

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 514**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.01.2009 PCT/FI2009/050038**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2009 WO09090312**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2009 E 09702857 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2240608**

54 Título: **Método para producir ADN de cadena sencilla**

30 Prioridad:

17.01.2008 FI 20085040
12.02.2008 US 28038 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.10.2017

73 Titular/es:

MOBIDIAG OY (100.0%)
Keilaranta 16 A
02150 Espoo, FI

72 Inventor/es:

MÄKI, MINNA-MARI;
PIIPARINEN, PASI;
AITAKORPI, ANNE;
LINDFORS, MERJA y
KIRVESKARI, JUHA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 635 514 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 producir ADN de cadena sencilla

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un método para producir moléculas de ADN de cadena sencilla, y a un kit para uso en dicho método.

Antecedentes de la invención

10 Una reacción en cadena de polimerasa (PCR, del inglés "polymerase chain reaction") es un método bien establecido para amplificar secuencias de ácido nucleico. Los protocolos de PCR usados más habitualmente producen un ácido desoxirribonucleico de cadena doble (dsADN), en el que las secuencias de dos cadenas son complementarias entre ellas. Sin embargo, en muchas aplicaciones de biología molecular y biotecnología se requiere la producción de solo una cadena, es decir la preparación de un ADN de cadena sencilla (ssADN), que incluye aquellas que emplean ssADN como sonda de hibridación.

15 Se han descrito varias estrategias para producir ssADN. Una forma es separar las cadenas del dsADN amplificado mediante una desnaturalización prolongada, por ejemplo mediante calor o álcali. Las cadenas separadas pueden entonces mantenerse separadas enfriando rápidamente. Alternativamente, se puede eliminar selectivamente una cadena tras una reacción de amplificación usando, por ejemplo, digestión de exonucleasa en donde la cadena deseada es protegida de la actividad enzimática de la exonucleasa (publicación de patente de EE.UU. 5.518.900). La cadena deseada también puede ser capturada selectivamente en base a una modificación de la cadena, tal como un cebador biotinilado usado en una PCR, en condiciones de desnaturalización (p.ej., publicación de patente Europea EP0456304 y publicación de patente de EE.UU. 5.817.797).

20 El ssADN también puede ser creado mediante una PCR asimétrica, en la que se usan dos cebadores a diferentes concentraciones. Dicho método se describe en la publicación de patente de EE.UU. 5.066.584, en la que se produce un exceso de ssADN de modo lineal, una vez agotado el cebador que limita la velocidad del proceso, en la amplificación exponencial del dsADN. La asimetría alcanzada, y por tanto la cantidad de ssADN producido, es difícil de predecir, especialmente cuando se usa una mezcla de cebadores degenerados competitivos. Otra forma de producir moléculas de ácido nucleico de cadena sencilla es transcribir dsADN en ARN, que a continuación puede ser amplificado a través de etapas múltiples en un cARN de cadena sencilla mediante un método isoterma de Amplificación Basada en Secuencia de Ácido Nucleico (NASBA) (publicación de patente de EE.UU. 5.409.818).

25 La publicación de patente de EE.UU. 6.887.664 describe un método de ciclado térmico asíncrono para producir un exceso de ssADN. El método comprende la hibridación de dos cebadores a dos temperaturas diferentes a la primera y segunda cadenas de un ácido nucleico, cada hibridación seguida de una extensión. Una segunda temperatura de hibridación es inferior a una primera temperatura de hibridación. El ciclo de etapas puede repetirse durante de 2 a 50 ciclos o más para producir dsADN. Las etapas de hibridación y extensión de un segundo cebador se pueden omitir en el último o en más ciclos para producir un exceso de ssADN. Cuando se usa para la producción de ssADN, sin embargo, el método requiere de mucho tiempo. Esto es debido a las dos temperaturas de hibridación diferentes para la producción de dsADN antes de que la producción de ssADN se pueda iniciar en los últimos ciclos.

30 Mazars et al., NAR, 1991, 19: 4783 describe un método de amplificar ADN genómico en el que cebadores con diferentes temperaturas de fusión (T_m) son empleados en la misma concentración. El ciclado se lleva a cabo en dos rondas en un único recipiente. Los cebadores son específicos de los exones 7 y 8 de p53 y del exón 1 de KRAS. La primera ronda de PCR conduce a la producción de ADN de cadena doble, y el ADN de cadena sencilla se produce en la segunda ronda de PCR.

35 Zhu et al. (Antimicrob. Agents Chemother., 2007, 51: 3707-3713) describe un método de PCR asimétrica múltiple de dos rondas para producir ssADN. En el método, se usan cebadores específicos de secuencia, así como cebadores marcados con una secuencia no relacionada universal en sus extremos 5' (cebadores UT). Los cebadores UT están diseñados de tal modo que se obtiene una diferencia de T_m de al menos 10°C en comparación con los cebadores específicos de secuencia. La reacción de primera ronda produce ADN de cadena doble, mientras que la reacción de segunda ronda produce ssADN ya que se emplea una temperatura de hibridación mayor que permite que solo se hibriden los cebadores UT a la diana. En este método, el diseño de cebador es más difícil y restringido debido a que la secuencia universal afecta y crea, por ejemplo, estructuras secundarias. La etiqueta de secuencia no relacionada universal hace que los cebadores sean relativamente largos y, por tanto, prolonga el tiempo requerido para la amplificación de ADN y aumenta los costes de síntesis.

40 En general, muchos de estos métodos comparten la desventaja de la necesidad de intervención manual y de múltiples etapas de procesado. Por tanto, existe una necesidad en la técnica de un método fiable para producir ssADN.

