

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 940**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2009 E 13178545 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2660336**

54 Título: **Amplificación isotérmica de ácido nucleico**

30 Prioridad:

11.06.2008 GB 0810650
11.12.2008 GB 0822533

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.11.2017

73 Titular/es:

ORION PHARMA (UK) LIMITED (100.0%)
Canterbury Enterprise Hub Giles Lane
Canterbury, Kent CT2 7NJ, GB

72 Inventor/es:

HOSER, MARK JAY

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 642 940 T3

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

DESCRIPCIÓN

Amplificación isotérmica de ácido nucleico

Campo de la invención

La invención se refiere a un kit para amplificación isotérmica de una molécula objetivo de ácido nucleico bicatenario.

5 Antecedentes de la invención

Dentro de las tecnologías de ácido nucleico y material genético, a menudo es necesario determinar si un gen, una parte de un gen o una secuencia de nucleótidos está presente en un organismo vivo, un extracto celular de este organismo o una muestra biológica. Dado que cualquier gen o parte de un gen se caracteriza por una secuencia específica de bases de nucleótidos, sólo es necesario buscar directamente la presencia de toda o parte de dicha secuencia específica en una muestra que contiene una mezcla de polinucleótidos.

10 Existe un enorme interés en esta búsqueda de secuencias polinucleotídicas específicas, particularmente en la detección de organismos patógenos, determinación de la presencia de alelos, detección de la presencia de lesiones en un genoma huésped o detección de la presencia de un ARN particular o modificación de un huésped celular. Las enfermedades genéticas tales como la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Duchenne, la fenilcetonuria y la beta talasemia se pueden diagnosticar mediante el análisis de los ácidos nucleicos del individuo. También es posible diagnosticar o identificar virus, viroides, bacterias, hongos, protozoos o cualquier otra forma de vida vegetal o animal mediante pruebas que empleen sondas nucleicas.

15 Una vez que se conoce la secuencia específica de un organismo o una enfermedad, se deben extraer los ácidos nucleicos de una muestra y debe determinarse si esta secuencia está presente. En la literatura se han descrito varios métodos de detección de ácidos nucleicos. Estos métodos se basan en las propiedades de apareamiento purina-pirimidina de hebras de ácido nucleico complementarias en dúplex de ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN. Este proceso de apareamiento se efectúa estableciendo enlaces de hidrógeno entre las bases de adenina-timina (A-T) y guanina-citosina (G-C) de ADN bicatenario; los pares de bases adenina-uracilo (A-U) también pueden formarse por enlace de hidrógeno en dúplex de ADN-ARN o ARN-ARN. El apareamiento de hebras de ácido nucleico para determinar la presencia o ausencia de una molécula de ácido nucleico determinada se denomina comúnmente "hibridación de ácido nucleico" o simplemente "hibridación".

20 El método más directo para detectar la presencia de una secuencia objetivo en una muestra de ácido nucleico es obtener una "sonda" cuya secuencia es suficientemente complementaria a parte del ácido nucleico objetivo para hibridar con la misma. Una sonda previamente sintetizada puede aplicarse en una muestra que contiene ácidos nucleicos. Si la secuencia objetivo está presente, la sonda formará un producto de hibridación con el objetivo. En ausencia de una secuencia objetivo, no se formará ningún producto de hibridación. La hibridación de la sonda puede detectarse mediante numerosos procedimientos conocidos en la técnica. Comúnmente, la sonda puede conjugarse con un marcador detectable. Los marcadores fluorescentes o enzimáticos forman la base de las guías moleculares, Taqman y otras sondas escindibles en sistemas homogéneos. Alternativamente, la sonda puede usarse para capturar material amplificado o marcado de manera que el amplicón se detecte después de separar una sonda hibridada con el amplicón de material no hibridado.

25 Sin embargo, la dificultad principal en este enfoque es que no es directamente aplicable a casos en los que el número de copias de la secuencia objetivo presentes en una muestra sea pequeño, inferior a aproximadamente 10^7 copias. En estas condiciones es difícil distinguir la unión específica de una sonda a su secuencia objetivo de la unión no específica de la sonda a una secuencia diferente de la secuencia objetivo. Una de las soluciones a este problema es utilizar una técnica de amplificación que consiste en aumentar la señal de detección mediante una técnica preliminar diseñada para aumentar específica y considerablemente el número de copias de un fragmento de ácido nucleico objetivo si está presente en la muestra.

30 Los artículos de Lewis (1992, Genetic Engineering News 12: 1-9) y Abramson y Myers (1993, Curr. Opin. Biotechnol., 4: 41-47) son buenos estudios generales de las técnicas de amplificación. Las técnicas se basan principalmente ya sea en las que requieren ciclos múltiples durante el proceso de amplificación o las que se realizan a una sola temperatura.

35 Las técnicas de ciclización se ejemplifican por métodos que requieren termociclización y la más ampliamente utilizada de esta clase de tecnología es la PCR (reacción en hebra de la polimerasa, patentes de los Estados Unidos Nos. 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159, patente europea No. 0 201 184) que permite la amplificación de una región de interés a partir de un ADN o ARN. El método generalmente consta de tres etapas:

(i) disociar (desnaturalizar) un ADN bicatenario en ADN monocatenarios por desnaturalización/fusión por calor (figura 1B);

(ii) hibridación de un oligonucleótido cebador con el ADN monocatenario (figura 1B); y

(iii) sintetizar (extender) una hebra complementaria a partir del cebador para copiar una región de un ADN de interés (figura 1C).

Después de completarse este proceso se calienta el sistema que separa las hebras complementarias y se repite el proceso. Típicamente se realizan 20 - 40 ciclos para amplificar el ADN genómico hasta el punto en que pueda analizarse más a fondo.

La mayoría de los procesos de amplificación exponencial de ácido nucleico se basan en un exceso de cebadores en dirección 5' y en dirección 3' que se unen al extremo terminal 3' y al complemento del extremo terminal 5' de la plantilla de ácido nucleico objetivo, como se muestra en las Figuras 1A-C.

Una segunda clase de técnicas de amplificación, conocidas como técnicas isotérmicas, son aquellas que se realizan a una sola temperatura o donde el aspecto principal del proceso de amplificación se realiza a una sola temperatura. En contraste con el proceso de PCR en el que el producto de la reacción se calienta para separar las dos hebras de tal manera que un cebador adicional puede unirse a la plantilla repitiendo el proceso, las técnicas isotérmicas se basan en una polimerasa que desplaza hebras para separar/desplazar las dos hebras del dúplex y copiar nuevamente la plantilla. Esta propiedad bien conocida ha sido objeto de numerosos artículos científicos (véase, por ejemplo, Y. Masamute y CC Richardson, 1971, J. Biol. Chem. 246, 2692-2701, RL Lechner et al., 1983, J. Biol Chem 258, 11174-11184, o RC Lundquist y BM Olivera, 1982, Cell 31, 53-60). La característica clave que diferencia las técnicas isotérmicas es el método que se aplica para iniciar el proceso reiterativo.

Las técnicas ampliamente isotérmicas pueden subdividirse en aquellos métodos que se basan en la sustitución de un cebador para iniciar la copia de plantilla reiterativa (ejemplificada por HDA (amplificación dependiente de helicasa), amplificación dependiente de exonucleasa (EP1866434), amplificación mediante polimerasa recombinasa (RPA) y amplificación mediada por bucle (LAMP)) y aquellas que se basan en la reutilización continua o la nueva síntesis de una sola molécula cebadora (ejemplificada por SDA (amplificación por desplazamiento de hebra y amplificación basada en ácido nucleico (NASBA y TMA)).

