-C.

El método de amplificación de ácidos nucleicos basado en TSO de la descripción, emplea un cebador compuesto aislado, tal y como se ha descrito anteriormente. Un segundo oligonucleótido empleado en el método de amplificación de la invención, es un oligonucleótido conmutador del molde (TSO), también tal y como se ha descrito anteriormente. El método de amplificación de la descripción emplea las siguientes enzimas: una polimerasa de ADN, una ribonucleasa tal como ARNasaH y una polimerasa de ARN dependiente de ADN. La diana de ácido nucleico que se va a amplificar puede ser de ADN o ARN. La amplificación de una diana de ARN requerirá una síntesis inicial de ADNc, tal y como se conoce en la técnica.

El nuevo método de amplificación lineal mejorada basada en TSO de la presente descripción, puede producir múltiples copias de un producto de ARN homólogo (es decir, la hebra transcrita) con la secuencia de ADN diana.

El ácido nucleico diana monocatenario se combina con el cebador compuesto, un oligonucleótido TSO, polimerasa de ADN, ribonucleasa tal como ARNasaH, una polimerasa de ARN dependiente de ADN y nucleótidos, tales como trifosfatos de desoxirribonucleósidos (dNTPs) y trifosfatos de ribonucleósidos (rNTPs) en un medio de reacción adecuado para la hibridación y la amplificación de ácidos nucleicos, tal y como se conoce en la técnica. El medio de reacción adecuado y las condiciones, se han descrito anteriormente. En una realización, la transcripción se realiza a una temperatura diferente, generalmente menor que la de las etapas precedentes. En otra realización, todas las etapas de los métodos se realizan de forma isotérmica.

En una realización, cada reacción de amplificación incluye cebadores compuestos de una secuencia idéntica. En otra realización, cada reacción de amplificación incluye una mezcla de variantes de cebador compuesto, en donde las variantes representan dos o más homólogos, pero no secuencias idénticas y en donde todas son capaces de hibridarse con la misma secuencia de ácido nucleico diana. La homología (identidad de secuencia) es preferentemente de al menos aproximadamente 50%, más preferentemente al menos aproximadamente 75% y lo más preferible al menos aproximadamente 90%. Las ventajas de esta realización incluyen la capacidad de introducir diferentes secuencias de interés en los productos de extensión del cebador. En aún otra realización, cada reacción de amplificación incluye una mezcla de cebadores compuestos, en donde los cebadores representan dos o más secuencias no idénticas que tienen baja homología o ninguna, y en donde los cebadores se hibridan preferentemente con diferentes secuencias de ácidos nucleicos diana o diferentes sitios a lo largo de la misma hebra de ácido nucleico diana. Las ventajas de esta realización incluyen la detección múltiple y/o el análisis de ácidos nucleicos diana mediante la amplificación de una pluralidad de especies de ácido nucleico diana en una sola reacción de amplificación.

En una realización, el TSO actúa como una secuencia de terminación y proporciona una secuencia propromotora. En otra realización, el TSO no comprende una secuencia propromotora. En esta realización, una secuencia propromotora es proporcionada separadamente por otro oligonucleótido, tal como un PTO, que comprende una secuencia propromotora y que es hibridable con la porción 3' del producto de extensión del cebador, de modo que puede tener lugar la transcripción del producto de extensión del cebador.

El cebador compuesto aislado y el TSO se hibridan entonces con la misma hebra del ácido nucleico que se va a amplificar. Los dos oligonucleótidos se pueden añadir a la muestra que se sospecha que contiene la diana de ácido nucleico antes de la etapa de desnaturalización del ácido nucleico diana. La hibridación de los dos oligonucleótidos con la hebra diana da como resultado la formación del complejo trimolecular I (Figura 2A-C).

Una polimerasa de ADN realiza la extensión del cebador. El cebador se extiende a lo largo de la hebra de ácido nucleico diana del complejo I (Figura 2A-C), hasta el sitio de hibridación de TSO. La conmutación del molde desde la hebra diana hasta la porción 5' no hibridada del TSO y la extensión adicional del cebador a lo largo del molde TSO, da como resultado la formación del complejo trimolecular II. El último comprende un ácido nucleico diana, el TSO y el primer producto de la extensión del cebador. El primer producto de extensión del cebador es un ADN único que comprende una porción dependiente de la diana (es decir, una secuencia complementaria al ácido nucleico diana) y una porción dependiente de TSO (es decir, una secuencia complementaria a la porción no hibridada del TSO).

El complejo II (Figura 2A-C) es un sustrato para una polimerasa de ARN y una ribonucleasa tal como una ARNasaH. La polimerasa de ARN dependiente de ADN se une al promotor bc funcional del complejo II y transcribe el primer producto de extensión del cebador para producir un producto III de ARN transcrito (Figura 2A-C). Una ribonucleasa, tal como ARNasaH, que es específica de la degradación de la hebra de ARN de un heterohíbrido de ARN/ADN, degrada la porción 5' del producto de extensión del cebador en el complejo II, para formar el complejo trimolecular IV.

El cebador compuesto libre se hibrida con el sitio complementario del cebador del complejo IV del ácido nucleico diana (Figura 2A-C). Esta hibridación da como resultado la formación del complejo V (Figura 2A-C) en el que la porción de ARN, generalmente la porción de ARN5' del cebador se hibrida con la hebra diana. El desplazamiento de la porción más 5' del producto de extensión del cebador por la porción de ADN 3' del cebador parcialmente hibridado, dará como resultado la formación del complejo VI (Figura 2A-C) que es un sustrato de una polimerasa de ADN. La extensión del cebador a lo largo de la hebra diana (VII; Figura 2A-C), da como resultado el desplazamiento del primer producto de extensión del cebador del complejo. Las extensiones repetidas del cebador y los desplazamientos de la hebra, dan como resultado la generación de copias múltiples de polinucleótidos que son al menos sustancialmente complementarias al ácido nucleico diana.

El producto de extensión del cebador generado tal y como se ha descrito anteriormente, se emplea como molde para la transcripción en la realización, en donde se proporciona el TSO que comprende una secuencia propromotora. El producto de extensión del cebador desplazado (VIII; Figura 2A-C) se hibrida con el oligonucleótido TSO libre para formar el híbrido IX parcial (Figura 2A-C). El complejo (híbrido) IX comprende una porción bicatenaria en un extremo y dos hebras aisladas no complementarias, obtenidas respectivamente a partir del producto de extensión del cebador y del TSO. La porción bicatenaria de este híbrido parcial contiene un promotor bicatenario totalmente funcional para la polimerasa de ARN dependiente de ADN. El último se une al promotor del híbrido parcial IX y se transcribe el producto de extensión del cebador para formar copias múltiples de un producto X de ARN transcrito (Figura 2A-C).

Los productos de la amplificación descrita anteriormente, se pueden detectar por métodos de detección homogéneos o heterogéneos, incluyendo la identificación por tamaño y/o las propiedades de migración en electroforesis en gel o por hibridación de sondas específicas de la secuencia. La detección del producto de amplificación es indicativa de la presencia del ácido nucleico diana. El análisis cuantitativo también es viable. Por ejemplo, comparando la cantidad de producto amplificado procedente de una muestra del ensayo que contiene una cantidad desconocida de un polinucleótido que contiene una secuencia diana para el producto de amplificación de una muestra de referencia, que tiene una cantidad conocida de un polinucleótido que contiene la secuencia diana, se puede determinar la cantidad de secuencia diana en la muestra del ensayo. Una extensión adicional del nuevo método de amplificación para analizar una alteración de la secuencia y la secuenciación del ácido nucleico diana, también son factibles, tal y como se describe a continuación.

Método 2 - Amplificación mejorada de ácidos nucleicos basándose en la secuencia de bloqueo

En otra realización, el método de amplificación lineal basado en la secuencia de bloqueo de la presente descripción, está ligado a la transcripción de los productos de extensión del cebador, para proporcionar una amplificación mejorada de los ácidos nucleicos. Esta amplificación alternativa, lineal y mejorada, Método 2, que no implica una etapa de conmutación del molde, se muestra en la Figura 3A-D.

El Método 2 utiliza el cebador compuesto aislado, como en el Método 1, tal y como se ha descrito anteriormente, un componente de la secuencia de bloqueo que es un oligonucleótido o un análogo de oligonucleótido que, como se ha descrito anteriormente, es capaz adicionalmente de hibridarse con una secuencia en la misma hebra de ácido nucleico diana que el cebador aislado, y un tercer oligonucleótido, el molde promotor (PTO) que, como se ha descrito anteriormente, comprende una porción 3' que es capaz de hibridarse (y que es preferentemente complementaria) al extremo 3' del producto de extensión desplazado y una porción 5' que incluye en su extremo 5' una secuencia de un promotor para una polimerasa de ARN dependiente de ADN. Tal y como se ha descrito anteriormente en el TSO, la secuencia inmediatamente adyacente a la secuencia promotora está diseñada para proporcionar preferentemente una actividad transcripcional óptima, mediante la polimerasa de ADN empleada en la amplificación, según el método de la invención. El componente de la secuencia de bloqueo se diseña para hibridar la secuencia diana en un sitio que está localizado aguas arriba, hacia el extremo 5' de la diana, en relación con el sitio de hibridación del cebador aislado. Expuesto de forma alternativa y tal y como se ha descrito anteriormente, la secuencia de bloqueo se hibrida con un segmento de la secuencia de ácido nucleico diana 5' de la posición en la secuencia diana que es complementaria al extremo 3' del producto de extensión del cebador. La secuencia de bloqueo se une con afinidad suficientemente alta para bloquear la extensión del cebador en el sitio de hibridación del bloqueador de la diana. Esta característica proporciona una parada energética de la extensión del cebador con la polimerasa y define el extremo 3' del producto de extensión del cebador.

Como en el Método 1, el ácido nucleico diana para la amplificación de acuerdo con el Método 2, es un ADN monocatenario. Cuando el ácido nucleico diana es un ADNbc, la diana se vuelve primero monocatenaria por desnaturalización. La desnaturalización de la diana de ADNbc se puede realizar calentando o por cualquier otro método conocido en la técnica, tal como tratamiento con álcali. Cuando el ácido nucleico diana es ARN, tal como ARNm, la diana se transcribe inversamente en primer lugar por métodos conocidos en la técnica, para producir un ADNc que se amplifica a continuación según el método de la descripción.

La diana de ácido nucleico monocatenario se combina con el cebador compuesto aislado, el componente de bloqueo, el molde propromotor (PTO), la polimerasa de ADN, la ribonucleasa, tal como ARNasaH, una polimerasa de ARN dependiente de ADN y nucleótidos tales con NTPs (p. ej., dNTPs y rNTPs) tal y como se ha descrito para el Método 1. El medio y las condiciones de reacción adecuadas son como se han descrito anteriormente. En una realización, la transcripción se realiza a diferente temperatura, generalmente menor que la de las etapas precedentes. En otra realización, todas las etapas de los métodos se realizan isotérmicamente.

En una realización, cada reacción de amplificación incluye cebadores compuestos de una secuencia idéntica. En otra realización, cada reacción de amplificación incluye una mezcla de variantes de cebador compuesto, en donde las variantes representan dos o más secuencias homólogas pero no idénticas y en donde todas son capaces de hibridarse con la misma secuencia de ácido nucleico diana. La homología (identidad de secuencia) es preferentemente de al menos aproximadamente 50%, más preferentemente al menos aproximadamente 75% y lo más preferible al menos aproximadamente 90%. Las ventajas de esta realización incluyen la capacidad de introducir diferentes secuencias de interés en los productos de extensión del cebador. En aún otra realización, cada reacción de amplifi-

cación incluye una mezcla de cebadores compuestos en donde los cebadores representan dos o más secuencias no idénticas que tienen poca o ninguna homología, y en donde los cebadores se hibridan preferentemente con diferentes secuencias de ácido nucleico diana o con diferentes sitios a lo largo de la misma hebra de ácido nucleico diana. Las ventajas de esta realización incluyen la detección múltiple y/o el análisis de los ácidos nucleicos diana a través de la amplificación de una variedad de especies de ácido nucleico diana en una sola reacción de amplificación.

El cebador compuesto aislado y el componente de la secuencia de bloqueo se hibridan con la misma hebra diana para formar un complejo trimolecular. El cebador se extiende a lo largo de la diana hasta el sitio de hibridación de la secuencia de bloqueo, para formar el complejo XII (Figura 3A-D).

Como en el Método 1, una ribonucleasa tal como una ARNasaH, corta la porción de ARN, generalmente la porción de ARN 5', del cebador compuesto aislado del complejo XII para formar el complejo XIII (Figura 3A-D). Tal y como se ha descrito anteriormente, la enzima es específica para cortar la hebra de ARN de un híbrido de ARN/ADN y no digiere el ARN monocatenario. Por tanto, la ribonucleasa no degrada el cebador compuesto libre. Las siguientes etapas, tal y como se ilustran en la Figura 3A-D, de la hibridación del cebador (XIV), desplazamiento del extremo 5' del producto de extensión del cebador por la porción de ADN 3' del cebador compuesto (XV), extensión del cebador y desplazamiento del primer producto de extensión del cebador (XVI), se realizan como en el Método 1, para obtener múltiples copias del producto de extensión desplazado (XVII). Al contrario que con el producto de desplazamiento del Método 1, XVII es totalmente complementario a la secuencia diana y no comprende una porción del extremo 3' que no es complementaria a la diana. Las extensiones repetidas del cebador y los desplazamientos de las hebras, dan como resultado la generación de múltiples copias de polinucleótidos que son complementarios al ácido nucleico diana.

El oligonucleótido molde promotor (PTO) se une al producto de extensión desplazado, para formar el complejo XVIII (Figura 3A-D) por hibridación de la porción del extremo 3' (A) del molde propromotor, con el extremo 3' del producto de extensión del cebador desplazado. Tal y como se ha descrito anteriormente, el extremo 3' del PTO puede estar bloqueado o no. Cuando el extremo 3' del molde propromotor no está bloqueado, el molde se extenderá a lo largo del producto de extensión del cebador desplazado. El extremo 3' del producto desplazado se extenderá con la polimerasa de nucleótidos (ADN) a lo largo de la porción B (véase la Figura 3A-D) del molde propromotor hibridado, para formar el complejo XIX que comprende en su extremo una secuencia bc promotora que puede utilizar la polimerasa de ARN dependiente de ADN. El complejo XIX se describe en la Figura 3A-D como el producto de hibridación de un molde promotor en el que el extremo 3' está bloqueado para la extensión de la polimerasa. Alternativamente, cuando el extremo 3' del molde promotor no está bloqueado, la extensión del extremo 3' a lo largo del producto de extensión del cebador desplazado, da como resultado la formación de un complejo completamente bicatenario. La polimerasa de ARN dependiente de ADN transcribirá el producto de extensión del cebador desplazado y extendido del complejo XIX en ambas formas (para la elección de la polimerasa de ARN se tiene que tener en cuenta su capacidad de transcribir desde un molde de ADN bc y/o mc), es decir, o la forma de híbrido parcial o de híbrido totalmente bicatenario del complejo. Las copias múltiples de un único producto de ARN monocatenario se producen mediante esta etapa de transcripción.

Los productos de la amplificación descrita anteriormente, se pueden detectar por métodos de detección homogéneos o heterogéneos, incluyendo la identificación por tamaño y/o las propiedades de migración en electroforesis en gel o por hibridación de sondas específicas de la secuencia. La detección del producto de amplificación es indicativa de la presencia del ácido nucleico diana. El análisis cuantitativo también es factible. Por ejemplo, comparando la cantidad de producto amplificado procedente de una muestra del ensayo que contiene una cantidad desconocida de un polinucleótido que contiene una secuencia diana, con el producto de amplificación de una muestra de referencia que tiene una cantidad conocida de un polinucleótido que contiene la secuencia diana, se puede determinar la cantidad de secuencia diana en la muestra del ensayo. Los métodos de amplificación de la presente descripción también se pueden extender al análisis de alteraciones de la secuencia y a la secuenciación del ácido nucleico diana, tal y como se describe a continuación.

Métodos que emplean los kits de amplificación y las composiciones de la invención

Los kits y las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para una variedad de fines. Para fines de ilustración, se describen métodos de secuenciación, genotipado (detección de mutaciones en el ácido nucleico), preparación de micromatrices empleando los productos de ácido nucleico amplificados generados por los métodos de la presente descripción y la caracterización de secuencias de ácidos nucleicos.

Secuenciación isotérmica de dianas definidas de ácidos nucleicos empleando el método de amplificación lineal de la invención

Los métodos de amplificación lineal e isotérmica de la descripción son útiles, por ejemplo, para secuenciar una secuencia definida de ácido nucleico diana. El procedimiento de secuenciación se realiza tal y como se ha descrito para los métodos de amplificación descritos en esta memoria. Además de los nucleótidos, tal como trifosfatos de soxirribonucleótidos naturales (dNTPs), que se emplean para el método de amplificación de acuerdo con la presente descripción, la mezcla de la reacción de secuenciación también incluye los análogos de trifosfatos de nucleótidos adecuados que pueden estar marcados o no, que después de la incorporación en un producto de extensión del

cebador, efectúan la terminación de la polimerización de nucleótidos. Tales análogos se emplean generalmente en otros métodos de secuenciación y son bien conocidos en la técnica, tales como didesoxirribonucleótidos. Pueden estar marcados, p. ej., con fluorocromos o radioisótopos. Los marcadores también pueden ser marcadores que son adecuados para la espectroscopía de masas. El marcador también puede ser una pequeña molécula que es un miembro de una pareja de unión específica y se puede detectar después de la unión del otro miembro de la pareja de unión específica, tal como biotina y estreptavidina, respectivamente, con el último miembro de la pareja de unión conjugada con una enzima que cataliza la generación de una señal detectable que podría ser detectada por métodos tales como colorimetría, fluorimetría o quimioluminiscencia. Todos los ejemplos anteriores son bien conocidos en la técnica. Estos se incorporan en el producto de extensión del cebador mediante la polimerasa y sirven para detener una extensión adicional a lo largo de la secuencia diana. Los productos de extensión truncados resultantes están marcados. Los productos de extensión del cebador desplazado, múltiples acumulados, varían en su longitud, según el sitio de incorporación de cada análogo, lo que representa las distintas posiciones de la secuencia de un nucleótido complementario en la secuencia diana.