55

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona un método para producir un ADN de cadena sencilla mediante amplificación asimétrica de un ADN deseado usando al menos un par de cebadores específicos de un primer cebador no marcado y un segundo cebador no marcado, en donde dicho primer cebador tiene una temperatura de fusión T_{mA} y dicho segundo cebador tiene una temperatura de fusión T_{mB} , y en donde las áreas de temperatura de hibridación de dicho primer cebador y dicho segundo cebador están parcialmente solapadas. En el método, dicha amplificación de ADN comprende las etapas de a) llevar a cabo una primera etapa de PCR, que comprende etapas repetidas de desnaturalización, hibridación y extensión, y b) llevar a cabo una segunda etapa de PCR que consiste en etapas repetidas de desnaturalización, hibridación y extensión, en donde la hibridación y la extensión se combinan y se llevan a cabo a la misma temperatura. Ambos cebadores, primero y segundo, se hibridan y extienden a una diana a la temperatura de hibridación de la primera etapa de PCR, mientras que solo dicho segundo cebador se hibrida y extiende a la diana a la temperatura de hibridación de la segunda etapa de PCR.

En una realización, T_{mA} es aproximadamente 8°C a aproximadamente 20°C menor que T_{mB} . En otras realizaciones, T_{mA} es aproximadamente 8°C a aproximadamente 16°C, aproximadamente 8°C a aproximadamente 12°C, o aproximadamente 8°C a aproximadamente 10°C menor que T_{mB} . En una realización adicional, la hibridación de la primera etapa de PCR se lleva a cabo a una temperatura $T_{mA} \pm 8^\circ\text{C}$. En otra realización adicional, la hibridación de la segunda etapa de PCR se lleva a cabo a una temperatura $T_{mB} \pm 14^\circ\text{C}$.

Tanto el primer como el segundo cebador pueden consistir en una mezcla de cebadores degenerados, tales como cebadores que se hibridan con regiones conservadas de genes que codifican topoisomerasas *gyrB/parE*. En una realización, dicho primer cebador comprende al menos una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 y/o dicho segundo cebador comprende al menos una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2. Algunas realizaciones de la presente invención comprenden el uso de cebadores marcados en el método.

El método según la presente invención puede consistir en las etapas descritas anteriormente o puede comprender etapas adicionales. El método también puede usarse para amplificación múltiple de ADN, en donde se usa más de un primer cebador y más de un segundo cebador para amplificar múltiples ADNs diana simultáneamente. En otras realizaciones, solo se usa un primer cebador y un segundo cebador.

La presente invención proporciona además un kit, tal como se define en las reivindicaciones, para uso en el presente método. El kit comprende al menos un par de cebadores específicos de un primer cebador no marcado que tiene una temperatura de fusión T_{mA} y un segundo cebador no marcado que tiene una temperatura de fusión T_{mB} , y en donde las áreas de temperatura de hibridación de dicho primer cebador y dicho segundo cebador solapan parcialmente, y en donde ambos cebadores, primero y segundo, se hibridan a y extienden una diana a una temperatura de hibridación de una primera etapa de PCR, mientras que solo el segundo cebador se hibrida a y extiende la diana a una temperatura de hibridación de una segunda etapa de PCR. En algunas realizaciones, el kit comprende solo un primer cebador y un segundo cebador.

Dichos primer y segundo cebadores pueden ser cada uno una mezcla de cebadores degenerados, tal como cebadores que se hibridan con regiones conservadas de genes que codifican topoisomerasas *gyrB/parE*. En una realización, dicho primer cebador comprende al menos una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 y dicho segundo cebador comprende al menos una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, los cebadores proporcionados en el kit son cebadores marcados.

Adicionalmente, una realización comprende dichos cebadores que están contenidos en un compartimento separado de un biochip. En otra realización, dicho biochip comprende además un compartimento separado para sondas de oligonucleótidos unidas.

Descripción breve de las figuras

A continuación la invención será descrita en mayor detalle a través de las realizaciones preferidas en referencia a las figuras anexas, en las que:

Figura 1: ilustra las áreas de temperatura de hibridación en las que pueden actuar el primer cebador y el segundo cebador como punto de partida para una extensión en una PCR. T_{mA} representa la temperatura de fusión del primer cebador y T_{mB} representa la temperatura de fusión del segundo cebador. El eje X representa una temperatura de hibridación (°C). La reacción se convierte entonces para favorecer la producción de ssADN a una temperatura de hibridación a la que el primer cebador no se hibrida a la cadena diana pero el segundo cebador se hibrida de manera eficaz.

Figura 2: ilustra una comparación entre una PCR asimétrica (Figuras 2B y 2D) y un método de ssADN de la presente invención (Figuras 2A y 2C). Cada calle de la respectiva figura representa una muestra, con un marcador de peso molecular en la primera calle de la izquierda.

Figura 3: ilustra la hibridación de un ssADN marcado, producido mediante el método según la presente invención, en un microsistema. Una muestra de paciente hibridada incluyó *Pseudomonas aeruginosa* como agente causante. El

microsistema incluyó dos sondas específicas de *Pseudomonas aeruginosa* (manchas con círculos) que se unieron específicamente a las cadenas diana. También fueron detectables dos oligonucleótidos de control positivo (manchas marcadas con triángulos).

5 Figura 4: ilustra la detección simultánea de *S. aureus* (mancha marcada con un triángulo) y gen *mecA* (manchas con círculos) en un microsistema. Las manchas de *mecA* del microsistema comprendían dos oligos de *mecA* específicos por mancha. También se detectaron cuatro oligonucleótidos de control (manchas recuadradas).

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención se refiere a un método nuevo para producir ADN de cadena sencilla en una reacción de amplificación de PCR simétrica. El método comprende dos etapas de PCR distintas: una primera etapa de PCR produce dsADN y una segunda etapa de PCR produce ssADN. El método no requiere implicación manual, minimizando de este modo el riesgo de contaminación y el tiempo de procesamiento. También permite determinar la cantidad de ssADN producido. Además, el procedimiento completo puede llevarse a cabo de forma conveniente en una única reacción de amplificación de PCR.

