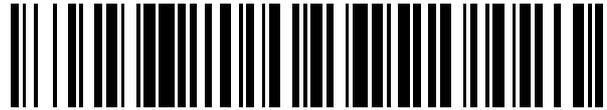


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 450**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2001 E 01917714 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 1275715**

54 Título: **Método para amplificar y detectar un ácido nucleico usando ácido nucleico bicatenario como molde**

30 Prioridad:

07.04.2000 JP 2000111939

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

23.09.2015

73 Titular/es:

**EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)
4-19-9, TAITO, TAITO-KU
TOKYO 110-8408, JP**

72 Inventor/es:

**NOTOMI, TSUGUNORI y
NAGAMINE, KENTARO**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 546 450 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para amplificar y detectar un ácido nucleico usando ácido nucleico bicatenario como molde

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método para sintetizar un ácido nucleico, a temperatura constante, que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a un ácido nucleico bicatenario molde, según las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

10 El método de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) dependiente de molde para sintetizar ácido nucleico ha sido una gran fuerza impulsora para el estudio en el reciente campo de la biociencia. El método de PCR permite la amplificación exponencial de un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a un ácido nucleico molde usando una pequeña cantidad del molde. El método de PCR prevalece ampliamente en la actualidad como herramienta para clonar o detectar un gen. En el método de PCR, un par de cebadores, que comprenden una secuencia de nucleótidos complementaria, se usa para ambos extremos de la secuencia de nucleótidos diana. El par de cebadores está diseñado de tal manera que un cebador se hibrida con un producto de extensión proporcionado por otro cebador. Una reacción de síntesis avanza repitiendo una hibridación con el producto de extensión mutuo y una reacción de síntesis de hebra complementaria, y se obtiene por tanto una amplificación exponencial.

15 En el método de PCR, un molde de ácido nucleico monocatenario se prepara mediante algún método y un cebador se hibrida con el molde. Puesto que una ADN polimerasa dependiente de molde requiere un cebador como origen de replicación, se considera que es esencial la preparación del molde monocatenario, para hibridar el cebador con el mismo en el método de PCR. La etapa de conversión de un ácido nucleico molde bicatenario en una hebra individual se denomina generalmente desnaturalización. La desnaturalización se lleva a cabo habitualmente mediante calentamiento. Puesto que otros componentes de reacción requeridos para la síntesis de ácido nucleico, incluyendo ADN polimerasa, son resistentes al calor, la desnaturalización y las sucesivas reacciones de síntesis de hebra complementaria pueden llevarse a cabo combinando todos los componentes de reacción y calentando adicionalmente la mezcla de reacción. Sin embargo, los métodos convencionales que contienen la etapa de tratamiento térmico tienen los problemas descritos a continuación.

20 En primer lugar, en el método de PCR, la desnaturalización de ácido nucleico bicatenario y la hibridación de un cebador deben realizarse en cada ciclo. Con ese fin, se requiere un mecanismo específico para controlar la temperatura. Por ejemplo, aunque se ha desarrollado un método para monitorizar el aumento de un producto de reacción durante la PCR, el método no puede llevarse a cabo usando equipo analítico convencional y, por tanto, es necesario proporcionar equipo dedicado que tiene un mecanismo para controlar la temperatura para llevar a cabo el método de PCR así como un mecanismo para monitorizar la reacción. Por consiguiente, si todas las reacciones para la síntesis de ácido nucleico pudieran llevarse a cabo a temperatura constante, la reacción podría monitorizarse fácilmente usando equipo analítico convencional. Un método conveniente de este tipo simplificaría no sólo el equipo sino también el funcionamiento experimental. Sin embargo, no se conoce actualmente un principio de reacción para este método.

25 La especificidad de reacción de la PCR depende de la especificidad de hibridación de cebadores. Puede esperarse que un cebador se hibride con un ácido nucleico monocatenario con especificidad adecuada a alta temperatura, próxima a la temperatura de fusión. Cuando la temperatura no es adecuadamente alta, se produce a menudo una hibridación no específica y reacciones de síntesis de hebra complementaria no específicas resultantes. Puesto que el método de PCR va acompañado por un cambio de temperatura complicado, la mezcla de reacción puede verse expuesta posiblemente a una temperatura a la que tiene tendencia a producirse una reacción no específica. Esta es una de las causas de las reacciones no específicas asociadas con el método de PCR.

30 Se han propuesto varios métodos para resolver el problema de la reacción no específica dependiente de la temperatura. Por ejemplo, un método usado en la práctica usa una ADN polimerasa que no funciona a una determinada temperatura o inferior. Específicamente, se notifica que se usan un inhibidor de ADN polimerasa sensible a la temperatura, un anticuerpo contra la ADN polimerasa, o una variante de ADN polimerasa y similares. Además, también se conoce un método en el que los componentes de reacción se ponen en compartimentos separados por un tabique que puede fundirse a alta temperatura, de modo que los componentes se mezclan sólo tras calentarse hasta una temperatura adecuada. En todos los casos, puesto que el método de PCR acompaña un cambio de temperatura complicado, se requiere usar un componente especial para impedir la reacción no específica.

35 También se conocen métodos de amplificación de ADN que tiene una secuencia complementaria a una secuencia diana usando la secuencia diana como molde, tal como el método de amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), (Pro.N.A.S., 89, págs. 392-396; 1992, Nucleic Acid, Res., 20, págs. 1691-1696; 1992). En el método SDA, cuando se sintetiza una hebra complementaria usando como origen de síntesis un cebador complementario al lado 3' de una determinada secuencia de nucleótidos, una ADN polimerasa única permite la síntesis de una hebra complementaria que desplaza la región de doble hebra en el lado 5'. Cuando se citan el "lado 5'" o el "lado 3'" a

continuación en el presente documento, los términos significan el sentido de una hebra molde. Este método se denomina amplificación por desplazamiento de hebra porque la parte de doble hebra del lado 5' se desplaza por una hebra complementaria que acaba de sintetizarse.

5 En el método SDA, la etapa de cambio de temperatura, que es esencial para el método de PCR, puede omitirse insertando una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción en una secuencia con la que se hibrida un cebador. Concretamente, una mella proporcionada por la enzima de restricción proporciona un grupo 3'-OH que se convierte en el origen de la síntesis de hebra complementaria. El desplazamiento de hebra y la síntesis de hebra complementaria se llevan a cabo desde el origen y la hebra complementaria sintetizada se disocia como una hebra individual y se utiliza como el molde en la síntesis de hebra complementaria posterior. Por tanto, el método SDA no
10 requiere un control de temperatura complicado que ha sido esencial para el método de PCR.

Aunque el control de temperatura no es necesario en el método SDA, el tratamiento térmico es todavía necesario para preparar la hebra individual necesaria para la hibridación de cebadores cuando se usa ácido nucleico bicatenario como molde. Además, este método requiere tanto una enzima de restricción que proporciona una mella como una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra. La necesidad de una enzima adicional conduce a un aumento en el coste. Además, para introducir una mella y no escindir la doble hebra (es decir, sólo se
15 escinde una hebra), debe usarse un derivado de dNTP, tal como α -tiodNTP, como sustrato para la síntesis de modo que una de las dobles hebras tenga resistencia a la digestión enzimática. Por consiguiente, un producto amplificado obtenido mediante SDA tiene una configuración diferente de la del ácido nucleico natural. Por tanto, la escisión con enzimas de restricción y el uso de un producto amplificado en clonación génica son limitados. El uso del derivado de
20 dNTP también provoca un aumento en el coste.

Como método para amplificar ácido nucleico sin un control de temperatura complicado, se conoce la amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), que también se denomina método de amplificación mediada por transcripción, TMA. NASBA es un sistema de reacción en el que se lleva a cabo síntesis de ADN usando ADN polimerasa, un ARN diana como molde, y una sonda a la que se le ha añadido el promotor de T7. El ADN sintetizado
25 se hace bicatenario usando una segunda sonda, y se realiza la transcripción usando ARN polimerasa de T7. El ADN bicatenario obtenido se usa como molde, amplificando de ese modo una gran cantidad de ARN (Nature, 350, págs. 91-92, 1991). La transcripción usando ARN polimerasa de T7 en NASBA avanza de manera isotérmica. Sin embargo, NASBA requiere ARN como molde, y por tanto no puede aplicarse a ácido nucleico bicatenario. Si el ácido nucleico bicatenario se hace monocatenario, esta reacción puede realizarse; sin embargo, en este caso, es
30 necesario un control de temperatura complicado similar al de PCR. Además, es esencial un uso en combinación de varias enzimas, tales como enzima de transcripción inversa, ARNasaH, ADN polimerasa y ARN polimerasa de T7, lo que es desfavorable desde el punto de vista económico como en SDA. Por tanto, los métodos de reacción de amplificación de ácido nucleico conocidos tienen el problema de un control de temperatura complicado o la necesidad de usar varias enzimas.

35 Para resolver el problema del control de temperatura en métodos de síntesis de ácido nucleico conocidos, se ha sintetizado una hebra complementaria en unas condiciones específicas, usando un cebador como origen para la síntesis (traducción al japonés publicada de la publicación internacional n.º Hei 11-509406; WO97/00330). El método reconoce el hecho de que la hibridación de ácidos nucleicos que tienen secuencias de nucleótidos complementarias se produce en un estado de equilibrio dinámico (cinética). En este método de la técnica anterior, se cree que la
40 reacción de síntesis de hebra complementaria, usando un cebador como origen para la síntesis, puede producirse con una determinada probabilidad, incluso a una temperatura que provoca la desnaturalización completa o inferior. El término "desnaturalización completa" tal como se usa en el presente documento significa condiciones en las que la mayor parte del ácido nucleico molde bicatenario se convierte en monocatenario.

45 En este informe, cuando se combinó un cebador y una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra con el ácido nucleico molde bicatenario y se elevó la temperatura, se observó la síntesis de hebra complementaria a una temperatura que no provocó desnaturalización de un ácido nucleico molde. Sin embargo, la eficiencia de la reacción de la síntesis de hebra complementaria sin ciclos térmicos es notablemente menor que la obtenida en el método de PCR con ciclos térmicos. De hecho, los presentes inventores realizaron una prueba complementaria y confirmaron que la reacción se había producido ciertamente, pero la cantidad del producto de reacción obtenido
50 mediante este método no alcanzó un nivel utilizable de un método de síntesis de ácido nucleico práctico.

Tal como se describió anteriormente, aún no se ha notificado una reacción de síntesis de ácido nucleico sin controlar la temperatura y sin deteriorarse la especificidad y eficiencia de la reacción.

Descripción de la invención

55 Un objeto de la presente invención es proporcionar un método de síntesis de ácido nucleico usando ácido nucleico bicatenario como molde, en el que el método no requiere cambio de temperatura y no da como resultado un deterioro de la eficiencia de síntesis, operabilidad, especificidad, o similar. Más específicamente, el objeto de la presente invención es proporcionar un método novedoso de síntesis de ácido nucleico en el que la reacción se lleva a cabo mediante la incubación de ácido nucleico bicatenario como molde junto con componentes de reacción, tales como un cebador y ADN polimerasa, a temperatura constante. Otro objeto de la presente invención es proporcionar

un método para amplificar de manera eficiente ácido nucleico utilizando el método de síntesis.

Para lograr la síntesis de hebra complementaria usando ácido nucleico bicatenario como molde sin ciclos térmicos, los presentes inventores estudiaron si la reacción de síntesis de hebra complementaria usando un cebador como origen para la síntesis podría llevarse a cabo en condiciones de temperatura constante. El método de síntesis de hebra complementaria conocido, basado en el equilibrio dinámico entre un ácido nucleico bicatenario y un cebador (traducción al japonés publicada de la publicación internacional n.º Hei 11-509406; WO97/00330), no requiere el cambio de temperatura. Sin embargo, tal como se describió previamente, es difícil obtener una eficiencia de síntesis utilizable en la práctica usando este método. Por tanto, los presentes inventores combinaron este método con la reacción isotérmica de síntesis de ácido nucleico para llevar a cabo de manera eficiente una síntesis de hebra complementaria basada en el equilibrio dinámico sin deteriorar la especificidad. Como resultado, los inventores descubrieron que podía obtenerse una eficiencia de amplificación de alto nivel, que no podía obtenerse mediante los métodos conocidos, y completaron la presente invención. Concretamente, la presente invención se refiere al siguiente método de síntesis de ácido nucleico y el método de amplificación de ácido nucleico basado en el mismo.

[1] Un método para sintetizar ácido nucleico usando ácido nucleico bicatenario como molde, en el que el método comprende:

a) incubar un molde de ácido nucleico bicatenario y un cebador arbitrario en presencia de una ADN polimerasa que cataliza una reacción de síntesis de hebra complementaria que acompaña a un desplazamiento de hebra, en condiciones que garantizan la síntesis de hebra complementaria usando el cebador arbitrario como origen, de tal manera que una región del ácido nucleico molde diana que va a hibridarse por un cebador que puede amplificar el ácido nucleico molde a temperatura constante se coloca en condiciones que permiten que la región experimente apareamiento de bases;

b) hibridar un cebador que puede amplificar el ácido nucleico molde a temperatura constante, con la región obtenida en la etapa a), que se coloca en condiciones tales que puede experimentar apareamiento de bases; y

c) llevar a cabo la síntesis de hebra complementaria usando el cebador como origen de síntesis.

[2] El método según el punto [1], en el que la etapa a) se lleva a cabo en presencia de un regulador de la temperatura de fusión.

[3] El método según el punto [2], en el que el regulador de la temperatura de fusión es al menos uno de compuestos seleccionados del grupo que consiste en betaína, prolina, dimetilsulfóxido y N-óxido de trimetilamina.

[4] Un método para sintetizar un ácido nucleico en el que una pluralidad de nucleótidos, que constituyen una región específica de un molde de ácido nucleico bicatenario que está constituido por secuencias de nucleótidos complementarias, se conectan en una hebra individual, en el que el método comprende:

a) incubar un molde de ácido nucleico bicatenario y un cebador arbitrario en presencia de ADN polimerasa que cataliza una reacción de síntesis de hebra complementaria que acompaña a un desplazamiento de hebra en condiciones que garantizan la síntesis de hebra complementaria usando el cebador arbitrario como origen, de tal manera que una región del ácido nucleico molde diana que va a hibridarse por un segundo cebador, se coloca en condiciones que permiten que la región experimente apareamiento de bases;

b) hibridar el segundo cebador con la región obtenida en la etapa a), que se coloca en condiciones tales que puede experimentar apareamiento de bases, y llevar a cabo la síntesis de hebra complementaria usando el segundo cebador como origen, en el que el extremo 3' del segundo cebador se hibrida con una región que define el lado 3' de una de las hebras que constituyen la región específica y el extremo 5' del segundo cebador comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una región arbitraria de un producto de reacción de síntesis de hebra complementaria obtenido usando el cebador como origen;

c) colocar una región del producto extendido del segundo cebador sintetizado en la etapa b), con el que se hibridará un primer cebador, en condiciones tales que la región puede experimentar apareamiento de bases, en el que el extremo 3' del primer cebador se hibrida con una región que define el lado 3' de dicha región en el producto extendido obtenido usando el segundo cebador como origen;

d) hibridar el primer cebador con la región obtenida en la etapa c), que se coloca en condiciones tales que puede experimentar apareamiento de bases y llevar a cabo la síntesis de hebra complementaria usando el primer cebador como origen; y

e) permitir que se produzca autohibridación en el extremo 3' del producto extendido del primer cebador sintetizado en la etapa d) y llevar a cabo la síntesis de hebra complementaria usando el propio producto extendido como molde, y obtener ácido nucleico en el que una pluralidad de los nucleótidos que constituyen la región específica se conectan en una hebra individual.

[5] El método según el punto [4], en el que el cebador arbitrario en la etapa a) es un primer cebador.