El análisis de los productos de la reacción para esclarecer la información de la secuencia, se puede realizar empleando cualquiera de los diversos métodos conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen electroforesis en gel y detección de las bandas marcadas empleando un escáner adecuado, secuenciación de la electroforesis en gel y detección de la banda radiomarcada directamente por fosforescencia, tal como con un lector de Molecular Dynamics, electroforesis capilar adaptada con un detector específico para los marcadores empleados en la reacción, y similares. El marcador también puede ser un ligando para una proteína de ligación que se emplea para la detección del marcador, en combinación con una enzima conjugada con la proteína de ligación, tal como un terminador de cadena marcado con biotina y estreptavidina conjugada con una enzima. El marcador se detecta por la actividad enzimática de la enzima que genera una señal detectable. Como con otros métodos de secuenciación conocidos en la técnica, las reacciones de secuenciación para los 4 tipos de nucleótidos (A, C, G, T) se realizan en un único recipiente de reacción o en recipientes de reacción separados (representando cada uno 1 de los 4 tipos de nucleótidos). La elección del método a emplear es dependiente de consideraciones prácticas, evidentes para un experto en la técnica, tales como los análogos de trifosfatos de nucleótidos y/o el marcador utilizado. Por tanto, por ejemplo, cuando cada uno de los análogos se marca diferencialmente, la reacción de secuenciación se puede realizar en un único recipiente. Las consideraciones para elegir el reactivo y las condiciones de reacción para una realización óptima de los análisis de secuenciación, de acuerdo con los métodos de la invención, son similares a las mencionadas para otros métodos de secuenciación descritos previamente. El reactivo y las condiciones de reacción deben ser como se han descrito anteriormente para los métodos de amplificación lineal de ácidos nucleicos de la presente descripción.

Secuenciación isotérmica de dianas definidas de ácido nucleico empleando los métodos de amplificación mejorada lineal (métodos 1 y 2) de la descripción

La secuenciación basada en la transcripción ha sido descrita previamente por, por ejemplo, Sasaki y col., *PNAS*, 95:3455-3460, 1998. La inclusión de análogos de rNTPs que pueden estar marcados o sin marcar, que después de la incorporarse en un transcrito de ARN efectúan la terminación de la polimerización de rNTP en la mezcla de reacción, para los métodos de amplificación lineal mejorada, dará como resultado la producción de productos de ARN truncados que dan como resultado el bloqueo de la polimerasa de ARN en los sitios de incorporación de los análogos. Análogos de rNTP adecuados son conocidos en la técnica. Los últimos se incorporan de forma opuesta al nucleótido complementario en el producto de extensión desplazado en los complejos relevantes, de acuerdo con el método empleado (Método 1 o Método 2).

El análisis de los productos de reacción para clarificar la información de la secuencia, se realiza empleando uno cualquiera entre una variedad de métodos conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen los descritos arriba para la secuenciación de dianas definidas de ácido nucleico, empleando los métodos de amplificación lineal (no mejorada) de la invención.

Detección isotérmica de una mutación basada en la porción de ARN que emplea los métodos de amplificación de la descripción

Las propiedades únicas del cebador compuesto para el uso en los métodos de amplificación isotérmica de la descripción, proporcionan la base para un método isotérmico de detección de mutaciones definidas o de sitios polimórficos (tales como SNPs), en una secuencia de ácidos nucleicos diana. El método es útil para el genotipado, la detección de mutaciones que conducen a la resistencia a fármacos y similares. Estos métodos son aplicables para caracterizar secuencias en una región en la hebra molde que se hibrida generalmente con la porción de ARN del cebador compuesto - por lo tanto, referencia a mutaciones "definidas", que se definen en función de su posición.

La secuencia de ácido nucleico diana adecuada para el método de la descripción es ADNmc. Sin embargo, la preparación de una diana de ADNmc a partir de una diana de ADNbc o una diana de ARN, se puede realizar tal y como se ha descrito anteriormente y es conocido en la técnica.

Una realización del método de la descripción se ilustra esquemáticamente en la Figura 4. En esta realización, la(s) porción(es) de ARN del cebador compuesto se diseña para que sea complementaria a la secuencia del ácido nucleico

co diana del ensayo, en el que se sospecha la presencia de una alteración de la secuencia. Expuesto de otra forma, el cebador comprende una(s) porción(es) de ARN que comprende una secuencia que es complementaria a la secuencia de referencia (por ejemplo, una secuencia de tipo silvestre) con la que se va a comparar la secuencia en el ácido nucleico diana del ensayo. En algunas realizaciones, la secuencia alterada (es decir, la secuencia que comprende una alteración de la secuencia) y la secuencia de referencia son alelos. La alteración de la secuencia puede ser una sustitución aislada de nucleótidos, una delección o una inserción. El sitio de la alteración de la secuencia se marca esquemáticamente con una X en la Figura 4.

En otra realización, la(s) porción(es) de ARN del cebador compuesto se diseña para que sea complementaria a la secuencia alterada, que se sospecha que está presente en el ácido nucleico diana del ensayo. Dicho de otra forma, el cebador comprende una(s) porción(es) de ARN que comprende una secuencia que es complementaria al ácido nucleico diana del ensayo y que, por tanto, no es complementaria a la secuencia de referencia (por ejemplo, una secuencia de tipo silvestre) con la que se compara la secuencia en el ácido nucleico diana del ensayo. En algunas realizaciones, la secuencia alterada (es decir, la secuencia que comprende una alteración de la secuencia) y la secuencia de referencia son alelos.

La porción de ARN, generalmente una porción de ARN 5', del cebador compuesto comprende una secuencia que es complementaria a una secuencia de tipo silvestre normal o un mutante conocido o un genotipo polimórfico. Generalmente, un cebador compuesto adecuado comprende una porción de ARN que permite que el cebador se hibride preferentemente con un ácido nucleico diana, si la secuencia de ácido nucleico diana comprende una secuencia complementaria a la porción de ARN del cebador, comparado con si fuera un mal emparejamiento (es decir, el cebador tiene la secuencia mutada y la diana no, o viceversa), en donde el ácido nucleico diana tiene un producto de extensión del cebador unido y su porción de ARN 5' está cortada. Tal y como se muestra en la Figura 4, la presencia de una alteración de la secuencia no evita generalmente la etapa inicial de amplificación. El cebador compuesto se hibrida con la secuencia diana para formar el complejo trimolecular primero, y se extiende. Una ribonucleasa, tal como ARNasaH, corta a continuación la porción de ARN del cebador extendido del complejo. Aunque es probable que la presencia de un par de bases mal emparejadas afecte al patrón de escisión del híbrido ARN/ADN, aun así, la escisión no es probable que tenga lugar. La siguiente etapa de unión de un cebador compuesto con el complejo, mediante la hibridación de la porción de ARN 5' se inhibirá, preferentemente se evitará, con un mal emparejamiento. Este efecto depende de factores tales como el tamaño del oligonucleótido a hibridar y las restricciones de las condiciones de la reacción. Estos factores se consideran en el diseño del cebador compuesto, según las técnicas bien conocidas y rutinarias en la técnica. También es posible que el mal emparejamiento inhiba la escisión de la(s) porción(es) de ARN del cebador compuesto, evitando de este modo la amplificación de la secuencia diana. Otra posibilidad es que el mal emparejamiento dé como resultado una menor eficacia de la escisión de la porción de ARN del cebador, dando como resultado una menor eficacia de la amplificación o la producción de menos producto de la amplificación. La incapacidad del cebador compuesto para hibridarse con la diana en esta etapa de la amplificación, evita etapas adicionales de desplazamiento de la hebra en la extensión del cebador y de producción de múltiples copias de los productos de la amplificación. Se entiende que la detección de la mutación con los métodos de la presente descripción, se puede basar en la ausencia o presencia de un producto de extensión del cebador o en comparaciones cuantitativas de la cantidad acumulada de producto de extensión del cebador. Por ejemplo, cuando el cebador compuesto comprende la secuencia de referencia (por ejemplo, de tipo silvestre), la presencia de una mutación en una hebra diana puede conducir a productos de la amplificación no detectables; alternativamente, puede conducir a productos detectables, pero menos que los producidos a partir de una hebra molde sin la mutación.

Cuando el cebador compuesto comprende una porción de ARN, generalmente una porción de ARN 5' que es totalmente complementaria a un genotipo mutante, se evitará la amplificación de una secuencia que tiene el genotipo normal, mientras que una diana con genotipo mutante se amplificará. Por tanto, en este caso, la detección y/o la determinación cuantitativa de copias múltiples del producto de amplificación será indicativa de la presencia de una secuencia diana del genotipo mutante. Por ejemplo, reacciones paralelas que incluyen la muestra de ácido nucleico de interés o la muestra de referencia de ácido nucleico diana, con una secuencia de tipo silvestre, podrían funcionar. La acumulación de más productos de extensión del cebador en la primera reacción comparada con la última reacción, sería indicativo de la presencia de un genotipo mutante en la muestra de interés. Alternativamente, cuando el cebador compuesto comprende una secuencia de ARN 5' que es totalmente complementaria a la secuencia del genotipo normal de la diana del ensayo, se evita la amplificación de una secuencia diana del genotipo mutante y la detección y/o la determinación cuantitativa de los productos de la amplificación es indicativa de un genotipo normal.

Cualquiera de los métodos de amplificación de la presente descripción son adecuados para la detección de una mutación, tal y como se ha descrito anteriormente.

Detección isotérmica de una mutación basada en el nucleótido 3' que emplea los métodos de amplificación de la descripción

En este método, la complementariedad del nucleótido más 3' de un cebador compuesto se emplea para caracterizar la presencia o ausencia de una secuencia mutada. La hibridación del nucleótido más 3' del cebador compuesto con un ácido nucleico diana, es necesaria para la extensión del cebador. Por ello, la amplificación del producto indica que el ácido nucleico diana contiene la secuencia definida por el nucleótido más 3' del cebador compuesto. La reducción o la ausencia de una amplificación del producto, por otro lado, indica que el ácido nucleico diana contiene

una alteración de la secuencia que incluye al menos la base complementaria al nucleótido más 3' del cebador compuesto. La falta de la secuencia se puede deber a una mutación puntual, a polimorfismo de un nucleótido aislado, inserción o delección de un segmento de secuencia que contiene la secuencia definida por el nucleótido más 3'.

5 En una realización, los cebadores específicos del genotipo, diseñados para tener el nucleótido más 3', correspondiente a las distintas secuencias en la posición del nucleótido variante (tal como la debida a alelismo) se emplean para la amplificación según los métodos de la invención. La presencia de productos de la amplificación, indicaría que el ácido nucleico diana comprende la secuencia definida por el nucleótido más 3' del cebador particular utilizado. La ausencia o la carencia (en comparación con un ácido nucleico de referencia que tiene la secuencia definida por el nucleótido más 3' del cebador particular empleado) de productos de amplificación indicaría que el ácido nucleico
10 diana no comprende la secuencia definida por el nucleótido más 3' del cebador particular utilizado.

Detección de la mutación basada en un polimorfismo en la configuración monocatenaria que emplea los métodos de amplificación de la descripción

15 Los productos de la amplificación del ARN o ADN generados según los métodos de la presente descripción, también son adecuados para el análisis de la detección de cualquier alteración en la secuencia de ácido nucleico diana, comparada con una secuencia de ácido nucleico de referencia que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico diana aparte de la alteración de la secuencia, tal y como se describe a continuación.

20 Los productos de los métodos de amplificación de ácidos nucleicos lineales (ADN) y de los métodos de amplificación lineal mejorada (ARN), descritos previamente son adecuados para la detección de mutaciones basadas en el polimorfismo en la configuración monocatenaria (SSCP o rSSCP). Teniendo en cuenta que el producto de ARN de los nuevos métodos de amplificación no es un sustrato para una amplificación adicional, la amplificación de la secuencia de acuerdo con los nuevos métodos, no requiere la presencia de agentes que reducen estructuras secundarias en el producto monocatenario. Los métodos de amplificación basados en la transcripción, descritos por otros, se realizan en presencia de agentes que reducen estructuras secundarias, tales como DMSO. Por tanto, se anticipa que los métodos de amplificación lineal mejorada de la presente descripción pueden estar ligados directamente con medios
25 adecuados para detectar un polimorfismo en la configuración monocatenaria, tal como un método de separación electroforética, para la identificación de un patrón de movilidad específico de los productos de ARN monocatenarios, para aclarar la presencia de características específicas de la secuencia o la presencia de cualquier diferencia en un ácido nucleico del ensayo, comparado con un ácido nucleico de referencia.

30 Los métodos basados en la electroforesis en gel o la electroforesis capilar, se pueden utilizar para la detección y el análisis de distintos isómeros configuracionales monocatenarios. Alternativamente, también es probable que la escisión del producto de ADN o ARN monocatenario, empleando nucleasas que reconocen estructuras secundarias dependientes de la secuencia, sea útil para la determinación del polimorfismo de la configuración específico de la secuencia. Tales nucleasas son conocidas en la técnica, tal como el ensayo de Cleavase (Third Wave). Los métodos electroforéticos son potencialmente más adecuados como métodos de detección de mutaciones de alto rendimiento o de genotipado.
35

La determinación de un patrón electroforético específico de secuencia para una secuencia de ácidos nucleicos dada, es útil para detectar los alelos específicos de una secuencia del ensayo. Además, se espera que un patrón de movilidad electroforética para diversos alelos, podría estar bien diferenciado, de modo que permita la detección de dos alelos en una sola muestra de ADN genómico, tal y como se requiere para un genotipo heterocigoto o alelos múltiples. Cualquier alteración en la secuencia de ácidos nucleicos del ensayo, tal como una sustitución de bases, inserciones o delección, podría ser detectada empleando este método. El método se espera que sea útil para detectar un polimorfismo específico de una base aislada, SNP, y el descubrimiento de nuevos SNPs.
40

Método para preparar micromatrices de ácidos nucleicos

45 La naturaleza monocatenaria de los productos de los métodos de amplificación lineal de ácidos nucleicos (ADN), y los métodos de amplificación lineal mejorada (ARN), descritos previamente, son particularmente adecuados para preparar micromatrices que comprenden los productos de la amplificación.

50 Se conocen bien diversas técnicas para fijar ácidos nucleicos a un sustrato sólido, tal como un portaobjetos de vidrio. Un método es incorporar bases modificadas o análogos que contienen un resto que es capaz de fijarse a un sustrato sólido, tal como un grupo amino, un derivado de un grupo amino u otro grupo con una carga positiva, en los ácidos nucleicos amplificados. El producto amplificado se pone en contacto a continuación con un sustrato sólido, tal como un portaobjetos de vidrio que es revestido con un grupo reactivo aldehído u otro grupo reactivo que formará un enlace covalente con el grupo reactivo que está en el producto amplificado y se fija covalentemente al portaobjetos de vidrio. Otros métodos, tales como los que emplean una química de superficie de amino propil silicio, también son conocidos en la técnica, tal y como se describe en <http://www.cmt.corning.com> y <http://cmgm.standord.edu/pbrown1>.

55 La fijación de grupos al cebador que se podrían convertir posteriormente en grupos reactivos, también es posible empleando métodos conocidos en la técnica. Cualquier fijación a nucleótidos del cebador compuesto, formará parte del producto de ADN monocatenario de los métodos de amplificación lineal, que se podría fijar a continuación a la superficie sólida de la micromatriz.

Los productos de la amplificación de los métodos de la presente descripción se pueden modificar adicionalmente, mediante la escisión en fragmentos o la fijación de marcadores detectables, antes o después de la fijación al sustrato sólido, tal y como es requerido y/o permitido por las técnicas empleadas.

Caracterización de ácidos nucleicos

- 5 Los productos de la amplificación obtenidos por los métodos de la descripción son particularmente susceptibles de una caracterización posterior, en parte debido a que los productos son monocatenarios. Los productos amplificados, tanto ADN como ARN, se pueden analizar utilizando técnicas de hibridación con sonda conocidas en la técnica, tales como la transferencia de tipo Southern o Northern. Los productos amplificados también se pueden analizar poniéndolos en contacto con micromatrices que comprenden sondas de oligonucleótidos. La identidad de las sondas proporciona la caracterización de la identidad de secuencia de los productos amplificados y de este modo por extrapolación, la identidad del ácido nucleico molde presente en una muestra sospechosa de contener dicho ácido nucleico molde.

Composiciones y kits de la invención

- 15 La invención proporciona composiciones y kits empleados en los métodos descritos en esta memoria. Las composiciones pueden ser cualquier componente(s), mezcla de reacción y/o compuesto intermedio descrito en esta memoria, así como cualquier combinación. Por ejemplo, la invención proporciona una composición que contiene un cebador compuesto, en donde el cebador compuesto comprende una porción de ARN y una porción de ADN 3'. En otro ejemplo, la invención proporciona una composición que comprende un cebador compuesto, en donde el cebador compuesto comprende una porción de ARN 5' y una porción de ADN 3'. En una realización, la porción de ARN es adyacente a la porción de ADN. En otro ejemplo, la invención proporciona una composición que comprende un cebador compuesto, en donde el cebador compuesto comprende porciones de ADN 5' y 3', con al menos una porción de ARN intercalado. En otros ejemplos, la invención proporciona una composición que comprende un cebador compuesto que se derivatiza adicionalmente por fijación de un resto capaz de efectuar la fijación de un polinucleótido que comprende el cebador compuesto a un sustrato sólido empleado para preparar micromatrices de ácido nucleico.
- 20 En algunas realizaciones, el cebador compuesto se derivatiza adicionalmente por fijación de un resto cargado positivamente, tal como una amina. En otras realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende un TSO (es decir, cualquiera de las realizaciones de TSO descritas en esta memoria, que incluyen TSOs que contienen una o varias modificaciones que mejoran la unión al molde). En algunas realizaciones, las composiciones comprenden un cebador compuesto y una secuencia de terminación. En otras realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia propromotora, tal como TSO o PTO (es decir, cualquiera de las realizaciones descritas en esta memoria) y puede comprender adicionalmente un cebador compuesto y/o una secuencia de bloqueo. En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende una secuencia de bloqueo (es decir, cualquiera de las realizaciones descritas en esta memoria, incluyendo secuencias de bloqueo con modificaciones).