15 En este contexto, el término "PCR simétrica" se refiere a una amplificación de PCR en la que se emplean concentraciones iguales de los miembros de un par de cebadores. El término "PCR asimétrica" se refiere a una amplificación de PCR en la que los miembros de un par de cebadores se usan en concentraciones diferentes.

20 La presente invención se basa en cebadores no marcados que se diseñan de tal modo que el área de temperatura de hibridación, en la que cual un primer cebador y un complejo ADN plantilla son suficientemente estables para permitir que una polimerasa extienda el cebador eficientemente, de un primer cebador solapa, siendo inferior, a la correspondiente temperatura de hibridación de un segundo cebador, tal como se ilustra en la Figura 1. En otras palabras, las áreas de las temperaturas de hibridación de dicho primer cebador y dicho segundo cebador solapan parcialmente. La primera etapa de la reacción se lleva a cabo a una temperatura de hibridación óptima para el primer cebador. En la segunda etapa, la temperatura de hibridación aumenta hasta cerca de una temperatura de extensión a la cual la polimerasa replica el ADN a una velocidad óptima. La hibridación y la extensión se llevan a cabo a continuación a la misma temperatura de modo combinado como una PCR de dos etapas. La temperatura de hibridación de la segunda etapa no permite que el primer cebador se hibride. Los cebadores se pueden diseñar de tal modo que las cualquiera de las cadenas de ADN pueda actuar como plantilla para la producción de ssADN.

25 En este contexto, el término "no marcado" se refiere a cebadores que no comprenden ninguna secuencia de nucleótidos adicional en sus extremos 5' o 3'. Sin embargo, dichos cebadores no marcados pueden comprender otras biomoléculas reactivas, tal como etiquetas o marcas, en su extremo 5' o 3' o hibridadas en su secuencia específica de diana.

30 En este contexto, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido, preferiblemente de cadena sencilla, que tiene la capacidad de iniciar una síntesis de ADN en las condiciones apropiadas, que normalmente incluye nucleótidos y una polimerasa de ADN. La longitud adecuada para los cebadores es variable, normalmente oscilando entre 10 y 100 nucleótidos. En el contexto de la presente invención, pueden actuar como cebadores análogos de oligonucleótidos, tales como ácidos nucleicos peptídicos (PNA), u oligonucleótidos que comprenden bases modificadas, y por tanto se incluyen en la definición de cebador. Un cebador no necesita tener una secuencia exactamente igual a la del ácido nucleico plantilla, pero debe ser suficientemente complementario para hibridarse con la plantilla. Adicionalmente, el término "cebador" incluye mezclas de cebadores, tales como las mezclas de cebadores degenerados.

35 Una temperatura de fusión (T_m) de un cebador es la temperatura (en unas condiciones de fuerza iónica y pH definidas) a la cual están presentes el 50% de los enlaces de hidrógeno entre pares de bases de una cadena de ácido nucleico. Habitualmente, se lleva a cabo una etapa de hibridación en la PCR aproximadamente 5°C por debajo de la T_m . Una temperatura de hibridación demasiado baja solo produce una pequeña cantidad del producto deseado. La T_m (°C) puede calcularse, por ejemplo, mediante la ecuación: $81,5 + 16,6 \log [Na^+] + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\%for) - 500/N$, en la que $[Na^+]$ es la concentración de cationes monovalentes, %GC es el porcentaje de guanina y citosina, %for es el porcentaje de formamida, y N es la longitud del oligonucleótido.

40 Un par de cebadores no marcados para uso en la presente invención está diseñado para presentar una diferencia de aproximadamente 8°C a aproximadamente 20°C, preferiblemente de aproximadamente 8°C a aproximadamente 16°C, y más preferiblemente de aproximadamente 8°C a aproximadamente 12°C, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 8°C a aproximadamente 10°C entre las temperaturas de fusión (T_m) del primer cebador y del segundo cebador. La T_m del primer cebador (T_{mA}) es inferior a la T_m del segundo cebador (T_{mB}). Se pueden diseñar múltiples pares de cebadores no marcados para ser usados simultáneamente en el método de la presente invención.

45 En la primera etapa de la PCR del método según la presente invención, se produce dsADN mediante PCR simétrica según protocolos conocidos en la técnica. Esta reacción comprende la repetición de etapas de desnaturalización, hibridación y extensión. Opcionalmente, la primera etapa de la PCR puede comprender además una parte de PCR de anotación en la que la temperatura de hibridación es disminuida después de cada ciclo, por ejemplo en 1°C.

Típicamente, la primera etapa de la reacción de amplificación de PCR del método comprende aproximadamente 30 ciclos de amplificación. El número de ciclos puede variar desde aproximadamente 10 a aproximadamente 50.

Tras un número apropiado de ciclos de amplificación en la primera etapa, la reacción de amplificación se convierte para favorecer la producción de ssADN a partir de una cadena de ADN, es decir una cadena diana, de la plantilla. Esto se logra usando una PCR de dos etapas con una temperatura de hibridación suficientemente alta (de aproximadamente 63°C a aproximadamente 73°C) para permitir que solo se una a la cadena diana el segundo cebador y para permitir que se produzcan la hibridación y la extensión de forma combinada a la misma temperatura. Como la T_m del primer cebador es inferior a la T_m del segundo cebador, la alta temperatura de hibridación usada en la segunda etapa favorece la hibridación del segundo cebador y la posterior amplificación de ssADN a partir de la cadena diana. En otras palabras, el segundo cebador tiene una T_m que permite la hibridación dentro de un amplio rango de temperaturas y, de esta manera, permite primero la producción de dsADN a una temperatura de hibridación menor y después la producción de ssADN a una temperatura de hibridación mayor. Si es necesario, también es posible llevar a cabo una etapa de desnaturalización adicional tras la PCR.