- [6] El método según el punto [4], en el que la etapa c) se lleva a cabo mediante desplazamiento según una reacción de síntesis de hebra complementaria usando como origen un cuarto cebador que se hibrida con el lado 3' de la región del molde hibridada por el segundo cebador.
- 5 [7] El método según el punto [4], en el que la etapa e) comprende además una etapa de conversión del producto extendido del primer cebador en una hebra individual mediante desplazamiento según una reacción de síntesis de hebra complementaria usando como origen un tercer cebador que se hibrida con el lado 3' de la región del molde hibridada por el primer cebador.
- [8] El método según el punto [4], en el que el extremo 5' del primer cebador comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una región arbitraria del producto de reacción de síntesis de hebra complementaria obtenido usando el primer cebador como origen.
- 10 [9] Un método para amplificar ácido nucleico en el que una pluralidad de nucleótidos, que constituyen una región específica de un molde de ácido nucleico bicatenario que está constituido por secuencias de nucleótidos complementarias, se conectan en una hebra individual, en el que el método comprende:
- 15 1) permitir que se produzca autohibridación en el extremo 3' del producto extendido del primer cebador producido por el método según el punto [7] y llevar a cabo la reacción de síntesis de hebra complementaria usando el producto extendido como origen;
- 2) hibridar el segundo cebador o el primer cebador con una región de bucle que se forma mediante autohibridación del extremo 3' y llevar a cabo la síntesis de hebra complementaria usando el cebador como origen;
- 20 3) permitir que se produzca desplazamiento de hebra del producto extendido desde el extremo 3' mediante la reacción de síntesis de hebra complementaria de la etapa 2) de modo que el extremo 3' puede experimentar apareamiento de bases;
- 4) llevar a cabo la reacción de síntesis de hebra complementaria usando como molde la propia hebra desplazada obtenida en la etapa 3), que puede experimentar apareamiento de bases y usando su extremo 3' como origen para desplazar una hebra complementaria sintetizada en la etapa 2) usando la región de bucle como origen, produciendo de ese modo un ácido nucleico monocatenario; y
- 25 5) repetir las etapas 2) a 4) para amplificar el ácido nucleico deseado.
- [10] El método según el punto [9], en el que el método comprende además:
- 6) llevar a cabo la reacción de síntesis de hebra complementaria mediante autohibridación del extremo 3' del ácido nucleico monocatenario producido en la etapa 4);
- 30 7) hibridar el segundo cebador o el primer cebador con una región de bucle que se forma mediante autohibridación del extremo 3' y llevar a cabo la síntesis de hebra complementaria usando el cebador como origen;
- 8) permitir que se produzca desplazamiento de hebra del producto extendido desde el extremo 3' mediante la reacción de síntesis de hebra complementaria de la etapa 7), de modo que el extremo 3' puede experimentar apareamiento de bases;
- 35 9) llevar a cabo la reacción de síntesis de hebra complementaria usando como molde la propia hebra desplazada obtenida en la etapa 8), que puede experimentar apareamiento de bases y usando su extremo 3' como origen para desplazar una hebra complementaria sintetizada en la etapa 7) usando la región de bucle como origen, produciendo de ese modo un ácido nucleico monocatenario; y
- 10) repetir las etapas 7) a 9) para amplificar el ácido nucleico deseado.
- 40 [11] Un método para detectar una secuencia de nucleótidos diana en una muestra, comprendiendo el método llevar a cabo el método de amplificación según el punto [10] y observar si se ha generado o no el producto de la reacción de amplificación.
- [12] Un método según el punto [11], en el que el método según el punto [10] se lleva a cabo en presencia de un agente de detección de ácido nucleico, que comprende además determinar si se ha generado o no el producto de la reacción de amplificación basándose en el cambio de señal del agente de detección.
- 45 [13] Un método para detectar una mutación mediante el método de detección según el punto [11], en el que una mutación en una secuencia de nucleótidos que va a amplificarse impide la síntesis de hebra complementaria, al menos en un extremo 3' que es el origen de la síntesis de hebra complementaria que constituye el método de amplificación.
- 50 [14] Un método para amplificar un ácido nucleico en el que una pluralidad de nucleótidos, que constituyen una región específica de un ácido nucleico bicatenario molde que está constituido por secuencias de nucleótidos

complementarias, se conectan en una hebra individual, en el que el método comprende una etapa de incubación de los siguientes elementos:

- una diana que comprende un molde de ácido nucleico bicatenario que comprende una región específica que va a amplificarse;
- 5 · una ADN polimerasa que cataliza la reacción de síntesis de hebra complementaria que acompaña a un desplazamiento de hebra;
- un primer cebador, cuyo extremo 3' se hibrida con una región que define el lado 3' de una de las hebras que constituyen la región específica y cuyo extremo 5' comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una región arbitraria de un producto de reacción de síntesis de hebra complementaria obtenido usando el cebador como
10 origen de síntesis;
- un segundo cebador, cuyo extremo 3' se hibrida con una región que define el lado 3' de una de las hebras que constituyen la región específica y cuyo extremo 5' comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una región arbitraria de un producto de reacción de síntesis de hebra complementaria obtenido usando el cebador como origen de síntesis; y
- 15 · un sustrato de nucleótido;

en condiciones que permiten la síntesis de hebra complementaria usando el primer cebador como origen.

[15] El método según el punto [14], en el que los elementos comprenden además:

- un tercer cebador que se convierte en el origen de la reacción de síntesis de hebra complementaria, usando el lado 3' de la región en el molde que va a hibridarse por el primer cebador como origen; y
- 20 · un cuarto cebador que se convierte en el origen de la reacción de síntesis de hebra complementaria, usando el lado 3' de la región en el molde que va a hibridarse por el segundo cebador como origen.

[16] El método según el punto [14], en el que la incubación se lleva a cabo en presencia de un regulador de la temperatura de fusión.

- 25 [17] El método según el punto [16], en el que el regulador de la temperatura de fusión es al menos uno de compuestos seleccionados del grupo que consiste en betaína, prolina, dimetilsulfóxido y N-óxido de trimetilamina.

- 30 [18] Un método para colocar una región de un ácido nucleico molde diana que va a hibridarse por un cebador que inicia una reacción de amplificación de un ácido nucleico molde a temperatura constante, en condiciones tales que la región puede experimentar apareamiento de bases, en el que el método comprende la etapa de incubación de un ácido nucleico bicatenario molde, un cebador arbitrario y un cebador que puede amplificar el ácido nucleico molde a temperatura constante, en presencia de ADN polimerasa, que cataliza una síntesis de hebra complementaria que acompaña a un desplazamiento de hebra, en condiciones que garantizan la síntesis de hebra complementaria, usando el cebador arbitrario como origen.

- 35 En la presente invención, se usa un cebador que puede amplificar un molde de ácido nucleico a temperatura constante. El cebador que puede amplificar el molde de ácido nucleico a temperatura constante significa un cebador usado para un método para amplificar ácido nucleico sin ciclos térmicos, usando como molde un ácido nucleico que tiene una región que va a hibridarse por el cebador, que puede experimentar apareamiento de bases. Concretamente, el cebador de la presente invención es uno para una reacción de amplificación de un ácido nucleico sin ciclos térmicos. El cebador de la presente invención no está limitado específicamente, siempre que sea un
40 cebador que permita la amplificación isotérmica de ácido nucleico. Por consiguiente, independientemente de si puede usarse para una reacción que requiere ciclos térmicos, cualquier cebador que permita la amplificación isotérmica de ácido nucleico está incluido en el cebador de la presente invención. Tal como se describió anteriormente, se notifica que la amplificación se ha llevado a cabo a temperatura constante utilizando los cebadores para PCR. Sin embargo, puesto que el método no puede lograr la amplificación de un nivel práctico, no puede decirse que el cebador para PCR sea un cebador que permita la amplificación isotérmica de ácido nucleico. En
45 particular, la amplificación de un ácido nucleico molde puede llevarse a cabo utilizando un método que puede producir de manera continua síntesis de hebra complementaria que no requiere ciclos térmicos. Los cebadores usados para un método de este tipo son deseables como cebadores de la presente invención.

- 50 En una realización preferida, el método para amplificar ácido nucleico utiliza un principio de reacción (método LAMP) que repite la reacción de síntesis de hebra complementaria mediante autohibridación de la región 3'-terminal que se usa como molde por sí misma, tal como se describe a continuación. Adicionalmente, puede usarse el método SDA que es una reacción conocida de amplificación de ácido nucleico. En la presente invención, la expresión "una región que puede experimentar apareamiento de bases" significa una región que no está acompañada por una hebra complementaria. Por consiguiente, no sólo incluye un ácido nucleico monocatenario que se produce mediante desnaturalización de un ácido nucleico bicatenario, sino también un ácido nucleico monocatenario contenido en un

ácido nucleico bicatenario que tiene parcialmente partes monocatenarias.

Además, en la presente invención, el ácido nucleico puede ser un ADN, un ARN, o una molécula quimérica de los mismos. El ácido nucleico puede ser un ácido nucleico natural o un ácido nucleico sintetizado artificialmente. Además, un derivado de nucleótido que tiene una configuración artificial parcial o totalmente completa puede estar incluido en el ácido nucleico de la presente invención, siempre que pueda experimentar apareamiento de bases. Un ejemplo de una molécula de este tipo es, por ejemplo, un derivado de polinucleótido en el que la estructura principal está formada por enlaces fosfotioato. El número de nucleótidos que constituyen el ácido nucleico usado en la presente invención no está limitado. En el presente documento, el término ácido nucleico tiene el mismo significado que el término polinucleótido. Por otra parte, el término oligonucleótido usado en el presente documento significa un polinucleótido particular que tiene un menor número de nucleótidos constituyentes. En general, un oligonucleótido significa un polinucleótido que tiene de 2 a 100 y más habitualmente de 2 a 50 nucleótidos, pero no se restringe mediante estos números.

Tal como se usa en el presente documento, la secuencia de nucleótidos diana significa la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico que va a sintetizarse. Concretamente, una secuencia de nucleótidos que constituye el ácido nucleico que va a sintetizarse en la presente invención es la secuencia de nucleótidos diana. Además, cuando la amplificación del ácido nucleico se lleva a cabo basándose en el método de síntesis de ácido nucleico de la presente invención, una secuencia de nucleótidos que constituye el ácido nucleico que va a amplificarse es la secuencia de nucleótidos diana. En general, la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico se describe desde el lado 5' hasta el lado 3' de la hebra sentido. La secuencia de nucleótidos diana de la presente invención incluye no sólo la hebra sentido sino también la secuencia de nucleótidos de la hebra complementaria de la misma, es decir la hebra antisentido. Más específicamente, el término "secuencia de nucleótidos diana" se refiere a al menos o bien la secuencia de nucleótidos que va a sintetizarse o bien su hebra complementaria.

El método de síntesis de ácido nucleico de la presente invención usa un ácido nucleico bicatenario como molde. En el contexto de la presente invención, el ácido nucleico bicatenario es un ácido nucleico en forma de las hebras complementarias hibridadas, al menos en una región que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a un cebador que se usa como origen de síntesis de la síntesis de hebra complementaria. Por consiguiente, una secuencia de nucleótidos diana que no es bicatenaria en partes está incluida en el ácido nucleico bicatenario usado en la presente invención. Además, el ácido nucleico bicatenario usado en la presente invención puede ser no sólo un dímero, sino también un producto de hibridación de dos o más de ácidos nucleicos monocatenarios, siempre que satisfaga la condición mencionada anteriormente. Además, puede ser un bucle en horquilla constituido por un polinucleótido monocatenario que contiene una secuencia de nucleótidos complementaria en la molécula. El ácido nucleico bicatenario que va a usarse en la presente invención incluye, por ejemplo, ADNc, ADN genómicos, e híbridos de ADN-ARN. Además, también pueden usarse diversos vectores en los que se han insertado estos ADN como ácido nucleico bicatenario usado en la presente invención. El ácido nucleico bicatenario usado en la presente invención puede ser ácido nucleico purificado o en bruto. Además, el método de la presente invención también es aplicable a ácido nucleico en células (*in situ*). Puede realizarse análisis genómico *in situ* usando como molde un ácido nucleico bicatenario en células.

Cuando se usa un ADNc como molde en la presente invención, la síntesis de ADNc puede llevarse a cabo en las mismas condiciones que para la síntesis de ácido nucleico según la presente invención. Cuando se sintetiza una primera hebra de ADNc usando ARN como molde, se forma un ácido nucleico bicatenario en forma de híbrido de ADN-ARN. Usando el ácido nucleico bicatenario así obtenido como molde, puede llevarse a cabo el método para sintetizar ácidos nucleicos según la presente invención. Cuando la ADN polimerasa usada en el método de síntesis de ácido nucleico de la presente invención tiene una actividad de transcriptasa inversa, puede realizarse la síntesis de ácido nucleico usándola como única enzima en las mismas condiciones. Por ejemplo, la Bca ADN polimerasa es una ADN polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de hebra así como actividad de transcriptasa inversa. Como cuestión de rutina, el método para sintetizar ácidos nucleicos según la presente invención también puede usarse tras la formación de ADNc bicatenario completo mediante la síntesis de segunda hebra.

Se emplea polimerasa que cataliza la reacción de síntesis de hebra complementaria que acompaña a un desplazamiento de hebra en la síntesis de ácido nucleico de la presente invención. La reacción de síntesis de hebra complementaria que acompaña a un desplazamiento de hebra usada en el presente documento significa la siguiente reacción. Concretamente, una reacción en la que cuando el molde para la reacción de síntesis de hebra complementaria, usando un cebador como origen de síntesis, se hibrida con otro polinucleótido y en forma de una doble hebra, la síntesis de hebra complementaria avanza a la vez que se separa el polinucleótido del molde, se denomina la reacción de síntesis de hebra complementaria con desplazamiento de hebra. En este momento, los enlaces fosfodiéster en el polinucleótido separado se mantienen habitualmente. Por consiguiente, el polinucleótido así formado tiene una longitud correspondiente a la de la hebra complementaria sintetizada y puede experimentar apareamiento de bases.

El mismo tipo de ADN polimerasas que las usadas para SDA y demás puede usarse como polimerasa que cataliza la síntesis de hebra complementaria con desplazamiento de hebra. Las polimerasas únicas conocidas sintetizan hebras complementarias mediante, si existe una región bicatenaria en el lado 5' del molde, desplazamiento de la región bicatenaria usando un cebador complementario a una región del lado 3' de una determinada secuencia de

nucleótidos como origen de síntesis. Según la presente invención, se usa además un sustrato requerido para la síntesis de hebra complementaria.

Un cebador arbitrario se mezcla con el ácido nucleico bicatenario en la presente invención, y la mezcla se incuba en condiciones que garantizan la síntesis de la hebra complementaria usando el cebador como origen. El cebador arbitrario de la presente invención permite que la región con la que se hibridará un cebador para la reacción de amplificación de ácido nucleico a temperatura constante esté lista para el apareamiento de bases. Por tanto, el cebador arbitrario debe poder iniciar la síntesis de hebra complementaria, usando la hebra complementaria de la hebra de nucleótidos como molde, con la que se hibrida un cebador para la reacción de amplificación, del ácido nucleico bicatenario molde. Además, la extensión de hebra en la síntesis de hebra complementaria usando el cebador arbitrario de la presente invención como origen de síntesis debe avanzar hacia la región con la que se hibrida un cebador para la reacción de amplificación. En otras palabras, el cebador puede proporcionar el origen de síntesis en una parte arbitraria de la región, región que sirve como molde en una síntesis de hebra complementaria usando el cebador para la reacción de amplificación como origen. El cebador arbitrario puede comprender una secuencia de nucleótidos complementaria a regiones arbitrarias, siempre que cumpla el criterio anterior. Por ejemplo, también puede usarse uno del conjunto de cebadores para la reacción de amplificación como cebador arbitrario. El uso del cebador es una de las realizaciones preferidas de la presente invención, debido al número reducido de componentes de reacción necesarios.

El apareamiento de bases con cebador para la reacción de amplificación puede garantizarse mediante el desplazamiento de una de las dos hebras del ácido nucleico bicatenario en síntesis de hebra complementaria usando el cebador arbitrario como origen. Mediante la elección de tales parámetros, la reacción de síntesis puede avanzar sin cambiar la temperatura, que es una de las estupidas características de la presente invención. Las condiciones que permiten que avance la reacción de síntesis de hebra complementaria mediante un cebador arbitrario usando un ácido nucleico bicatenario como molde son prácticamente las mismas que las requeridas para que avancen los siguientes múltiples:

- i) proporcionar el origen de síntesis mediante un cebador arbitrario a un ácido nucleico bicatenario molde; y
- ii) proceder con la reacción de síntesis de hebra complementaria usando el origen de síntesis.

Se creía que un cebador podría proporcionar un origen de síntesis a una hebra de ácido nucleico sólo si la región con la que se hibrida cebador fuese monocatenaria. Por tanto, previamente, cuando se usaba como molde un ácido nucleico bicatenario, el ácido nucleico se sometía a desnaturalización, una etapa que convierte el ácido nucleico en hebras individuales antes del apareamiento de cebadores. Sin embargo, puede proporcionarse un origen de síntesis mediante la incubación de un molde con un cebador en condiciones mediante las cuales la doble hebra se desestabiliza mediante determinados medios aunque no se convierte completamente en hebras individuales. Un ejemplo de condiciones de desestabilización de una doble hebra de este tipo implica calentar el ácido nucleico bicatenario casi hasta la temperatura de fusión (a continuación en el presente documento abreviada Tf). Alternativamente, la adición de un regulador de Tf también es eficaz.