- 35 En otras realizaciones, la invención proporciona composiciones que comprenden (a) un cebador compuesto, en donde el cebador compuesto comprende una porción de ARN y una porción de ADN 3' (en algunas realizaciones, la porción de ARN es adyacente a la porción de ADN); y (b) una secuencia de terminación. En algunas realizaciones, la secuencia de terminación es un TSO. En otras realizaciones, la secuencia de terminación es una secuencia de bloqueo. En algunas realizaciones, el cebador compuesto comprende una porción de ARN 5' y una porción de ADN 3' (en ciertas realizaciones, la porción de ARN es adyacente a la porción de ADN). En otras realizaciones, el cebador compuesto comprende porciones de ADN 5' y 3' con al menos una porción de ARN intercalado. En algunas realizaciones, la composición comprende (a) un cebador compuesto; (b) un polinucleótido que comprende una secuencia de terminación; (c) un polinucleótido que comprende una secuencia propromotora. En algunas realizaciones, la secuencia propromotora es proporcionada por un PTO. En otras realizaciones, la secuencia propromotora es proporcionada por un TSO. Cualquiera de las composiciones anteriores puede comprender adicionalmente un molde (que comprende una secuencia diana) y/o cualquiera de las enzimas descritas en esta memoria (tales como polimerasa de ADN, ARNasaH y/o polimerasa de ARN). Las composiciones están generalmente en forma acuosa, preferentemente en un tampón adecuado.

- 50 La invención también proporciona composiciones que comprenden los productos de amplificación descritos en esta memoria. Por tanto, la invención proporciona una población de moléculas de ADN (de hebra complementaria) o de ARN (de hebra transcrita) que son copias de una secuencia diana que son producidas por cualquiera de los métodos descritos en esta memoria.

Las composiciones están generalmente en un medio adecuado, aunque pueden estar en forma liofilizada. Los medios adecuados incluyen, pero no están limitados a medios acuosos (tales como agua pura o tampones).

- 55 La invención proporciona kits para llevar a cabo los métodos de la invención. Por tanto, se proporciona una variedad de kits, envasados adecuadamente. Los kits se pueden utilizar para uno cualquiera o para más de los usos descritos en esta memoria y, por tanto, pueden contener instrucciones para uno o para varios de los siguientes usos: amplificar una secuencia de nucleótidos; secuenciar polinucleótidos amplificados y detectar una mutación de la secuencia en polinucleótidos amplificados.

Los kits de la invención comprenden uno o varios recipientes que comprenden cualquier combinación de los componentes descritos en esta memoria; y a continuación hay ejemplos de tales kits. Un kit comprende cualquiera de los cebadores compuestos descritos en esta memoria. En algunas realizaciones, un kit comprende dos o más cebadores compuestos que pueden estar envasados o no separadamente. En otras realizaciones, un kit comprende un cebador compuesto y una secuencia de terminación (cualquiera de las descritas en esta memoria). Un kit puede comprender un cebador compuesto, un polinucleótido que comprende una secuencia de terminación y un polinucleótido que comprende una secuencia propromotora (que puede ser un PTO o TSO). El cebador compuesto puede estar marcado o no. Los kits pueden incluir también opcionalmente cualquiera entre una o varias de las enzimas descritas en esta memoria, así como trifosfatos de desoxinucleósidos y/o trifosfatos de ribonucleósidos. Los kits también pueden incluir uno o varios tampones adecuados (tal y como se ha descrito en esta memoria). Los kits útiles para la secuenciación de ácidos nucleicos pueden incluir opcionalmente análogos de nucleótidos marcados o sin marcar que, después de incorporarles en un producto de extensión del cebador, efectúan la terminación de la polimerización de nucleótidos. Uno o varios reactivos en el kit se puede proporcionar como un polvo seco, generalmente liofilizado, que incluye excipientes que en disolución proporcionarán una solución de reactivo que tenga las concentraciones adecuadas para realizar cualquiera de los métodos descritos en esta memoria. Cada componente puede ser envasado en recipientes separados o algunos componentes se pueden combinar en un recipiente que permita reactividad cruzada y una duración de almacenamiento.

Los kits de la invención pueden incluir opcionalmente un conjunto de instrucciones, generalmente instrucciones escritas, aunque también son aceptables los medios de grabación electrónicos (p. ej., disquete magnético o disco óptico), en relación con el uso de los componentes de los métodos de la presente invención para la amplificación deseada de ácidos nucleicos y/o son adecuados para el uso de los productos de amplificación para fines tales como la secuenciación de ácidos nucleicos y la detección de una mutación de la secuencia. Las instrucciones incluidas en el kit, incluyen generalmente información sobre los reactivos (si están incluidos o no en el kit) necesarios para poner en práctica los métodos de la invención que se presenta, instrucciones sobre cómo utilizar el kit y/o condiciones de reacción adecuadas.

El(los) componente(s) del kit pueden estar envasados en cualquier envase conveniente y adecuado. Los componentes pueden estar envasados separadamente o en una o varias combinaciones. Cuando se proporcionan kits para poner en práctica los métodos de amplificación lineal mejorada de la presente invención, la polimerasa de ARN (si está incluida) se proporciona preferentemente de forma separada de los componentes empleados en las etapas anteriores a las etapas de la transcripción.

Las cantidades relativas de los distintos componentes en los kits pueden variar ampliamente para proporcionar las concentraciones de los reactivos que mejoran sustancialmente las reacciones que tienen que ocurrir para poner en práctica los métodos descritos en esta memoria y/o para mejorar adicionalmente la sensibilidad de cualquier ensayo.

La invención también proporciona mezclas de reacción (o composiciones que comprenden mezclas de reacción) que contienen diversas combinaciones de componentes descritos en esta memoria. En algunas realizaciones, la invención proporciona mezclas de reacción que comprenden (a) un molde de polinucleótido; (b) un cebador compuesto que comprende una porción de ADN 3' y una porción de ARN y (c) una polimerasa de ADN. Tal y como se ha descrito en esta memoria, cualquiera de los cebadores compuestos puede estar en la mezcla de reacción (o una pluralidad de cebadores compuestos), que incluyen un cebador compuesto que comprende una porción de ARN 5' que es adyacente a la porción de ADN 3'. La mezcla de reacción puede comprender también adicionalmente una enzima que corta el ARN de un híbrido ARN/ADN, tal como ARNasaH. Una mezcla de reacción de la invención también puede comprender cualquiera de los polinucleótidos que comprenden secuencias de terminación descritas en esta memoria. Otro ejemplo de una mezcla de reacción es (a) un producto de extensión del cebador desplazado (y que, como tal, contiene en su extremo 5' una complementariedad de secuencia con la porción de ADN 3' del cebador compuesto, pero no las secuencias complementarias a la porción de ARN del cebador compuesto); (b) un polinucleótido que contiene una secuencia propromotora (por ejemplo, un PTO); y (c) una polimerasa de ARN. Otras mezclas de reacción se describen en esta memoria y están incluidas en la invención.

La invención también incluye composiciones que comprenden cualquiera de los complejos (que son productos intermedios en los métodos descritos en esta memoria) descritos en esta memoria. Los complejos se describen esquemáticamente en las Figuras 1-4. A modo de ejemplo, un complejo de la invención es un complejo que comprende: (a) una hebra molde y (b) un cebador compuesto, que comprende una porción de ADN 3' y una porción de ARN. El cebador compuesto puede tener una porción de ARN que es 5', adyacente a la porción de ADN 3'. El complejo puede comprender adicionalmente un polinucleótido que comprende una secuencia de terminación (tal como un TSO o una secuencia de bloqueo). El complejo también puede comprender un polinucleótido que comprende un propromotor, tal como un PTO.

Los siguientes Ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, pero no para limitar la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Métodos Generales

Los métodos generales que se describen en este ejemplo también se emplean en otros ejemplos proporcionados en esta memoria.

5 Tampones

Los tampones que se emplearon durante todos los ejemplos se prepararon con los siguientes materiales.

Tampón TE: Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM

Tampón TBE: Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3

Tampón FX: TrisSO₄ 20 mM, pH 9,0, (NH₄)₂SO₄ 20 mM, NP40 0,1%

10 Amplificación lineal isotérmica que emplea un cebador quimera aislado, una polimerasa de ADN y ARNasaH

La amplificación de la secuencia se realizó en reacciones de 15 µl que contenían Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, MgCl₂ 6,0 mM, dATP 1,0 mM, dCTP 1,0 mM, dTTP 1,0 mM, dGTP 0,8 mM, dITP 0,2 mM (dNTPs de Amersham), 0-6% de DMSO, 0-8% de glicerol, 0-100 µg/ml de BSA acetilada (Ambion, Austin, TX), 0,6 unidades/µl de inhibidor de ribonucleasa recombinante (rRNasin, Promega, Madison, WI), 0,5-5 µM de cebador compuesto IA005 y 100200 nM de oligonucleótido promotor-molde (PTO) IA015C. El cebador compuesto IA005 es un cebador 20-mero con la secuencia: ACGGAUGCGGUCUCCAGTGT (SEQ ID NO:1). El oligonucleótido promotor-molde (PTO) IA015C es un oligonucleótido 55-mero con la secuencia:

ggAATTCTAATACgACTCACTATAgggAgAgCggTACgCTgATCAAAGATCCgTgbiotina (SEQ ID NO:12).

20 Las reacciones se reunieron con todos los componentes excepto las dos enzimas. Después de calentar a 70°C o 99°C durante 10 s, en un ciclador térmico programable (GeneAmp 9600, Perkin Elmer), las mezclas de las reacciones se enfriaron a 55°C, 60°C o 65°C, tal y como se describe en los ejemplos individuales. Después de alcanzar la temperatura inferior, se añadieron 0,05-0,24 unidades de ARNasaH (diluida a partir de la solución madre de 5 U/µl) empleando una solución de diluyente/almacenamiento: Tris-HCl 10 mM, pH 8,5, 30% de glicerol; Hybridase thermostable RNase H, Epicentre Technologies, Madison, WI) y 1,0-5,0 unidades de polimerasa de ADN Bca (2 U/µl; Panvera, Madison, WI). Las reacciones se incubaron a 55°C-65°C durante 30 minutos. Al final de la incubación, las reacciones se enfriaron a 4°C. Las reacciones pueden permanecer a 4°C hasta que se desee iniciar la etapa de transcripción del ARN.

Amplificación lineal mejorada mediante transcripción de ARN del producto de ADNmc de la amplificación lineal

30 La transcripción del ARN se realizó a 37°C durante 3 h en reacciones de 10 µl que contenían 2,5 µl de las mezclas de reacción de amplificación lineal anteriores y Tris-HCl 40 mM, pH 8,5, KCl 70 mM, DTT 5,0 mM, MgCl₂ 12 mM, 110 µg/ml de BSA, 3 mM de cada rNTP (ATP, CTP, UTP, GTP, Amersham), 7,5% de DMSO, 1 unidad/µl de rRNasin (Promega, Madison, WI) y 20 unidades de polimerasa de ARN de T7 (Ambion, Austin, TX).

Moldes de ADN

35 Una secuencia de la región del gen J de *E. coli* K12 se escogió como molde de ADN para varios de los siguientes Ejemplos. Se emplearon tres moldes de ADN para estos experimentos: una diana de ADN sintético (IA013), un molde de ADN principalmente monocatenario (351 bases) producido por amplificación con PCR y ADN genómico procedente de la cepa K12 de *E. coli* (preparación descrita en el Ejemplo 4). La diana de ADN sintético IA013 comprende:

40 Espaciador 18-espaciador
18CGGTACGCTGATCAAAGATCCGTGCAACAAATGTCATGGTCATGGTCGTGTTGAGCTGCAGCAAAACGCTGT
CCGTTAAAATCCCGGCAGGGGTGGACTGGAGACCGCATCCGT (SEQ ID NO:18). El espaciador 18 se refiere a espaciadores de polioxietileno. Estos se añadieron al oligo para retardar su movilidad en relación con el producto de ADNmc de 100 pb. La secuencia del molde de ADN principalmente monocatenario (351 bases), mencionado anteriormente, producido por amplificación con PCR es:

45 **CGGTACGCTGATCAAAGATCCGTGCAACAAATGTCATGGTCATGGTCGTGTTGAGCGCAGCAAAACGCTGTCC**
GTTAAAATCCCGGCAGGGGTGGACTGGAGACCGCATCCGTCTTGCAGGCGAAGGTGAAGCGGGGCGAGCA
TGGCGCACCGGCAGGCGATCTGTACGTTTCAGGTTCAAGTTAAACAGCACCCGATTTTCGAGCGTGAAGGCAAC
AACCTGTATTGCGAAGTCCCGATCAACTTCGCTATGGCGGCGCTGGGTGGCGAAATCGAAGTACCGACCCTTGA
50 TGCTCGCGTCAAAGTGCCTGGCGAAACCCAGACCCGGTAAGCTATTCCGTATGCG (SEQ ID NO:17) en
donde los cebadores de la PCR están en negrita y subrayados y los cebadores compuestos están en negrita, con la porción de ARN en cursiva.

Preparación de diana de ADNmc a partir de un producto de amplificación con PCR

El molde de ADN monocatenario para la amplificación isotérmica lineal se preparó mediante amplificación con PCR de un segmento de 351 pb del gen J de *E. coli*, empleando los cebadores IA006 e IA004. El cebador IA006 es un 23-mero con la secuencia: CGGTACGCTGATCAAAGATCCGT (SEQ ID NO:16). El cebador IA004 es un 26-mero con la secuencia: CGCATACGGAATAGCTTACCGGTCT (SEQ ID NO:15).

La PCR se realizó en reacciones de 100 µl que contenían TrisSO₄ 20 mM, pH 9,0, (NH₄)₂SO₄ 20 mM, 0,1% de NP40, MgCl₂ 2,0 mM, 300 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 5 unidades de polimerasa de ADN Taq, cebador IA006 400 nM, cebador 5'fosfato IA004 400 nM y 0,2 µl de un lisado en bruto de la cepa K12 de *E. coli*. Se empleó un protocolo de "PCR de aterrizaje" con los siguientes parámetros: 95°C durante 5 segundos, 68°C durante 1 minuto para 5 ciclos; 94°C durante 5 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto para 5 ciclos; 94°C durante 5 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto para 40 ciclos; 72°C durante 15 minutos y a continuación se mantuvo indefinidamente a 4°C. El cebador IA004 se sintetizó con un 5'-fosfato para proteger la hebra transcrita de la digestión con la exonucleasa lambda (kit Strandase, Novagen, Madison, WI). La digestión con Strandase se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En forma resumida, el producto de la PCR, preparado tal y como se ha descrito anteriormente, se precipitó desde la mezcla de reacción por adición de 1/10 volúmenes de acetato sódico 3 M, pH 5,2 y 0,6 volúmenes de isopropanol, se enfrió a -20°C durante 1 hora y se centrifugó a velocidad máxima en una microcentrífuga durante 30 minutos. El sedimento de ADN se lavó una vez con etanol al 75%, a continuación se secó brevemente al aire antes de resuspender en 80 µl de agua. La concentración se estimó con D.O. a 260 nm y se añadieron 60 unidades de exonucleasa lambda (Strandase, Novagen). La digestión se realizó a 37°C durante 20 minutos, las reacciones se calentaron luego a 75°C durante 10 minutos y se enfriaron a 4°C. Las incubaciones se realizaron en un ciclador térmico programable (GeneAmp 9600, Perkin Elmer). El ADN restante se purificó empleando columnas de eliminación de nucleótidos de QiaQuick (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante y empleando los tampones proporcionados con el kit (Qiagen, Valencia, CA). De forma resumida, se añadieron 10 volúmenes de Tampón PN (Qiagen) a la muestra. El volumen total se aplicó a continuación a una columna con rotación de Qiagen y se centrifugó (6000 rpm 1 minuto en una microcentrífuga). El material filtrado se eliminó y la columna se lavó dos veces con 500 µl de Tampón PE (Qiagen). La columna se secó a continuación a fondo por centrifugación a velocidad máxima durante 3 minutos. El ADN se eluyó en 50 µl de Tampón EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5) (Qiagen). La concentración se estimó que era de aproximadamente 2,5 X 10¹² copias/5 µl a partir de la DO a 260 nm. El análisis del gel reveló que ADNbc significativo (menos de la mitad del total) permanecía, pero el error en la concentración era menor de 2 veces. El ADN se diluyó hasta tener 10¹⁰ copias/5 µl en tampón TE. Se prepararon diluciones en serie a partir de la solución madre con 10¹⁰ copias, según fuera la necesidad. La concentración basada en mediciones de la D.O. se confirmó limitando el análisis con PCR de la dilución.