En una realización del método, la temperatura de hibridación de la primera etapa puede definirse como $T_{mA} \pm 8^\circ\text{C}$ y preferiblemente como $T_{mA} \pm 6^\circ\text{C}$, y la segunda etapa como $T_{mB} \pm 14^\circ\text{C}$ y preferiblemente como $T_{mB} \pm 12^\circ\text{C}$, aunque manteniendo la diferencia de aproximadamente 8°C a aproximadamente 20°C entre las temperaturas de fusión de los cebadores y las condiciones a las que el primer cebador no se hibrida a la segunda temperatura de hibridación.

Los cebadores pueden incorporar características adicionales en un ADN amplificado que permitan que el ADN sea detectado o inmovilizado, pero que no afecte a la propiedad básica del cebador, es decir, una capacidad de amplificación de ADN. Se puede usar una serie de métodos de marcado conocidos basados en un cebador marcado, o se pueden usar nucleótidos para producir un ADN marcado para uso en la presente invención. Los ejemplos de métodos de marcado adecuados incluyen marcas fluorescentes (p.ej., Cy5, Cy3, Cy2, rojo Texas, FITC, Alexa 488, TMR, FluorX, ROX, TET o HEX), marcas radiactivas (p.ej., ^{32}P , ^{33}P o ^{33}S), marcas quimioluminiscentes (p.ej., HiLight Single-Color Kit), y detección colorimétrica (p.ej., basada en marcaje de biotina y detección de conjugado de biotina-estreptavidina-enzima).

El ADN a amplificar puede obtenerse a partir de varias fuentes y de muestras que se sospechen que contienen ácidos nucleicos. Éstas incluyen fluidos corporales, tales como sangre entera, saliva, esputos, orina, fluidos fecales, peritoneales y pleurales, muestras de tejido, cultivos celulares o microbianos, muestras medioambientales, y muestras de comida o pienso. Los métodos apropiados para extraer o aislar ADN de dichas muestras se encuentran fácilmente disponibles en la técnica.

En el método de la presente invención, los reactivos usados en la amplificación de ADN mediante PCR pueden ser cualesquier reactivos que se usen convencionalmente para la amplificación de ADN y que son bien conocidos por los especialistas en la técnica. Los reactivos adecuados y de precio competitivo que se encuentran disponibles comercial incluyen diferentes tipos de ADN polimerasas y tampones de las mismas (p.ej., AmpliTaq GOLD™, AmpliTaq® LD, DyNAzyme™, TaqPlus® Precision, o HotStart-Taq®), nucleótidos o mezclas de nucleótidos pre-preparadas (p.ej., Sigma, Applied Biosystems o Amersham Biosystems), y MgCl_2 (por el que se usa generalmente un producto del fabricante de la ADN polimerasa). Preferiblemente, la ADN polimerasa usada es HotStartTaq® (Qiagen).

El equipamiento usado para la amplificación puede ser cualquier dispositivo adecuado (p.ej., Termociclador Biometra® T1, Applied Biosystems GenAmp® PCR system 2700, o Eppendorf Mastercycler®). Prácticamente, se pueden usar todos los dispositivos y equipamiento adecuados para la amplificación de ADN, y la amplificación también puede realizarse manualmente transfiriendo tubos de reacción de una temperatura a otra. Adicionalmente, la amplificación se puede llevar a cabo directamente sobre un biochip que comprende pocillos específicos para la PCR, y un área de hibridación específica, tal como un microsistema, sobre la cual se pueden unir las sondas y los oligonucleótidos de control.

El presente método puede usarse para producir ssADN para varios propósitos, tales como ensayos basados en hibridación de diferente tipo, o secuenciamiento. Por ejemplo, además de producir dianas marcadas para microsistemas, mediante el método de la presente invención se podrían producir sondas de microsistema de mayor longitud (>75 a 100 nucleótidos), que no pueden sintetizarse de forma óptima mediante los actuales métodos de síntesis de oligonucleótidos.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un kit, tal como se define en las reivindicaciones, para uso en el método según la presente invención. El kit comprende un primer cebador no marcado y un segundo cebador no marcado, descrito en más detalle más adelante, en donde dicho primer cebador tiene una temperatura de fusión T_{mA} y dicho segundo cebador tiene una temperatura de fusión T_{mB} , y donde las áreas de temperatura de hibridación de dicho primer cebador y dicho segundo cebador solapan parcialmente. El kit puede comprender además algunos o todos los reactivos necesarios, tal como tampones, nucleótidos, controles, MgCl_2 , y una polimerasa para la reacción de amplificación. Además, el kit puede comprender uno o más cebadores adicionales, siendo por tanto adecuado para PCR múltiples.

En una realización, el kit puede comprender además un dispositivo en el que se lleva a cabo la amplificación de ADN. Dichos dispositivos incluyen incubadoras, termocicladores y biochips de diferente tipo.

Ejemplo 1. Amplificación de ADN de cadena sencilla

5 Se extrajo ADN de una muestra de un paciente clínico que se sospechaba que tenía una infección bacteriana usando un robot de extracción de ácido nucleico (Nuclisens® easyMAG™, bioMérieux, Francia). Tras la extracción de ADN, se amplificó la diana deseada mediante PCR. En primer lugar, una mezcla de reacción que contenía tampón de PCR 1xHot Start Taq® (Qiagen, Alemania), a la que se añadió MgCl₂ de tal modo que la concentración final fue de 2,0 mM, 300 µM de cada uno de dATP, dGTP, dCTP y dTTP (Finnzymes, Finlandia), 1,5 g/L de BSA (EuroClone, Italia), y se preparó 0,125 U/µL de ADN polimerasa Hot Start Taq® (Qiagen, Alemania). Mezclas de cebadores de amplio rango (Tabla 1) que procedían de regiones conservadas de genes que codifican genes de topoisomerasa *gyrB* y *parE* y que amplifican eficazmente ADN de diferentes bacterias, fueron añadidas a la mezcla de tal modo que la concentración final de ambas mezclas de cebadores gB3F y gB4R marcado con Cy5 (pedidas en Thermo Electron, EE.UU.) fueron 1 µM. Finalmente, se añadió 1,5 µL de un ADN aislado y el volumen total se llevó a 15 µL.