La reacción, que comprende una serie de etapas, se lleva a cabo en presencia de tampón, proporcionando un pH adecuado para la reacción enzimática así como sales requeridas para la hibridación del cebador y el mantenimiento de la actividad catalítica de la enzima, conservantes para la enzima, y además, si es necesario, un regulador de la temperatura de fusión (Tf), y demás. El tampón, con una acción tamponante en un intervalo desde pH neutro hasta débilmente alcalino, tal como Tris-HCl, se usa en la presente invención. Se ajusta el pH dependiendo del tipo de ADN polimerasa usada. Los ejemplos de sales que van a añadirse para mantener la actividad enzimática y modificar la temperatura de fusión (Tf) del ácido nucleico incluyen KCl, NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, etc. Los conservantes de enzimas incluyen albúmina sérica bovina y azúcares.

Además, los reguladores de la temperatura de fusión (Tf) típicos incluyen betaína, prolina, dimetilsulfóxido (a continuación en el presente documento abreviado DMSO), formamida y N-óxido de trimetilamina (TMANO). Cuando se usa un regulador de la temperatura de fusión (Tf), la hibridación del oligonucleótido mencionado anteriormente puede regularse dentro de un intervalo de temperatura limitado. Además, las sales de tetraalquilamonio y betaína (N,N,N-trimetilglicina) contribuyen eficazmente a la mejora de la eficiencia de desplazamiento de hebra debido a su acción de isoestabilización. Se espera que la adición de betaína, a una concentración de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 3,0 M, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 M, a la disolución de reacción, potencie la amplificación de ácidos nucleicos de la presente invención. Puesto que estos reguladores de la temperatura de fusión disminuyen la temperatura de fusión, se eligen empíricamente condiciones que proporcionen la rigurosidad y reactividad deseadas mediante la consideración de las condiciones de reacción, tales como la concentración de sales y la temperatura de reacción.

Pueden elegirse fácilmente condiciones de temperatura adecuadas para reacciones enzimáticas mediante la utilización de un regulador de Tf. La Tf varía, dependiendo de la relación del cebador y la secuencia de nucleótidos diana. Por tanto, es preferible ajustar la cantidad de un regulador de Tf de modo que las condiciones que mantienen la actividad enzimática concuerden con las condiciones de incubación que cumplen el criterio de la presente invención. Basándose en la divulgación de la presente invención, los expertos en la técnica pueden elegir fácilmente

cantidades apropiadas de un regulador de Tf que han de añadirse, dependiendo de la secuencia de nucleótidos del cebador. Por ejemplo, puede determinarse la Tf basándose en la longitud de la secuencia de nucleótidos de hibridación, el contenido de GC, la concentración de sales y la concentración del regulador de Tf.

5 Se supone que la hibridación de un cebador con un ácido nucleico bicatenario en tales condiciones es inestable. Sin embargo, la síntesis de hebra complementaria avanza usando el cebador inestable como origen de síntesis cuando se incuban los ADN con una polimerasa que cataliza la síntesis de hebra complementaria con desplazamiento de hebra. A medida que avanza la síntesis de hebra complementaria, la hibridación entre la hebra complementaria sintetizada y el ácido nucleico molde se vuelve más estable a lo largo del tiempo. Las ADN polimerasas enumeradas anteriormente pueden catalizar la síntesis de hebra complementaria usando un cebador como origen de síntesis para el ácido nucleico bicatenario molde.

10 Una ADN polimerasa que cataliza la reacción de síntesis de hebra complementaria con desplazamiento de hebra desempeña un papel fundamental en el método para sintetizar un ácido nucleico según la presente invención. Tales ADN polimerasas incluyen las enumeradas a continuación. Además, pueden usarse diversos mutantes de estas enzimas en la presente invención, siempre que tengan la actividad de síntesis de hebra complementaria dependiente de secuencia y la actividad de desplazamiento de hebra. Tales mutantes incluyen enzimas truncadas que tienen sólo las estructuras con la actividad catalítica o enzimas mutantes cuya actividad catalítica, estabilidad o estabilidad térmica se ha modificado mediante mutaciones de aminoácidos, y demás.

Bst ADN polimerasa

Bca ADN polimerasa (exo-)

20 Fragmento de Klenow de ADN polimerasa I

Vent ADN polimerasa

Vent ADN polimerasa (exo-) (Vent ADN polimerasa libre de actividad exonucleasa)

DeepVent ADN polimerasa

DeepVent ADN polimerasa (exo-) (DeepVent ADN polimerasa libre de actividad exonucleasa)

25 ADN polimerasa de fago Φ 29

ADN polimerasa de fago MS-2

Z-Taq ADN polimerasa (Takara Shuzo)

ADN polimerasa de KOD (TOYOBO)

30 Entre estas enzimas, Bst ADN polimerasa y Bca ADN polimerasa (exo-) se prefieren particularmente, porque tienen un alto grado de estabilidad térmica y alta actividad catalítica. Según la presente invención, la etapa de uso de un cebador como origen de síntesis para un ácido nucleico bicatenario y la reacción de síntesis de hebra complementaria se llevan a cabo en las mismas condiciones. Puesto que tales reacciones requieren a menudo cierto calentamiento, se prefiere el uso de enzimas termoestables. La reacción puede lograrse en una amplia variedad de condiciones usando enzimas termoestables.

35 Por ejemplo, Vent ADN polimerasa (exo-) es una enzima altamente termoestable que tiene actividad de desplazamiento de hebra. Se ha notificado que la adición de una proteína de unión a hebra individual acelera la reacción de síntesis de hebra complementaria con desplazamiento de hebra mediante ADN polimerasa (Paul M. Lizardi *et al.*, Nature Genetics 19, 225-232, julio de 1998). Mediante la aplicación del método a la presente invención, se espera la aceleración de la síntesis de hebra complementaria mediante la adición de una proteína de unión a hebra individual. Cuando se usa Vent ADN polimerasa (exo-), la del gen 32 de T4 es eficaz como proteína de unión a hebra individual.

45 Cuando se usa una ADN polimerasa que carece de actividad exonucleasa 3'-5', se conoce en la técnica un fenómeno en el que la síntesis de hebra complementaria no se termina ni siquiera cuando la reacción alcanza el extremo 5' del molde y se añade un nucleótido extra a la hebra sintetizada. No se prefiere tal fenómeno en la presente invención, porque se inicia la síntesis de hebra complementaria siguiente a partir de la secuencia de hebra complementaria de extremo 3' sintetizada. Sin embargo, el nucleótido añadido al extremo 3' por la ADN polimerasa es el nucleótido "A" con alta probabilidad. Por tanto, debe seleccionarse una secuencia para la síntesis de hebra complementaria de modo que inicie la síntesis desde el extremo 3' de A para evitar problemas por la adición errónea de un solo nucleótido de dATP. Alternativamente, incluso cuando el extremo 3' sobresale durante la síntesis de hebra complementaria, puede digerirse para dar un extremo romo mediante una actividad exonucleasa 3'→5'. Por ejemplo, la Vent ADN polimerasa natural, que tiene tal actividad, puede usarse en combinación con Vent ADN polimerasa (exo-) para superar el problema.

A diferencia de las ADN polimerasas descritas anteriormente, ADN polimerasas, tales como Taq polimerasa PCR que se usan de manera rutinaria en PCR y demás, no presentan sustancialmente actividad de desplazamiento de hebra en las condiciones típicas. Sin embargo, tales ADN polimerasas pueden usarse para la presente invención, siempre que se usen en condiciones que garanticen desplazamiento de hebra.

5 Se ha notificado un fenómeno en el que se sintetiza una hebra complementaria mediante la incubación de un cebador en condiciones en las que el ácido nucleico bicatenario se vuelve inestable (traducción al japonés publicada de la publicación internacional n.º Hei 11-509406; WO97/00330). Sin embargo, sólo se espera que se produzcan realmente cantidades traza del producto de síntesis en las condiciones notificadas. Aunque en principio es posible llevar a cabo la síntesis de hebra complementaria usando un cebador como origen de síntesis mediante la utilización de la desestabilización del ácido nucleico bicatenario, la reacción no es tan eficiente como la reacción que usa un ácido nucleico monocatenario como molde. Cuando se combina con una reacción de síntesis de hebra complementaria que requiere un cambio de temperatura, tal como el método de PCR, la eficiencia de la reacción de síntesis de hebra complementaria, que utiliza la desestabilización de la doble hebra, influye en todas las reacciones de síntesis de hebra complementaria; por tanto, es difícil obtener una eficiencia de la reacción utilizable en la práctica. Se cree que ésta es la causa de una eficiencia de amplificación insuficiente en los métodos conocidos.

Por otra parte, la presente invención se basa en un hallazgo mediante el cual la baja eficiencia de la síntesis de hebra complementaria basada en la desestabilización del ácido nucleico de doble hebra puede compensarse mediante la aplicación de la reacción de síntesis de hebra complementaria basada en la desestabilización del ácido nucleico bicatenario a la reacción de amplificación de ácido nucleico que proporciona una región que va a hibridarse por el cebador para la reacción de amplificación que avanza originariamente a temperatura constante. Puesto que la presente invención utiliza una reacción de amplificación de ácido nucleico que avanza a temperatura constante, si se coloca una región con la que se hibrida un cebador en condiciones que garantizan el apareamiento de bases, la reacción de síntesis de hebra complementaria posterior, que no requiere la desestabilización de la doble hebra, avanza. Por consiguiente, puede minimizarse la influencia de la baja eficiencia de la reacción de síntesis de hebra complementaria basada en la desestabilización de la doble hebra. Se logra un nivel utilizable en la práctica de la eficiencia de síntesis por primera vez mediante la combinación de los dos métodos. En otras palabras, la reacción de síntesis de hebra complementaria basada en la desestabilización de la doble hebra es útil como reacción para suministrar una región que va a hibridarse por el cebador para la reacción de amplificación de ácido nucleico que avanza de manera isotérmica. Al contrario, es difícil aplicarla a una reacción de amplificación de ácido nucleico que requiere ciclos térmicos.

En el método isotérmico de amplificación de ácido nucleico según la presente invención, por ejemplo, es deseable que el extremo 3' se hibride consigo mismo y se usa como molde para la reacción de síntesis de hebra complementaria. Concretamente, la principal característica de la presente invención es que no se requiere un cambio de temperatura y se realiza el mejor uso de la misma en particular cuando se usa el cebador tal como se describe a continuación. Los presentes inventores diseñaron el método de amplificación de ácido nucleico usando un cebador que tiene una configuración específica. A continuación en el presente documento, el método se describe como el método LAMP (amplificación isotérmica mediada por bucle). Según el método LAMP, el extremo 3' de un polinucleótido molde se hibrida consigo mismo para servir como origen de la síntesis de hebra complementaria, y se usa un cebador que se hibrida con el bucle así formado para permitir la reacción isotérmica de síntesis de hebra complementaria. Los presentes inventores encontraron que no es necesaria la desnaturalización de un molde bicatenario.

La presente invención se refiere a un método de síntesis de ácido nucleico que usa un cebador que puede amplificar el ácido nucleico de manera isotérmica, siendo el cebador un oligonucleótido constituido por al menos dos regiones, X2 y X1c, en el que X1c se conecta al lado 5' de X2.

45 En el presente documento, X2 se define como una región que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una región arbitraria X2c del ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos específica.

Además, X1c se define como una región que tiene una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a una región arbitraria en el lado 5' de la región X2c del ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos específica.

El cebador se utiliza como un primer cebador y un segundo cebador en la explicación facilitada a continuación. El primer cebador se hibrida con el producto extendido sintetizado usando el segundo cebador como origen para servir como origen de la reacción de síntesis de hebra complementaria y viceversa. El producto de síntesis preparado mediante el método de síntesis de ácido nucleico, que usa el cebador como origen de síntesis, permite la amplificación de ácido nucleico que se mencionará a continuación. La presente invención se refiere a un método para sintetizar ácido nucleico en el que una pluralidad de nucleótidos, que constituyen una región específica de un ácido nucleico molde bicatenario que está constituido por secuencias de nucleótidos complementarias, se conectan en una hebra individual, en el que el método comprende las siguientes etapas. En el presente documento, una condición de que una determinada secuencia de nucleótidos 1 y al menos una secuencia de nucleótidos 2 complementaria a la misma existan en la hebra idéntica, se denomina condición de que contenga una pluralidad de secuencias de nucleótidos complementarias en una hebra individual.

- 5 a) incubar un ácido nucleico bicatenario molde y un cebador arbitrario en presencia de ADN polimerasa, que cataliza una reacción de síntesis de hebra complementaria que acompaña a un desplazamiento de hebra, en condiciones que garantizan la síntesis de hebra complementaria usando el cebador como origen, de tal manera que una región del ácido nucleico molde diana que va a hibridarse por un cebador que puede amplificar el ácido nucleico molde a temperatura constante, se coloca en condiciones en las que la región puede experimentar apareamiento de bases;
- 10 b) hibridar el segundo cebador con la región obtenida en la etapa a), que puede experimentar apareamiento de bases, y llevar a cabo la síntesis de hebra complementaria usando el segundo cebador como origen, en el que el extremo 3' del segundo cebador se hibrida con una región que define el lado 3' de una de las hebras que constituyen la región específica y el extremo 5' del segundo cebador comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una región arbitraria de un producto de reacción de síntesis de hebra complementaria obtenido usando el cebador como origen;
- 15 c) colocar una región del producto extendido del segundo cebador sintetizado en la etapa b), con el que se hibridará un primer cebador, en condiciones en las que puede experimentar apareamiento de bases;
- d) hibridar el primer cebador con la región obtenida en la etapa c), que puede experimentar apareamiento de bases, y llevar a cabo la síntesis de hebra complementaria usando el primer cebador como origen, en el que el extremo 3' del primer cebador se hibrida con una región que define el lado 3' de dicha región en el producto extendido obtenido usando el segundo cebador como origen; y
- 20 e) permitir que se produzca autohibridación en el extremo 3' del producto extendido del primer cebador sintetizado en la etapa d), llevar a cabo la síntesis de hebra complementaria usando el producto extendido como molde, y obtener ácido nucleico en el que una pluralidad de nucleótidos, que constituyen la región específica, se conectan en una hebra individual.

25 Entre las reacciones mencionadas anteriormente, sólo se logra la etapa a) mediante la desestabilización del ácido nucleico bicatenario. El producto extendido del cebador para la reacción de amplificación (concretamente, el segundo cebador), que ha obtenido una región que va a hibridarse en esta etapa, se utiliza como molde en la reacción posterior. Debe indicarse que puesto que se usa la ADN polimerasa que cataliza la reacción de síntesis de hebra complementaria con desplazamiento de hebra, no sólo junto con el cebador para la reacción de amplificación, sino también en la totalidad de la síntesis de hebra complementaria en la presente invención, la configuración bicatenaria que aparece en el sentido anterior de la reacción de síntesis de hebra complementaria no obstruye la reacción sólo si se logra la hibridación del cebador.

30 Además, en la presente invención, la reacción tras esta etapa avanza originariamente a temperatura constante y no depende de una síntesis de hebra complementaria que utiliza la desestabilización del ácido nucleico bicatenario con escasa eficiencia. Concretamente, la reacción de amplificación de ácido nucleico, que avanza a temperatura constante, se inicia tras la síntesis de hebra complementaria usando el cebador usado en la etapa a) como origen de síntesis.

35 Incluso tras iniciarse la reacción de amplificación de ácido nucleico que avanza de manera isotérmica, un cebador para la secuencia de nucleótidos diana que existe en el sistema de reacción puede provocar posiblemente la síntesis de hebra complementaria, basándose en la desestabilización del ácido nucleico bicatenario. No puede negarse la posibilidad de que se produzca tal reacción, y no es necesario decir que el que se produzca tal reacción contribuye a la mejora de la eficiencia total de la reacción. La reacción de síntesis de hebra complementaria basada en la desestabilización del ácido nucleico bicatenario, que se produce simultáneamente durante la reacción de amplificación, no es esencial en la reacción de amplificación de ácido nucleico según la presente invención.

45 Resulta ventajoso utilizar un cebador externo en la etapa c) de la reacción mencionada anteriormente. En el presente documento, el cebador externo proporciona el origen de la reacción de síntesis de hebra complementaria que avanza hacia un cebador que se hibrida con la secuencia de nucleótidos diana (este cebador se denomina un cebador interno, al contrario que el cebador externo). Por consiguiente, la región con la que se hibrida el cebador externo es la región del lado 5' (lado 3' en un molde) del cebador interno. Como cebador externo, puede usarse un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que funciona como cebador al menos en su lado 3'. El primer cebador y el segundo cebador corresponden al cebador interno en este ejemplo.