Electroforesis en gel

Los productos de la amplificación se separaron electroforéticamente en geles en gradiente de poliacrilamida de 420% premoldeada de Novex (Invitrogen, Carlsbad, CA; part. n° EC62255) en Tampón TBE IX (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3) en un aparato de electroforesis de Novex (EI9001-XCell II Mini Cell, Novex). Las mezclas de reacción (5 µl) de la amplificación lineal o la transcripción (amplificación lineal mejorada) se mezclaron con 1 µl de 6X solución de carga del gel (40% de sacarosa, 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol), y la muestra completa se cargó inmediatamente en cada pocillo. Los geles se sometieron a 250 V durante aproximadamente 5 minutos, hasta que todas las muestras entraron en el gel y el voltaje se disminuyó a 175 V durante 45 minutos. Los geles se retiraron de entre las placas de plástico y se tiñeron en 0,5 µg/ml de bromuro de etidio en tampón TBE 1X (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3). Un marcador del tamaño molecular de ADNbc (Hi-Lo DNA Marker, Bionexus, San Leandro, CA) se incluyó en una pista de cada recorrido del gel. Este marcador contiene 16 fragmentos con los siguientes tamaños: 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000, 1400, 1550, 2000, 3000, 4000, 6000, 8000 y 10000 pb. Típicamente, 50-2000 pb se podían resolver en los geles empleados.

Hibridación

Las sondas de oligonucleótidos para los ejemplos de hibridación (IA010 para los productos de ADNmc; IA014 para los productos de ARNmc) se marcaron en el extremo 5', empleando la quinasa de polinucleótidos de T4 (New England Biolabs, Beverly, MA) y γ-³²PATP (5'-[γ-³²P]trifosfato de adenosina, sal de trietilamonio, Amersham, Piscataway, NJ; PB10218, >5000 Ci/mmol, 10 mCi/ml). El cebador IA010 es un 21-mero con la secuencia: ATGTCATGGTCATGGTCGTGT (SEQ ID NO:13). El cebador IA014 es un 31-mero con la secuencia: CCAACACGACCATGACCATGACATTTGTTG (SEQ ID NO:14). Las reacciones de marcación (50 µl del volumen total) contenían Tris-HCl 70 mM, pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, 1 µg de oligo (147 pmol para el cebador IA010; 101 pmol para el cebador IA014), 250 µCi de γ-³²P-ATP y 30 unidades de quinasa de polinucleótido de T4. La incubación era a 37°C durante 30 minutos, seguido de eliminación de los nucleótidos no incorporados empleando el kit de eliminación de nucleótidos de QIAquick (Qiagen, Valencia, CA). La tasa de desintegración (cpm) se determinó en un contador de centelleo líquido de 4000 series de Packard Minaxi TriCarb de Cherenkov que hacía el recuento de 1 µl de oligo marcado.

La hibridación se realizó en reacciones de 30 μ l. El ADN producto (o ARN) (10 μ l) se añadió a 20 μ l de mezcla de sonda. Las reacciones contenían NaCl 100 mM y 10^6 cpm de sonda (corregir para la desintegración empleando una semivida de 14,3 días). Después de calentar a 65°C, 15 segundos, se dejó transcurrir la hibridación a 42°C durante 30 minutos, seguido de enfriamiento a 4°C. Estas etapas se realizaron en un ciclador térmico programable con una cubierta calentada (GeneAmp 9600, Perkin Elmer). El volumen total de la reacción de hibridación fue sometido a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en Tampón TBE 1X (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3) a 150 V durante 3 horas. Los geles se retiraron de las placas de vidrio, se envolvieron en una envoltura de plástico y se expusieron a una película de autorradiografía (BioMax, MR, Kodak) a -20°C durante una noche (~16 horas) con dos detecciones intensificantes.

10 Ejemplo 2: Amplificación isotérmica lineal

La amplificación isotérmica lineal se realizó empleando un cebador compuesto aislado, una polimerasa de ADN, una ARNasaH y un TSO o bloqueador. Las mezclas de la reacción que contenían todos los componentes de la reacción, tal y como se ha descrito anteriormente, así como las mezclas de reacción sin uno de los reactivos clave, tal como el cebador compuesto, la ARNasaH o la polimerasa de ADN Bca (Panvera, Madison, WI) se replicaron con 10^{10} copias de la diana de ADNmc sintética (IA010 - secuencia mencionada en el Ejemplo 1). Una reacción de testigo negativo que contenía todos los reactivos y no tenía ADNmc diana, también estaba incluida. La amplificación lineal isotérmica de la secuencia de ADN diana se realizó tal y como se ha descrito anteriormente. La desnaturalización de la diana se realizó a 70°C y la amplificación isotérmica se realizó a 65°C.

20 Los productos de la amplificación se resolvieron por electroforesis en gel (Figura 5) (Primera pista: escala de pesos moleculares, pistas n° 1-4: sin ADN, sin cebador, sin ARNasaH, sin polimerasa de ADN Bca, respectivamente; pista 5: contiene todos los componentes). No se detectaron productos de la amplificación en las mezclas de reacción sin cebador, ARNasaH, polimerasa de ADN Bca.

25 La hibridación y la autorradiografía de la sonda IA010 con el producto de ADNmc del método de amplificación lineal, tal y como se muestra en la Figura 6 (Pistas 1-4: sin ADN, sin cebador, sin ARNasaH, sin polimerasa de ADN, respectivamente; pista 5: contiene todos los componentes), verificó la identidad del producto de la amplificación. La amplificación lineal de la diana de oligonucleótidos sintéticos en este experimento se realizó empleando un oligonucleótido promotor-molde no bloqueado (IA015b). El oligonucleótido promotor-molde IA015b es un 55-mero con una secuencia: GGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCGGTACGCTGATCAAAGATCCGTG (SEQ ID NO:11). Los componentes de la reacción convencional de la reacción de amplificación, empleados para esta reacción de amplificación son como los mencionados anteriormente. La etapa inicial de desnaturalización se realizó a 70°C durante 10 segundos. Las reacciones se enfriaron hasta 65°C y se incubaron adicionalmente a esta temperatura durante 30 minutos después de la adición de polimerasa Bca y ARNasaH. No se detectó hibridación en las reacciones testigos (sin ADN, sin cebador, sin ARNasaH, sin Bca).

Ejemplo 3: Amplificación y transcripción lineal isotérmica acoplada con oligonucleótido promotor molde

35 El oligonucleótido promotor molde (PTO) contiene dos motivos de secuencia esenciales: una secuencia de promotor de T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGGAG (SEQ ID NO:20)) y una secuencia complementaria al molde de ADNmc. Se diseñaron cuatro versiones de un PTO (IA012, IA012b, IA015, IA015b). El PTO IA012 es un 67-mero y tiene la secuencia:

40 GGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGATCGAGTAGCTCCGGTACGCTGATCAAAGATCCGTG (SEQ ID NO:8). El PTO IA012 contiene dos secuencias además del núcleo del promotor T7: una extensión 5' (5'-GGAATTC (SEQ ID NO:21)) y un espaciador (5'-ATCGAGTAGCTC (SEQ ID NO:22)) entre el promotor y la secuencia complementaria de ADN diana. IA015 es el PTO más corto (48-mero) que carece de la extensión 5' y del espaciador. El PTO IA015 tiene la secuencia: TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCGGTACGCTGATCAAAGATCCGTG (SEQ ID NO:10). El PTO IA012b es un 60-mero que contiene el espaciador pero no la extensión. El PTO IA012b tiene la secuencia:

45 TAATACGACTCACTATAGGGAGAGATCGAGTAGCTCCGGTACGCTGATCAAAGATCCGTG (SEQ ID NO: 9). IA015b contiene la extensión, pero no el espaciador. La secuencia de IA015b se describe en el Ejemplo 2. Todos los cebadores distintos de los oligonucleótidos quiméricos IA005, IA019 y IA020 fueron sintetizados por Keystone (División de BioSource International, Camarillo, CA) y se purificaron con PAGE.

50 Un esquema general para este método de amplificación se ilustra en la Figura 2A-C. La capacidad de IA012, IA012b, IA015 y IA015b para convertir el molde de ADNmc en un sustrato para la polimerasa de ARN de T7, se determinó comparando la cantidad de ARN producido después de la transcripción de productos de extensión solapantes, formados entre un oligoproducto sintético (IA009) y cada uno de los PTOs. El oligoproducto sintético IA009 es un 100-mero con la secuencia:

55 AGTGTCCACCCCTGCCGGGATTTTAACGGACAGCGTTTTGCTGCGCTCAACACGACCATGACCATGACATTTGT TGCACGGATCTTTGATCAGCGTACCG (SEQ ID NO:19). La extensión solapante se preparó en reacciones de 15 μ l que contenían Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, MgCl₂ 6 mM, 1 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), IA009 100 nM, PTO 100 nM y 1 unidad de polimerasa de ADN Bca. Las reacciones se constituyeron sin polimerasa de ADN

Bca, se calentaron a 95°C y a continuación se enfriaron durante 10 minutos a 60°C. Después de añadir la polimerasa de ADN, las reacciones se incubaron a 60°C durante 30 minutos. Una porción (2,5 µl) de la mezcla de reacción se añadió a la mezcla de reacción de transcripción de ARN convencional y las reacciones de transcripción se determinaron mediante electroforesis en gel.

- 5 Tal y como se muestra en la Figura 7 (pista 1: escala del peso molecular; pistas 2-5: producto de extensión solapante de IA012, IA012b, IA015, IA015b, respectivamente, las pistas 6-13: ARN desde IA012, IA012b, IA015, IA015b, IA012, IA012b, IA015, IA015b, respectivamente) se produjo significativamente más ARN con el sustrato de la transcripción producido con los PTOs más cortos (IA015, IA015b) que con IA012 o IA012b. El PTO que contenía la extensión 5' pero no el espaciador (IA015b) producía unos rendimientos demostrablemente mayores de ARN. En todos los casos, sin embargo, aparecen múltiples productos además de la banda principal de ARN. Se diseñó un quinto PTO que tenía la misma secuencia que IA015b pero con un grupo 3' bloqueante (biotina) para eliminar el 3'-OH libre, para demostrar el comportamiento mejorado de un PTO bloqueado en 3'. El bloqueo del 3'-OH libre del PTO, elimina su capacidad de iniciar una incorporación no específica de una secuencia promotora funcional en los productos de amplificación, que conduce a una generación no específica de productos de transcripción. El comportamiento del PTO bloqueado en 3' y el PTO no bloqueado en la amplificación lineal isotérmica mejorada, se determinó a partir de la amplificación de una diana de oligonucleótidos sintéticos, empleando condiciones convencionales. El PTO bloqueado en 3' (IA015c) producía rendimientos comparables con IA015b de ARN específico, pero con significativamente menos ruido de fondo, tal y como se muestra en la Figura 8 (pista 1: escala de pesos moleculares; pistas 2, 9: sin ADN, 30 minutos; pistas 3, 10: sin ADN, 1 h; pistas 4, 11: sin ADN, 2 h; pistas 5, 12: 10¹⁰ copias de IA013, 30 min; pistas 6, 13: 10¹⁰ copias de IA013; 1 h; pistas 7, 14: 10¹⁰ copias de IA013, 2 h; pistas 8, 15: 10¹¹ copias de IA013, 30 min; las reacciones 17 no se bloquearon (IA015b), las reacciones 815 se bloquearon (IA015c)). Las reacciones de los testigos negativos (sin molde de ADN) y las reacciones que contenían 10¹⁰ copias de oligodiana (IA013) se amplificaron por desplazamiento de la hebra durante 30 minutos, 1 hora o 2 horas a 55°C, con IA015b o IA015c, incluido en la reacción de desplazamiento de la hebra. Cuando el 3'-OH no estaba bloqueado, se producía ARN no específico en todas las reacciones y complicaba la identificación de la banda de ARN específica. Por el contrario, el PTO bloqueado producía principalmente un producto de ARN aislado.

Ejemplo 4: Amplificación de una secuencia del gen J de ADN genómico de *E. coli* mediante la amplificación lineal, isotérmica y mejorada

- 30 El ADN se aisló a partir de 25 ml de *E. coli* K12 (ATCC 10798) que creció durante una noche en medio de tripton- NaCl. El ADN genómico se aisló por digestión con lisozima y solubilización en una solución de lisis caotrópica (kit Bactozol, Molecular Research Center, Cincinnati, OH) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. De forma resumida, se recogieron las bacterias por centrifugación a 6000 x g durante 5 minutos. Los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón de digestión Bactozyme y se incubaron a 50°C durante 30 minutos. El material lisado resultante se aclaró al final de la digestión, sin ningún racimo visible de células sin digerir. El material lisado se mezcló con 4 volúmenes de reactivo DNazol (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) y se incubó durante 35 minutos a temperatura ambiente. El ADN fue precipitado de la solución añadiendo 0,6 volúmenes de etanol helado. Después de incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente, el ADN precipitado se recogió por centrifugación durante 5 minutos a velocidad máxima en una microcentrífuga. El sedimento de ADN se lavó con etanol al 75%, se centrífugo de nuevo y se resuspendió en 1,5 ml de Tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) calentado a 40 50°C/55°C durante 30 minutos, con agitación frecuente. La solución resultante se hizo pasar repetidamente a través de una aguja de jeringa de calibre 22 para cizallar el ADN y reducir la viscosidad de la solución. El ADN se precipitó de nuevo (EPI005-35) añadiendo 1/10 volúmenes de acetato de amonio 5 M y 3 volúmenes de etanol helado. Después de incubar a 20°C durante 1 h, el ADN se recogió por centrifugación a velocidad máxima en una microcentrífuga. El sedimento se lavó con etanol al 75%, se centrífugo de nuevo y se resuspendió en 150 µl de Tampón TE. Se prepararon dos diluciones en Tampón TE para medir la D.O. (espectrofotómetro Beckman DU640, a partir de las 45 cuales se calculó la concentración de ADN, asumiendo que 50 µg/ml de ADNbc produce una D.O. a 260 nm de 1. Las concentraciones de ADN de dos diluciones eran 24,2 µg/10 µl y 24,6 µg/10 µl. La media de estas dos mediciones (24,4 µg/10 µl) se corresponde aproximadamente con 2,5 X 10⁹ copias del genoma/5 µl (5 fg de ADN genómico de *E. coli* = 1 copia).

50 Amplificación lineal mejorada isotérmica

El ADN se diluyó en Tampón TE en series de 10⁹, 10⁸ o 10⁷ copias/5 µl y se desnaturizó por calentamiento a 95°C durante 5 minutos, seguido de un rápido enfriamiento en hielo. El ADN molde monocatenario se diluyó hasta 10⁹ copias/5 µl. Las reacciones se determinaron para contener ausencia de ADN, 10⁷, 10⁸, 10⁹ o 2,5 x 10⁹ copias de ADN genómico.

- 55 La amplificación se realizó en reacciones de 15 µl que contenían Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, MgCl₂ 6,0 mM, dATP 1,0 mM, dCTP 1,0 mM, dTTP 1,0 mM, dGTP 0,8 mM, dITP 0,2 mM (dNTPs de Amersham), 6% de DMSO, 8% de glicerol, 100 µg/ml de BSA acetilada (Ambion, Austin, TX), 0,6 unidades/µl de inhibidor de la ribonucleasa recombinante (rRNasin, Promega, Madison, WI), cebador compuesto IA005 5 µM (secuencia descrita en el Ejemplo 1), oligonucleótido promotormolde (PTO) IA015C 200 nM (secuencia descrita en el Ejemplo 1). Las reacciones se reunieron con todos los componentes excepto las dos enzimas. Después de calentar a 99°C durante 10 segundos en un ciclador térmico programable (GeneAmp 9600, Perkin Elmer), las reacciones se incubaron a 60°C durante 30 minutos.

Después de alcanzar 60°C, se añadieron 0,6 µl de ARNasaH (0,05 unidades diluidas de la solución madre de 5 U/µl en Tris-HCl 10 mM, pH 8,5, 30% de glicerol, Hybridase, Epicentre Technologies, Madison, WI) y 1,0 µl de polimerasa de ADN Bca (2,0 unidades, Panvera, Madison, WI). Al final de la incubación a 60°C, las reacciones se enfriaron a 4°C. Un volumen de 5,0 µl de producto de desplazamiento de hebra se añadió a cada reacción de transcripción de ARN (volumen total 20 µl). La transcripción del ARN se realizó empleando condiciones convencionales y aumentando el volumen de la reacción hasta 20 µl para proporcionar suficiente material para el análisis directo del gel (5 µl) y la hibridación de la sonda (10 µl).

Al contrario que la amplificación de la diana sintética definida monocatenaria, la amplificación del ADN genómico de acuerdo con el método de la invención, requiere la formación de una parada definida para la formación de un producto de ADNmc con un extremo 3' definido. La formación de una parada definida para la extensión del cebador, se puede conseguir con un bloqueador, que se hibrida con el sitio definido en la hebra diana y no se puede ser desplazado por la polimerasa. Alternativamente, como en el presente ejemplo, una secuencia rica en GC aguas arriba del sitio del cebador, proporciona un punto de detención para la extensión del cebador, conduciendo de este modo a la formación de un producto de ADNmc con extremo 3' definido.

La amplificación con éxito de una secuencia definida de ADN genómico mediante el método de amplificación lineal, isotérmica mejorada de la invención, se muestra en la Figura 9 (Pista 1: sin ADN; pista 2: 10⁷ copias de ADN genómico de *E. coli*; pista 3: vacía; pista 4: 10⁸ copias de ADN genómico de *E. coli*). El producto de ARNmc se muestra que se hibrida con una sonda de oligonucleótidos específica.