15 **Tabla 1. Cebadores usados en la reacción de amplificación.**

Nombre del cebador	Gen amplificado	T _m (°C). Media	Secuencia 5'→3'
gB3F	<i>gyrB</i>	57,8	CGICCIGGKATGTAYATHGG (SEQ ID NO: 1)
Cy5-gB4R	<i>gyrB</i>	69,0	RMICCWACICCRTGYAGICCICC (SEQ ID NO: 2)

En las secuencias de los cebadores, I representa una base inosina; K representa una base G ó T; Y representa una base C ó T; H representa una base A ó C ó T; R representa una base A ó G; M representa una base A ó C; y W representa una base A ó T.

20 En los cálculos de T_m, se aplicó un programa de análisis proporcionado por "Integrated DNA Technologies" usando una concentración de Na⁺ de 50 mM y una concentración de oligo de 0,25 µM. Se diseñaron los cebadores de tal modo que un cebador Cy5-gB4R tenía una T_m mayor y por tanto produjo ssADN en la reacción. La diferencia entre la T_m media de los cebadores fue de 11,2°C.

25 La PCR se llevó a cabo usando un termociclador (Eppendorf, Alemania). La primera etapa de la PCR se inició con una etapa de desnaturalización de 15 minutos a 95°C. Ésta vino seguida de 36 ciclos de 10 segundos a 96°C, 20 segundos a 52°C y 5 segundos a 72°C para producir dsADN. A continuación, se llevó a cabo la segunda etapa de la PCR usando 10 ciclos de 10 segundos a 95°C y 30 segundos a 67°C. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis de gel de agarosa usando SYBR® Green II (Invitrogen, EE.UU.) para demostrar la amplificación de ssADN bacteriano.

30 Ejemplo 2. Comparación entre el método de la presente invención y la PCR asimétrica

Un objetivo de este experimento fue comparar el método de la presente invención con una PCR asimétrica.

35 Se aisló un ADN bacteriano a partir de diferentes elementos aislados de cultivo bacteriano, que contenían *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *Listeria monocytogenes* como agentes causantes, usando los métodos descritos en el Ejemplo 1. Se aplicó la siguiente mezcla de reacción a una PCR asimétrica (principio descrito en la publicación de patente de EE.UU. 5.066.584): 0,15 µM o 0,495 µM de mezcla de cebadores gB3F (Thermo Electron, EE.UU.), 0,6 µM o 1,98 µM de mezcla de cebadores gB4R marcados con Cy5 (Thermo Electron, EE.UU.), tampón de PCR 1xHot Start Taq® (Qiagen, Alemania), al que se añadió MgCl₂ de tal modo que la concentración final fue de 2,0 mM, 300 µM de cada uno de dATP, dGTP, dCTP y dTTP (Finnzymes, Finlandia), 1,5 g/L de BSA (EuroClone, Italia), 0,125 U/µL de ADN polimerasa Hot Start Taq® (Qiagen, Alemania), y 1,5 µL de ADN aislado en un volumen total de 15 µL. Se usó el siguiente programa de PCR: una etapa de desnaturalización de 15 minutos a 95°C, 36 ciclos de 20 segundos a 95°C, 35 segundos a 52°C, y 20 segundos a 72°C.

45 Al método de la presente invención, se aplicó la siguiente mezcla: 0,6 µM o 1,98 µM de mezcla de cebadores gB3F (Thermo Electron, EE.UU.), 0,6 µM o 1,98 µM de mezcla de cebadores gB4R marcados con Cy5 (Thermo Electron, EE.UU.), tampón de PCR 1xHot Start Taq® (Qiagen, Alemania), al que se añadió MgCl₂ de tal modo que la concentración final fue de 2,0 mM, 300 µM de cada uno de dATP, dGTP, dCTP y dTTP (Finnzymes, Finlandia), 1,5 g/L de BSA (EuroClone, Italia), 0,125 U/µL de ADN polimerasa Hot Start Taq® (Qiagen, Alemania), y 1,5 µL de ADN aislado en un volumen total de 15 µL. La PCR se llevó a cabo usando el termociclador (Eppendorf, Alemania). Se inició un programa de PCR con una etapa de desnaturalización de 15 minutos a 95°C. A ésta le siguieron 36 ciclos de 20 segundos a 95°C, 35 segundos a 52°C, y 20 segundos a 72°C para producir dsADN (primera etapa de la PCR). A continuación, 10 ciclos de 10 segundos a 95°C y 30 segundos a 67°C, y finalmente 5 ciclos de 10 segundos a 95°C y 30 segundos a 69°C produjeron ssADN (segunda etapa de la PCR).

Tras la PCR, el éxito de la amplificación de ssADN fue verificado mediante electroforesis de gel usando un gel de agarosa que contenía SYBR® Green II (Invitrogen, EE.UU.). La Figura 2 demuestra que tanto en concentraciones bajas (Figuras 2A y 2B) como altas (Figuras 2C y 2D) de cebador, la producción de ssADN y la de dsADN es más efectiva mediante el método de la presente invención (Figuras 2A y 2C) que mediante una PCR asimétrica (Figuras 2B y 2D).

Ejemplo 3: Hibridación de ADN de cadena sencilla marcado en un microsistema

Se amplificó ADN, extraído de una muestra de cultivo de sangre positiva de un paciente de sepsis, tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2 usando mezclas de cebadores 1 μ M. La hibridación del ADN amplificado se llevó a cabo sobre un biochip que contiene un área de hibridación específica, un microsistema, sobre el que se unieron sondas específicas de diferentes bacterias diana. Las sondas específicas de especie útiles se describen, por ejemplo, en la publicación de patente internacional WO2004046379.