50 Por otra parte, el cebador interno contiene en su extremo 3' la secuencia de nucleótidos del molde de ácido nucleico bicatenario, que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de una región que va a sintetizarse. El cebador interno se usa habitualmente como conjunto de dos cebadores. Sin embargo, si la región que va a sintetizarse contiene repeticiones de la secuencia de nucleótidos idéntica, los dos cebadores pueden comprender la secuencia de nucleótidos idéntica. El conjunto de cebadores está diseñado de tal manera que uno de los cebadores internos puede hibridarse con el producto extendido a partir del otro cebador interno. Cuando se conocen al menos las secuencias de nucleótidos en ambos extremos de la región que va a amplificarse, se conoce bien un método de determinación de la secuencia de nucleótidos usada como cebador.

55 Si los cebadores internos son cebadores cuyos lados 3' pueden hibridarse con la secuencia de nucleótidos diana, puede añadirse una secuencia de nucleótidos arbitraria al lado 5' del cebador interno. El hecho de que puede

añadirse una secuencia arbitraria al lado 5' del cebador interno proporciona muchas variaciones al método de síntesis de ácido nucleico de la presente invención. Los ejemplos específicos se describen a continuación.

5 Los cebadores internos en la presente invención pueden ser anidados. Concretamente, el segundo conjunto de cebadores internos, que puede hibridarse con la segunda secuencia de nucleótidos diana, puede combinarse además con el primer conjunto de cebadores internos, que puede hibridarse con la primera secuencia de nucleótidos diana. En esta combinación, la primera secuencia de nucleótidos diana está contenida dentro de la segunda secuencia de nucleótidos diana. Cuando los cebadores internos son anidados, los cebadores externos están diseñados de modo que se hibridan con el lado 5' de los segundos cebadores internos (lado 3' del molde).

10 Los cebadores internos comprenden habitualmente una combinación de dos cebadores, mientras que el número de los cebadores externos puede ser arbitrario. En general, el cebador externo de la presente invención comprende dos cebadores que proporcionan los orígenes de la reacción de síntesis de hebra complementaria que avanza hacia las regiones con las que se hibridan los cebadores internos respectivos. Sin embargo, aunque los cebadores externos sólo se apliquen a cualquiera de los cebadores internos, puede llevarse a cabo el método de la presente invención. Alternativamente, una pluralidad de cebadores externos pueden combinarse con un cebador interno. En todo momento, cuando la síntesis de hebra complementaria que avanza hacia la región con la que se hibridan los cebadores internos está acompañada, el producto de la reacción de síntesis de hebra complementaria usando los cebadores internos como origen de síntesis puede generarse de manera eficiente.

20 La síntesis de hebra complementaria dirigida por los cebadores externos en la presente invención está diseñada para iniciarse de manera posterior a la síntesis de la hebra complementaria usando los cebadores internos como origen de síntesis. Los medios más sencillos para lograr esto suceden cuando la concentración de los cebadores internos es mayor que la de los cebadores externos. Específicamente, la síntesis de hebra complementaria a partir de los cebadores internos puede ser llevada a cabo de manera predominante cuando la diferencia de la concentración de los cebadores habitualmente es aproximadamente de 2 a 50 veces, y preferiblemente de aproximadamente 4 a 10 veces. Además, el momento de la reacción de síntesis de hebra complementaria puede controlarse mediante el ajuste de la temperatura de fusión (Tf) de los cebadores externos menor que la Tf de los cebadores internos. La temperatura de fusión (Tf) puede calcularse de manera teórica, basándose en la longitud de la hebra complementaria que se hibrida y la combinación de los nucleótidos que constituyen el apareamiento de bases, cuando todas las demás condiciones son constantes. Por consiguiente, los expertos en la técnica pueden obtener fácilmente condiciones de reacción deseables a partir de la divulgación de la presente memoria descriptiva.

30 Además, puede aplicarse un fenómeno denominado apilamiento contiguo para ajustar el momento de hibridación de los cebadores externos. El apilamiento contiguo es un fenómeno en el que un oligonucleótido que no puede hibridarse independientemente puede hibridarse cuando se coloca adyacente a una parte bicatenaria (Chiara Borghesi-Nicoletti *et al.*, Bio Techniques 12, págs. 474-477 (1992)). Concretamente, los cebadores externos se colocan adyacentes a los cebadores internos y están diseñados de tal manera que no pueden hibridarse independientemente en las condiciones de incubación. Por tanto, sólo si se hibridan los cebadores internos, pueden hibridarse los cebadores externos. Por tanto, la hibridación de los cebadores internos predomina inevitablemente. Basándose en el principio, un ejemplo de ajuste de la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido cebador necesario para una serie de reacciones se describe en el ejemplo.

40 En la explicación descrita a continuación, X2 y X1c en uno de los cebadores internos se denominan temporalmente F2 y F1c, y X2 y X1c en el otro cebador interno se denominan R2 y R1c. Los cebadores internos usados para la explicación se denominan temporalmente FA y RA. Uno de FA y RA es el primer cebador de la presente invención, y el otro funciona como segundo cebador. Las regiones que constituyen FA y RA son tal como sigue:

	X2	X1c
FA	F2	F1c
RA	R2	R1c

45 En el método de amplificación de ácido nucleico de la presente invención, a través de las etapas a) a c) mencionadas anteriormente, es importante producir un ácido nucleico que tenga en su extremo 3' la región F1, que puede hibridarse con la parte F1c en la misma hebra, formar un bucle que contiene la región F2c y experimentar apareamiento de bases mediante hibridación de la región F1 con F1c en la misma hebra. Tal configuración de ácido nucleico puede proporcionarse por la reacción de síntesis de ácido nucleico basada en la presente invención utilizando los cebadores internos que tienen la siguiente configuración. Los detalles de la reacción son tal como se mencionaron anteriormente.

50 Concretamente, los cebadores internos que se usan para la reacción de amplificación de ácido nucleico de la presente invención están constituidos por al menos las dos regiones mencionadas anteriormente X2 y X1c, y comprenden el oligonucleótido en el que X1c se conecta con el lado 5' de X2.

En el presente documento, el ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos específica que determina la configuración de los cebadores internos de la presente invención significa un ácido nucleico que se convierte en el

molde cuando los cebadores internos de la presente invención se utilizan como cebador. Cuando la amplificación de ácido nucleico se lleva a cabo basándose en el método de síntesis de la presente invención, el ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos específica es un ácido nucleico bicatenario que va a amplificarse o su derivado. El ácido nucleico bicatenario que tiene una secuencia de nucleótidos específica significa un ácido nucleico en el que al menos una parte de la secuencia de nucleótidos se aclara o cuya secuencia puede suponerse. La parte cuya secuencia de nucleótidos debe aclararse es la región mencionada anteriormente X2c y la región X1c en su lado 5'.

Las dos regiones pueden unirse entre sí o pueden existir por separado. El estado de la parte de bucle formada mediante autohibridación del ácido nucleico producto depende de la posición relativa de las dos regiones. Preferiblemente, las dos regiones no están innecesariamente separadas, de tal manera que la autohibridación del ácido nucleico producto se logre de manera más preferente que la hibridación de dos moléculas. Por tanto, una longitud preferida de la secuencia de nucleótidos espaciadora entre las dos regiones es normalmente de 0 a 500 nucleótidos. Sin embargo, en algunos casos, regiones que existen demasiado cerca entre sí pueden resultar desventajosas para formar un bucle de autohibridación deseable. Más específicamente, es deseable que el bucle tenga una estructura que permita la hibridación de un nuevo cebador y un inicio suave para la reacción de síntesis de hebra complementaria con desplazamiento de hebra. Por tanto, más preferiblemente, los cebadores están diseñados de tal manera que la distancia entre la región X2c y la región X1c ubicada en su lado 5' es de aproximadamente 0 a 100 nucleótidos, más preferiblemente de aproximadamente 10 a 70 nucleótidos. Los valores de distancia enumerados en el presente documento no contienen las longitudes de X1c y X2. La longitud de nucleótidos de la parte de bucle incluye además la longitud correspondiente a X2.

Además, los términos "idéntica" y "complementaria" tal como se usa en el presente documento para caracterizar la secuencia de nucleótidos que constituye el cebador usado para la presente invención abarcan casos que no son completamente idénticos y no completamente complementarios. Más específicamente, una secuencia idéntica a una determinada secuencia también puede incluir una secuencia complementaria a una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con la determinada secuencia. Por otra parte, una secuencia complementaria se refiere a una secuencia que se hibrida en condiciones rigurosas y proporciona el origen para la síntesis de hebra complementaria. En la presente invención, el término "idéntica" significa que la homología de la secuencia de nucleótidos es, por ejemplo, del 90% o más, habitualmente del 95% o más, y más preferiblemente del 98% o más. El término "complementaria" se refiere a una secuencia de nucleótidos idéntica a la secuencia complementaria. Concretamente, cuando la homología de la secuencia de nucleótidos es, por ejemplo, del 90% o más, habitualmente del 95% o más, y más preferiblemente del 98% o más con la secuencia complementaria, puede decirse que es "complementaria". Además, cuando la secuencia complementaria de nucleótidos funciona como origen de la síntesis de hebra complementaria, es deseable que al menos un nucleótido del extremo 3' coincida completamente con la secuencia complementaria.

Las regiones X2 y X1c que constituyen el cebador interno usado en la presente invención se disponen normalmente de manera continua, sin solapamiento entre sí. Alternativamente, si X2 y X1c comparten una secuencia de nucleótidos común, pueden colocarse de modo que se solapen parcialmente entre sí. Sin excepción, X2 debe colocarse en el extremo 3' para funcionar como cebador. Por otra parte, X1c se coloca en el extremo 5' tal como se describe a continuación, para proporcionar una función como cebador en el extremo 3' de una hebra complementaria sintetizada usando X1c como molde. La hebra complementaria obtenida usando el oligonucleótido como origen de síntesis sirve como molde de la síntesis de hebra complementaria inversa en la siguiente etapa, y finalmente la parte de cebador interno según la presente invención también se copia como molde para la hebra complementaria. El extremo 3' copiado contiene la secuencia de nucleótidos X1, y se hibrida con X1c ubicada dentro de la hebra idéntica para formar un bucle.

El cebador interno usado en la presente invención es un oligonucleótido que cumple dos requisitos: (1) tiene la capacidad para formar un par de bases complementario a una secuencia de nucleótidos diana, y (2) proporciona un grupo -OH en el extremo 3' del par de bases que sirve como origen de síntesis de hebra complementaria. La estructura principal del cebador no se restringe a las que se componen de enlaces fosfodiéster. Por ejemplo, el cebador puede comprender fosfotioato. Además, el nucleótido puede ser cualquier nucleótido, siempre que forme un par de bases complementario. En general, existen cinco tipos de nucleótidos que se producen de manera natural, concretamente A, C, T, G y U; sin embargo, también están incluidos análogos tales como bromodesoxiuridina, por ejemplo. El oligonucleótido usado en la presente invención sirve no sólo como origen de síntesis sino que también actúa preferiblemente como molde de síntesis de hebra complementaria.

El cebador interno usado en la presente invención consiste en nucleótidos con longitud apropiada para permitir el apareamiento de bases con la hebra complementaria manteniendo la especificidad requerida en condiciones dadas en diversos tipos de reacciones de síntesis de ácido nucleico descritas a continuación. Específicamente, el cebador comprende de 5 a 200 nucleótidos, y más preferiblemente de 10 a 50 nucleótidos. La longitud mínima de un cebador reconocida por polimerasas conocidas que catalizan síntesis de ácido nucleico dependiente de secuencia es de aproximadamente 5 nucleótidos. Por tanto, la longitud de una parte de hibridación debe ser de al menos 5 nucleótidos o más larga. Además, para garantizar una alta probabilidad de especificidad nucleótido-secuencia, se prefiere usar un cebador que comprende 10 nucleótidos o más. Por otra parte, una secuencia de nucleótidos excesivamente larga es difícil de sintetizar químicamente. Por tanto, la longitud mencionada anteriormente de los cebadores se pone como ejemplo del intervalo preferido. La longitud de cebadores puesta como ejemplo

corresponde sólo a la parte que se hibrida con la hebra complementaria. El cebador interno de la presente invención comprende al menos dos regiones, X2 y X1c. Por tanto, longitud de cebadores puesta como ejemplo anteriormente debe entenderse como la longitud correspondiente a la longitud de cada región que constituye el cebador interno.

Además, el cebador interno usado en la presente invención puede marcarse con sustancias de marcaje conocidas. 5 Tales sustancias de marcaje incluyen ligandos con capacidad de unión, tales como digoxina y biotina; enzimas; sustancias fluorescentes; sustancias luminiscentes; y radioisótopos. Además, se conocen técnicas para convertir nucleótidos en el cebador interno en análogos fluorescentes (documento WO 95/05391; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 6644-6648, 1994).

Además, el cebador interno usado en la presente invención puede inmovilizarse sobre una fase sólida. 10 Alternativamente, una parte arbitraria del cebador interno puede marcarse con un ligando que tiene capacidad de unión, tal como biotina, y luego puede inmovilizarse indirectamente mediante una pareja de unión, tal como avidina inmovilizada. Cuando se usa un cebador interno inmovilizado como origen de síntesis, el ácido nucleico producto sintetizado se inmoviliza sobre una fase sólida, y por tanto puede separarse fácilmente. El producto separado puede detectarse mediante indicadores específicos de ácido nucleico o mediante hibridación adicional con una sonda 15 marcada. Alternativamente, un fragmento de ácido nucleico de interés puede recuperarse mediante digestión del ácido nucleico con una enzima de restricción arbitraria.

El término "molde" tal como se usa en el presente documento se refiere a ácidos nucleicos que sirven como molde en la síntesis de una hebra complementaria. Aunque una hebra complementaria que tiene una secuencia de 20 nucleótidos que es complementaria a un molde es una hebra correspondiente al molde, la relación entre los dos es meramente relativa. Específicamente, una hebra sintetizada como una hebra complementaria tiene la capacidad de funcionar como molde. En otras palabras, una hebra complementaria también puede servir como molde.

El cebador interno en la presente invención puede contener regiones adicionales a las dos regiones mencionadas anteriormente. Específicamente, X2 y X1c se colocan en el extremo 3' y el extremo 5', respectivamente, y una 25 secuencia arbitraria puede colocarse entre las dos regiones. Una secuencia arbitraria de este tipo incluye, por ejemplo, una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción, un promotor reconocido por ARN polimerasa, una ribozima que codifica para ADN, etc. El ácido nucleico monocatenario, el producto de síntesis de la presente invención, en el que se conectan secuencias de nucleótidos complementarias, puede digerirse para dar dos ácidos nucleicos bicatenarios con idéntica longitud mediante la inserción de una secuencia de reconocimiento de enzima de 30 restricción. Mediante la inserción de una secuencia promotora reconocida por ARN polimerasa, el producto sintetizado de la presente invención puede transcribirse en ARN usando el producto como molde. Además, disponiendo adicionalmente un ADN que codifica para una ribozima, es posible establecer un sistema de autoescisión para los transcritos. Todas las secuencias de nucleótidos adicionales mencionadas anteriormente funcionan sólo cuando las secuencias se forman en ácidos nucleicos bicatenarios. Por consiguiente, estas 35 secuencias no funcionan en el ácido nucleico monocatenario de la presente invención que está en forma de un bucle. Las secuencias adicionales funcionan por primera vez sólo tras avanzar la extensión de ácido nucleico e hibridarse la secuencia con una secuencia de nucleótidos complementaria sin formar ningún bucle.

Cuando los cebadores internos usados en la presente invención se combinan con un promotor en el sentido que permita la transcripción de la región sintetizada, el producto de reacción según la presente invención, que tiene la 40 secuencia de nucleótidos idéntica de manera repetida, realiza un sistema de transcripción altamente eficiente. La traducción a proteína también es posible combinando el sistema de transcripción con un sistema de expresión apropiado. Concretamente, puede aplicarse a la transcripción y traducción a proteína en una bacteria o una célula de animal, o *in vitro*.

Diversos cebadores usados en la presente invención pueden sintetizarse químicamente. Alternativamente, un ácido 45 nucleico natural puede digerirse mediante enzima de restricción y similares para modificarlo o conectarlo de modo que contenga la secuencia de nucleótidos mencionada anteriormente.

El principio básico de la reacción de amplificación para ácidos nucleicos bicatenarios mediante el uso combinado de los cebadores internos mencionados anteriormente, FA y RA, y ADN polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de hebra se describe a continuación haciendo referencia a las figuras 1 a 4. Según los ejemplos, el 50 conjunto de cebadores de amplificación consiste en los cebadores internos, FA y RA, y además, RA sirve como cebador arbitrario en la presente invención.