Ejemplo 5: Evaluación del efecto del diseño del cebador sobre el comportamiento de la amplificación lineal isotérmica mejorada

Se determinó el comportamiento de cada uno de los tres cebadores compuestos en los métodos de amplificación de la invención. La amplificación lineal isotérmica se realizó en reacciones de 15 µl que contenían Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, MgCl₂ 6,0 mM, dATP 1,0 mM, dCTP 1,0 mM, dTTP 1,0 mM, dGTP 0,8 mM, dITP 0,2 mM (dNTPs de Amersham), DMSO al 6%, glicerol al 8%, 100 µg/ml de BSA acetilada (Ambion, Austin, TX), 0,6 unidades/µl de inhibidor de la ribonucleasa recombinante (rRNasin, Promega, Madison, WI), cebador compuesto 5 µM, oligonucleótido promotor (PTO) IA015C 200 nM. La secuencia del PTO IA015C está descrita en el Ejemplo 1. La secuencia de los cebadores compuestos IA005 (20-mero) está descrita en el Ejemplo 1. Otras secuencias de cebadores compuestos con nombres alfanuméricos son las siguientes:

IA019 (20-mero) ACGGAUGCGGUCUCCAGTGT (SEQ ID NO:2)

IA020 (21-mero) GACGGAUGCGGUCUCCAGTGT (SEQ ID NO:3)

Se utilizaron otras cuatro secuencias de cebadores compuestos que no tenían nombres alfanuméricos. Sus secuencias son, respectivamente:

(1) GCAAGACGGAUGCGGUCUCCAGTGT (SEQ ID NO:4)

(2) GACGATGCGUCTCCAGTGT (SEQ ID NO:5)

(3) GACGGATGCGGUUCTCCAGUGT (SEQ ID NO:6)

(4) GACGGATGCGGUUCTCCAGUGUCCA (SEQ ID NO:7)

Estos cebadores compuestos fueron sintetizados por Dharmacon Research, Inc. (Boulder, CO). La porción de ARN del oligonucleótido fue sintetizada empleando un grupo protector 5'-silylo junto con un grupo protector 2'-ortoéster lábil frente a ácidos (éter 2'-bis(acetoxietoxi)metílico o "2'-ACE" (Scaringe, S.A., y col. *J. Am. Chem. Soc.* 120:11820-11821 (1998) y Scaringe, S.A. "Advanced 5'-silyl-2'-orthoester approach to RNA oligonucleotide synthesis. *Methods in Enzymology*" (en prensa)). Los cebadores se purificaron con PAGE.

Las reacciones se reunieron con todos los componentes excepto las dos enzimas. Después de calentar a 70°C durante 10 segundos en un ciclador térmico programable (GeneAmp 9600, Perkin Elmer), las reacciones se enfriaron a 55°C-65°C. Después de alcanzar la temperatura inferior, se añadieron 0,05 unidades de ARNasaH (diluida a partir de la solución madre de 5 U/µl, empleando una solución de diluyente/almacenamiento: Tris-HCl 10 mM, pH 8,5, 30% de glicerol; Hybridase Thermostable RNAase H, Epicentre Technologies, Madison, WI) y 2,0 unidades de polimerasa de ADN Bca (2 U/µl; Panvera, Madison, WI). Las reacciones se incubaron a 55°C-65°C durante 30 minutos. Al final de la incubación, las reacciones se enfriaron a 4°C hasta la transcripción. La transcripción del ARN se realizó a 37°C durante 3 horas en reacciones de 10 µl que contenían 2,5 µl de la reacción de amplificación lineal anterior y Tris-HCl 40 mM, pH 8,5, KCl 70 mM, DTT 5,0 mM, MgCl₂ 12 mM, 110 µg/ml de BSA, 3 mM de cada rNTP (ATP, UTP, CTP, GTP, Amersham), 7,5% de DMSO, 1 unidad/µl de rRNasin (Promega, Madison, WI) y 20 unidades de polimerasa de ARN de T7 (Novagen, Madison, WI).

Los productos de la amplificación lineal mejorada generada con cada uno de los cebadores compuestos se resolvió por electroforesis en gel, tal y como se muestra en la Figura 10 (Pista 1: escala de peso molecular; pistas 1, 2:

IA015, 60°C; pistas 3, 4: IA019, 55°C; pistas 5, 6: IA019, 60°C; pistas 7, 8: IA019, 65°C; pistas 9, 10: IA020, 55°C; pistas 11, 12: IA020, 60°C; pistas 13, 14: IA020, 65°C). Los cebadores compuestos se diseñaron para hibridarse en el mismo sitio sobre la hebra diana y diferían en el número de desoxinucleótidos en el extremo 3'. Los mayores rendimientos de producto de ARN se produjeron con el cebador IA020, seguido de IA005 y IA019 igualmente. Los otros cuatro cebadores compuestos producían menos producto de ARN. La temperatura óptima para la etapa de amplificación lineal isotérmica era diferente para los distintos cebadores, tal y como se esperaba.

Ejemplo 6: Secuenciación isotérmica de las dianas de ácido nucleico empleando métodos de amplificación lineal

Las secuencias de ácidos nucleicos que se van a analizar, se aislaban primero de sus fuentes. Ejemplos no limitativos de fuentes empleadas en este ejemplo son animales, vegetales, bacterias, virus, levaduras u hongos. Si la fuente de ácidos nucleicos (ADN o ARN) procede de tejidos animales, entonces el tejido se homogeniza o se somete a ultrasonidos o a alguna fuerza para permitir que las células individuales se separen del tejido conectivo. Se debe tener cuidado para evitar la degradación del ADN y ARN, especialmente, especialmente ARNm y para evitar el cizallamiento de ADN genómico durante el tratamiento del tejido. Las células animales también se pueden obtener a partir de fuentes comerciales, es decir Gibco BRL o a partir de fuentes sin beneficios, es decir, American Tissue Type Culture (ATCC). Dependiendo de la forma deseada de ácidos nucleicos, ADN genómico, ARN total o ARNm, se pueden aislar siguiendo protocolos convencionales encontrados en Sambrook y col., más arriba. Los protocolos para aislar ácido nucleico de células vegetales también se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, más arriba. Si la fuente de ácido nucleico son fuentes de no mamíferos, por ejemplo, bacterias, levaduras, hongos o virus, se emplean protocolos ligeramente diferentes para aislar el ácido nucleico. Estos protocolos se pueden encontrar en Sambrook y col., o "Current Protocols in Molecular Biology for bacteria, yeast, fungi, and viruses".

La amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana definida se realiza como se ha descrito para la amplificación lineal isotérmica, tal y como se ha descrito en esta memoria. Aproximadamente 10^2 hasta 10^{12} copias se emplean para el molde. Además de los trifosfatos de desoxinucleótidos naturales (dNTPs) que se emplean en el método de amplificación, la mezcla de reacción de secuenciación incluye análogos de trifosfato marcados. Si cada análogo se marca exclusivamente, se pueden añadir los cuatro en el mismo tubo de reacción. Por otro lado, si cada análogo de nucleótido se marca con el mismo marcador, las reacciones de secuenciación se realizan en cuatro tubos de reacción diferentes en donde cada mezcla de reacción contiene uno de los análogos de nucleótido. Estos análogos se incorporan en el producto de extensión del cebador mediante la polimerasa y sirven para detener una extensión adicional a lo largo de la secuencia diana. Los productos de extensión truncados resultantes están marcados. Los múltiples productos de extensión del cebador desplazado acumulado, varían en la longitud, según el sitio en donde se incorpora cada uno de los análogos, lo que representa las distintas posiciones en la secuencia de un nucleótido complementario en la secuencia diana. El análisis de los productos de la reacción para elucidar la información de la secuencia, se puede realizar sometiendo los productos a una electroforesis en gel. Alternativamente, otros métodos de análisis también se pueden utilizar. Como con otros métodos de secuenciación, las reacciones de secuenciación se realizan en un recipiente de reacción sencillo o en recipientes de reacción separados. La elección del método que se va a utilizar depende de los análogos de trifosfato de nucleótidos utilizados. Por tanto, cuando cada uno de los análogos se marca diferencialmente, la reacción de secuenciación se puede realizar en un recipiente aislado. Las consideraciones para la elección del reactivo y las condiciones de reacción para una realización óptima del análisis de secuenciación de acuerdo con el método de la invención, son similares a las de otros métodos descritos previamente.

La pluralidad de los productos de extensión del cebador que difieren en tamaño de acuerdo con la incorporación específica del terminador de la elongación, se separan por el tamaño empleando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica. El perfil de la pluralidad de productos de extensión del cebador producidos con cada uno de los análogos de terminadores, es indicativo de la secuencia de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos del ensayo.

Ejemplo 7: Secuenciación de dianas de ácido nucleico empleando la amplificación mejorada

La amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana definida se realiza tal y como se ha descrito para la amplificación isotérmica lineal que implica transcripción, tal y como se ha descrito en esta memoria. El uso de TSO o PTO se puede emplear para anexionar la secuencia protopromotora al producto de la amplificación lineal isotérmica. Además de los trifosfatos de ribonucleótidos naturales (rRTPs) que se emplean para el método de amplificación lineal mejorada de acuerdo con la presente invención, la mezcla de reacción de secuenciación también incluye análogos de trifosfato marcados adecuados, que se emplean normalmente en otros métodos de secuenciación conocidos en la técnica. Estos se incorporan en el producto de extensión mediante la polimerasa de ARN y sirven para detener una extensión adicional de la secuencia diana. Los productos de extensión truncados resultantes están truncados. Los productos de extensión desplazados múltiples acumulados varían en la longitud, según el sitio de incorporación de cada uno de los análogos que representan las distintas localizaciones de la secuencia de un nucleótido complementario, sobre la secuencia diana. El análisis de los productos de la reacción para elucidar la información de la secuencia, se puede realizar tal y como se ha descrito en el anterior ejemplo de secuenciación.

Ejemplo 8: Genotipado empleando amplificación lineal isotérmica mejorada y cebador compuesto específico de genotipo

El ADN genómico se aísla a partir de células del ensayo, empleando métodos descritos en ejemplos anteriores o por otros medios conocidos por los expertos en la técnica. Organismos distintos que incluyen, pero no están limitados a bacterias, virus, hongos, levaduras, vegetales y animales se genotipan. Los cebadores específicos del genotipo se diseñan para comprender un nucleótido en el extremo 3' que se hibrida con un genotipo de una secuencia de ácidos nucleicos específica o que se hibrida con el genotipo duplicado. Los genotipos específicos que determinan una variación de la secuencia pueden ser mutaciones puntuales, polimorfismo de nucleótidos aislados (SNP), inserciones, deleciones y similares.

La amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana definida se realiza como se ha descrito para la amplificación de la secuencia genómica de *E. coli*, en el ejemplo anterior. Empleando el cebador específico del genotipo y la polimerasa de ADN que está desprovista de actividad de corrección de pruebas, la generación del producto de la amplificación indica la presencia de la secuencia diana del genotipo definido. La variación de la secuencia que evita la hibridación del extremo 3' del cebador con la secuencia de ácido nucleico diana, evitará la amplificación. El producto de la amplificación se detecta mediante uno cualquiera de los distintos métodos para detectar una secuencia de ácido nucleico monocatenario, que se conocen en la técnica. Por ejemplo, la hibridación de sondas de oligonucleótidos marcadas específicas, con el producto de la amplificación, se detecta por electroforesis en gel.

En casos en los que se requiere el genotipado de células diploides, tales como en la determinación de un genotipo homocigoto o heterocigoto, es posible realizar la amplificación de la secuencia diana de ácido nucleico específica, empleando cebadores específicos, diseñados para el genotipo silvestre y el mutante, o para un genotipo y para otro genotipo. Las reacciones de amplificación que emplean los cebadores específicos, se realizan en recipientes de reacción separados. La detección del producto de la amplificación en un solo tubo de reacción o menos producto de amplificación es indicativa de un genotipo homocigoto, es decir, tanto de tipo silvestre como homocigoto mutante. La detección del producto de la amplificación en ambas reacciones de amplificación, indica un genotipo heterocigoto.

Ejemplo 9: Detección isotérmica de una mutación que se basa en una porción de ARN, empleando métodos de amplificación

Los métodos de amplificación isotérmica descritos en esta memoria, se emplean para la detección de mutaciones definidas o de sitios polimórficos (tales como SNPs) en una secuencia de ácido nucleico diana. Los métodos se emplean para genotipar o detectar la mutación que conduce a una resistencia a los fármacos. La secuencia de ácido nucleico diana es ADN(mc) monocatenario. La diana de ADN monocatenario se prepara a partir de una diana de ADN bicatenario o una diana de ARN empleando los métodos de amplificación isotérmica, descritos en esta memoria.

Tal y como se muestra en la Figura 4, un cebador compuesto que es complementario a una secuencia de ADN de tipo silvestre, se emplea junto con una diana de ADNmc que tiene o que se sospecha que tiene una mutación en el alelo bajo escrutinio. Se emplean aproximadamente 10^2 hasta aproximadamente 10^{12} copias de la diana de ADNmc y aproximadamente 0,05-5 μM de cebador compuesto. La presencia de la alteración de la secuencia no evita la etapa inicial de la amplificación, en donde el cebador compuesto se hibrida con la secuencia diana para formar el primer complejo trimolecular y se produce un producto de extensión. Una ribonucleasa, ARNasaH, corta a continuación la porción de ARN del cebador extendido del complejo. El corte de la porción de ARN del cebador compuesto o el producto de extensión del cebador, mediante la ARNasaH, está afectado por la presencia de un mal emparejamiento. Esto puede evitar el corte, alterar el patrón de corte o reducir la eficacia del corte. La siguiente etapa de unir un cebador compuesto al complejo mediante hibridación de la porción de ARN 5', se inhibe por un mal emparejamiento, por la razón descrita anteriormente. La incapacidad de del cebador compuesto de hibridarse con la diana, evita etapas adicionales de desplazamiento de la hebra de extensión del cebador y la producción de múltiples copias de los productos de la amplificación. Los productos de la amplificación, o la falta de los mismos, se visualiza mediante electroforesis en gel u otros medios equivalentes.

Los factores que contribuyen a inhibir la hibridación del cebador incluyen el tamaño del oligonucleótido que se va a hibridar y las restricciones de las condiciones de la reacción. Estos factores se consideran en el diseño del cebador compuesto, según las técnicas bien conocidas y rutinarias de la técnica.

Un cebador compuesto que es complementario a una secuencia de ADN mutada, también se emplea junto con una diana de ADNmc de tipo silvestre en el método de amplificación isotérmica descrito anteriormente. En este caso, el cebador se une al ADN diana y se produce una extensión. Sin embargo, después del tratamiento ARNasaH, no se puede unir más cebador al ADN de tipo silvestre por el mal emparejamiento de nucleótidos y, por tanto, se produce una menor o ninguna amplificación del producto. Los productos de la amplificación o la falta de los mismos, se visualiza por electroforesis en gel u otros medios equivalentes.

También se realizan reacciones paralelas que incluyen la muestra de ácido nucleico de interés o la muestra de referencia del ácido nucleico diana, con una secuencia de tipo silvestre. La acumulación de más productos de extensión del cebador en la primera reacción, comparada con la última, es indicativo de la presencia de un genotipo mutante en la muestra de interés. Alternativamente, cuando el cebador compuesto comprende una secuencia de ARN 5' que es totalmente complementaria a una secuencia de genotipo normal de la diana del ensayo, se evita la amplificación

de una secuencia diana del genotipo mutante y la detección y/o la determinación cuantitativa de los productos de la amplificación son indicativas de un genotipo normal.

Ejemplo 10: Genotipado que emplea métodos de amplificación isotérmica e hibridación de la sonda específica del genotipo

5 Los métodos para secuenciar mediante hibridación se describen en los ejemplos previos. La determinación de la identidad de secuencia mediante hibridación de una sonda específica es particularmente ventajoso, empleando el método isotérmico de la invención, mientras que el producto de la amplificación generado por el método de la invención sea monocatenario y de buena disponibilidad para emplear en la hibridación de sondas específicas. Las sondas específicas para un genotipo definido se diseñan empleando métodos conocidos en la técnica. Es posible determinar
10 criterios de hibridación que apoyen la hibridación de una sonda selectiva con los productos de la amplificación generados por amplificación de un genotipo y no del otro. Una variación de la secuencia, tan reducida como un único nucleótido, puede evitar la hibridación de la sonda. Los siguientes factores se toman en consideración para los criterios de hibridación: longitud de la sonda, temperatura de la reacción de hibridación y la composición del tampón, en particular, la concentración de iones divalentes. Las sondas empleadas para el análisis pueden estar en solución o
15 pueden estar fijadas a una superficie sólida. Además, las sondas se pueden marcar o fijar directamente a un miembro de una pareja específica de unión y, de este modo, ser capaz de unirse específicamente a otro miembro de la pareja de unión específica que puede estar marcado directa o indirectamente.

El ADN genómico se aísla a partir de las muestras del ensayo por métodos conocidos en la técnica o como se ha descrito en el ejemplo anterior. El ADN del ensayo se combina con los componentes de la amplificación descritos, el
20 cebador quimera específico de la diana y la secuencia propromotora (tal como PTO). La combinación se somete a condiciones de incubación, tales como las descritas en esta memoria, para generar un producto de amplificación de ARN monocatenario. La hibridación del producto de la amplificación con las sondas específicas del genotipo se realiza en solución o en fase sólida con sondas específicas del genotipo fijadas. Puesto que los productos de los métodos de amplificación lineal, isotérmica mejorada son monocatenarios, los productos son perfectamente adecuados para ser fijados a la fase sólida, tal como un portaobjetos de vidrio, para generar una formación de sondas específicas con resolución espacial (es decir, chip génico). Alternativamente, la fase sólida comprende partículas a las que se fijan sondas específicas. La detección de la hibridación de la sonda con los productos de amplificación se realiza mediante diversos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos por Sambrook y col., más
25 arriba. Las sondas específicas se marcan y el cambio de las propiedades espectrales marcadas debido a la hibridación se detecta y se almacena en algoritmos de ordenador.

La asociación de partículas debida a la hibridación de sondas específicas con los productos de la amplificación, también se emplea para la detección de la hibridación de la sonda. Los productos de la amplificación marcados se generan y la hibridación de los productos con sondas inmovilizadas sobre superficies sólidas se detecta y se almacena mediante algoritmos de ordenador. La generación del producto de amplificación marcado se realiza mediante
35 la incorporación de rNTPs marcados durante la etapa de transcripción, sustituyendo uno de los cuatro rNTPs por un análogo de rNTP, que está marcado. La marcación es un colorante o una pequeña molécula tal como biotina, que se detecta a continuación por la unión a una entidad de unión específica, tal como estreptavidina marcada. Los métodos para detectar la hibridación de la sonda sobre superficies sólidas son conocidos en la técnica.