La amplificación mediante polimerasa recombinante (RPA) es un proceso en el que el direccionamiento mediado por recombinasa de oligonucleótidos a objetivos de ADN se acopla a la síntesis de ADN mediante una polimerasa (Morrical SW et al., J. Biol Chem., 1991, 25, 266 (21): 14031-8 y Armes y Stemple, solicitud estadounidense No. 10/371.641). El documento WO 2008/035205 describe un proceso RPA de amplificación de una molécula de ácido nucleico objetivo bicatenaria, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto proteínas UVSX, UVSY y GP32 con un primer y un segundo cebador de ácido nucleico monocatenario específico para dicha molécula de ácido nucleico objetivo bicatenaria para formar un primer y un segundo cebador de nucleoproteína; (b) poner en contacto el primer cebador de nucleoproteína con dicha molécula de ácido nucleico objetivo bicatenaria para crear una primera estructura de bucle D en una primera porción de dicha molécula de ácido nucleico objetivo bicatenaria y poner en contacto el segundo cebador de nucleoproteína con dicha molécula de ácido nucleico objetivo bicatenaria para crear una segunda estructura de bucle D en una segunda porción de dicha molécula de ácido nucleico objetivo bicatenaria de tal manera que los extremos 3' de dicho primer cebador de ácido nucleico y dicho segundo cebador de ácido nucleico estén orientados uno hacia el otro sobre la misma molécula de ácido nucleico objetivo bicatenaria sin desnaturalizar completamente la molécula de ácido nucleico objetivo; (c) extender el extremo terminal 3' de dichos primer y segundo cebadores de nucleoproteína con una o más polimerasas capaces de síntesis de desplazamiento de hebra y dNTP para generar una primera y segunda moléculas de ácido nucleico objetivo bicatenarias y una primera y segunda hebras desplazadas de ácido nucleico; y (d) continuar la reacción mediante la repetición de (b) y (c) hasta alcanzar un grado de amplificación deseado.

Con el fin de discriminar la amplificación del objetivo de aquella de los artefactos productores de amplificación inútil, pueden utilizarse sistemas basados en sondas que detectan secuencias del amplicón bajo investigación que no están presentes en los cebadores suministrados al sistema.

Todos estos procesos se basan únicamente en una plantilla que comprende un sitio de unión para los dos cebadores en sus extremos terminales. Una plantilla con estas cualidades puede ser producida por interacciones no específicas entre los cebadores en dirección 5' y en dirección 3' solos y el producto (dímeros-cebadores) puede ser capaz de una amplificación eficiente independientemente de la plantilla bajo investigación, como se muestra en las Figs. 1D-E. Como consecuencia de esta amplificación inútil, los componentes de ensayo se consumen por eventos no productivos que limitan la sensibilidad del proceso de ensayo.

Los documentos WO 2007/096702 y WO 2005/118853 describen ambos un proceso de RPA de un ADN bicatenario objetivo, empleando un complejo de recombinasa-cebador para escanear DNA bicatenario y facilitar el intercambio de hebras.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un kit adecuado para uso en una técnica isotérmica de amplificación de ácido nucleico. Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un kit para uso en una técnica de amplificación exponencial. Es un objeto adicional minimizar o eliminar artefactos de amplificación y proporcionar así un kit adecuado para uso en la amplificación de ácidos nucleicos con mayor especificidad y/o sensibilidad.

Sumario de la invención

La invención proporciona un kit de acuerdo la reivindicación 1 más adelante, para la amplificación isotérmica de una molécula objetivo de ácido nucleico bicatenario que comprende que comprende:

5 (a) un cebador en dirección 5' y un cebador en dirección 3', comprendiendo cada uno una molécula de ADN monocatenario de menos de 30 nucleótidos, al menos una porción de la cual es complementaria a una secuencia de la molécula objetivo;

10 (b) un oligonucleótido que comprende una molécula de ADN monocatenario de al menos 30 nucleótidos, en donde al menos una porción del oligonucleótido es complementaria a una porción de la secuencia objetivo que interviene en los cebadores en dirección 5' y en dirección 3', y en donde el oligonucleótido tiene un extremo terminal 3' no extensible;

(c) una recombinasa

en donde los cebadores en dirección 5' y en dirección 3' no amplifican la molécula objetivo independientemente del oligonucleótido,

15 en donde el oligonucleótido se pone en contacto con la recombinasa para permitir que invada la molécula objetivo, de ácido nucleico bicatenaria volviendo de este modo la región complementaria de la molécula objetivo y regiones adyacentes monocatenarias; permitiendo de este modo que los cebadores tengan acceso para unirse al ADN de monocatenario complementario sobre la molécula objetivo

20 Ventajosamente, este kit proporciona amplificación isotérmica y exponencial de una molécula de ácido nucleico objetivo. La amplificación es más específica y sensible que los métodos conocidos y da como resultado artefactos de amplificación mínima o nula.

La recombinasa puede ser el sistema T4 UVSX/GP32/UVSY. Una porción del oligonucleótido es complementaria a una porción de la secuencia objetivo que interviene los cebadores en dirección 5' y en dirección 3'. El oligonucleótido comprende una molécula de ADN monocatenario de al menos 30 nucleótidos que tiene un extremo terminal 3' no extensible.

25 Preferiblemente, el sustrato para el sistema de invasión de la cadena facilita la separación del dúplex de plantilla objetivo o el producto de la extensión del cebador sobre el ácido nucleico objetivo. Uno o más oligonucleótidos adicionales pueden facilitar la separación del dúplex objetivo por el oligonucleótido intermedio. Preferiblemente, el oligonucleótido comprende un elemento en dirección 3' en su extremo terminal 3' que es complementario a la secuencia objetivo y que no es un sustrato de polimerasa eficaz. Este puede unirse a la hebra objetivo liberada por el oligonucleótido y la rama migra al ácido nucleico dúplex proximal separando adicionalmente las hebras dúplex.

30 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la formación de dímeros de cebador en una reacción de amplificación dependiente del cebador.

35 1A: Se incuban los cebadores en dirección 5' y en dirección 3' con una plantilla dúplex. La plantilla es afín en sus extremos terminales a los cebadores. Un soporte de la plantilla es afín al cebador en dirección 5' y la otra hebra es afín al cebador en dirección 3'.

1B: Las hebras de la plantilla se separan lo que permite que el cebador en dirección 5' y en dirección 3' se una.

1C: La extensión de los cebadores unidos a la plantilla produce dos dúplex idénticos. Cada dúplex puede participar en las etapas previas en la reacción de tal manera que la plantilla se amplifica exponencialmente.

40 1D-E: El cebador en dirección 5' y en dirección 3' se copia sobre cada uno de ellos en la ausencia de la plantilla. Estos pueden reemplazar la plantilla bajo investigación y también pueden amplificarse exponencialmente causando un artefacto.

La Figura 2 muestra el sistema básico de amplificación de esta invención junto con un sistema opcional de detección basado en una sonda.

45 La Figura 3 muestra un método de amplificación en el que se usa un elemento en dirección 3' para proteger de productos de amplificación no específicos.

La Figura 4 muestra un método de amplificación que utiliza un oligonucleótido de complemento inverso de tal manera que no pueden formarse productos no específicos.

La Figura 5 muestra la secuencia de eventos que pueden conducir a artefactos cebadores en un sistema tripartito.

La Figura 6A muestra configuraciones plantilla/cebador.

La Figura 6B muestra la amplificación en un sistema de 2 cebadores (medido por fluorescencia de Sybr Green).

La Figura 7A muestra configuraciones plantilla/cebador/oligonucleótido.

La Figura 7B muestra la amplificación en un sistema tripartito (medido por la fluorescencia de Sybr Green).

La Figura 8 muestra el efecto de la longitud del cebador en un sistema tripartito.

5 La Figura 9A muestra configuraciones plantilla/cebador/oligonucleótido que incluyen oligonucleótidos y sondas 2-O-metilados en dirección 3'.

La Figura 9B muestra el efecto de usar un oligonucleótido intermedio que tiene un elemento en dirección 3' metilado.