La mezcla de reacción de hibridación contenía aproximadamente de 50 a 100 ng de diana marcada, 2x tampón de hibridación (que consistía en 1 comprimido de PBS pH 7,4 (Sigma, EE.UU.), NaCl 0,7 M (Fluka, Suiza), 0,1% de Tween® 20 (100%, Fluka, Suiza), 2x disolución de Denhardt (5x, Sigma, EE.UU.), 20 μ g/mL de ADN de esperma de salmón (dsADN) (Amersham, Reino Unido)), oligonucleótidos de control de hibridación, y agua esterilizada. El volumen de la mezcla de reacción fue de 25 μ L. Se precalentó 2x tampón de hibridación a 55°C antes del uso. La mezcla de reacción de hibridación se transfirió a un área de hibridación del biochip. El área de hibridación se selló con pinzas y el biochip se colocó en un dispositivo de hibridación especial. Durante 10 minutos de hibridación a 55°C, una diana de ssADN marcado con Cy5 se unió a la secuencia de sonda complementaria inmovilizada sobre el microsistema, creando una estructura de cadena doble marcada.

Tras la etapa de hibridación, el biochip se lavó brevemente a fin de eliminar un ADN no hibridado. Las etapas de lavado se llevaron a cabo como se indica a continuación: en 2x disolución SSC durante 1 minuto a 40°C, y en 0,2x disolución SSC durante 1 minuto a 40°C. Tras el lavado, el biochip se secó. El biochip se analizó con un lector óptico, que consistió en una fuente de luz LED y una cámara CCD. La detección se basa en una señal fluorescente liberada por el ssADN marcado con Cy5 y capturada por la cámara.

Un ejemplo del resultado de la hibridación se presenta en la Figura 3. Se detectó *Pseudomonas aeruginosa* en la muestra. La identificación estaba en línea con el resultado del cultivo de sangre. Por tanto, el ssADN producido mediante el método de la presente invención es claramente adecuado para aplicaciones de biología molecular.

Ejemplo 4. Detección de *Staphylococcus aureus* y gen *mecA*

El ADN extraído de un elemento aislado de cultivo bacteriano derivado de un paciente de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA) fue amplificado usando el método descrito a continuación.

Se aisló ADN de la muestra para ser analizado usando un robot de extracción de ácido nucleico (Nuclisens® easyMAG™, bioMérieux, Francia). Tras aislamiento del ADN, la diana deseada se amplificó usando PCR. En primer lugar, se preparó una disolución de reacción. La mezcla de reacción de PCR contenía 1 μ M de mezcla de cebadores gB3F (SEQ ID NO: 1; pedida a Thermo Electron, EE.UU.), 1 μ M de mezcla de cebadores gB4R marcados con Cy5 (SEQ ID NO: 2; pedida a Thermo Electron, EE.UU.), 0,25 μ M de cebador directo de *mecA* (SEQ ID NO: 3), 0,25 μ M de cebador inverso de *mecA* marcado con Cy5 (SEQ ID NO: 4), 0,165 μ M de cebador de topoisomerasa específica de *S. aureus* (SEQ ID NO: 5), tampón de PCR 1x Hot Start Taq® (Qiagen, Alemania), al que se añadió MgCl₂ de tal modo que la concentración final fue de 2,0 mM, 300 μ M de cada uno de dATP, dGTP, dCTP y dTTP (Finnzymes, Finlandia), 1,5 g/L de BSA (EuroClone, Italia), 0,125 U/ μ L de ADN polimerasa Hot Start Taq® (Qiagen, Alemania), y 1,5 μ L de ADN aislado en un volumen total de 15 μ L.

Las T_m de las mezclas de cebadores gB3F y Cy5-gB4R se presentan en el Ejemplo 1. El cebador directo de *mecA* (SEQ ID NO: 3) se diseñó para tener una T_m de 48,5 °C, mientras que el cebador inverso Cy5-*mecA* (SEQ ID NO: 4) se diseñó para tener una T_m de 56,5°C. La diferencia entre las T_m de los cebadores de *mecA* fue de 8°C.

Se llevó a cabo la PCR en un termociclador (Mastercycler®, Eppendorf, Alemania). Se usó el siguiente programa de PCR: una etapa de desnaturalización de 15 minutos a 95°C, 36 ciclos de 20 segundos a 95°C, 35 segundos a 52°C, 20 segundos a 72°C, tras lo cual se realizaron 10 ciclos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 67°C, y finalmente 5 ciclos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 69°C. Después de la PCR, el éxito de la amplificación de ADN se verificó mediante electroforesis de gel usando un gel de agarosa al 2% que contenía SYBR® Green II (Invitrogen, EE.UU.).

Se unieron sondas de topoisomerasa específicas de *S. aureus* y sondas específicas de *mecA* a un biochip de base silicio, y los ssADNs diana amplificados fueron hibridados con ellas. La mezcla de reacción de hibridación contenía aproximadamente de 50 a 100 ng de diana marcada, 2x tampón de hibridación (que consistía en 1 comprimido de PBS a pH 7,4 (Sigma, EE.UU.), NaCl 0,7 M (Fluka, Suiza), 0,1% de Tween® 20 (100%, Fluka, Suiza), 2x disolución de Denhardt (5x, Sigma, EE.UU.), 20 μ g/mL de ADN de esperma de salmón (dsADN) (Amersham, Reino Unido)), oligonucleótidos de control de la hibridación, y agua esterilizada. El volumen de la mezcla de reacción fue de 25 μ L. El 2x tampón de hibridación se pre-calentó a 55°C antes de ser usado. La mezcla de reacción de hibridación se

transfirió a un área de hibridación del biochip. El área de hibridación se selló con pinzas y el biochip se colocó en un dispositivo especial de hibridación. Durante 10 minutos de hibridación a 55°C, una diana de ssADN marcada con Cy5 se unió a la secuencia de sonda complementaria inmovilizada sobre el microsistema, creando una estructura de cadena doble marcada.