Ejemplo 11: Genotipado mediante rSSCP (Polimorfismo en la configuración monocatenaria del ARN)

40 El genotipado se realiza por amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana específica, empleando los métodos descritos en esta memoria y por determinación del patrón de las bandas electroforéticas del producto de ARN monocatenario que refleja la configuración monocatenaria. El uso de SSCP para la detección de la alteración de la secuencia está ampliamente empleado. La configuración monocatenaria específica del genotipo se determina sometiendo las muestras a electroforesis en gel o capilar. La generación de producto monocatenario por amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana, según el método de la invención, vuelve este método particularmente adecuado para la determinación del genotipo combinando el método de amplificación con el análisis rSSCP.
45

El ADN genómico del ensayo purificado se combina con componentes del método de amplificación de la invención, tal y como se ha descrito anteriormente, y el cebador compuesto específico de la diana y la secuencia propromotora, tal como PTO. La combinación se somete a condiciones para la amplificación isotérmica de la secuencia diana. La mezcla de reacción que contiene el producto de la amplificación se somete a electroforesis en gel o capilar, empleando instrumentos y condiciones conocidas en la técnica. El patrón de bandas electroforéticas del producto de la amplificación se determina. La visualización del producto oligonucleótido se consigue por inclusión de un intercalador de colorante. El patrón electroforético del producto de la amplificación se compara con el de los productos de la amplificación generados por amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana, obtenida a partir de células de genotipo conocido. Cualquier cambio en el patrón de movilidad electroforético es indicativo de variabilidad de la secuencia. La combinación del método de amplificación de la invención y rSSCP proporciona un solo método para descubrir el polimorfismo en la secuencia de secuencias dianas definidas y para detectar los genotipos definidos previamente. El patrón electroforético de secuencias de ácido nucleico conocidas o de genotipos definidos, se puede predeterminar y el patrón generado por los productos de la amplificación del ADN del ensayo se comparará con patrones conocidos para la determinación del genotipo.
60

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Kurn, N.

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN LINEAL E ISOTÉRMICA DE SECUENCIAS DE POLINUCLEÓTIDOS

5	<130> 492692000100	
	<140> Adjunta	
	<141>	
	<160> 22	
	<170> FastSEQ para Windows versión 4.0	
10	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Cebador sintético	
	<220>	
15	<223> Cebador quimérico de ADN/ARN. IA005	
	<400> 1	
	acggaugcgg ucuccagtgt	20
20	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Cebador sintético	
	<220>	
25	<223> Cebador quimérico de ADN/ARN. IA019	
	<400> 2	
	acggaugcgg ucuccagtgt	20
30	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Cebador sintético	
	<220>	
	<223> Cebador quimérico de ADN/ARN. IA020	
35	<400> 3	
	gacggaugcg gucuccagtgt	21
40	<210> 4	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Cebador sintético	
	<220>	
	<223> Cebador quimérico de ADN/ARN	
	<400> 4	
	gcaagacgga ugcggucucc agtgt	25
45	<210> 5	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Cebador sintético	
	<220>	
50	<223> Cebador quimérico de ADN/ARN	

ES 2 447 419 T3

	<400> 5 gacggatgcg guctccagtg t	21
5	<210> 6 <211> 21 <212> ADN <213> Cebador sintético <220> <223> Cebador quimérico de ADN/ARN	
10	<400> 6 gacggatgcg guctccagug t	21
15	<210> 7 <211> 24 <212> ADN <213> Cebador sintético <220> <223> Cebador quimérico de ADN/ARN	
20	<400> 7 gacggatgcg guctccagug ucca	24
25	<210> 8 <211> 67 <212> ADN <213> Cebador sintético <220> <223> IA012	
30	<400> 8 ggaattctaa tacgactcac tatagggaga gatcgagtag ctccggtacg ctgatcaaag atccgtg	60 67
35	<210> 9 <211> 60 <212> ADN <213> Cebador sintético <220> <223> IA012b	
40	<400> 9 taatagcact cactataggg agagatcgag tagctccggt acgctgatca aagatccgtg	60
45	<210> 10 <211> 48 <212> ADN <213> Cebador sintético <220> <223> IA015	
50	<400> 10 taatagcact cactataggg agagcggtag gctgatcaaa gatccgtg	48
55	<210> 11 <211> 55 <212> ADN <213> Cebador sintético <220> <223> IA015b	
50	<400> 11 ggaattctaa tacgactcac tatagggaga gcggtacgct gatcaaagat ccgtg	55

ES 2 447 419 T3

	<210> 12	
	<211> 55	
	<212> ADN	
	<213> Cebador sintético	
5	<220>	
	<223> La guanina tiene fijada una molécula de biotina IA015c	
	<400> 12	
	ggaattctaa tacgactcac tatagggaga gcggtacgct gatcaaagat ccgtg	55
10	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Cebador sintético	
	<220>	
15	<223> IA010	
	<400> 13	
	atgcatggt catggtcgtg t	21
	<210> 14	
	<211> 31	
20	<212> ADN	
	<213> Cebador sintético	
	<220>	
	<223> IA014	
	<400> 14	
25	ctcaacacga ccatgacat gacattgtt g	31
	<210> 15	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Cebador sintético	
30	<220>	
	<223> IA004	
	<400> 15	
	cgcatacgga atagcttacc ggtct	25
	<210> 16	
35	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Cebador sintético	
	<220>	
	<223> IA006	
40	<400> 16	
	cggtacgctg atcaaagatc cgt 23	
	<210> 17	
	<211> 351	
	<212> ADN	
45	<213> Cebador sintético	
	<400> 17	
	cggtacgctg atcaaagatc cgtgcaaca atgcatggt catggtcgtg ttgagcgcag 60	
	caaaacgctg tccgttaaaa tcccgccagg ggtggacct ggagaccgca tccgtcttc 120	
	ggcggaaggt gaagcgggcg agcatggcg accggcaggc gatctgtacg ttcagggtca 180	
50	ggtaaacag caccgattt tcgagcgtga aggcaacaac ctgtattgag aagtcccgat 240	
	caacttcgct atggcggcg tgggtggcga aatcgaagta ccgacccttg atggtcgcgt 300	
	caactgaaa gtgcctggcg aaaccagac gcctaagcta tccgtatgc g 351	

ES 2 447 419 T3

	<210> 18	
	<211> 115	
	<212> ADN	
	<213> Cebador sintético	
5	<220>	
	<223> IA013	
	<400> 18	
	cggtacgctg atcaaagatc cgtgcaacaa atgtcatggt catggtcgtg ttgagcgcag	60
	caaaacgctg tccgtaaaa tcccggcagg ggtggacact ggagaccgca tccgt	115
10	<210> 19	
	<211> 100	
	<212> ADN	
	<213> Cebador sintético	
	<220>	
15	<223> IA009	
	<400> 19	
	agtgtccacc cctgccggga ttttaacgga cagcgtttg ctgcgctcaa cacgaccatg	60
	accatgacat ttgtgcacg gatccttgat cagcgtaccg	100
20	<210> 20	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Bacteriófago	
	<400> 20	
	taatagcact cactataggg agag	24
25	<210> 21	
	<211> 7	
	<212> ADN	
	<213> Cebador sintético	
	<400> 21	
30	ggaattc	7
	<210> 22	
	<211> 12	
	<212> ADN	
	<213> Cebador sintético	
35	<400> 22	
	atcgagtagc tc	12

REIVINDICACIONES

1. Un kit para amplificar una secuencia de polinucleótidos, que comprende un cebador compuesto en donde el cebador compuesto comprende una porción de ARN y una porción de ADN 3', y en donde la porción de ARN es totalmente complementaria a la secuencia de polinucleótidos y tiene al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 3, 4 o 5 nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 10, 15, 20, 25 o 30 nucleótidos y la porción de ADN 3' es complementaria al menos en un 95% a la secuencia de polinucleótidos y tiene al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 3, 5, 7 o 10 nucleótidos con un límite superior de aproximadamente 10, 12, 15 o 18 nucleótidos.
2. El kit según la reivindicación 1, en donde la porción de ARN consiste en cualquiera de 3 a 30 nucleótidos, 5 a 30 nucleótidos, 3 a 25 nucleótidos, 5 a 25 nucleótidos, 3 a 20 nucleótidos, 5 a 20 nucleótidos, 3 a 18 nucleótidos, 3 a 15 nucleótidos, 5 a 18 nucleótidos, 5 a 15 nucleótidos, 3 a 12 nucleótidos o 5 a 12 nucleótidos.
3. El kit según la reivindicación 1 o 2, en donde la porción de ADN 3' consiste en cualquiera entre 3 a 18 nucleótidos, 3 a 15 nucleótidos, 3 a 12 nucleótidos, 5 a 18 nucleótidos, 5 a 15 nucleótidos, 5 a 12 nucleótidos, 7 a 18 nucleótidos, 7 a 15 nucleótidos, 7 a 12 nucleótidos, 10 a 18 nucleótidos, 10 a 15 nucleótidos o 10 a 12 nucleótidos.
4. El kit según la reivindicación 1, en donde el cebador compuesto comprende una porción de ARN 5' y una porción de ADN 3', y en donde la porción de ARN 5' tiene al menos aproximadamente cualquiera entre 3, 5, 7, 8 o 10 nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 15, 17, 18 o 20 nucleótidos y la porción de ADN 3' tiene al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 3, 5, 7 o 10 nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 10, 12, 15 o 18 nucleótidos.
5. El kit según la reivindicación 4, en donde dicha porción de ARN 5' es adyacente a dicha porción de ADN 3'.
6. El kit según la reivindicación 4 o 5, en donde la porción de ARN consiste en cualquiera de 3 a 20 nucleótidos, 3 a 18 nucleótidos, 3 a 15 nucleótidos, 5 a 20 nucleótidos, 5 a 18 nucleótidos, 5 a 15 nucleótidos, 10 a 20 nucleótidos, 10 a 18 nucleótidos, 10 a 15 nucleótidos, 7 a 20 nucleótidos, 7 a 18 nucleótidos o 7 a 15 nucleótidos.
7. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde la porción de ADN consiste en cualquiera de 3 a 18 nucleótidos, 3 a 15 nucleótidos, 3 a 12 nucleótidos, 3 a 10 nucleótidos, 5 a 18 nucleótidos, 5 a 15 nucleótidos, 5 a 12 nucleótidos, 5 a 10 nucleótidos, 7 a 18 nucleótidos, 7 a 15 nucleótidos, 7 a 12 nucleótidos, 7 a 10 nucleótidos, 10 a 18 nucleótidos, 10 a 15 nucleótidos o 10 a 12 nucleótidos.
8. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el cebador compuesto consiste en la porción de ARN y la porción de ADN.
9. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente una enzima que escinde el ARN a partir de un híbrido de ARN/ADN.
10. El kit según la reivindicación 9, en donde la enzima que escinde el ARN a partir del híbrido de ARN/ADN es ARNasaH.
11. El kit según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente una polimerasa de ADN.
12. Una composición que comprende un cebador compuesto según se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
13. La composición según la reivindicación 12, que comprende adicionalmente una enzima que escinde el ARN a partir de un híbrido de ARN/ADN.
14. La composición según la reivindicación 13, en donde la enzima que escinde el ARN a partir de un híbrido de ARN/ADN es ARNasaH.
15. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, que comprende adicionalmente una polimerasa de ADN.
16. El kit según la reivindicación 1, en donde la porción de ARN es totalmente complementaria a la secuencia de tipo silvestre o a una variante de secuencia de la secuencia de polinucleótidos.
17. El kit según la reivindicación 1, en donde la variante de secuencia de la secuencia de polinucleótidos comprende un solo polimorfismo de nucleótidos.
18. Un kit para amplificar una secuencia de polinucleótidos que comprende un cebador compuesto, en donde el cebador compuesto comprende una porción de ARN y una porción de ADN 3', y en donde la porción de ARN comprende una secuencia complementaria a una variante de secuencia de la secuencia de polinucleótidos y tiene al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 3, 4 o 5 nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cual-

quiera entre 10, 15, 20, 25 o 30 nucleótidos y la porción de ADN 3' tiene al menos aproximadamente cualquiera entre 1, 3, 5, 7 o 10 nucleótidos, con un límite superior de aproximadamente cualquiera entre 10, 12, 15 o 18 nucleótidos; y una enzima que escinde el ARN a partir de un híbrido de ARN/ADN.

- 5 19. El kit según la reivindicación 16, en donde la variante de secuencia de la secuencia de polinucleótidos comprende un solo polimorfismo de nucleótidos.