La Figura 10 muestra que un sistema tripartito puede amplificarse a partir de ADN derivado biológicamente.

10 La Figura 11A muestra el resultado de la amplificación con un sistema tripartito utilizando 75 nM de oligonucleótido intermedio metilado en dirección 3'.

La Figura 11B muestra que la sensibilidad del sistema tripartito usando un intermediario metilado en dirección 3' puede ser al nivel de una sola molécula.

La Figura 12 muestra el uso de aglomerantes en el sistema tripartito.

La Figura 13 muestra la amplificación en un sistema tripartito interrogado por sondas.

15 Descripción detallada de la invención

La invención describe un kit adecuado para amplificación isotérmica y exponencial de un ácido nucleico objetivo bicatenario. La secuencia de ácido nucleico puede comprender ADN, ARN transcrito inversamente (ADNc) o ADN genómico. El ácido nucleico también puede contener nucleósidos modificados o no naturales donde pueden ser copiados por la acción de una polimerasa.

20 En contraste con otros procesos de amplificación de ácido nucleico, los cebadores en dirección 5' y en dirección 3' que se unen a los extremos terminales del ácido nucleico (cebadores terminales) son, solos, incapaces de inducir amplificación exponencial del ácido nucleico objetivo. El aspecto exponencial de la amplificación está habilitado por uno o más oligonucleótidos (oligonucleótidos intermedios o intermedios, IO) que son afines a una porción de la secuencia plantilla que interviene los cebadores en dirección 5' y en dirección 3'. Dado que una plantilla afín a los
25 cebadores en dirección 5' y en dirección 3' por sí sola no es una unidad de amplificación viable, el sistema puede diseñarse de tal manera que sea impermeable a la pérdida de sensibilidad por los artefactos dímeros del cebador descritos en la figura 1 y también otros artefactos erróneos.

30 Los cebadores no son capaces de amplificarse en ausencia de la secuencia IO y la IO no es extensible. Como resultado, la amplificación artefacto se suprime o se reduce significativamente ya que la IO no puede impartir amplificación artefacto por sí misma. Además, en algunos aspectos de la invención, la IO comprende secuencias que no son sustratos para una polimerasa y, como tal, no hay eventos artefactos que puedan reproducir la secuencia amplificable en ausencia del objetivo bajo investigación.

La invención proporciona un kit para la amplificación isotérmica de una molécula objetivo de ácido nucleico bicatenario que comprende:

35 (a) un cebador en dirección 5' y un cebador en dirección 3', comprendiendo cada uno una molécula de ADN monocatenario de menos de 30 nucleótidos, al menos una porción de la cual es complementaria a una secuencia de la molécula objetivo;

40 (b) un oligonucleótido que comprende una molécula de ADN monocatenario de al menos 30 nucleótidos, en donde al menos una porción del oligonucleótido es complementaria a una porción de la secuencia objetivo que interviene los cebadores en dirección 5' y en dirección 3', y en donde el oligonucleótido tiene un extremo terminal 3' no extensible;

(c) una recombinasa;

45 en donde los cebadores en dirección 5' y en dirección 3' no amplifican la molécula objetivo independientemente del oligonucleótido, en donde el oligonucleótido se pone en contacto con la recombinasa para permitir que invada la molécula objetivo del ácido nucleico bicatenario, volviendo de este modo la región complementaria de la molécula objetivo y regiones adyacentes monocatenarias permitiendo de este modo que los cebadores tengan acceso a unirse al ADN monocatenario complementario sobre la molécula objetivo.

La presente invención se basa en los siguientes componentes.

El cebador de en dirección 5' (o cebador directo) se une a una hebra de la molécula de ácido nucleico objetivo en o proximal a la región 5' del oligonucleótido intermedio (IO).

El cebador en dirección 3' (o cebador inverso) se une a una hebra de la molécula de ácido nucleico objetivo en o cerca al extremo terminal 3' del IO. Se une a la hebra opuesta a la que se une el cebador en dirección 5'.

5 Esencialmente, un cebador se une a una plantilla y se extiende, mediante la acción de una polimerasa. Los cebadores directo e inverso deben ser sustratos eficientes de polimerasa. Los cebadores no deben ser sustratos de recombinasa competentes. Esto significa que deben tener menos de 30 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, el cebador es menor de 25 nucleótidos. Lo más preferiblemente, el cebador es de aproximadamente 15 a 23 nucleótidos. Los cebadores son capaces de unirse a hebras opuestas de la molécula de ácido nucleico objetivo. No es esencial que el cebador completo se una a (sea complementario con) la secuencia objetivo.

10 Oligonucleótido de intervención o intermedio (IO) es un sustrato para el sistema de invasión de cadenas (SIS). El sustrato para el sistema de invasión de cadena facilita la separación del dúplex de la plantilla objetivo o el producto de la extensión del cebador sobre el ácido nucleico objetivo, permitiendo de ese modo que los cebadores tengan acceso para unirse al ADN monocatenario complementario sobre la molécula objetivo.

15 La recombinasa permite que el IO invada la región complementaria de la molécula objetivo. Al menos una porción del oligonucleótido es complementaria a una porción de la secuencia objetivo que interviene los cebadores en dirección 5' y en dirección 3'. El oligonucleótido intermedio comprende una región que es un sustrato de recombinasa. Como las recombinasas realizan preferentemente un oligonucleótido sustrato que tiene más de aproximadamente 30 nucleótidos (Formosa T. y Alberts B., JBC, (261) 6107-6118, 1986, Gamper B et al., Biochemistry, (42) 2643-2655, 2003), el oligonucleótido comprende una molécula de ADN monocatenaria de al menos 30 nucleótidos. Además, debe tener un área afín lo suficientemente larga como para invadir una plantilla eficientemente y por lo tanto al menos una porción del es complementaria a la secuencia objetivo que interviene en los cebadores directo e inverso. Generalmente esto es un mínimo de 24 bases y óptimamente alrededor de 38 bases. La porción 5' de la secuencia complementaria es preferiblemente lo suficientemente próxima al extremo terminal dúplex de que la temperatura de fusión del dúplex residual da como resultado la disociación del dúplex residual después de la unión. Usualmente esto significa que el extremo terminal 5' de la secuencia complementaria no debe ser mayor de 15-20 nucleótidos desde el extremo terminal dúplex.

25 El IO también puede comprender un extremo terminal 5' que no es afín a la plantilla con el fin de sembrar eficientemente el área afín con recombinasa. Típicamente estaría en exceso de 12 bases. De este modo, la longitud total del IO es preferiblemente de al menos 36 bases, más preferiblemente al menos 50 bases, incluyendo la región afín. También puede comprender un extremo terminal 3' que no es afín a la plantilla.

30 El IO tiene un extremo terminal 3' no extensible. Esto se puede conseguir incorporando uno o más de varios nucleótidos modificados. Típicamente, estos incorporarán una modificación 3' del nucleótido terminal. Ejemplos de estos nucleótidos modificados son nucleótidos didesoxinucleótidos, espaciadores 3'-aminoalilo, 3'-carbono de diferentes longitudes, nucleótidos incorporados en una orientación inversa (enlace 3'-3'), 3'-fosfato, 3'-biotina, 3'-tiol. Alternativamente, el extremo terminal puede comprender nucleótidos incompatibles con la extensión mediante una polimerasa debido a su pobre capacidad como sustrato, tal como PNA o LNA o ADN enlazado 2'-5' o ARN 2'-O-metilo.

Sistemas de recombinasa

40 Las recombinasas deben unirse a moléculas de ADN más largas que 30 nucleótidos. Preferiblemente, tienen una preferencia más fuerte por ADN monocatenario y una preferencia relativamente más débil por ADN bicatenario. Esto les permite unirse al IO, pero no a los cebadores en dirección 5' o en dirección 3'.