El cebador arbitrario mencionado anteriormente (RA en la figura 1-(1)) se hibrida en primer lugar con X2c (correspondiente a R2c) en el ácido nucleico bicatenario molde para servir como origen de síntesis de hebra 55 complementaria. En tales condiciones, el ácido nucleico bicatenario es inestable y el cebador sirve directamente como origen de síntesis de hebra complementaria en el ácido nucleico bicatenario. En la figura 1-(2), la hebra complementaria sintetizada usando RA como origen desplaza una de las hebras del ácido nucleico bicatenario molde, y F2c, que es la región que se hibrida con el cebador para la reacción de amplificación FA, está listo para el apareamiento de bases (figura 1-(2)).

Se lleva a cabo una síntesis de hebra complementaria mediante la hibridación de FA con la región F2c que está lista

para el apareamiento de bases. En el presente documento, un cebador externo F3, que inicia la síntesis de hebra complementaria a partir del lado 5' de FA (lado 3' del molde), también se hibrida con la región (figura 2-(4)). El cebador externo está diseñado de modo que inicie la síntesis de hebra complementaria en el lado 5' de cada cebador interno (lado 3' del molde). El cebador externo tiene además una mayor Tf y se usa a una menor concentración que la de los cebadores internos. Por tanto, el cebador externo siempre inicia una síntesis de hebra complementaria con una menor probabilidad en comparación los cebadores internos. Como resultado de la síntesis de hebra complementaria usando el cebador externo F3 como origen, el producto extendido sintetizado usando el cebador interno FA como origen se desplaza y se libera como una hebra individual (figura 2-(5)). Usando esta hebra individual como molde, RA y el cebador externo, R3, correspondiente a RA se hibridan entre sí e inician la síntesis de hebra complementaria (figura 3-(6)). Como resultado, los productos extendidos a partir de RA tienen una estructura con la que F1 en el extremo 3' puede hibridarse intramolecularmente consigo mismo (figura 3-(8)). En la figura 3-(6), el extremo 5' de la hebra se hibrida intramolecularmente consigo misma. Sin embargo, la reacción de amplificación no puede iniciarse con esta estructura, puesto que el extremo 5' no sirve como origen de síntesis de hebra complementaria. La reacción de amplificación se inicia sólo cuando se sintetiza una hebra complementaria a la hebra mostrada en la figura 3-(6), y después de eso, se proporciona una estructura que se hibrida consigo mismo en el extremo 3' de la misma (figura 3-(8)). Estas etapas de reacción pueden denominarse etapas preliminares para la reacción de amplificación de la presente invención.

A continuación se describe específicamente la amplificación de ácido nucleico según la presente invención, con referencia a la ilustración esquemática representada en las figuras. El F1 en el extremo 3' autohibridado (figura 3-(8)) sirve como origen de síntesis de hebra complementaria. Se produce la hibridación con el extremo 3' entre F1 y F1c, y por tanto, existe la posibilidad de que la hibridación compita con FA, que también contiene F1c. Sin embargo, en realidad, las secuencias de nucleótidos complementarias F1/F1c que existen en una región vecina en una hebra idéntica preferentemente se hibridan entre sí. Por tanto, la reacción de síntesis de hebra complementaria usando su propia hebra como molde se inicia preferentemente. El ácido nucleico en el que la secuencia de nucleótidos diana se ha conectado en una hebra individual se sintetiza a través de esta reacción. Además, F2c, con el que puede hibridarse el cebador interno FA, está presente en una región de formación de bucle que se forma mediante la autohibridación de F1 en el extremo 3'. Tras hibridarse FA con esta parte, se inicia la síntesis de hebra complementaria (figura 3-(8)). La síntesis de hebra complementaria a partir de FA hibridado con el bucle desplaza los productos de la síntesis de hebra complementaria iniciada desde el extremo 3' usándose a sí misma como molde, y de nuevo se permite que el extremo 3' esté listo para autohibridación (figura 4-(9)). La reacción posterior comprende etapas alternas de síntesis de hebra complementaria usando el extremo 3' de sí misma como origen y su propia hebra como molde, y síntesis de hebra complementaria usando la parte de bucle como origen y el cebador interno FA o RA como origen. Tal como se describió anteriormente, la reacción de amplificación de ácido nucleico comprende las etapas alternas de extensión repetida de extremo 3', usando su propia hebra como molde, y extensión recién iniciada a partir de la hibridación de cebadores con la parte de bucle.

Por otra parte, con respecto a la hebra de ácido nucleico sintetizada complementaria al ácido nucleico monocatenario, que se extiende usando su propia hebra como molde, usando el oligonucleótido que se hibrida con la parte de bucle del mismo como origen, la síntesis de un ácido nucleico que tiene una pluralidad de secuencias de nucleótidos complementarias conectadas en una hebra individual también avanza en la hebra de ácido nucleico sintetizada. Específicamente, la síntesis de hebra complementaria a partir de la parte de bucle se completa, por ejemplo, cuando alcanza R1 tal como se representa en la figura 4-(9). Entonces, otra síntesis de hebra complementaria se inicia nuevamente usando el extremo 3' desplazado por la síntesis de ácido nucleico como origen (figura 4-(9)). Eventualmente, la reacción alcanza la parte de bucle que ha sido el origen de síntesis en las etapas previas para iniciar el desplazamiento de nuevo. Por tanto, el ácido nucleico que inició la síntesis a partir de la parte de bucle también se desplaza, y como resultado, se produce la hibridación de R1 en el extremo 3' en la propia hebra (figura 4-(11)). Este R1 en el extremo 3' inicia la síntesis de hebra complementaria tras la hibridación con R1c presente en la hebra idéntica. Cuando F en esta reacción se considera como R y R como F, la reacción es la misma que la representada en la figura 3-(8). Por tanto, la estructura representada en la figura 4-(11) sirve como nuevo ácido nucleico que continúa el proceso de autoextensión y la síntesis de otro ácido nucleico.

Tal como se describió anteriormente, según el método de la presente invención, la reacción que proporciona de manera continua ácidos nucleicos que inician otra extensión avanza junto con el alargamiento de un ácido nucleico. A medida que se extiende adicionalmente el ácido nucleico, se generan múltiples secuencias de formación de bucle no sólo en el extremo de hebra sino también dentro de la hebra idéntica. Cuando estas secuencias de formación de bucle están listas para el apareamiento de bases a través de la reacción de síntesis que comprende desplazamiento de hebra, los cebadores internos se hibridan con las secuencias de formación de bucle y sirven como orígenes de síntesis para producir nuevos ácidos nucleicos. Se logra una amplificación más eficiente combinando la síntesis iniciada desde regiones internas de la hebra con la síntesis de hebra desde el extremo de hebra. Tal como se describió anteriormente, la extensión de hebra que acompaña a una síntesis de nuevos ácidos nucleicos puede lograrse mediante la aplicación del método LAMP. Además, según el método LAMP, los propios ácidos nucleicos recién generados se extienden, y dan como resultado una nueva generación de otros ácidos nucleicos. De manera teórica, esta serie de reacción continúa sin parar, y por tanto puede lograr una amplificación extremadamente eficiente de ácido nucleico. Además, el método de la presente invención puede llevarse a cabo en condiciones de reacción isotérmica.

En el presente documento, el producto de reacción acumulado tiene una estructura en la que las secuencias de nucleótidos entre F1 y R1, y secuencias complementarias de las mismas, se conectan en una pluralidad. La región que contiene las secuencias de nucleótidos de F2-F1 (F2c-F1c) o R2-R1 (R2c-R1c) se continúa en ambos extremos de las secuencias de unidades de repetición. Por ejemplo, la figura 4-(10) muestra un estado en que las secuencias de nucleótidos se conectan en el orden de (R2-F2c)-(F1-R2c)-(R1-F1c)-(F2-R2c) desde el lado 5'. Esto es debido a que la reacción de amplificación de la presente invención avanza basándose en un principio de que la amplificación se inicia a partir de F2 (o R2) usando los cebadores internos como orígenes de síntesis, y sucesivamente, el producto se extiende desde F1 (o R1) mediante la reacción de síntesis de hebra complementaria usando el propio extremo 3' como origen de síntesis.

Como la realización más preferible en el presente documento, los cebadores internos, FA y RA, se usan como los oligonucleótidos que se hibridan con una parte de bucle. Sin embargo, la amplificación de ácido nucleico según la presente invención puede llevarse a cabo sólo cuando se usan tanto el oligonucleótido que tiene esta estructura limitada así como un oligonucleótido que puede iniciar la síntesis de hebra complementaria a partir de un bucle. Concretamente, si sólo se desplaza el extremo 3' (que continúa extendiéndose) por la síntesis de hebra complementaria a partir de un bucle, se proporciona de nuevo otra parte de bucle. Puesto que la síntesis de hebra complementaria, que se inicia a partir de una parte de bucle, usa un ácido nucleico molde en el que una pluralidad de secuencias de nucleótidos complementarias se conectan en una hebra individual, resulta obvio que puede sintetizarse un ácido nucleico deseado de la presente invención. Sin embargo, el ácido nucleico sintetizado de esta manera forma un bucle tras el desplazamiento para realizar la síntesis de hebra complementaria, pero no tiene extremo 3' para formar el bucle después de eso y por tanto no puede funcionar como nuevo molde. Por consiguiente, de forma contraria al caso de usar el ácido nucleico que inicia la síntesis a partir de FA o RA, no puede esperarse amplificación exponencial. Por ese motivo, los cebadores internos que tienen estructuras como FA y RA son útiles en la presente invención para síntesis altamente eficaz de ácido nucleico.

Una serie de reacciones avanzan simplemente añadiendo los componentes a continuación al ácido nucleico bicatenario que sirve como molde e incubándolos en condiciones que garantizan la hibridación de los cebadores internos y los cebadores externos y la reacción de síntesis de hebra complementaria usando estos cebadores como orígenes. Las condiciones de incubación son tal como se describieron previamente. En la presente invención, la reacción de amplificación del ácido nucleico molde se logra mediante la incubación de los siguientes elementos a una menor temperatura que la requerida para desnaturalizar el ácido nucleico bicatenario que sirve como molde. En este momento, la etapa de desnaturalización del ácido nucleico molde es innecesaria. En el presente documento, la temperatura requerida para la desnaturalización del ácido nucleico bicatenario significa una temperatura a la que el ácido nucleico molde puede convertirse en una hebra individual tras enfriamiento rápido.

- Cuatro clases de oligonucleótidos: FA, RA, cebador externo F3 y cebador externo R3;
- ADN polimerasa que cataliza la reacción de síntesis de hebra complementaria con desplazamiento de hebra;
- Nucleótido como sustrato de ADN polimerasa

Tal como se describe en la explicación del principio de la reacción, cuando se usan los FA y RA mencionados anteriormente como los cebadores internos, el método de síntesis de ácido nucleico de la presente invención, usando el ácido nucleico bicatenario como molde, es necesario para una reacción que usa como molde un ácido nucleico derivado de una muestra. Cuando los cebadores internos que tienen estructuras específicas como FA y RA se aplican al método de síntesis de ácido nucleico de la presente invención, el extremo 3' del producto generado se hibrida consigo mismo y sirve como origen de síntesis para la hebra complementaria, usándose a sí mismo como molde. Además, un nuevo cebador se hibrida con la parte de bucle, formada mediante autohibridación del extremo 3' del producto mencionado anteriormente, que sirve como origen de síntesis, y avanza la reacción de síntesis de hebra complementaria con desplazamiento de hebra. Estas reacciones avanzan independientemente del método de síntesis de ácido nucleico según la presente invención usando el ácido nucleico bicatenario como molde.

Concretamente, cuando se usan FA y RA como los cebadores internos, la reacción de síntesis de ácido nucleico de la presente invención usando el ácido nucleico bicatenario como molde constituye una reacción inicial. Por consiguiente, la reacción inicial requiere condiciones que garanticen la hibridación de los cebadores internos y los cebadores externos y la reacción de síntesis de hebra complementaria usando estos cebadores como orígenes. Las reacciones posteriores pueden realizarse en condiciones más apropiadas. Sin embargo, cuando se requiere un cambio de temperatura con ese fin, la ventaja de la presente invención, en la que la etapa de desnaturalización no se requiere, no puede aprovecharse por completo. Por consiguiente, en la presente invención, es preferible que no sólo la reacción inicial, sino también todas las reacciones posteriores se lleven a cabo en condiciones preferibles.

En casos en los que se usan FA y RA como los cebadores internos de la presente invención, es importante observar que la serie de etapas de reacción avanzan sólo cuando las posiciones relativas de las múltiples regiones se mantienen de manera constante. Por consiguiente, la síntesis no específica que acompaña a una síntesis de hebra complementaria no específica puede impedirse de manera eficaz. Específicamente, este aspecto contribuye a la reducción en la probabilidad de que el producto sirva como material de partida en una etapa de amplificación posterior, incluso cuando se produce cierta reacción no específica. Además, el hecho de que el procedimiento de la

reacción se controle mediante una pluralidad de diferentes regiones proporciona la flexibilidad para construir un sistema de detección que garantiza la discriminación precisa de secuencias de nucleótidos similares.

5 El aspecto de la invención puede utilizarse para detectar una mutación de un gen. Cuatro clases de cebadores en total (dos clases de los cebadores externos y dos clases de los cebadores internos) se usan en la realización de la presente invención que usa cebadores externos. Si las secuencias de nucleótidos que constituyen seis regiones que están contenidas en cuatro clases de oligonucleótidos y la secuencia de nucleótidos diana no se preparan tal como está diseñado, se inhibe cualquiera de las reacciones de síntesis de hebra complementaria de la presente invención. En particular, las secuencias de nucleótidos cerca del extremo 3' de los oligonucleótidos respectivos que sirven como origen de síntesis para la hebra complementaria y las secuencias de nucleótidos cerca del extremo 5' de la región X1c cuya secuencia de nucleótidos complementaria sirve como origen de síntesis, son importantes para la síntesis de hebra complementaria. Por tanto, si la secuencia de nucleótidos importante para la síntesis de hebra complementaria está diseñada de modo que corresponda a la mutación que va a detectarse, la presencia o ausencia de la mutación, tal como la delección e inserción de nucleótido(s) o polimorfismo génico tal como SNP, puede detectarse mediante la observación del producto de reacción de síntesis según la presente invención.

10 Más específicamente, cuando el nucleótido que se espera que tenga una mutación o polimorfismo ubicado cerca del extremo 3' de los oligonucleótidos que sirven como origen de la síntesis de hebra complementaria o una hebra complementaria recién sintetizada se vuelve el origen de síntesis, las secuencias de nucleótidos deben diseñarse de modo que sean equivalentes a la secuencia en las proximidades del extremo 5' de la hebra que sirve como molde en la síntesis de hebra complementaria. Cuando existe apareamiento erróneo en el extremo 3', que sirve como origen de la síntesis de hebra complementaria, o cerca del mismo, la reacción de síntesis de hebra complementaria de ácido nucleico se inhibe notablemente.

15 Según el método LAMP, no se logra una amplificación extensa cuando una reacción desde la estructura de extremo del producto, que se produce en las fases iniciales de la reacción, no se repite muchas veces. Por tanto, aunque se produzca una síntesis errónea, no se logrará una amplificación extensa con apareamientos erróneos, porque la síntesis de hebra complementaria para la amplificación es inhibe en alguna fase. Como resultado, los apareamientos erróneos suprimen eficazmente la amplificación para proporcionar un resultado correcto. Concretamente, la amplificación de ácido nucleico usando el método LAMP tiene un mecanismo de comprobación de secuencia de nucleótidos con un mayor grado de perfección. Estas características proporcionan una ventaja con respecto a los métodos, por ejemplo, tales como PCR, en el que simplemente se amplifican secuencias entre dos regiones.

20 Además, la región X1c, que es característica del oligonucleótido usado en la presente invención, sólo sirve como origen cuando se sintetiza una secuencia complementaria, y la secuencia complementaria se hibrida con la X1 recién sintetizada dentro de la secuencia idéntica para llevar a cabo la reacción de síntesis usando la propia hebra como molde. Por tanto, los oligonucleótidos de la presente invención están libres de la formación de bucles, lo que a menudo es un grave problema en la técnica anterior aunque se genere un denominado dímero de cebador. Por consiguiente, no se produce amplificación no específica debida a un dímero de cebador en la presente invención, lo que contribuye a la mejora de la especificidad de reacción.

25 La amplificación de ácido nucleico puede llevarse a cabo de manera eficiente mediante el ajuste de la Tf de los cebadores externos de modo que sean (cebadores externos F3: $F3c \leq (F2c/F2)$) con relación a los cebadores internos FA. Es deseable diseñar las regiones respectivas que constituyen FA de modo que la hibridación entre F1c y F1 se produzca de manera más predominante que entre F2c y F2. Deben diseñarse teniendo en cuenta la Tf, las bases constituyentes, y similares. Además, puesto que la hibridación entre F1c y F1 es una reacción intermolecular, también debe indicarse que la hibridación avanza de manera predominante con una alta posibilidad. No es necesario decir que también se tendrán en cuenta las condiciones similares para diseñar RA, que se hibrida con el producto extendido de FA. Pueden lograrse condiciones de reacción ideales con una fuerte probabilidad garantizando tal relación.