FIGURA 1A

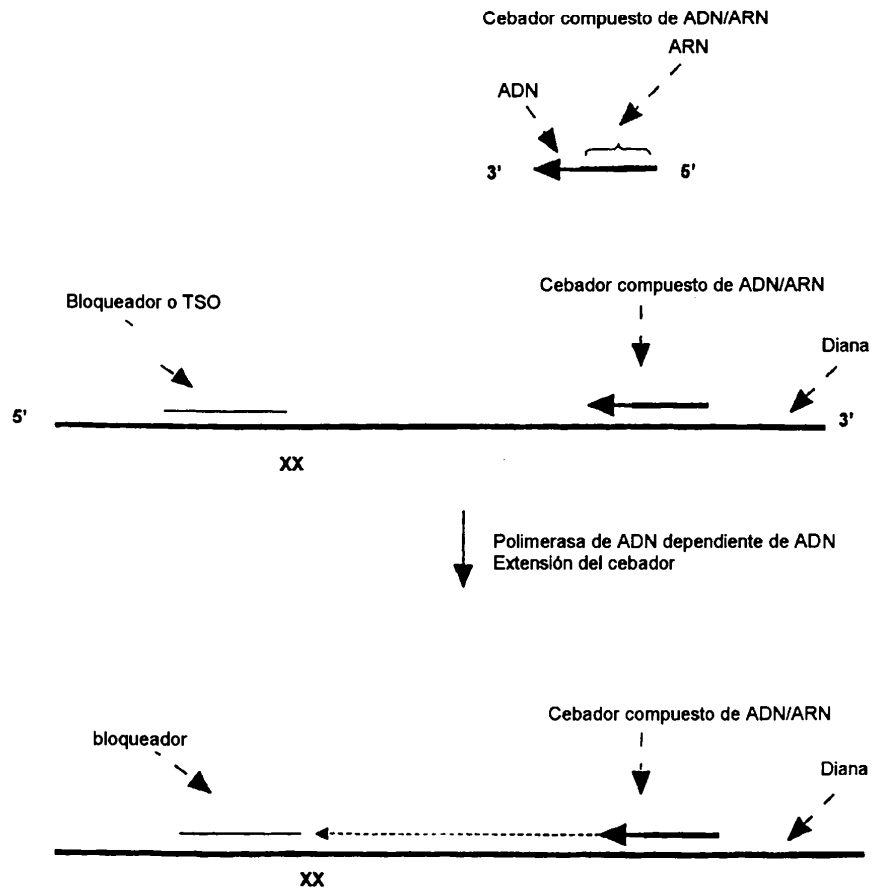


FIGURA 1B

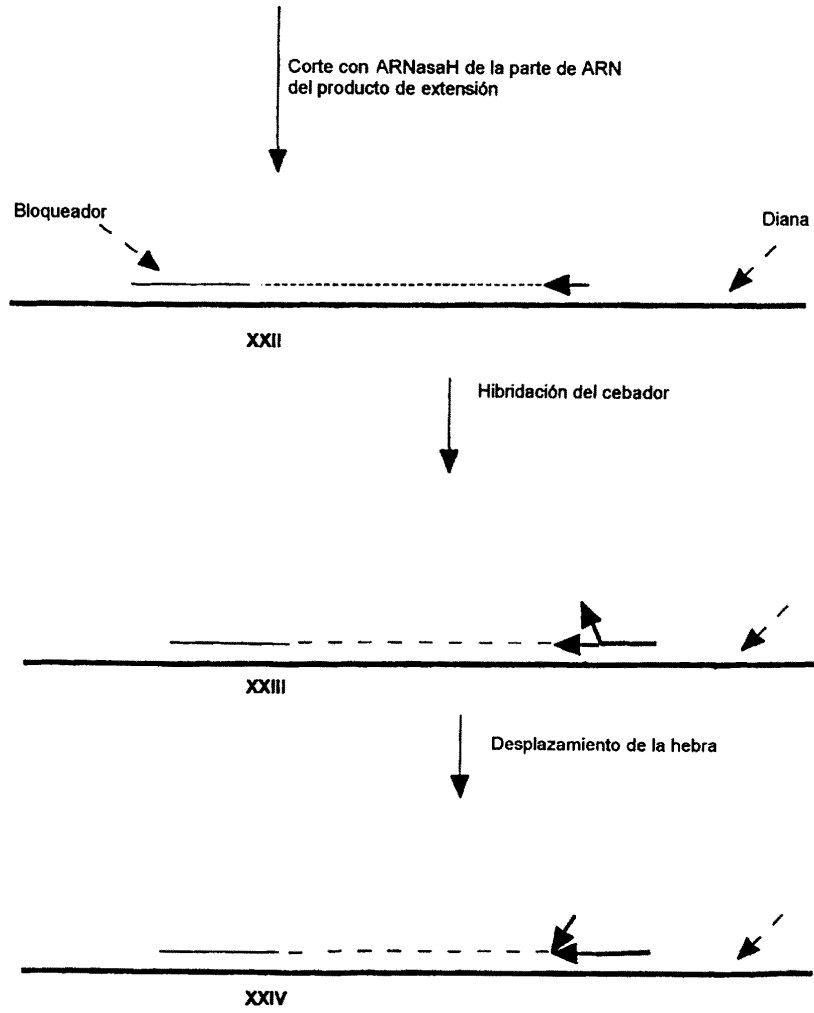


FIGURA 1C

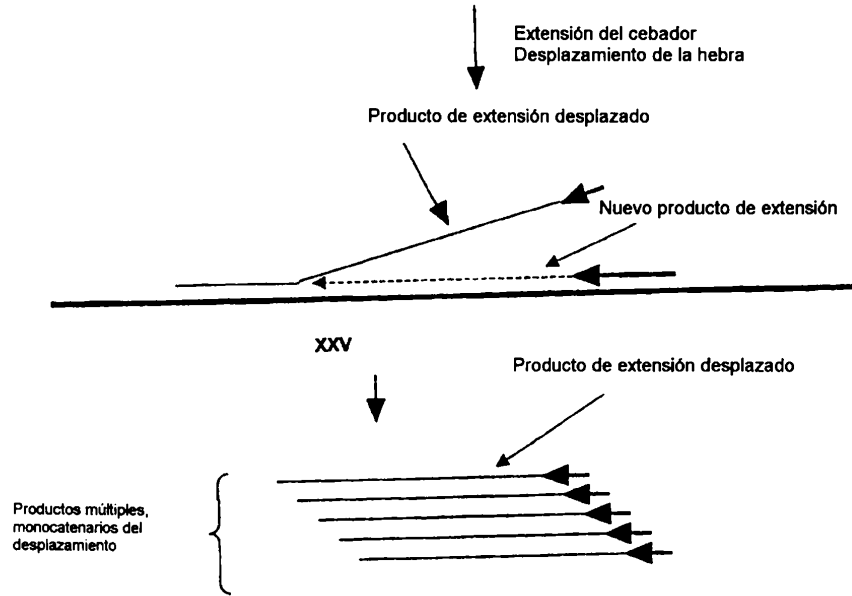
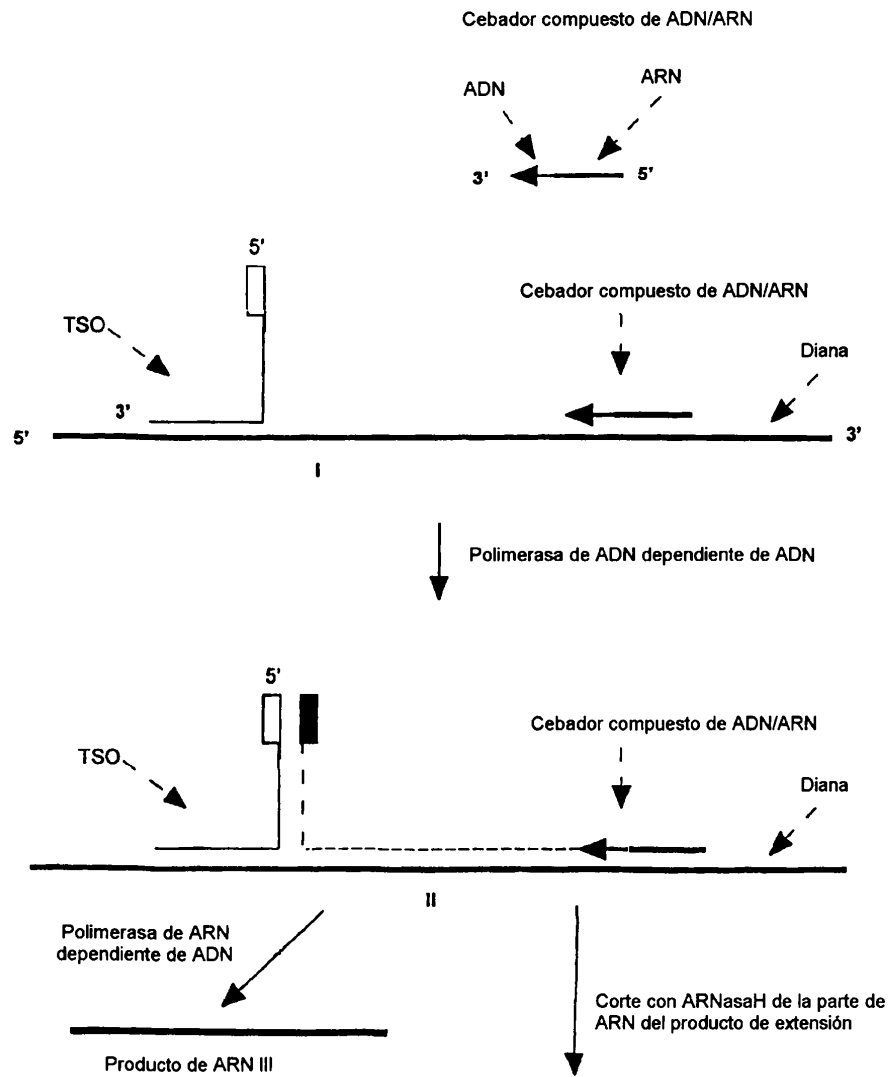


FIGURA 2A



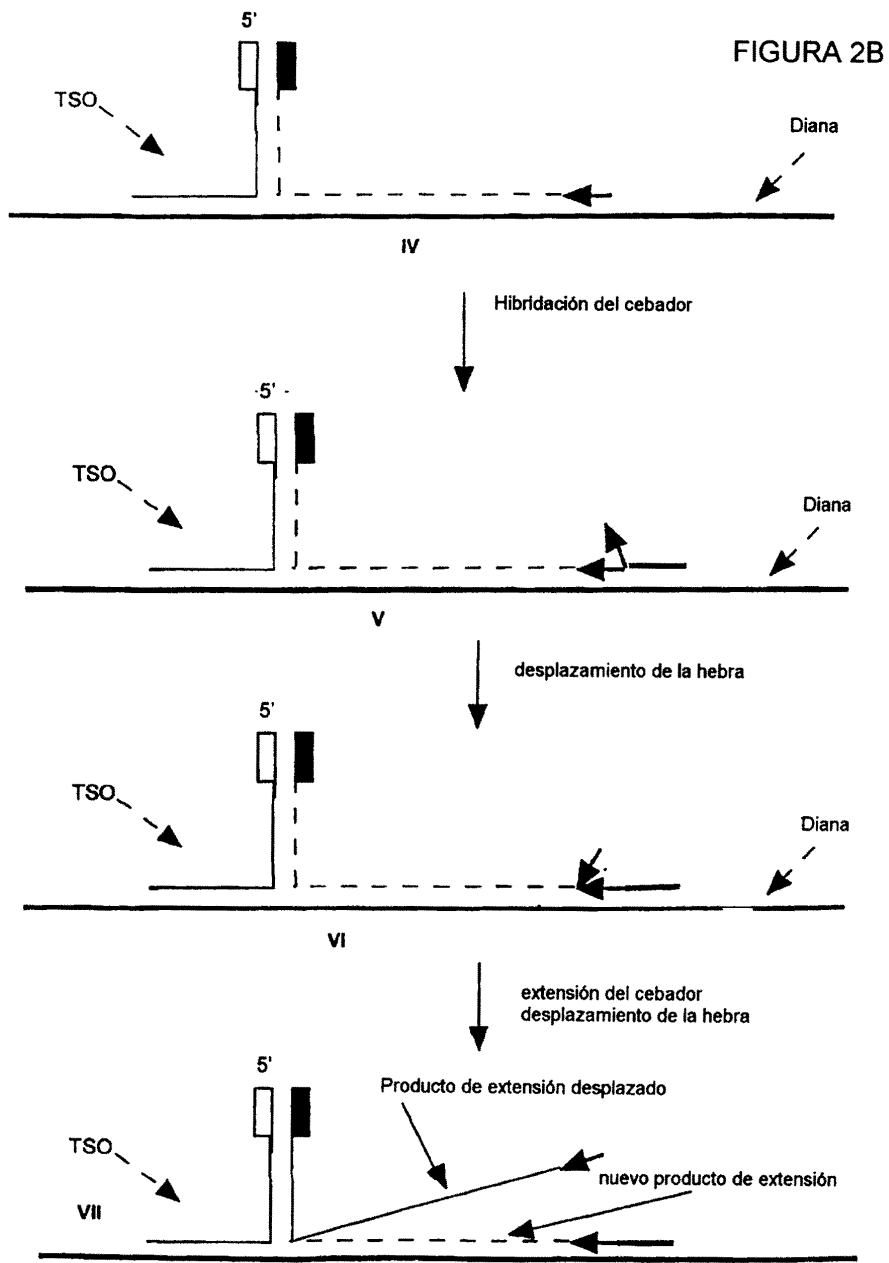


FIGURA 2C

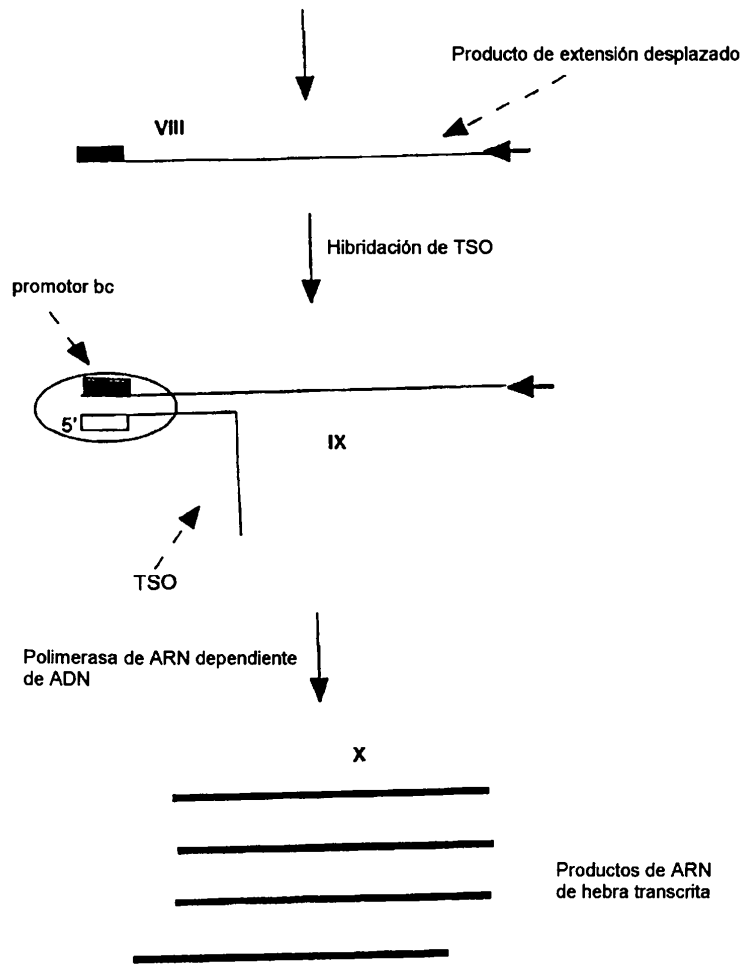


FIGURA 3A

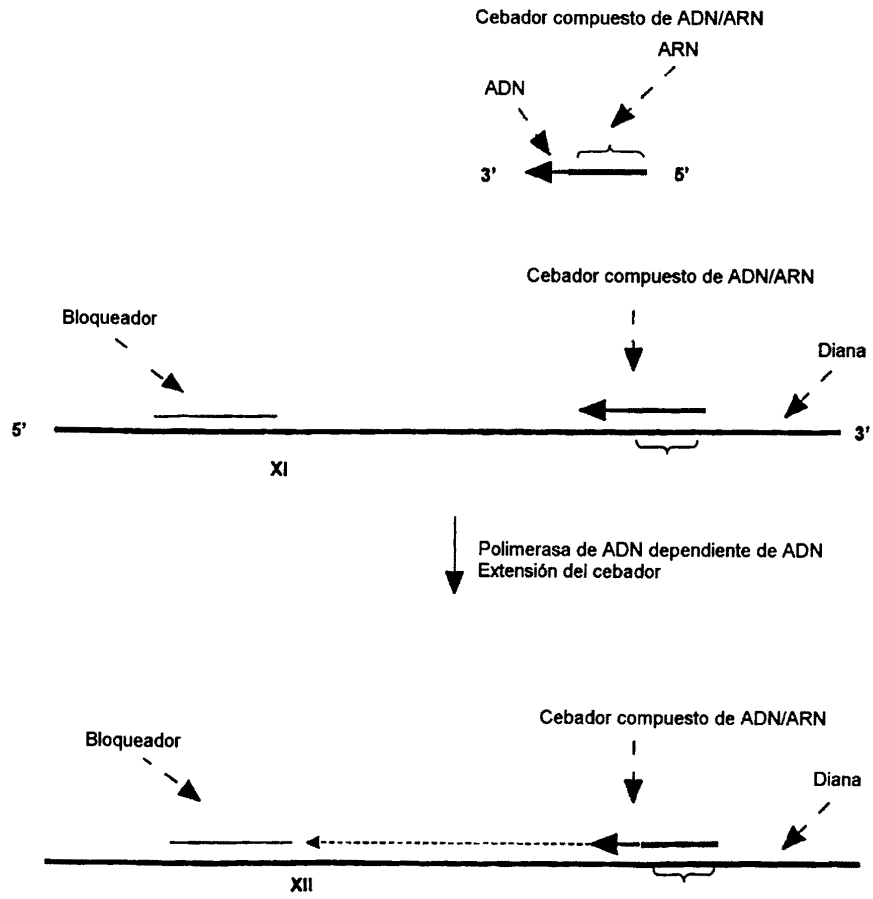


FIGURA 3B

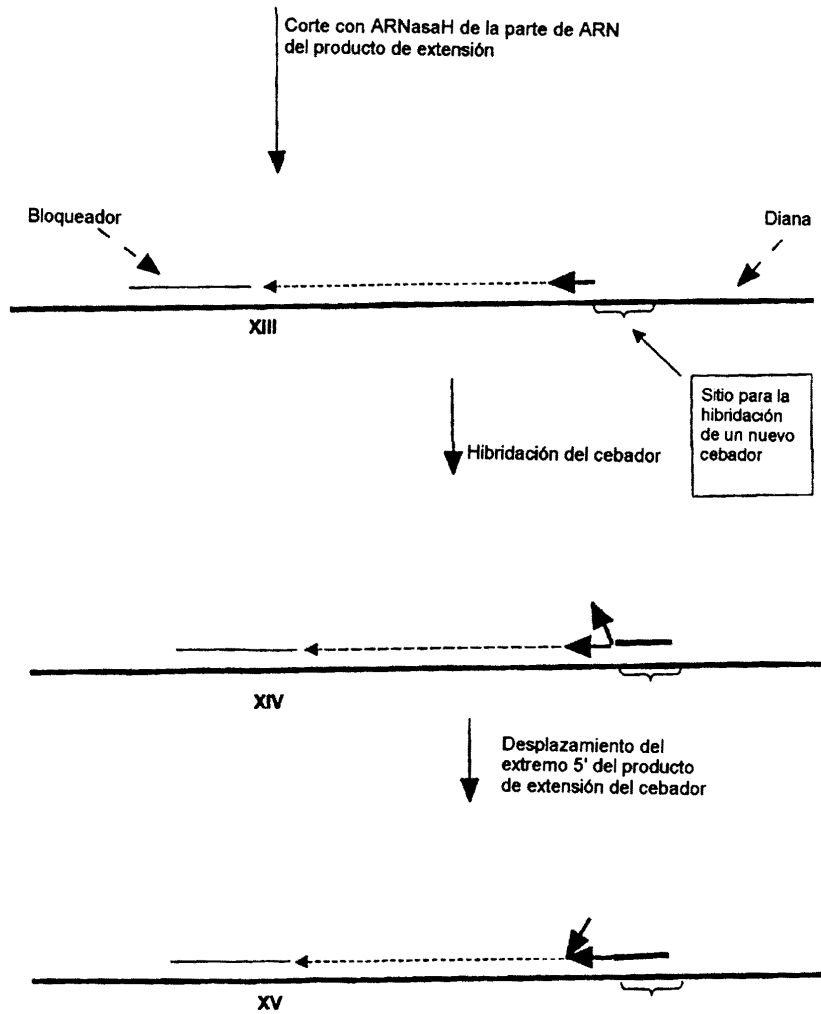


FIGURA 3C

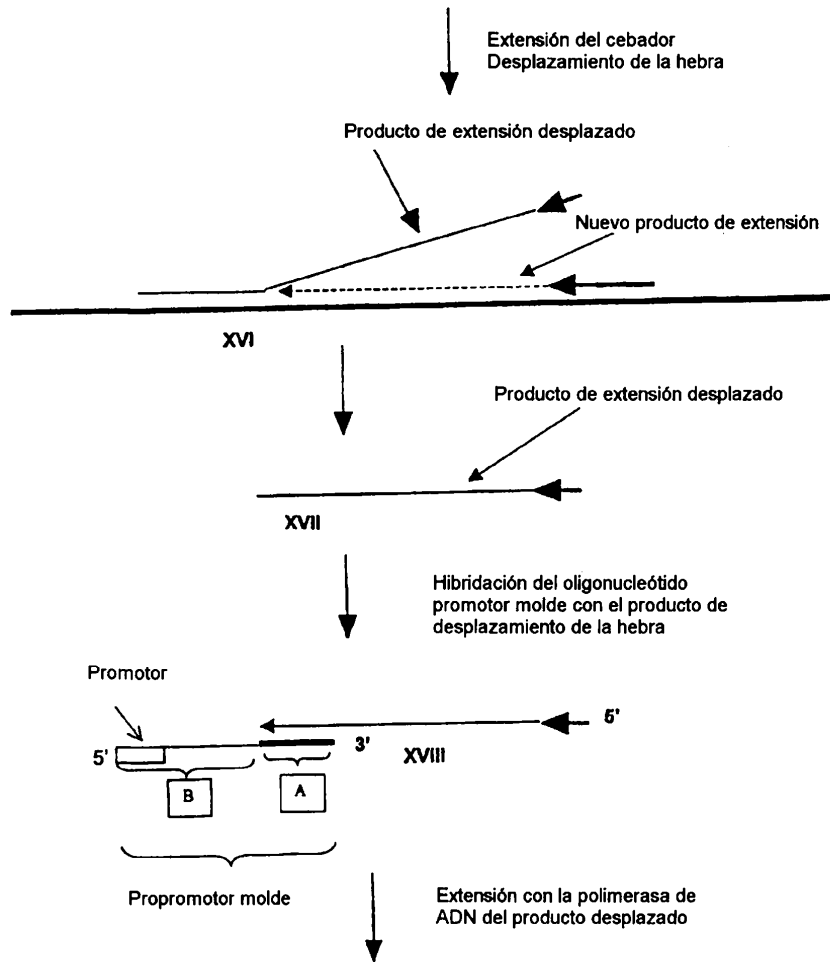


FIGURA 3D

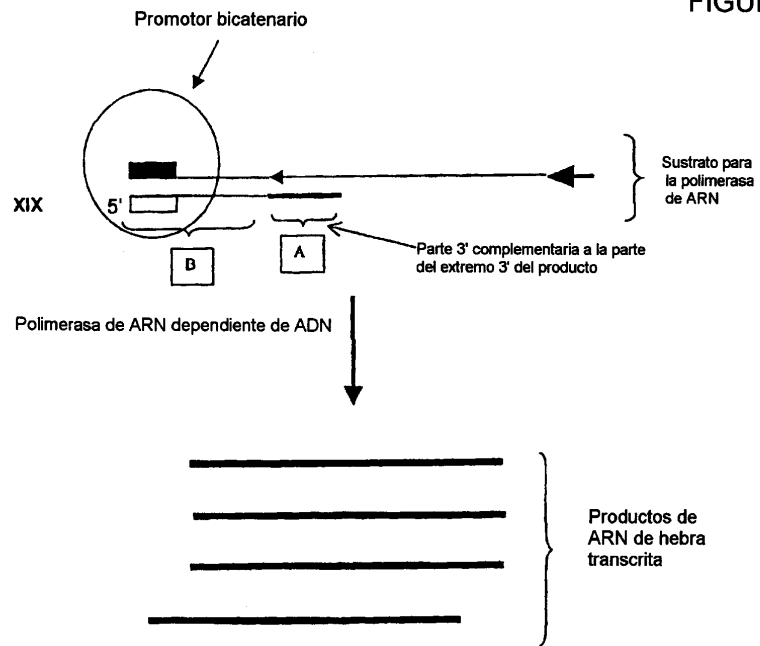


FIGURA 4A

X significa una mutación en el ADN diana en un sitio complementario a la parte de ARN 5' del cebador.
 Tal y como se muestra, la amplificación del A.N. diana está bloqueada cuando está presente una mutación.