45 Se conocen diversos sistemas de recombinasa por parte de aquellos familiarizados con la técnica y han sido revisados de diversas maneras (por ejemplo, Piero R. Bianco et al., Frontiers in Bioscience 3, d570-603, 1998, 570 DNA Strand Exchange Proteins: A Biochemical and Physical Comparison). Cualquier sistema de recombinasa se puede utilizar en el método de la invención y la aplicación detallada de las recombinasas para la invasión de dúplex de ácido nucleico es conocida por los familiarizados con la técnica (Kodadek T et al., JBC 264, 1989, y Liu J, JBC Na Qian1, 281, 26308 - 266319, 2006).

50 El sistema recombinasa puede comprender un componente derivados de levaduras, bacterias, fagos o mamíferos u otros eucariotas. El sistema recombinasa puede ser mesófilo o termófilo. Por ejemplo, la recombinasa puede derivarse de un fago de myoviridae. El fago de myoviridae puede ser, por ejemplo, T4, T2, T6, Rb69, Aehl, KVP40, fago 133 de Acinetobacter, fago 65 de Aeromonas, cianofago P-SSM2, cianofago PSSM4, cianofago S-PM2, Rb14, Rb32, Fago 25 de Aeromonas Vibrio Fago nt-1, phi-1, Rb16, Rb43, Fago 31, Fago 44RR2.8t, Rb49, Fago Rb3, o Fago LZ2. En una realización preferida, se puede usar la recombinasa T4 UVSX. También se pueden usar los sistemas Rad de eucariotas o el sistema recA-Reco de *E. coli* u otros sistemas procariotas.

55 Normalmente, una recombinasa se polimeriza sobre un oligonucleótido monocatenario en la dirección 5'-3'. La invención tal como se describe en la presente memoria se refiere a tal recombinasa. Sin embargo, la recombinasa puede polimerizar en una dirección 3'- 5' y dichas recombinasas también pueden usarse de acuerdo con la presente invención. En este caso y con referencia a la direccionalidad de los componentes descritos, se aplica lo contrario.

Las proteínas accesorias de la recombinasa pueden incluirse en el sistema, tal como una proteína de unión monocatenaria (por ejemplo, GP32) y un agente de carga de la recombinasa (por ejemplo, UVSY). En una realización preferida, el sistema de recombinasa comprende la T4 GP32, UVSX y UVSY. Cuando se utiliza tal sistema, todos los elementos monocatenarios (es decir, cebadores e IO) se recubren con la proteína de unión monocatenaria (por ejemplo, GP32). El agente de carga de la recombinasa (por ejemplo, UVSY) actúa como un cofactor para la recombinasa y recubre el IO. La recombinasa (por ejemplo, UVSX) cubre competentemente sólo el IO puesto que solamente este elemento comprende una longitud suficiente para inducir el proceso.

La recombinasa (por ejemplo, UVSX), y donde se usa el agente de carga de la recombinasa (por ejemplo, UVSY) y la proteína de unión al ADN monocatenario (por ejemplo, GP32), pueden ser proteínas nativas, híbridas o mutantes de las mismas o diferentes fuentes de fagos de myoviridae. Una proteína nativa puede ser un tipo silvestre o una variante natural de una proteína. Una proteína mutante (también llamada proteína modificada genéticamente) es una proteína nativa con mutaciones naturales o provocadas por el hombre, tales como inserciones, supresiones, sustituciones o una combinación de las mismas, que están en el extremo terminal N, el extremo terminal C o interior (entre el extremo terminal N y el extremo terminal C). Una proteína híbrida (también llamada proteína quimérica) comprende secuencias de al menos dos organismos diferentes. Por ejemplo, una proteína UVSX híbrida puede contener un aminoácido de una especie (por ejemplo, T4), pero un bucle de unión a ADN de otra especie (por ejemplo, T6). La proteína híbrida puede contener características mejoradas en comparación con una proteína nativa. Las características mejoradas pueden ser una velocidad de amplificación aumentada o más rápida o una velocidad de amplificación disminuida o más controlable.

Otros factores usados para aumentar la eficacia del sistema de la recombinasa pueden incluir compuestos usados para controlar las interacciones de ADN, por ejemplo, prolina, DMSO o aglomerantes que se sabe que aumentan la carga de recombinasas sobre ADN (Lavery P et al., JBC 1992, 26713, 9307- 9314, WO2008 035205). Mientras que se sabe que los agentes de aglomeración tales como PVA, gelatina o albúmina influyen en la cinética enzimática aumentando la concentración efectiva de reactivos debido a la ocupación en volumen (Reddy MK et al., Methods, Enzymol, 1995, 262: 466-76, Harrison B, Zimmerman SB. Anal Biochem. 1986 noviembre 1; 158 (2): 307-15; Reddy MK, Weitzel SE, von Hippe I PH. Proc Natl Acad Sci USA. 1993, 15 de abril; 90 (8): 3211-5; Stommel JR et al., Biotechniques. 1997, junio; 22 (6): 1064-6), DMSO, betaina, prolina y detergentes pueden mejorar los sistemas alterando la Tm o la estructura secundaria de los oligonucleótidos en el ensayo.

Polimerasa

Las polimerasas utilizadas en el procedimiento de la invención son preferiblemente aquellas con actividad de desplazamiento de hebras. Esta actividad es una propiedad bien conocida de ciertas ADN polimerasas (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, páginas. 5.33-5.35, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor). Las propiedades de las ADN polimerasas, particularmente la actividad de desplazamiento de la hebra de algunas de ellas, se dan en detalle por Kornberg y Baker, DNA Replication, 2ª edición, páginas 113-225, Freeman, N.Y. (1992). El desplazamiento de la hebra no es una propiedad común a todas las ADN polimerasas ya que algunas de ellas, como las ADN polimerasas de T4, no son capaces de realizar el desplazamiento de hebras solamente. El desplazamiento de hebras puede ser impartido en estos casos mediante la adición de las proteínas accesorias de polimerasas. La actividad de desplazamiento de las hebras se mostró inicialmente para el fragmento Klenow de ADN polimerasa I de *Escherichia coli* (Masamune y Richardson, 1971, J. Biol. Chem. 246: 2692-2701), que confiere a esta enzima la capacidad de iniciar la replicación de ácido nucleico desde el extremo 3'OH del sitio de escisión en un ADN bicatenario. Esta actividad de desplazamiento de la hebra también se ha mostrado en ADN polimerasas termoestable tales como ADN polimerasa Tli (Kong et al., 1993. J. Biol. Chem. 268: 1965-1975). En este caso también se ha demostrado que las formas mutadas de esta enzima no tienen actividad exonucleasa 5'-3' que tiene una capacidad más alta de desplazamiento de hebras. Esta actividad de desplazamiento de hebras también se ha mostrado para la ADN polimerasa T7 (Lechner et al., 1983. J. Biol. Chem. 258: 11174-11184) y para la transcriptasa inversa del VIH (Huber et al., 1989, J. Biol. Chem 264: 4669-4678).

Preferiblemente, se utiliza una ADN polimerasa sin actividad exonucleasa 5'-3' para llevar a cabo el ciclo de amplificación de acuerdo con la invención ya que la efectividad de la actividad de desplazamiento de hebras es mayor en enzimas sin tal actividad de exonucleasa. El fragmento Klenow de ADN polimerasa I de *Escherichia coli* es un ejemplo de una polimerasa sin actividad exonucleasa 5'-3', al igual que polimerasas tales como ADN polimerasa T7 o Secuenasa (US Biochemical). También se puede usar ADN polimerasa T5 o ADN polimerasa Phi29. Sin embargo, se puede usar una polimerasa de ADN que tiene esta actividad exonucleasa 5'-3' se puede utilizar cuando no evita que se lleve a cabo el proceso de amplificación. En este caso, el rendimiento de la reacción de amplificación puede mejorarse por inhibición específica de la actividad exonucleasa 5'-3' de ADN polimerasas bajo las condiciones de reacción empleadas.