30 En la presente invención, se usan los términos "síntesis" y "amplificación" de ácido nucleico. Síntesis de ácido nucleico en el presente documento se refiere al alargamiento de ácidos nucleicos a partir de un oligonucleótido que sirve como origen de síntesis. Una serie de reacciones, incluyendo la reacción continua de formación de otros ácidos nucleicos y el alargamiento de los ácidos nucleicos formados además de la síntesis, se denominan colectivamente "amplificación".

35 La región F1, que puede hibridarse con una parte F1c en la hebra idéntica, está prevista en el extremo 3' usando FA y RA como los cebadores internos. La hibridación de la región F1 con la región F1c en la hebra idéntica produce un ácido nucleico monocatenario que puede formar un bucle que contiene la región F2c que puede experimentar apareamiento de bases. El ácido nucleico monocatenario funciona como importante sustancia de partida en la reacción de amplificación de ácido nucleico posterior. El ácido nucleico monocatenario también puede suministrarse basándose en el siguiente principio. Concretamente, la síntesis de hebra complementaria avanza usando un cebador que tiene la siguiente estructura como cebador interno:

5'-[región X1 que se hibrida con la región X1c situada en el cebador] - [secuencia de formación de bucle que está en condiciones que garantizan el apareamiento de bases] - [región X1c] - [región que tiene secuencia complementaria

al molde]-3'

Se preparan dos clases de una secuencia de nucleótidos complementaria a F1 (el cebador FA) y una secuencia de nucleótidos complementaria a R1c (el cebador RA) para la región que tiene una secuencia complementaria a un molde. Además, la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico que va a sintetizarse incluye la secuencia de nucleótidos desde la región F1 hasta la región R1c y la secuencia de nucleótidos desde la región R1, que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos, hasta la región F1c. Por otra parte, X1c y X1, que pueden hibridarse intermolecularmente en el cebador, pueden ser una secuencia arbitraria. Sin embargo, es deseable que las secuencias de la región X1c/X1 se diferencien de los cebadores FA y RA.

En primer lugar, usando un cebador arbitrario, la región F2 del ácido nucleico bicatenario que se convierte en el molde se coloca en condiciones que garantizan el apareamiento de bases. El cebador FA se hibrida entonces con F2 que puede experimentar apareamiento de bases, y se lleva a cabo la síntesis de hebra complementaria. En este momento, RA puede usarse como cebador arbitrario. Entonces, la región R2c de la hebra complementaria así sintetizada se coloca en condiciones que garantizan el apareamiento de bases, y otro cebador se hibrida con esta región para preparar el origen de la síntesis de hebra complementaria. Puesto que el extremo 3' de la hebra complementaria sintetizada tiene una secuencia de nucleótidos complementaria al cebador FA que constituye la parte de extremo 5' de la hebra sintetizada en primer lugar, tiene la región X1 en el extremo 3', que entonces se hibrida con la región X1c en la hebra idéntica para formar un bucle. Por tanto, se proporciona la configuración del extremo 3' que es característica de la presente invención tal como se describió anteriormente, y la reacción posterior es el sistema de reacción que se ha mostrado previamente como la realización más deseable. Obsérvese que el oligonucleótido que se hibrida con la parte de bucle tiene la región X2 complementaria a la región X2c, que existe en el bucle, en el extremo 3', y la región X1 en el extremo 5'. En el sistema de reacción previo, se proporciona la configuración de bucle en el extremo 3' del ácido nucleico mediante la síntesis de una hebra complementaria al ácido nucleico molde usando los cebadores FA y RA. El método proporciona eficazmente la configuración terminal, que es característica de la presente invención, usando un cebador corto. Por otra parte, en la presente realización, toda la secuencia de nucleótidos del bucle se proporciona como cebador desde el principio, y se requiere la síntesis de un cebador más largo.

Además, el principio de la presente invención también puede aplicarse a los métodos conocidos de amplificación de ácido nucleico tales como, por ejemplo, SDA y NASBA. Con el fin de aplicar el principio de SDA a la presente invención, el conjunto de cebadores para SDA, ADN polimerasa que cataliza la reacción de síntesis de hebra complementaria con desplazamiento de hebra, una enzima de restricción y un sustrato necesario para la síntesis de hebra complementaria (incluyendo tionucleótido para proporcionar resistencia a nucleasa), se incuban junto con el ácido nucleico bicatenario que se convierte en el molde en las condiciones mencionadas anteriormente de la presente invención. Cuando cualquiera de los cebadores para SDA inicia la síntesis de hebra complementaria mediante la desestabilización de la doble hebra, la región con la que debe hibridarse el otro cebador en el ácido nucleico molde sustituido se convierte en una condición que garantiza el apareamiento de bases. Entonces, se llevan a cabo la hibridación de los cebadores y la síntesis de la hebra complementaria al ácido nucleico molde.

A continuación, se producen la hibridación de los cebadores externos con el cebador y la síntesis de la hebra complementaria, y la hebra complementaria previamente sintetizada a partir del cebador para SDA se sustituye para generar un ácido nucleico monocatenario. Además, la síntesis de hebra complementaria usando el cebador arbitrario mencionado anteriormente avanza en el sentido del lado 5' del ácido nucleico molde. Por consiguiente, no sólo la región con la que debe hibridarse el cebador para SDA, sino también la región con la que debe hibridarse el cebador externo, se convierten en una condición que garantiza el apareamiento de bases. La hebra complementaria sintetizada a partir de otro cebador, usando el ácido nucleico monocatenario como molde, es resistente a nucleasa. Por consiguiente, la enzima de restricción actúa sólo en el sitio de reconocimiento de enzima de restricción en el cebador para generar de ese modo una mella. La síntesis de hebra complementaria y el desplazamiento se llevan a cabo repetidamente, usando esta mella como origen de síntesis, para obtener la amplificación. Al mismo tiempo, el cebador para SDA también se hibrida con el ácido nucleico monocatenario que se genera mediante la sustitución, y se lleva a cabo la síntesis de la hebra complementaria.

El ácido nucleico que sirve como molde en este momento es resistente a nucleasa, pero, la mella producida por la enzima de restricción se genera en los cebadores para SDA puesto que no son resistentes a nucleasa. Como resultado, la reacción de amplificación de ácido nucleico también se logra en el ácido nucleico monocatenario sustituido. Por consiguiente, continuando con la incubación en estas condiciones, el ADN bicatenario, que comprende las secuencias de nucleótidos de la región que se prescribe mediante los cebadores para SDA, se sintetiza sucesivamente, y, como resultado, se logra la amplificación del ácido nucleico. Aunque ya se conoce el principio del método SDA, la presente invención proporciona un hallazgo novedoso, concretamente que la etapa de desnaturalización del ácido nucleico bicatenario puede eliminarse iniciando la reacción utilizando la reacción de síntesis de ácido nucleico basada en la desestabilización de la doble hebra.

Para llevar a cabo el método NASBA basándose en la presente invención, se usan cebadores para el método NASBA en combinación con la ADN polimerasa y ARN polimerasa que catalizan la reacción de síntesis de hebra complementaria con desplazamiento de hebra. Los cebadores para NASBA están constituidos por el primer cebador al que se añade la secuencia promotora y el segundo cebador que se hibrida con la hebra complementaria

5 sintetizada usando el primer cebador como origen.

En primer lugar, se lleva a cabo la síntesis de hebra complementaria usando un cebador arbitrario para el ácido nucleico molde bicatenario, y la región con la que debe hibridarse el primer cebador para NASBA se coloca en condiciones que garantizan el apareamiento de bases. Posteriormente, la hebra complementaria sintetizada usando el primer cebador para NASBA como origen se sustituye por los cebadores externos para hacer que sea monocatenario. Cuando el segundo cebador para NASBA se hibrida con la hebra individual obtenida para hacer que sea bicatenario, la región promotora añadida al primer cebador para NASBA se convierte en bicatenaria. La reacción de transcripción usando ARN polimerasa se inicia por la región promotora, que se ha convertido en bicatenaria, y se lleva a cabo la síntesis de ARN usando la secuencia de nucleótidos diana como molde.

10 Diversos reactivos que se requieren para el método de síntesis o el método de amplificación de ácido nucleico según la presente invención pueden suministrarse como kit que se envasa previamente. Específicamente, un kit de la presente invención comprende oligonucleótidos que son necesarios como los cebadores internos y los cebadores externos, dNTP (que es el sustrato de la síntesis de hebra complementaria), ADN polimerasa que lleva a cabo la síntesis de hebra complementaria con desplazamiento de hebra, un tampón que proporciona condiciones preferibles para la reacción enzimática, además, si es necesario, reactivos requeridos para detección del producto de la reacción de síntesis, y similares. En particular, en la realización preferida de la presente invención, puesto que la adición de reactivos es innecesaria durante la reacción, los reactivos necesarios para una reacción pueden suministrarse en un estado en el que se ponen en un recipiente de reacción de modo que la reacción puede iniciarse únicamente añadiendo una muestra. Si se construye un sistema en el que la detección del producto de reacción puede llevarse a cabo en el recipiente de reacción usando una señal de emisión de luz o una señal fluorescente, puede anularse la apertura y el cierre del recipiente tras la reacción. Esto es muy deseable desde el punto de vista de impedir la contaminación.

Breve descripción de los dibujos

25 La figura 1 representa esquemáticamente las partes (1) y (2) del principio de la reacción de una realización preferida según la presente invención.

La figura 2 representa esquemáticamente las partes (3) a (5) del principio de la reacción de una realización preferida según la presente invención.

La figura 3 representa esquemáticamente las partes (6) a (8) del principio de la reacción de una realización preferida según la presente invención.

30 La figura 4 representa esquemáticamente las partes (9) a (11) del principio de la reacción de una realización preferida según la presente invención.

La figura 5 es una fotografía de un gel de electroforesis tras una reacción de amplificación utilizando secuencias génicas de VHB, VHC y PSA.

35 La figura 6 es una fotografía de un gel de electroforesis tras la reacción de amplificación en presencia o ausencia de betaína.

La figura 7 es una fotografía de un gel de electroforesis tras la reacción de amplificación en presencia de prolina y DMSO.

40 La figura 8 es un gráfico que muestra el resultado de observar la influencia de un cebador externo sobre el método de amplificación de ácido nucleico de la presente invención. El eje vertical y el eje horizontal indican la intensidad de fluorescencia y el tiempo de reacción, respectivamente.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se ilustra además específicamente a continuación por medio de ejemplos.

[Ejemplo 1] Amplificación de secuencias génicas de VHB, VHC y PSA

45 Se llevó a cabo el método de síntesis de ácido nucleico de la presente invención usando como molde un ADN (bicatenario) que se preparó mediante la incorporación de cada una de las secuencias génicas parciales de VHB, VHC y PSA en un plásmido. Se usaron cuatro clases de cebadores (interno F, interno R, externo F y externo R) en el experimento. Externo F y externo R son cebadores externos para el desplazamiento de un primer ácido nucleico obtenido usando interno F e interno R, respectivamente, como orígenes de síntesis.

50 Se ajustó una alta concentración de interno F (o interno R) de modo que la hibridación del cebador se produjera de manera predominante. Las secuencias de molde del presente ejemplo derivadas de VHB, VHC y PSA que se incorporaron en plásmidos se muestran en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, respectivamente. Además, las secuencias de los cebadores (interno F, interno R, externo F y externo R) usados para amplificar los moldes respectivos se muestran a continuación.

ES 2 546 450 T3

· VHB:

Interno F (SEQ ID NO: 4):

5' -GATAAAACGCCGCAGACACATCCTTCCAACCTCTTGTCTCCAA-3'

Interno R (SEQ ID NO: 5):

5' -CCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTTGACAAACGGGCAACATACCTT-3'

Externo F (SEQ ID NO: 6):

5' -CAAAATTCGCAGTCCCAAC-3'

Externo R (SEQ ID NO: 7):

5' -GGTGGTTGATGTTCTGGA-3'

10 · VHC:

Interno F (SEQ ID NO: 8):

5' -GAGTGGGTTTATCCAAGAAAGGACTTTAGCCATAGTGGTCTGCGGA-3'

Interno R (SEQ ID NO: 9):

5' -CTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGCTTTGCACTCGCAAGCACCTATC-3'

15 Externo F (SEQ ID NO: 10):

5' -GCAGAAAGCGTCTAGCCATGG-3'

Externo R (SEQ ID NO: 11):

5' -CTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGC-3'

· PSA:

20 Interno F (SEQ ID NO: 12):

5' -TGTTCTGATGCAGTGGGCAGCTTTAGTCTGCGGCGGTGTTCTG-3'

Interno R (SEQ ID NO: 13):

5' -TGCTGGGTCGGCACAGCCTGAAGCTGACCTGAAATACCTGGCCTG-3'

Externo F (SEQ ID NO: 14):

25 5' -TGCTTGTGGCCTCTCGTG-3'

Externo R (SEQ ID NO: 15):

5' -GGGTGTGTGAAGCTGTG-3'

Además, las características de la configuración de cebadores se resumen a continuación.

Interno F:

30 Cebador de región del lado 5'/región del lado 3'

Interno F, el mismo que la región F1c de la hebra complementaria sintetizada usando interno F /complementario a la región F2c del ADN molde

Interno R, el mismo que la región R1c de la hebra complementaria sintetizada usando interno R /complementario a la región R2c de la hebra complementaria sintetizada usando interno F

ES 2 546 450 T3

Externo F, complementario a F3c adyacente al lado 3' de la región F2c del ADN molde

Externo R, complementario a R3c adyacente al lado 3' de la región R2c de la hebra complementaria sintetizada usando interno F

- 5 Estos cebadores sintetizaron el ácido nucleico en el que la región desde la región F1 hasta R1c en la que se incorporó la secuencia parcial del gen individual y su secuencia de nucleótidos complementaria se conectan de manera plural en una hebra individual que intercala la secuencia de formación de bucle que contiene F2c. La composición de la disolución de reacción para el método de síntesis de ácido nucleico usando estos cebadores según la presente invención se muestra a continuación.

· Composición de disolución de reacción (en 25 μ l)

- 10 Tris-HCl 20 mM, pH 8,8
KCl 10 mM
(NH₄)₂SO₄ 10 mM
MgSO₄ 4 mM
Betaína 1 M
- 15 Triton X-100 al 0,1%
dNTP 0,4 mM
8 U de Bst ADN polimerasa (NEW ENGLAND BioLabs)

Cebador:

- Interno F 1600 nM
- 20 Interno R 1600 nM
Externo F 400 nM
Externo R 400 nM

Molde:

- 1 x 10⁻²⁰ mol de ADN de VHB
- 25 1 x 10⁻¹⁷ mol de ADN de VHC
1 x 10⁻²² mol de ADN de PSA

Como molde, se prepararon aquéllos que no se desnaturalizan térmicamente. Se hizo reaccionar la disolución de reacción a 65°C durante una hora.

- 30 Confirmación de reacción: se añadieron 5 μ l de tampón de carga a 5 μ l de la disolución de reacción anterior, y entonces se cargó sobre un gel de agarosa al 2% (TBE al 0,5%). Se llevó a cabo electroforesis durante 0,5 horas a 100 V. Como marcador de tamaño molecular, se usó ϕ X174 Hae III. Tras la electroforesis, se tiñó el gel con bromuro de etidio (en el presente documento, abreviado EtBr) para visualizar los ácidos nucleicos. Se representa el resultado en la figura 6. Cada uno de los carriles corresponde a las siguientes muestras.

Carril 1: ϕ X174 Hae III

- 35 Carril 2: ADN (+), PSA
Carril 3: ADN (-), PSA
Carril 4: ADN (+), VHB
Carril 5: ADN (-), VHB
Carril 6: ADN (+), VHC
- 40 Carril 7: ADN (-), VHC

Como resultado de los experimentos, incluso en los casos de uso de cualquiera de los ADN tales como de VHB,

VHC y PSA como molde, se observó una escalera que es característica para el producto de amplificación mediante los cebadores internos de la presente invención. Se confirmó que es posible la síntesis del ácido nucleico en condiciones de temperatura constante usando el ácido nucleico bicatenario como molde y cebadores internos en combinación con cebadores externos.

5 [Ejemplo 2] Amplificación en presencia de betaína

Se llevó a cabo el método de síntesis de ácido nucleico de la presente invención usando un ADN (1×10^{-17} mol) en el que se incorporó la secuencia parcial del gen de VHC en un plásmido, como molde. Se usaron cuatro clases de los cebadores (interno F, interno R, externo F y externo R) en el experimento. En este momento, también se preparó una disolución de reacción que no contenía betaína.