- 5 Tras la etapa de hibridación, el biochip fue lavado brevemente a fin de eliminar el ADN no hibridado. Las etapas de lavado se llevaron a cabo como se indica a continuación: en 2x disolución SSC durante 2,5 minutos a 40°C, y en 0,2x disolución SSC durante 2,5 minutos a 40°C. Tras el lavado, el biochip fue secado. El biochip se analizó con un lector óptico, que consistía en una fuente de luz LED y una cámara CCD. La detección se basa en una señal fluorescente liberada por el producto génico marcado con Cy5 y capturada por la cámara. En la Figura 4 se presenta un ejemplo del resultado de la hibridación, que ilustra la detección de un gen de *S. aureus* y *mecA*. No se observó hibridación con una sonda específica del género *Staphylococcus*, lo que implica que el paciente presentaba una infección de MRSA. La identificación estuvo en línea con el resultado de un cultivo de sangre. De esta manera, los resultados demuestran una producción eficiente y específica de ssADN mediante el método según la presente invención.
- 10
- 15 Para el especialista en la técnica será evidente que según avance la tecnología, el concepto inventivo puede implementarse en diferentes formas. La invención y sus realizaciones no se limitan a los ejemplos descritos anteriormente, sino que pueden variar dentro del alcance de las reivindicaciones.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Mobidiag oy

5 <120> Método para producir ADN de cadena sencilla
 <130> 2062251PC

<160> 5

10 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1
 <211> 20

15 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

20 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (3)..(3)
 <223> n representa inosina

25 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (6)..(6)
 <223> n representa inosina

30 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (9)..(9)
 <223> n representa G o T

35 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (15)..(15)
 <223> n representa C o T

40 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (18)..(18)
 <223> n representa A, C o T

45 <400> 1
 cgnccnggna tgtanatngg 20

<210> 2

50 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(1)

60 <223> n representa A o G

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (2)..(2)

	<223> n representa A o C	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
5	<222> (3)..(3)	
	<223> n representa inosina	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
10	<222> (6)..(6)	
	<223> n representa A o T	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
15	<222> (9)..(9)	
	<223> n representa inosina	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
20	<222> (12)..(12)	
	<223> n representa A o G	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
25	<222> (15)..(15)	
	<223> n representa C o T	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
30	<222> (18)..(18)	
	<223> n representa inosina	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
35	<222> (21)..(21)	
	<223> n representa inosina	
	<400> 2	
40	nnnccnacnc cntgnagncc ncc	23
	<210> 3	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 3	
50	aatacaatcg cacatacatt aata	24
	<210> 4	
	<211> 30	
	<212> ADN	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
60	<400> 4	
	ttactcatgc catacataaa tggatagacg	30
	<210> 5	
	<211> 20	
65	<212> ADN	
	<213> Artificial	

<220>

<223> Cebador

5 <400> 5
agacctggta tgtatattgg 20

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un ADN de cadena sencilla mediante amplificación simétrica de un ADN deseado usando al menos un par de cebadores específicos, constituido por un primer cebador no marcado y un segundo cebador no marcado, comprendiendo dicha amplificación las etapas de:
- 5 a) llevar a cabo una primera etapa de PCR que comprende repetir las etapas de desnaturalización, hibridación de ambos cebadores, primero y segundo, y extensión de los mismos,
- b) llevar a cabo una segunda etapa de PCR que consiste en repetir las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión, en donde la hibridación y la extensión se combinan y se llevan a cabo a una temperatura a la cual solo dicho segundo cebador se hibrida y extiende el ADN diana,
- 10 en donde dicho primer cebador tiene una temperatura de fusión T_{mA} y dicho segundo cebador tiene una temperatura de fusión T_{mB} , y en donde las áreas de temperatura de hibridación de dicho primer cebador y dicho segundo cebador solapan parcialmente, y
- en donde la definición "no marcado" se refiere a cebadores que no comprenden ninguna secuencia de nucleótidos adicional en su extremo 5' o 3'.
- 15 **2.** El método según la reivindicación 1, en donde T_{mA} es de aproximadamente 8°C a aproximadamente 20°C inferior a T_{mB} .
- 3.** El método según la reivindicación 1, en donde en la etapa a) dicha hibridación se lleva a cabo a una temperatura de $T_{mA} \pm 8^\circ\text{C}$.
- 20 **4.** El método según la reivindicación 1, en donde en la etapa b) dicha hibridación se lleva a cabo a una temperatura de $T_{mB} \pm 14^\circ\text{C}$.
- 5.** El método según cualquier reivindicación precedente, en donde tanto el primer cebador como el segundo cebador consisten en una mezcla de cebadores degenerados.
- 6.** El método según cualquier reivindicación precedente, en donde dicho primer cebador y dicho segundo cebador se hibridan con regiones conservadas de genes que codifican topoisomerasas *gyrB* y *parE*.
- 25 **7.** El método según la reivindicación 6, en donde dicho primer cebador comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 y dicho segundo cebador comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2; o dicho primer cebador comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3 y dicho segundo cebador comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4.
- 8.** El método según cualquier reivindicación precedente, en donde dichos cebadores están marcados.
- 30 **9.** Un kit para producir un ADN de cadena sencilla mediante el método según la reivindicación 1, que comprende al menos un par de cebadores específico, constituido por un primer cebador no marcado que tiene una temperatura de fusión T_{mA} y un segundo cebador no marcado que tiene una temperatura de fusión T_{mB} , y
- 35 en donde las áreas de temperatura de hibridación de dicho primer cebador y dicho segundo cebador solapan parcialmente, y en donde tanto el primer cebador como el segundo cebador se hibridan y extienden una diana a una temperatura de hibridación de una primera etapa de PCR, mientras que solo dicho segundo cebador se hibrida y extiende la diana a una temperatura de hibridación de una segunda etapa de PCR, y
- en donde la definición "no marcado" se refiere a cebadores que no comprenden ninguna secuencia de nucleótidos adicional en su extremo 5' o 3', y
- 40 en donde dicho primer cebador del al menos un par de cebadores comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 y dicho segundo cebador del al menos un par de cebadores comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2; o
- dicho primer cebador del al menos un par de cebadores comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3 y dicho segundo cebador del al menos un par de cebadores comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4.
- 45 **10.** El kit según la reivindicación 9, en donde T_{mA} es de aproximadamente 8°C a aproximadamente 20°C inferior a T_{mB} .
- 11.** El kit según la reivindicación 9, en donde T_{mA} es de aproximadamente 8°C a aproximadamente 10°C inferior a T_{mB} .
- 50 **12.** El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde tanto el primer cebador como el segundo cebador consiste en una mezcla de cebadores.

13. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde dicho primer cebador y dicho segundo cebador se hibridan con regiones conservadas de genes que codifican topoisomerasas *gyrB* y *parE*.
14. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en donde dichos cebadores están contenidos en un compartimento separado de un biochip.
- 5 15. El kit según la reivindicación 14, en donde dicho biochip comprende además un compartimento separado para las sondas de oligonucleótidos unidas.
- 10 16. El uso de un kit para producir un ADN de cadena sencilla mediante el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho kit comprende al menos un par de cebadores específico, constituido por un primer cebador no marcado que tiene una temperatura de fusión T_{mA} y un segundo cebador no marcado que tiene una temperatura de fusión T_{mB} , y
- en donde las áreas de temperatura de hibridación de dicho primer cebador y dicho segundo cebador solapan parcialmente, y en donde tanto el primer cebador como el segundo cebador se hibridan y extienden una diana a una temperatura de hibridación de una primera etapa de PCR, mientras que solo dicho segundo cebador se hibrida y extiende la diana a una temperatura de hibridación de una segunda etapa de PCR, y
- 15 en donde la definición "no marcado" se refiere a cebadores que no comprenden ninguna secuencia de nucleótidos adicional en su extremo 5' o 3'.

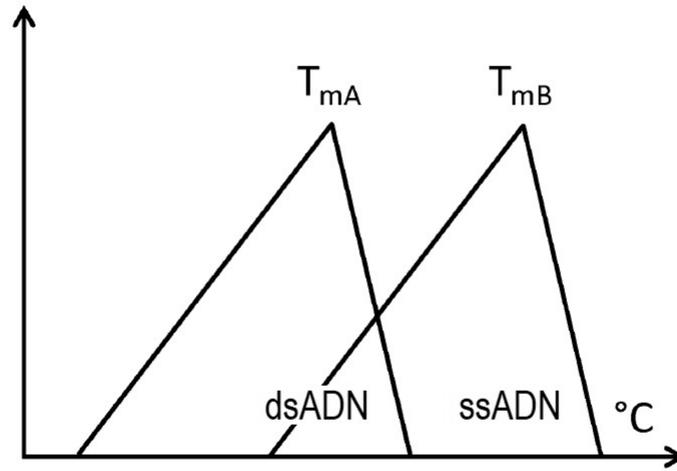
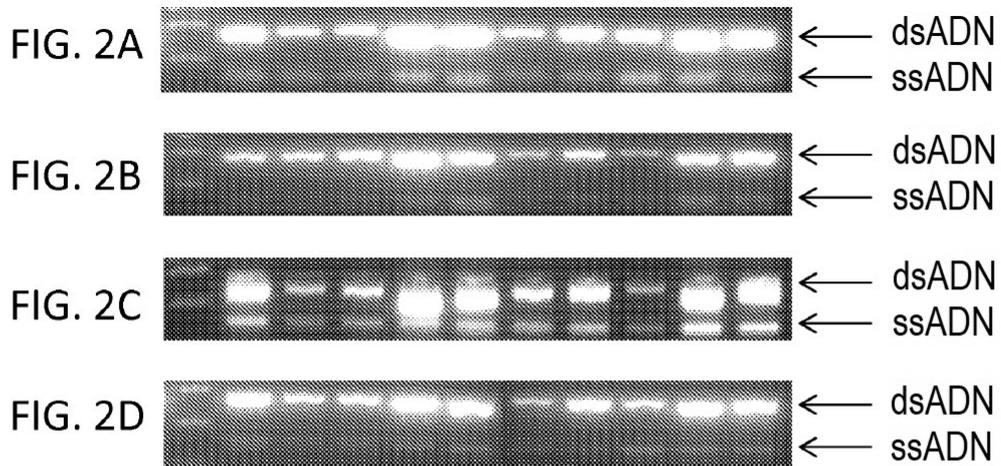


FIG. 1



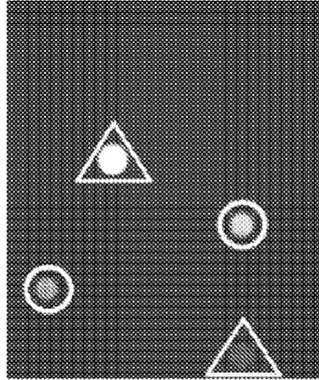


FIG. 3

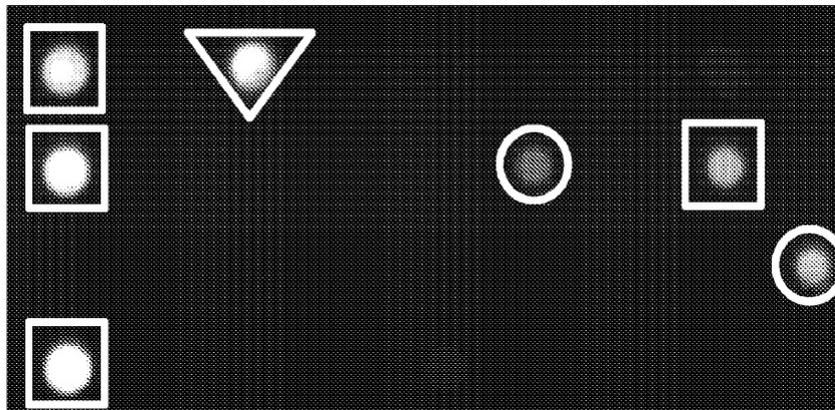


FIG. 4