El desplazamiento de la hebra también se puede mejorar mediante la aplicación de sistemas enzimáticos u otros elementos que estabilicen el ADN monocatenario en lugar del dúplex. Ejemplos de tales sistemas son la aplicación de ADN helicasas, la estabilización mediante proteínas de unión monocatenarias, así como la influencia de la polimerasa particular utilizada en el sistema. Es esencial que el método de aumento del desplazamiento de la hebra no interfiera con el sistema de invasión de la hebra.

Las polimerasas adecuadas incluyen polI o fragmentos de polI o variantes tales como aquellas de *E. coli*, *Bacillus subtilis*, esterotermófilas o T7 polimerasas. Igualmente puede usarse un complejo de holoenzima polimerasa tal como aquella descrita para el fago T4. Las polimerasas preferidas son Klenow, exo, una T7 polimerasa o BST phi29 o pol-I de *Bacillus subtilis* o una holoenzima. En algunas realizaciones y especialmente cuando se usa un elemento en dirección 3' o un complemento inverso, puede ser preferible que la polimerasa no tenga una actividad fuerte de desplazamiento de hebras como es el caso del fragmento Klenow de polI de *E. coli*. En otras realizaciones, la actividad fuerte de desplazamiento de la hebra de la polimerasa puede ser una ventaja.

Sistema de regeneración de ATP

Cuando se utiliza una recombinasa para la etapa de invasión de la hebra, el sistema puede tener un requisito para una fuente de energía. La mayoría de estas enzimas utilizan ATP como fuente de energía, pero dado que el ATP agrupa los iones de magnesio necesarios para la actividad enzimática, es prudente suministrar un sistema de regeneración de ATP adicional en lugar de aumentar la concentración de ATP. Los sistemas de generación de ATP pueden implicar varias enzimas en las vías glicolíticas u otras vías bioquímicas y junto con el consumo de ATP estas enzimas junto con las enzimas SIS inducen la acumulación de ortofosfato y/o pirofosfato junto con la producción de AMP y ADP. La acumulación de fosfatos inorgánicos también es capaz de quelar el magnesio y puede ser perjudicial para el sistema de diversas maneras. La conversión de pirofosfato en ortofosfato puede lograrse mediante pirofosfatasa y la conversión de ortofosfatos en organofosfatos menos dañinos también ha sido informada de diversas maneras.

Preferiblemente, la conversión de fosfato u ortofosfato inorgánico en organofosfato utiliza sacarosa y sacarosa fosforilasa u otras fosforilasas de azúcar. Alternativamente se puede usar ribósido de nicotinamida y purina fosforilasa.

Dado que algunos sistemas de regeneración de ATP utilizan ADP exclusivamente como sustrato, puede ser una ventaja convertir AMP producido por algunas recombinasas en ADP usando una mioquinasa. Esto también evita el agotamiento prematuro del recurso de ATP. Bajo las condiciones de operación estándar descritas en los ejemplos, la recombinasa T4 no produce AMP y puede omitirse esta etapa.

Los sistemas de regeneración de ATP por sí mismos usan generalmente fosfocreatina con creatina quinasa o fosfofenil-piruvato y piruvato quinasa. Puesto que la recombinasa UVSX puede quemar hasta 300 moléculas de ATP en un minuto y ya que puede usarse UVSX 3 μ M, es ventajoso utilizar un sistema con fosfocreatina 40-100 mM.

En la práctica puede ser ventajoso incluir una o más de las fuentes de energía anteriores en la solución de reacción, por ejemplo, uno o más de ATP, fosfocreatina, creatina quinasa, mioquinasa, pirofosfatasa, sacarosa, sacarosa fosforilasa.

Consideraciones generales para la optimización del sistema

En la práctica, cuando se lleva a cabo el método de la invención, se puede requerir una titulación estándar de los diversos componentes del sistema mostrado en el procedimiento operativo estándar para asegurar una amplificación óptima. La titulación de componentes incluye titulaciones de iones metálicos proteicos y sales. En el caso de las sales, la naturaleza del catión y el anión, así como la concentración óptima, pueden evaluarse para conseguir una amplificación óptima.

Por lo tanto, se pueden incluir diversos componentes tales como: iones magnesio; fosfocreatina y su contraión, ajustadores de pH, DTT u otros agentes reductores, BSA/PEG de diversas distribuciones de pesos moleculares u otros agentes de aglomeración, ATP y su contraión, dNTP, sacarosa, creatina quinasa, mioquinasa, pirofosfatasa, sacarosa fosforilasa, UVSX, UVSY, GP32 (NEB, 10 mg/mL), Klenow, exo u otras polimerasas.

El sistema regulador utilizado en el protocolo de amplificación debe ser compatible con todos los elementos suministrados al sistema. Claramente las condiciones óptimas para todos los componentes pueden no ser alcanzadas dentro de un solo sistema regulador. Existen numerosas oportunidades que pueden usarse para equilibrar la condición experimental de tal manera que el sistema funcione eficientemente.

El diseño del cebador y del oligonucleótido también afecta al equilibrio del sistema ya que la alteración de la longitud y la temperatura de fusión de los diversos cebadores y oligonucleótidos, así como la longitud del amplicón elegido, pueden alterar el equilibrio de la separación dúplex y la extensión del cebador.

La temperatura de fusión (T_m) es la temperatura que separa la mitad de la población de dúplex idénticos. La longitud y secuencia de un dúplex se refiere a la T_m de manera que un dúplex más largo tiende a tener una T_m más alta. Igualmente, la solución reguladora utilizada durante la amplificación puede alterar la T_m puesto que varias sales y otros componentes pueden alterar la afinidad entre plantillas y cebadores (Chadalavada S.V. FEBS Letters 410 (1997) 201-205). En el contexto de esta invención, la T_m se refiere a las áreas de un dúplex que no han sido invadidas por un IO. Aunque el detalle en la presente memoria se refiere a sistemas desarrollados para trabajar a aproximadamente 40°C, es posible desarrollar sistemas que funcionen a diferentes temperaturas, por ejemplo, de aproximadamente 21 a 50°C, preferiblemente de aproximadamente 25 a 45°C, más preferiblemente de

aproximadamente 37-40°C. En consecuencia, las longitudes y secuencias del objetivo y los cebadores pueden ajustarse como corresponde. Cuando la plantilla bajo investigación está superenrollada negativamente, entonces estas tendencias no se aplican a la plantilla inicial ya que el ADN superenrollado negativamente puede tratarse como si fuera un ADN de hebra sencilla. En la primera ronda de amplificación puede ser necesario calentar o bien desnaturalizar químicamente/enzimáticamente o escindir el objetivo para iniciar el proceso de amplificación. Un cebador adicional llamado cebadores amortiguadores puede usarse para iniciar la primera ronda de amplificación como se ha informado previamente (Nuovo G. J. Mol. Pathol. 2000 (4): 195 - 202). Además, si el sistema permite que el cebador en dirección 5' o en dirección 3' se extienda lentamente en las primeras rondas de amplificación, entonces no se necesitan características adicionales, pero habrá una fase de retardo causada por la resistencia al evento de amplificación inicial.

Método de amplificación

La siguiente parte de la descripción describirá el proceso de la invención que se basa en un oligonucleótido inducido por una recombinasa. Una recombinasa reacciona con un sustrato de oligonucleótido monocatenario y le permite invadir una hebra complementaria dentro de un ácido nucleico dúplex, desplazando la otra hebra saliente (OS) del dúplex.

El principio esencial de la invención es que se presenta un oligonucleótido (IO) que invade un objetivo de ácido nucleico dúplex. La consecuencia de este suceso es que las hebras del dúplex objetivo se separan y se disocian en la región plantilla afín al oligonucleótido invasor, pero también en un área exterior pero próxima al sitio de invasión y esto permite que los cebadores terminales se unan a las hebras componentes, y se extiendan, lo que da como resultado dos copias dúplex. El proceso se repite recursivamente con una amplificación exponencial resultante del objetivo.