10 Como molde, se prepararon aquéllos que no se desnaturalizan térmicamente. Se hicieron reaccionar las disoluciones de reacción a 65°C durante una hora y dos horas.

Confirmación de reacción: se añadieron 5 µl de tampón de carga a 5 µl de la disolución de reacción anterior, y entonces se cargó sobre un gel de agarosa al 2% (TBE al 0,5%). Se llevó a cabo electroforesis durante 0,5 horas a 100 V. Como marcador de tamaño molecular, se usó φX174 Hae III. Tras la electroforesis, se tiñó el gel con EtBr para visualizar los ácidos nucleicos. Se representa el resultado en la figura 7. Cada uno de los carriles corresponde a las siguientes muestras.

- 15 Carril 1: φX174 Hae III
 Carril 2: ADN (-), betaína (-), 1 h
 Carril 3: ADN (+), betaína (-), 1 h
 20 Carril 4: ADN (-), betaína (+), 1 h
 Carril 5: ADN (+), betaína (+), 1 h
 Carril 6: φX174 Hae III
 Carril 7: ADN (-), betaína (-), 2 h
 Carril 8: ADN (+), betaína (-), 2 h

25 Como resultado de los experimentos, cuando el tiempo de reacción fue de una hora, sólo se observó amplificación en presencia de betaína. Por otra parte, cuando se amplió el tiempo de reacción a 2 horas, se observó amplificación incluso en ausencia de betaína. Concretamente, pudo confirmarse que también se observa amplificación en un sistema de reacción habitual.

[Ejemplo 3] Amplificación en presencia de prolina o DMSO

30 Se llevó a cabo el método de síntesis de ácido nucleico de la presente invención usando un ADN (1×10^{-17} mol) en el que se incorporó la secuencia parcial del gen de VHC en un plásmido, como molde. Se usaron cuatro clases de los cebadores (interno F, interno R, externo F y externo R) en los experimentos.

Se añadió prolina o DMSO a la disolución de reacción en lugar de betaína de modo que la concentración final de prolina o DMSO era del 1% o el 5%. La otra composición de disolución de reacción era igual que la descrita anteriormente.

35 Como molde, se prepararon aquéllos que no se desnaturalizan térmicamente. Se hizo reaccionar la disolución de reacción a 65°C durante dos horas.

Confirmación de reacción: se añadieron 5 µl de tampón de carga a 5 µl de la disolución de reacción anterior, y entonces se cargó sobre un gel de agarosa al 2% (TBE al 0,5%). Se llevó a cabo electroforesis durante 0,5 horas a 100 V. Como marcador de tamaño molecular, se usó φX174 Hae III. Tras la electroforesis, se tiñó el gel con EtBr para visualizar los ácidos nucleicos. Se representa el resultado en la figura 8. Cada uno de los carriles corresponde a las siguientes muestras.

- 40 Carril 1: φX174 Hae III
 Carril 2: prolina (+)
 45 Carril 3: DMSO (+)
 Carril 4: betaína (-)

Como resultado de la reacción de amplificación usando prolina o DMSO que tiene un efecto similar (la acción para

disminuir la temperatura de fusión) que betaína, pudo confirmarse que la reacción de amplificación avanzaba aunque se usara prolina o DMSO.

[Ejemplo 4] Influencia de cebadores externos

5 Se llevó a cabo el método de síntesis de ácido nucleico según la presente invención usando ADN de lambda (SEQ ID NO: 16, 1×10^5 moléculas) que es una hebra lineal y sirve como secuencia de nucleótidos diana. Se usaron cuatro clases de cebadores (interno F, interno R, externo F y externo R) para el experimento. Se llevaron a cabo al mismo tiempo reacciones en las que no se usaron los cebadores externo F y externo R. Se añadió bromuro de etidio (EtBr) a todos los sistemas de reacción hasta una concentración final de 0,25 µg/ml.

10 Se preparó la diana, que no se desnaturaliza térmicamente. Se hicieron reaccionar las disoluciones de reacción a 65°C durante 1,5 horas, y se observó el cambio en la intensidad de fluorescencia en el lapso de tiempo usando ABI 7700 (Perkin Elmer). EtBr es un agente de tinción fluorescente que es específico para el ácido nucleico bicatenario. Por consiguiente, la intensidad de fluorescencia aumenta dependiendo de la cantidad del ácido nucleico bicatenario que se genera mediante la amplificación de ácido nucleico.

15 El resultado de medición se muestra en la figura 9. Se encontró que la tasa de amplificación era lenta en el sistema de reacción sin los cebadores externos.

La secuencia de nucleótidos del cebador de ADN de lambda

Interno F (SEQ ID NO: 17):

CAGCCAGCCGCAGCACGTTTCGCTCATAGGAGATATGGTAGAGCCGC

Interno R (SEQ ID NO: 18):

20 **GAGAGAATTTGTACCACCTCCCACCGGGCACATAGCAGTCCTAGGGACAGT**

Externo F (SEQ ID NO: 19):

GGCTTGGCTCTGCTAACACGTT

Externo R (SEQ ID NO: 20):

GGACGTTTGTAATGTCCGCTCC

25 **Aplicabilidad industrial**

La presente invención proporciona un método de síntesis de ácido nucleico que elimina la necesidad del cambio de temperatura sin deteriorar la especificidad y eficiencia de la reacción. Aunque la presente invención usa ácido nucleico bicatenario como molde, el cambio de temperatura para la desnaturalización es innecesario. Por consiguiente, la síntesis del ácido nucleico puede llevarse a cabo sin usar equipo que tenga un mecanismo de control de temperatura específico. Además, según la presente invención que no requiere ciclos térmicos, puede impedirse de manera esperada una reacción no específica provocada por el cambio de temperatura.

30 El método de síntesis de ácido nucleico según la presente invención puede aplicarse a cualquier método de síntesis de ácido nucleico basado en un principio que usa un cebador como origen de síntesis. En particular, puede obtenerse una mayor eficiencia de síntesis cuando se combina con la reacción de síntesis de ácido nucleico basada en un principio que no requiere originariamente un cambio de temperatura. El método de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, tal como se muestra en los ejemplos, que proporciona un producto amplificado con una configuración en la que la región 3'-terminal puede hibridarse con una parte de sí misma, puede lograr operabilidad y especificidad excelentes cuando se combina con la presente invención. Puede lograrse un alto nivel de eficiencia de amplificación únicamente incubando el ácido nucleico bicatenario, que se convierte en molde, junto con un cebador y ADN polimerasa a temperatura constante. La presente invención permite un método de amplificación de ácido nucleico que no requiere un cambio de temperatura a la vez que mantiene la alta especificidad y alta eficiencia de amplificación.

45 Puesto que el método de síntesis de ácido nucleico basado en la presente invención no requiere cambios de temperatura, la monitorización de la reacción puede llevarse a cabo fácilmente. Concretamente, puede usarse un mecanismo de incubación que proporcione temperatura constante y equipo con un mecanismo de lectura óptica para monitorizar la reacción. Tal mecanismo es un mecanismo general previsto en equipo de análisis óptico convencional. Por consiguiente, el método de amplificación de ácido nucleico basado en la presente invención permite la monitorización mediante equipo de análisis convencional.

5 Tal como se describió anteriormente, el método de síntesis de ácido nucleico según la presente invención no requiere un control de temperatura complicado, que es un problema asociado con los métodos conocidos, tales como los métodos de PCR, y simplifica notablemente el funcionamiento experimental. Además, la presente invención permite un método de amplificación de ácido nucleico que no requiere equipo específico para el control de temperatura y por tanto puede usarse generalmente. Además, en la presente invención, puede impedirse la reacción no específica provocada por el cambio de temperatura.

Lista de secuencias

<110> Eiken Chemical Co., Ltd.

10 <120> MÉTODO PARA AMPLIFICAR ÁCIDO NUCLEICO USANDO ÁCIDO NUCLEICO BICATENARIO COMO MOLDE

<130> E2-A0001P

<140>

<141>

<150> Documento JP 2000-111939

15 <151> 07-04-2000

<160> 20

<170> PatentIn ver. 2.0

<210> 1

<211> 198

20 <212> ADN

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 1

```

caaaatcgc agtccccaac ctccaatcac tcaccaacct ctgtcctcc aattgtcct 60
ggctatcgc ggatgtgtct gggcgtttt atcatattcc tcttcactct gctgctatgc 120
ctcatcttct tgttggttct tctggactac caaggtatgt tgcccgtttg tctctactt 180
ccaggaacat caaccacc                                     198
    
```

25 <210> 2

<211> 279

<212> ADN

<213> Virus de la hepatitis C

<400> 2

gcagaaagcg tctagccatg gcgtagtat gagggtcgta cagcctccag gccccccct 60
cccgggagag ccatagtggg ctgcggaacc ggtgagtaca ccggaattac cggaaagact 120
gggtcctttc ttggataaac ccaactctatg tccggtcatt tgggcgtgcc cccgcaagac 180
tgctagccga gtagcgttgg gttgcgaaag gccttgtggg actgcctgat aggggtgcttg 240
cgagtgcccc gggaggtctc gtagaccgtg catcatgag 279

<210> 3

<211> 178

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

tgcttgtggc ctctcgtggc agggcagtct gggcggtgt tctgggtgac cccagtggg 60
tctcacagc tgcccactgc atcaggaaca aaagcgtgat cttgctgggt cggcacagcc 120
tgtttcatcc tgaagacaca ggccaggtat ttcaggtcag ccacagcttc acacaccc 178

<210> 4

<211> 44

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de cebador sintetizado artificialmente

<400> 4

15 **gataaaacgc cgcagacaca tccttccaac ctcttgtcct cca** 44

<210> 5

<211> 46

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de cebador sintetizado artificialmente

<400> 5

cctgctgcta tgccctatct tctttgacaa acgggcaaca tacctt 46

<210> 6

	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de cebador sintetizado artificialmente		
	<400> 6		
	caaaattcgc agtccccaac		20
	<210> 7		
	<211> 19		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de cebador sintetizado artificialmente		
	<400> 7		
15	ggtggttgat gttcctgga		19
	<210> 8		
	<211> 46		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de cebador sintetizado artificialmente		
	<400> 8		
	gagtgggttt atccaagaaa ggactttagc catagtggc tgcgga		46
	<210> 9		
25	<211> 46		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de cebador sintetizado artificialmente		
30	<400> 9		
	ctagccgagt agcgttgggt tgctttgcac tcgcaagcac cctatc		46
	<210> 10		
	<211> 21		

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
5	<400> 10	
	gcagaaagcg tctagccatg g	21
	<210> 11	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
	<400> 11	
	ctagccgagt agcgttgggt tgc	23
15	<210> 12	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
	<400> 12	
	tgttcctgat gcagtgggca gctttagtct gcggcggtgt tctg	44
	<210> 13	
	<211> 45	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
	<400> 13	
30	tgctgggtcg gcacagcctg aagctgacct gaaatacctg gcctg	45
	<210> 14	
	<211> 18	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
	<400> 14	
5	tgcttgtggc ctctcgtg	18
	<210> 15	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
	<400> 15	
	gggtgtgtga agctgtg	17
	<210> 16	
15	<211> 245	
	<212> ADN	
	<213> Bacteriófago lambda	
	<400> 16	
	ggcttggctc tgctaacacg ttgctcatag gagatatggt agagccgcag acacgtcgta 60	
	tgcaggaacg tgctgaggct ggctggtgaa ctccgatag tgcgggtggt gaatgatttc 120	
	cagttgctac cgattttaca tattttttgc atgagagaat ttgtaccacc tcccaccgac 180	
	catctatgac tgtaagccac tgtccctagg actgctatgt gccggagcgg acattacaaa 240	
	cgccc	245
20	<210> 17	
	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de cebador sintetizado artificialmente	
	<400> 17	
	cagccagccg cagcacgttc gctcatagga gatatggtag agccgc	46

	<210> 18		
	<211> 51		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de cebador sintetizado artificialmente		
	<400> 18		
	gagagaattt gtaccacctc ccaccgggca catagcagtc ctagggacag t		51
	<210> 19		
10	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de cebador sintetizado artificialmente		
15	<400> 19		
	ggcttggctc tgctaacacg tt		22
	<210> 20		
	<211> 22		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de cebador sintetizado artificialmente		
	<400> 20		
	ggacgtttgt aatgtccgct cc		22
25			

REIVINDICACIONES

1. Método para amplificar y detectar una secuencia de nucleótidos diana en una muestra, comprendiendo el método llevar a cabo un método de amplificación y observar si se ha generado o no el producto de la reacción de amplificación,
- 5 en el que el método de amplificación es un método para la amplificación de ácido nucleico a temperatura constante usando ácido nucleico bicatenario como molde, en el que una hebra del ácido nucleico bicatenario comprende regiones F3c, F2c, F1c, R1, R2 y R3 del lado 3' del ácido nucleico bicatenario y en el que la otra hebra del ácido nucleico bicatenario comprende las regiones complementarias F3, F2, F1, R1c, R2c y R3c del lado 5' del ácido nucleico bicatenario, en el que el método comprende:
- 10 a) incubar un molde de ácido nucleico bicatenario y un cebador interno RA constituido por regiones R1c y R2, mediante lo cual la región R2 se hibrida con la región R2c en el molde de ácido nucleico bicatenario en presencia de una ADN polimerasa que cataliza una reacción de síntesis de hebra complementaria que acompaña a un desplazamiento de hebra, en condiciones en las que el ácido nucleico bicatenario es inestable usando el cebador interno RA como origen, de tal manera que una región F2c del ácido nucleico molde diana que va a hibridarse por un cebador interno FA constituido por regiones F1c y F2, mediante lo
- 15 cual la región F2 se hibrida con la región F2c en el molde de ácido nucleico bicatenario que puede amplificar el ácido nucleico molde a temperatura constante cuando la hebra individual liberada se hibrida de manera intramolecular con sí mismo
- 20 b) hibridar un cebador externo F3 con la región F3c de la hebra individual desplazada en la etapa a), que se coloca en condiciones tales que puede experimentar apareamiento de bases;
- c) llevar a cabo la síntesis de hebra complementaria usando el cebador externo F3 como origen de síntesis, mediante lo cual el producto extendido sintetizado usando el cebador interno FA como origen se desplaza y se libera como una hebra individual; y
- 25 d) usar la hebra individual como molde, el cebador interno RA y el cebador externo R3, mediante lo cual la región R2 se hibrida con la región R2c, y R3 se hibrida con la región R3c en la hebra individual desplazada en la etapa c) e iniciar la síntesis de hebra complementaria.
2. Método para detectar una mutación mediante el método de detección según la reivindicación 1, en el que una mutación en una secuencia de nucleótidos que va a amplificarse impide la síntesis de hebra complementaria, al menos en un extremo 3' que es el origen de la síntesis de hebra complementaria que
- 30 constituye el método de amplificación.