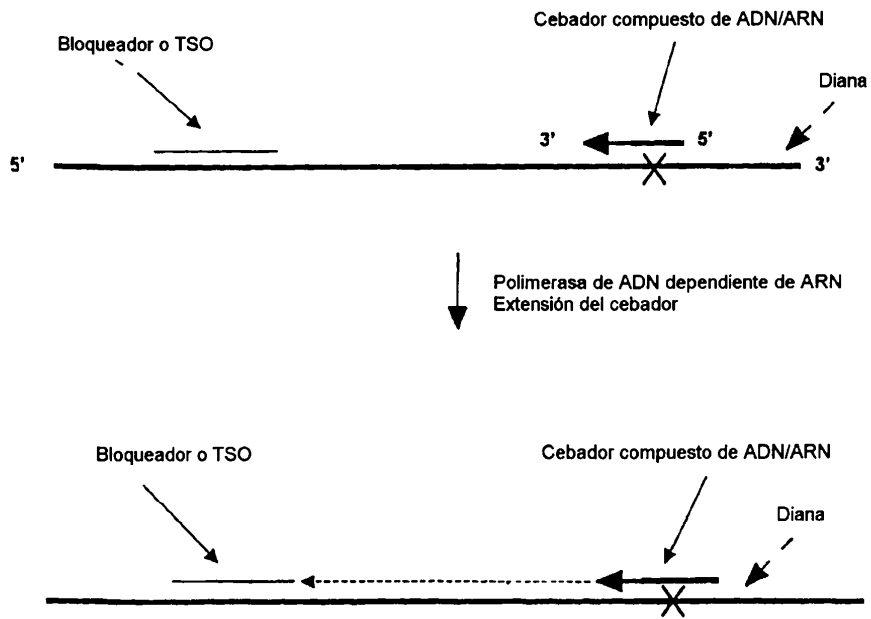


FIGURA 4B

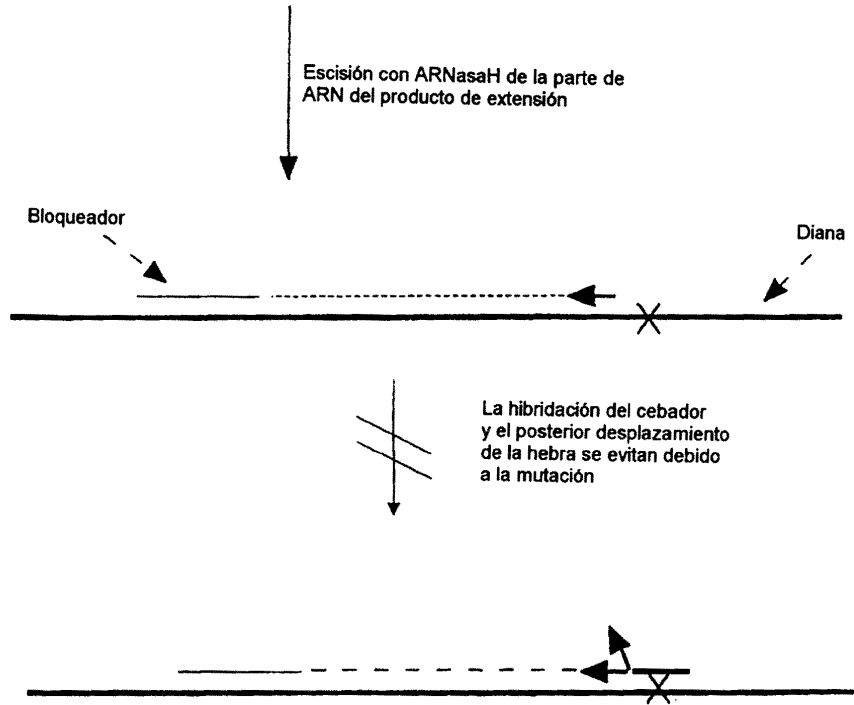
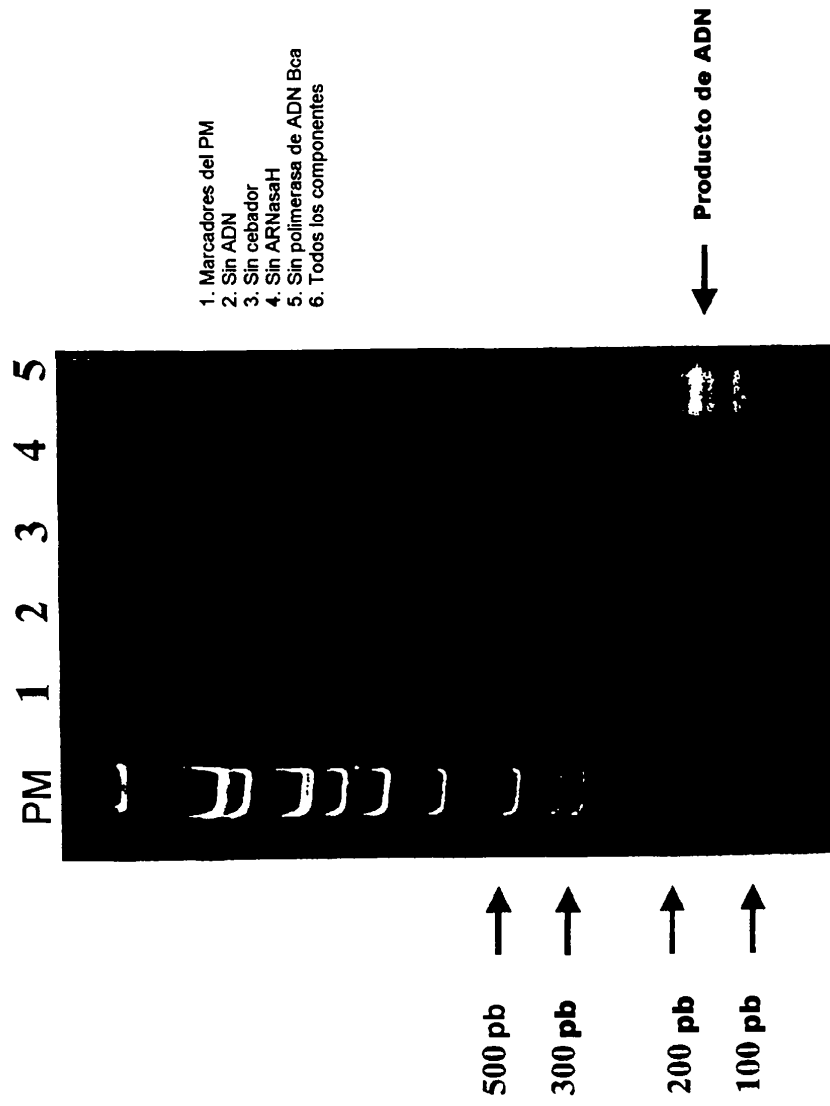
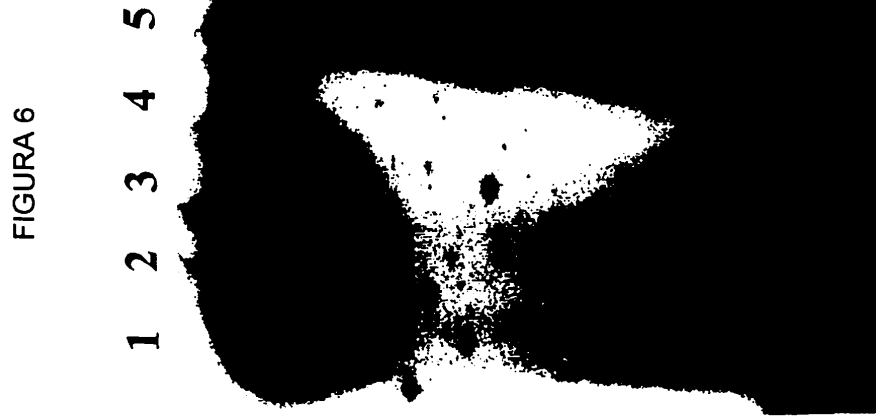


FIGURA 5





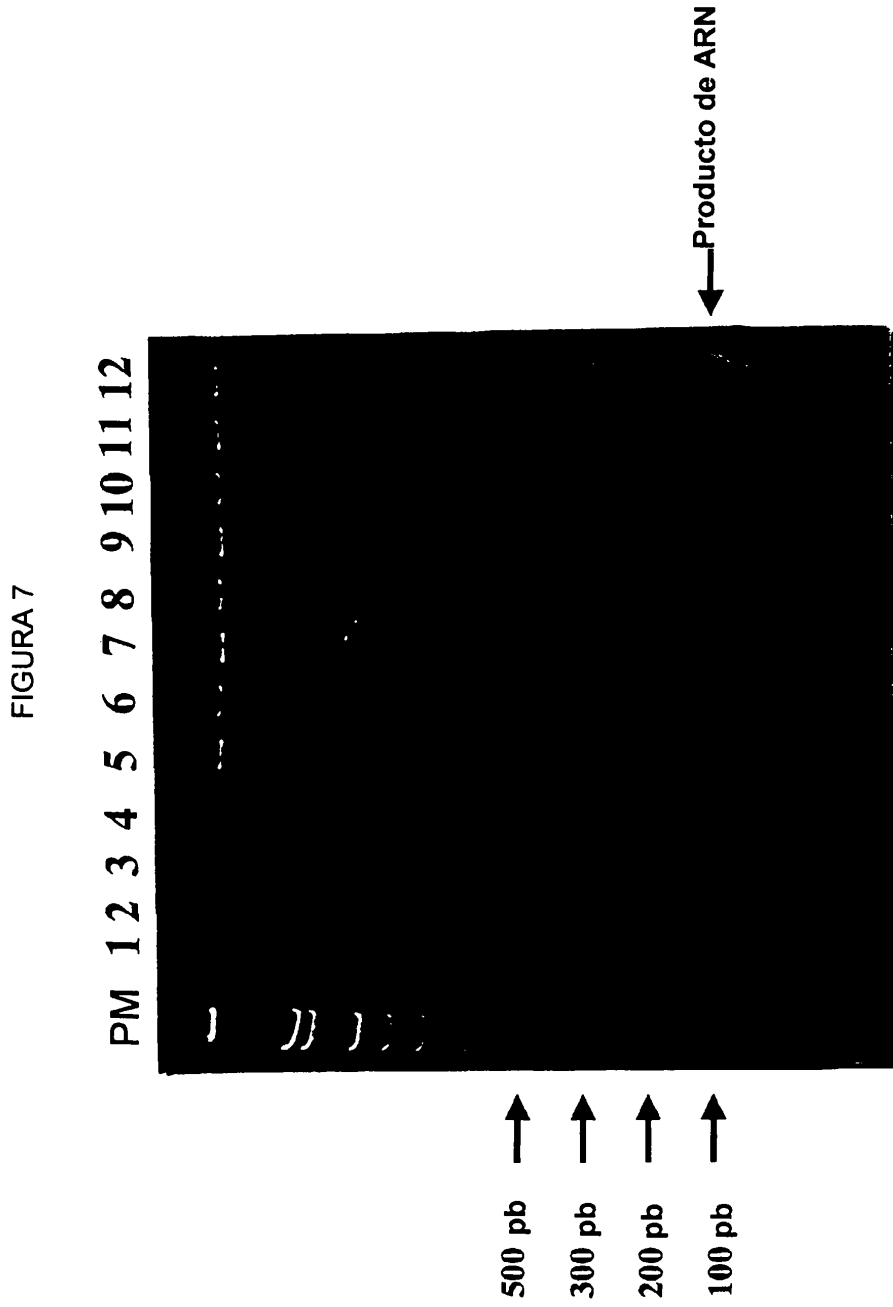


FIGURA 8

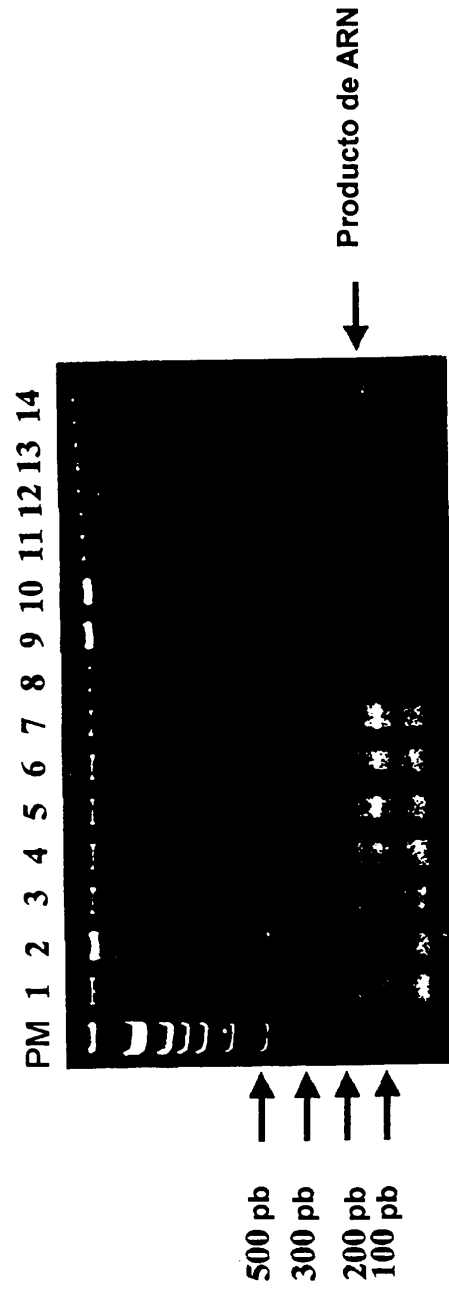


FIGURA 9

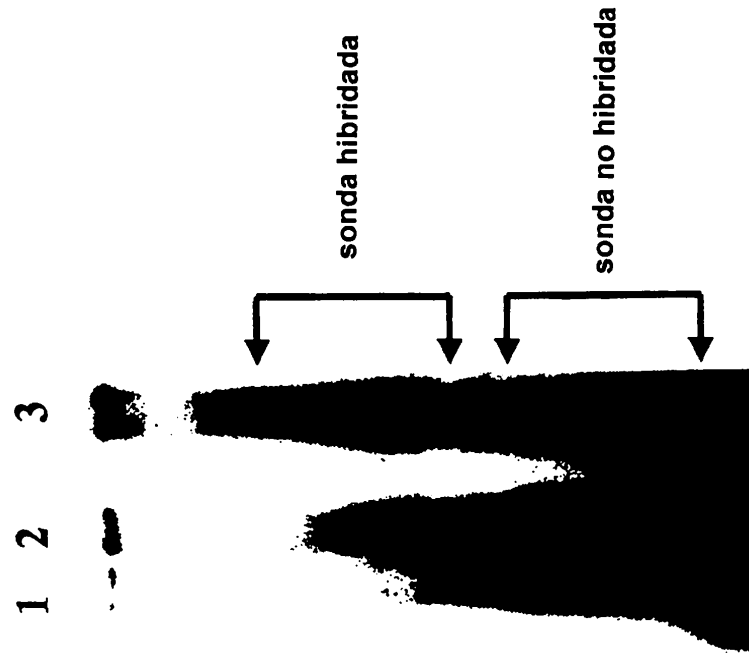


FIGURA 10