Un ácido nucleico objetivo dúplex es invadido en su región media por un oligonucleótido monocatenario no extensible (IO) por la acción de una recombinasa. La invasión por el oligonucleótido perturba la estabilidad del dúplex hasta una medida en que el dúplex se deshace y se convierte en hebra sencilla. Esto expone sitios de unión para los cebadores en dirección 5' y en dirección 3' (que no son sustratos de recombinasa) y éstos se extienden sobre las hebras separadas creando dos copias del dúplex (Figura 2).

La Figura 2 muestra el sistema de amplificación básico de la invención junto con un sistema de detección opcional con base en sondas. Este sistema está protegido de una amplificación no específica hasta cierto punto, pero pueden formarse productos no específicos después de una incubación prolongada como se muestra en la figura 5 (que se discute más adelante). Las Figuras 2 a 4 se describen en relación con el sistema T4 GP32, UVSX y UVSY recombinasa, pero puede usarse cualquier sistema de recombinasa.

2A: Los elementos de este sistema se muestran como I-IV. Una plantilla dúplex se muestra como líneas punteadas. I representa un cebador en dirección 5' que no se une a la recombinasa. II muestra el componente central del sistema, el IO, que puede ser extensible por la acción de una polimerasa o no extensible. Este elemento de ácido nucleico se une a la recombinasa e invade el dúplex objetivo. No necesita ser accionado por una polimerasa. Este elemento también puede comprender opcionalmente una cola 3' o 5' extendida que no es afín a la secuencia que está invadida. La región 5' del área afín del oligonucleótido invasor está lo suficientemente cerca del extremo dúplex de tal manera que la temperatura de fusión del dúplex residual está por debajo de la temperatura ambiente del sistema y da como resultado la disociación del dúplex residual en dirección 5' después de la unión. III muestra el sitio potencial para un sistema de sonda opcional tal como una sonda sensible a exonucleasa T7 o una guía molecular. IV representa el cebador en dirección 3' que no se une a la recombinasa.

Todos los elementos de hebra sencilla del sistema se recubren con la proteína de unión monocatenaria GP32. UVSY, que es un cofactor para UVSX también recubre el IO. Los elementos recubiertos de GP32 tienen una capacidad reducida para la migración a una rama. UVSX cubre de manera competente sólo el IO puesto que sólo este elemento comprende una longitud suficiente para inducir el proceso.

2B: Después de recubrir el IO (II) con recombinasa, es capaz de invadir el dúplex. El dúplex se separa y se convierte en monocatenario en la región de invasión y también en regiones adyacentes, normalmente alrededor de 15 a 20 nucleótidos de longitud. Esto libera el extremo terminal en dirección 5' del ácido nucleico dúplex.

2C: El cebador en dirección 5' (I) es capaz de unirse a la hebra liberada. La temperatura de concentración del cebador y otros componentes del sistema tales como desnaturalizantes se optimizan de tal manera que el cebador se une eficazmente a pesar de su proximidad a su temperatura de fusión.

2D: Se extiende el cebador en dirección 5' (I) que estabiliza su producto y desplaza el IO (II). Esto recrea el dúplex original. El cebador en dirección 3' (IV) junto con la sonda opcional (III) es capaz de unirse a la región desplazada en dirección 3'. El sistema se puede optimizar de tal manera que las concentraciones de cebadores en dirección 5' o en dirección 3' sean asimétricas y por este mecanismo un exceso del cebador en dirección 3' asegura que un exceso de hebra simple del producto en dirección 3' se induce al final de la reacción y que el sitio de unión para la sonda está disponible.

2E: El cebador en dirección 3' se extiende duplicando el número de dúplex.

Usualmente dos oligonucleótidos complementarios se unen con una afinidad que depende de la longitud y secuencia de la región afín. Las dos hebras tienden a separarse sólo por encima de una temperatura particular y esta se denomina temperatura de fusión (T_m). La longitud de la hebra afín es proporcional a la T_m . La T_m también se ve afectada por la concentración de magnesio y sal monovalente y también se reduce en presencia de proteínas de unión de hebra sencilla. La presencia transitoria de una recombinasa en un oligonucleótido aumentará su T_m . Por lo tanto, los parámetros de temperatura de fusión relevantes se evalúan generalmente empíricamente.

Un dúplex puede ser invadido por un oligonucleótido recubierto con recombinasa y esto depende de que sea afín a una hebra del dúplex invadido. La otra hebra del dúplex se designa como la hebra saliente (OS) y está esencialmente separada de la hebra afín del dúplex y se convierte en monocatenaria. Por consiguiente, cuando el dúplex residual fuera de la región invadida tiene una longitud y secuencia tal que la T_m está por debajo de la temperatura ambiente, entonces el dúplex completo se disociará produciendo dos terminales de hebra sencilla que pueden unirse a cebadores terminales.

La mayoría de las recombinasas polimerizan sobre un oligonucleótido desde su región 5' hacia su región 3' y una vez que el oligonucleótido recubierto invade un dúplex, entonces la recombinasa continúa polimerizándose sobre el dúplex 3' con el oligonucleótido invasor (en dirección 3'). Los elementos revestidos de un sistema invadido se mantienen unidos más firmemente que una región no revestida. También es notable que un cebador unido a una plantilla que está recubierta con una recombinasa no puede extenderse hasta que la recombinasa se haya despolimerizado y se haya eliminado.

Como consecuencia de las observaciones anteriores, si el extremo dúplex de la plantilla en dirección 5' del IO está próximo a la región invadida, entonces el extremo se separará ya que no está recubierto con la recombinasa y un cebador puede unirse y extenderse desplazando el IO de modo que pueda ser reutilizado por el sistema. Bajo las mismas circunstancias, el terminal en dirección 3' se mantendrá unido hasta que la recombinasa se despolimerice/ desprenda, que también está en una dirección 5' a 3'. Si la T_m del extremo terminal en dirección 3' es más alta que la temperatura ambiente, entonces sus hebras permanecerán asociadas incluso después de la despolimerización de la recombinasa, pero las hebras seguirán siendo separadas a medida que el cebador en dirección 5' se extiende y desplace las hebras del dúplex original. Esto permitirá que un cebador en dirección 3' se una posteriormente y se extienda (Fig. 2).

Si el extremo terminal en dirección 5' no está cerca de la región invadida, pero la proximidad del extremo terminal en dirección 3' está lo suficientemente cerca para permitir la fusión, entonces podría esperarse que el extremo terminal en dirección 3' se separara después de la despolimerización de la recombinasa. Sorprendentemente, esto no es el caso ya que el extremo terminal cerrado en dirección 5' de la rama dúplex migra a medida que la recombinasa despolimeriza desplazando el oligonucleótido invasor, reposicionando la hebra saliente sobre su compañera y reformando el dúplex original y no dando la oportunidad al cebador en dirección 3' de unirse. La migración de ramas es rápida en este escenario ya que la hebra saliente permanece envuelta alrededor del complejo en una conformación plectonémica y permanece altamente asociada con su hebra afín incluso cuando está desplazada.

La consecuencia de estos eventos es que para que un sistema sea viable de tal manera que la recombinasa permita separar un dúplex, entonces el extremo terminal en dirección 5' de un dúplex objetivo debe separarse durante el evento de invasión de la hebra. Esto se consigue asegurando que la región en dirección 5' del dúplex proximal al sitio de invasión tenga una temperatura de fusión próxima o inferior a la temperatura ambiente. Esto se determina fácilmente por el experto en la materia usando técnicas estándar, pero estará influenciado por componentes del sistema tales como proteínas de unión de hebra sencilla, concentraciones de iones metálicos y concentración de sal.