Figura 1

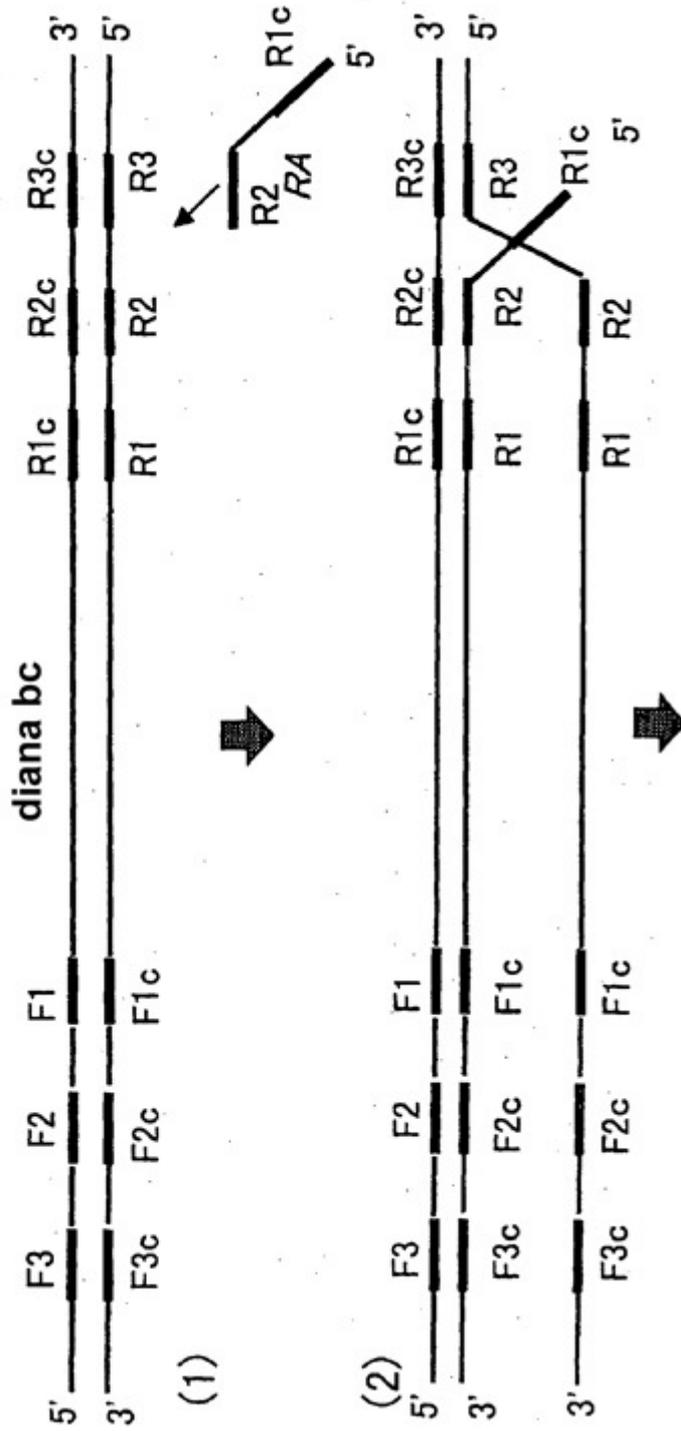


Figura 2

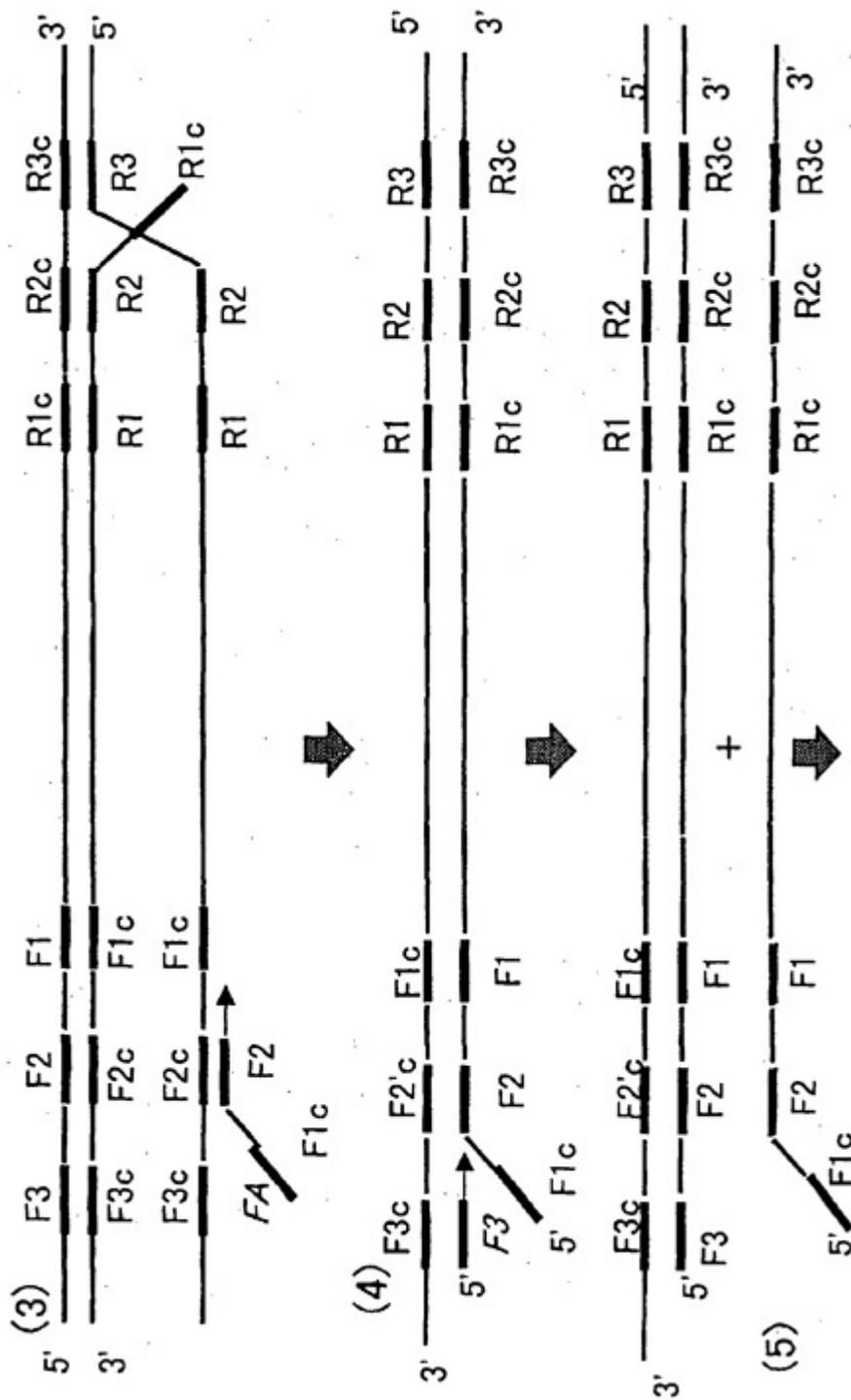


Figura 3

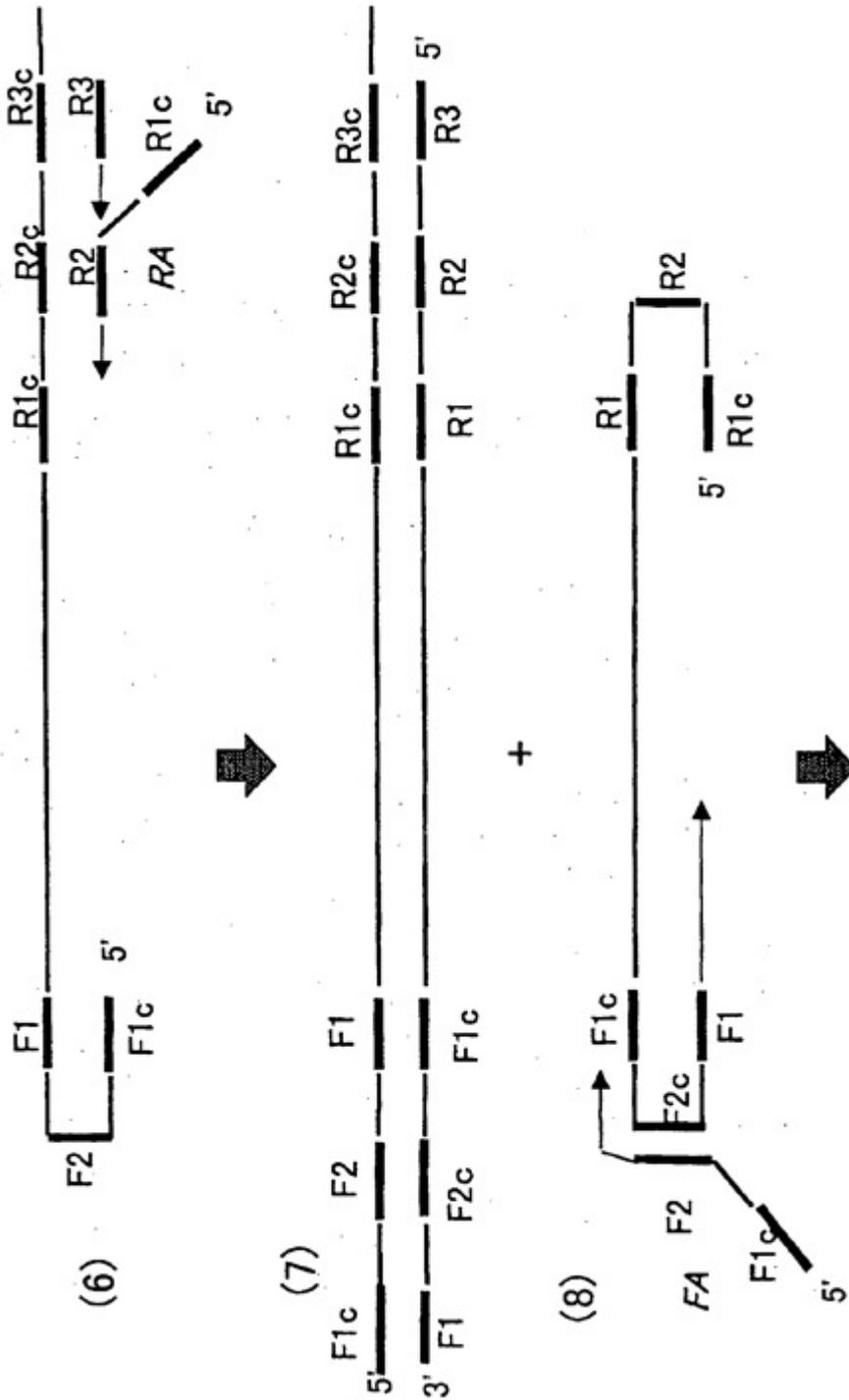


Figura 4

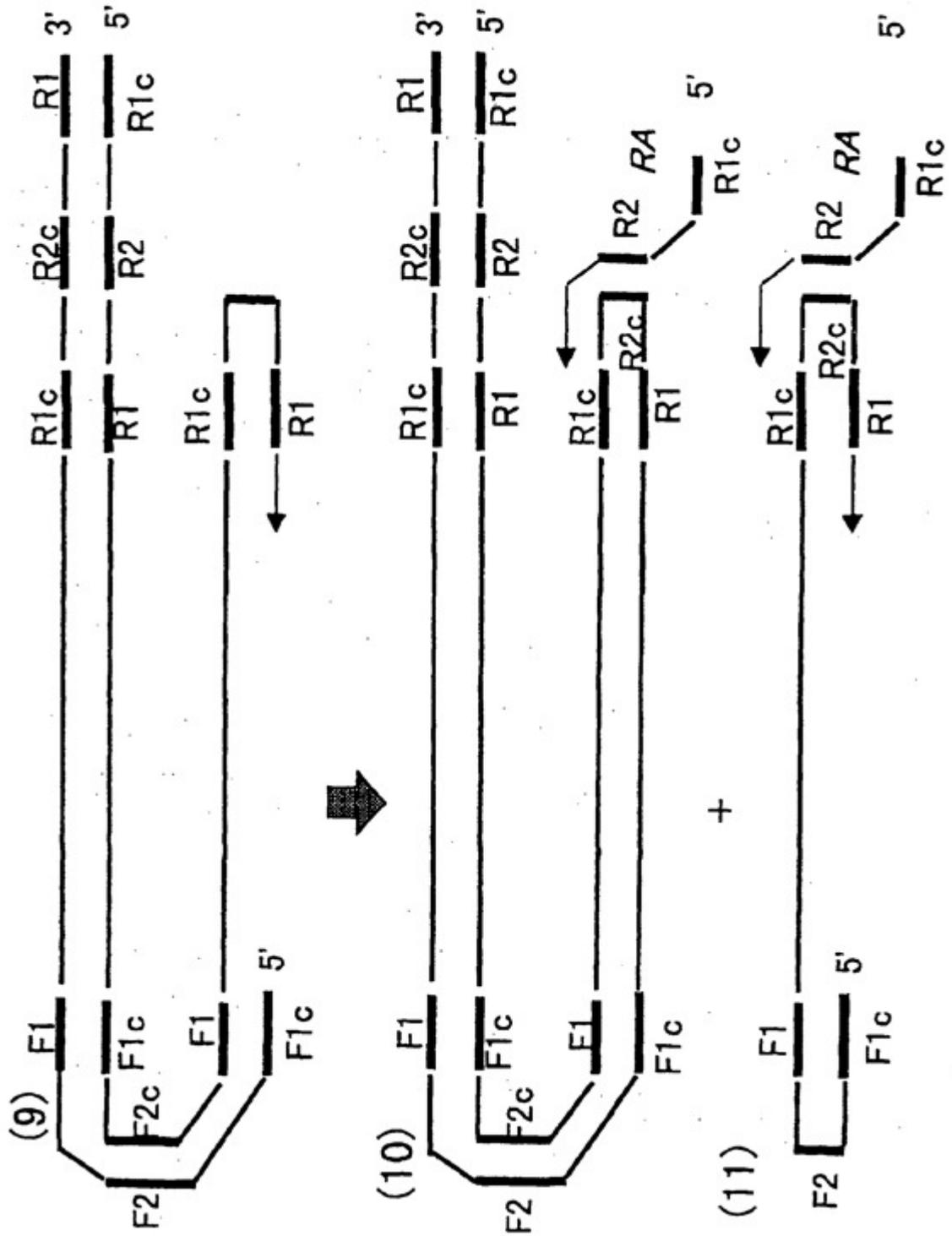


Figura 5

1 2 3 4 5 6 7

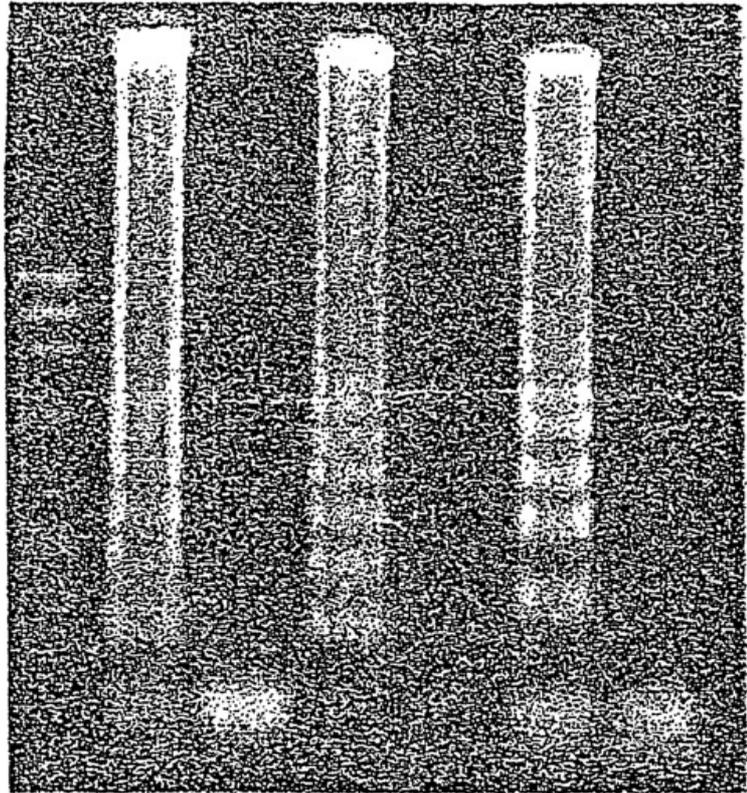


Figura 6

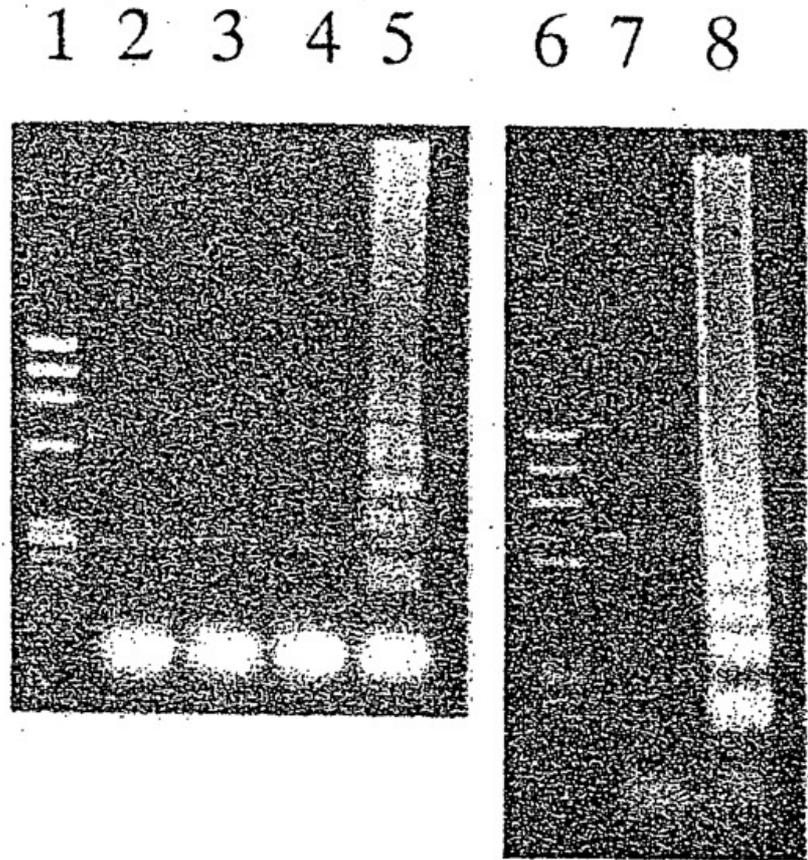


Figura 7

1 2 3 4



Figura 8