Por consiguiente, el IO debe diseñarse preferiblemente de tal manera que sea complementario a la molécula objetivo dejando sólo 10-20 bases, preferiblemente 15-17 bases, a cada lado de la región afín. Por lo tanto, por ejemplo, cuando la aplicación se realiza a 40°C, se suministra un IO no extensible al sistema de tal manera que deja 10-17 bases de dúplex a cada lado de la región afín. En la invasión por el IO el extremo terminal en dirección 5' (en relación con el oligonucleótido invasor) del dúplex se funde mientras que el extremo terminal 3' se mantiene unido debido a la polimerización dependiente de la invasión de la recombinasa en el dúplex en dirección 3'. El cebador en dirección 5' se une al extremo terminal fundido en dirección 5' del dúplex y se extiende, desplazando de ese modo el IO. El extremo en dirección 3' del dúplex puede estar separado por la prolongación continua del cebador en dirección 5' o puede ser suficientemente corto para que cuando la recombinasa lo despolimerice también se funda.

El escenario anterior representa la consecuencia de una recombinasa que se polimeriza en la dirección 5'-3' (en dirección 5' hacia 3'). La descripción describe aquí la amplificación con este tipo de recombinasa. Cuando se utiliza una recombinasa que polimeriza en la dirección opuesta, entonces la configuración del sistema se invierte. La mayoría de las recombinasas prefieren una región de 12-15 bases en el extremo terminal en dirección 5' de un IO para facilitar la siembra de la recombinasa y esta característica puede ser incorporada de manera que un IO comprende una región no afín anterior.

En los métodos descritos anteriormente, aunque los artefactos de amplificación se minimizan, es plausible que un

cebador pueda copiarse no específicamente sobre el IO y que el producto de esta extensión pueda ser desplazado, copiando sobre un cebador adicional como se muestra en la figura 5.

La figura 5 muestra el mecanismo mediante el cual pueden producirse artefactos de cebador en un sistema tripartito que no incluye un elemento en dirección 3'.

5 5A: Los componentes del sistema que inducen la amplificación artefacto comprenden el cebador en dirección 5' (I), el oligonucleótido intermedio (II) y el cebador en dirección 3' (III)

5B: Un cebador en dirección 3' puede ocasionalmente copiarse en el oligo intermedio.

5C: Cualquier cebador oligonucleótido adicional puede copiarse sobre el intermedio en dirección 5' de la posición que ocupaba el cebador en dirección 3'.

10 5D: La extensión del cebador oligonucleótido adicional dará como resultado el desplazamiento del producto de la extensión del cebador en dirección 3'.

5E: Finalmente, si un cebador en dirección 5' se copia sobre el producto desplazado entonces se puede producir una unidad amplificable.

15 Estos eventos son más complejos que los implicados en la producción de artefactos de dímero de cebador para el sistema de dos cebadores descrito en la figura 1 y como resultado la sensibilidad del sistema para evaluar la presencia de la plantilla de prueba se mejora con respecto a los sistemas que dependen solamente de dos cebadores.

20 Aunque tal evento es raro, la secuencia del oligonucleótido resultante sería potencialmente una unidad amplificable. Sin embargo, esta eventualidad es anulada por realizaciones de la invención que se discuten a continuación. Con el fin de superar cualquier potencial de amplificación no específica, se puede utilizar el siguiente fenómeno.

25 Cuando sólo se separa un extremo del dúplex debido a la invasión por el IO, entonces un cebador afín se puede unir al extremo disociado, pero la hebra saliente parcialmente atada permanece en estrecha proximidad. Dado que la hebra saliente comprende también una región idéntica a la del cebador, es capaz de competir con el cebador entrante por la unión a la plantilla. Adicionalmente, el extremo terminal enlazado puede también ramificar migrando después de la despolimerización de la recombinasa, reinstalando el dúplex original antes de que un cebador unido al extremo terminal separado tenga la oportunidad de extenderse. Bajo estas circunstancias y cuando sólo se funde el extremo terminal en dirección 5', la extensión del cebador en dirección 5' puede verse comprometida y depender de la separación de los extremos terminales en dirección 3' de tal manera que las hebras del dúplex ya no estén atadas y se desprenda. Mediante este proceso, la competencia por la hebra saliente se suprime. Por lo tanto, se puede diseñar un sistema tal que, a pesar de la separación del aspecto en dirección 5' del dúplex, el cebador en dirección 30 5' sólo sea competente si también se han separado los extremos terminales en dirección 3'. La dependencia del sistema sobre la separación de ambos terminales añade especificidad al sistema y puede lograrse alterando la competencia del cebador en dirección 5' en favor del restablecimiento de la hebra saliente o utilizando una polimerasa a bajas concentraciones o con una actividad de desplazamiento débil de la hebra (exoactividad de Klenow) ya que esto también afectará el equilibrio de la extensión del cebador con la reposición dúplex. En cualquier circunstancia se observa que la amplificación es sustancialmente más rápida cuando las dos hebras del dúplex están separadas. Por lo tanto, la amplificación artefacto, que no imparte esta calidad, será superada si la amplificación del objetivo específico induce la separación de la hebra.

La competencia del cebador en dirección 5' puede ser alterada por varios mecanismos, por ejemplo:

40 (i) El cebador en dirección 5' puede estar diseñado para solaparse con el IO invasor. La región de superposición es preferiblemente de aproximadamente 5 a 10 nucleótidos. La extensión de un cebador solapante se basará en la migración preliminar de la rama del cebador sobre la plantilla desplazando el IO. En algunas circunstancias, y específicamente cuando están presentes proteínas de unión de hebra sencilla, la migración de ramas es lenta y hace una pausa en la extensión del cebador de tal manera que la competencia entre la unión y la extensión del cebador frente al restablecimiento del dúplex original puede estar a favor del restablecimiento. Otra ventaja de esta realización es que los terminales próximos a IO no se separan si la longitud está por encima de 18-23 bases. Como tal, la temperatura de fusión está por encima de la temperatura ambiente de la reacción cuando ésta es de aproximadamente 40°C. El cebador descrito en esta construcción tiene una Tm que está por encima de esta figura, pero crea un término con una Tm por debajo de la temperatura ambiente. Si se usa dicho cebador entonces puede unirse al extremo afín del dúplex fundido y su región 3' se ramificará migrando hacia el aspecto invadido del dúplex si es afín y posteriormente se extiende por la acción de una polimerasa. Si el cebador se convierte en parte de un producto independiente no específico/de la plantilla, a menos que esté perfectamente posicionado con la región IO, puede que no sea una unidad de amplificación viable.

55 (ii) El cebador en dirección 5' puede bloquearse temporalmente y depender de una escisión enzimática antes de la extensión. Esto se ejemplifica por un cebador bloqueado en 3' que comprende una base de ARN proximal al extremo 3' junto con RNasaH. Pueden utilizarse sistemas análogos que utilizan endonucleasas alternativas como

cualquier mecanismo que retrasa el progreso del cebador.

En la realización descrita anteriormente, la amplificación se hace dependiente de la fusión del extremo terminal en dirección 3' así como del extremo terminal en dirección 5'. Los sistemas diseñados para confiar en la fusión del extremo terminal dirección 3' pueden añadir una especificidad absoluta a la amplificación. Si la T_m de un cebador en dirección 3' es más alta que la temperatura ambiente entonces el extremo terminal en dirección 3' no se fundirá y, además, el producto artefacto no específico no se amplificará. Es una ventaja el uso de tales cebadores, pero queda el problema de cómo un cebador con una T_m por encima de la temperatura ambiente de la reacción puede inducir que un extremo terminal se separe. Esto se logra utilizando otros elementos dependientes de la secuencia adicionales para fundir el extremo terminal en dirección 3'.

Por ejemplo, los extremos conectados en dirección 3' pueden separarse por la unión de uno o más oligonucleótidos adicionales que facilitan la separación del dúplex objetivo por el oligonucleótido intermedio y cuya función depende de la etapa de invasión de IO. El valor de este enfoque es que dicho oligonucleótido está diseñado para unirse y separar el dúplex, pero no es ni una polimerasa ni un sustrato de recombinasa. Tal oligonucleótido no puede participar en la producción de un artefacto cebador ya que no es un sustrato de polimerasa que es importante como se muestra en la figura 5. Preferiblemente, el oligonucleótido adicional se une a la hebra liberada por el IO y la rama migra al ácido nucleico dúplex proximal. Es importante destacar que cuando su función exige la migración de rama y donde se encuentra que la migración de la rama se inhibe por las proteínas de unión de hebra sencilla, entonces puede diseñarse de tal manera que no se una de forma significativa a las proteínas de unión de hebra sencilla. Este enfoque se ejemplifica por:

(i) El IO puede comprender una secuencia que es una extensión de su extremo terminal 3' (elemento en dirección 3', DE) que está relacionado con la región terminal objetivo, como se muestra en la Fig. 3 y se discute a continuación.

En esta realización, el DE comprende elementos que no son un sustrato de polimerasa y opcionalmente ni recombinasa ni sustratos SSB. Típicamente, esto puede impartirse mediante el uso de nucleótidos modificados en 2'. Las modificaciones típicas de la posición 2' incluyen hidroxilación, metilación y alquilación. Alternativamente pueden ser inducidas por modificación del componente de azúcar base o fosfato que da como resultado cualidades incompetentes en la plantilla y/o en el cebador. Los elementos adecuados incluyen ARN y análogos de ARN, tales como ácido nucleico bloqueado (LNA), morfolino, ácido nucleico peptídico (PNA) y otras modificaciones de ácidos nucleicos que permiten la hibridación. Estos oligonucleótidos difieren, ya que tienen un azúcar de cadena principal diferente pero aún se unen de acuerdo con el apareamiento de Watson y Crick con ARN o ADN, pero no pueden amplificarse ya que la polimerasa es incapaz de reconocerlos. Es importante que el elemento sea capaz de hibridarse con su secuencia objetivo.

El DE puede ser una extensión del IO y es capaz de la rama migra en dirección 3' de la sección invasora que altera el dúplex restante y deja un área intacta del dúplex con una T_m por debajo de la temperatura ambiente, separando el dúplex de tal manera que un cebador puede unirse y extenderse. Existe una superposición afin entre el cebador en dirección 3' y el DE. Es importante que el cebador DE y el cebador en dirección 3' no pueden copiarse entre sí y, como tal, el DE no debe ser ni un cebador, ni un sustrato de plantilla para una polimerasa, es decir, no debe permitir que un cebador se una y se extienda sobre esta región más allá de su unión con el IO y sobre el IO. El extremo terminal 3' del DE puede opcionalmente tener bases espurias adicionales y/o estar bloqueado para extenderse para facilitar esto, por ejemplo, colocando una unidad no extensible en su extremo terminal 3' o añadiendo bases no afines en esta región. Típicamente, la extensión del extremo terminal 3' se bloquea incorporando uno o más de varios nucleótidos modificados. Típicamente, estos incorporarán una modificación 3' del nucleótido terminal. Ejemplos de estos nucleótidos modificados son nucleótidos didesoxinucleótidos, 3'-aminoalilo, espaciadores 3'-carbono de varias longitudes, nucleótidos incorporados en una orientación inversa (enlace 3'-3'), 3' fosfato, 3' biotina, 3' salilo, 3'-tiol. Alternativamente, el extremo terminal puede comprender nucleótidos incompatibles con la extensión, que es una polimerasa debido a su pobre capacidad como sustrato, tal como PNA o LNA, o ADN enlazado 2'-5' o ARN 2'-O-metil.

(ii) Se puede suministrar un oligonucleótido adicional (complemento inverso, RC) que tiene una región 3' afin a la región 3' del IO y una región 5' afin a los extremos terminales objetivo tal como se muestra en la Fig. 4 y se discute a continuación.

El complemento inverso tiene una región 3' afin a la región 3' del IO y se une a la hebra plantilla saliente en esta región. El extremo terminal 5' del CR es afin al dúplex objetivo próximo a la región de IO y sobre la hebra saliente. La región 3' debe ser lo suficientemente larga para unirse a la hebra saliente y suficientemente estable como para inducir la migración de la rama de su aspecto 5' en el dúplex proximal. Típicamente, esta región 3' tendría 10-20, preferiblemente 10-14, bases de longitud.

Es importante que no interfiera significativamente con la función del IO y puesto que es afin a este oligonucleótido puede ser preferible incluir bases que no sean sustratos de recombinasa tales como elementos 2' modificados, ARN o ARN 2'-O-metilo o PNA o LNA. Además, es útil que este oligonucleótido no sea una plantilla para una polimerasa. La región 5' debería ser capaz de la rama migra dentro del dúplex proximal en presencia de los constituyentes del sistema, de manera similar al elemento en dirección 3'. Para este fin es preferible que esta zona incluya

modificaciones que no sean un sustrato para proteínas de unión de hebra sencilla.

5 El RC está apuntando en la misma dirección que el cebador en dirección 3' y, como tal, sus interacciones con este elemento no son importantes. El RC se une a la hebra opuesta del dúplex en comparación con el elemento en dirección 3' y, como tal, el cebador en dirección 3' se superpondrá con, pero no es afín al RC. Dado que el RC es afín con parte del IO, puede ser una ventaja que el IO esté bloqueado para extenderse (por ejemplo, con bases 3' espurias o como se ha descrito anteriormente) y/o tener algunas bases adicionales en su extremo terminal 3' que no son afines con la plantilla. Esto evitará que el IO forme una unidad amplificable. Lo mismo es cierto para el extremo terminal 3' del RC y para este fin el RC puede ser bloqueado en su extremo terminal 3' para evitar adicionalmente la extensión y puede comprender algunas bases adicionales en su extremo terminal 3' que no son afines con la plantilla.

10 La Figura 3 muestra un método de amplificación en el que se usa un elemento en dirección 3' para protegerse de productos no específicos de amplificación.

15 3A: Los elementos de este sistema se muestran como I-IV. Una plantilla dúplex se muestra como líneas punteadas. I representa un cebador en dirección 5'; II un oligonucleótido intermedio (IO); III un elemento en dirección 3' (DE) que es una extensión 3' del IO y puede comprender bases no afines en su extremo terminal 3'. En contraste con el IO, este elemento en dirección 3' no es un sustrato para una polimerasa y puede no ser un sustrato para la recombinasa. IV representa un cebador en dirección 3'.

20 La base de la amplificación es similar a la mostrada en la Figura 2, pero en este sistema ambos iniciadores terminales tienen una temperatura de fusión que está por encima de la temperatura ambiente del sistema y, en consecuencia, no se amplificarán a menos que se reúnan las limitaciones de este sistema.

El cebador en dirección 5' se solapa con el IO y el cebador en dirección 3' se superpone al DE y, por lo tanto, es parcialmente afín a este elemento.

25 Todos los elementos monocatenarios del sistema se recubren con la proteína de unión monocatenaria GP32 aunque esto no es necesariamente el caso para el DE. UVSX, que es un cofactor para UVSX también cubre el IO. Los elementos recubiertos de GP32 tienen una capacidad reducida para la migración de ramificaciones. UVSX cubre de manera competente sólo el IO ya que sólo este elemento comprende una longitud suficiente para inducir el proceso.

30 3B: El IO recubierto con recombinasa invade al dúplex que funde al extremo terminal en dirección 5'. El extremo terminal en dirección 3' no se funde ya que su Tm está por encima de la temperatura ambiente y también porque UVSX se polimeriza sobre esta zona sujetando al dúplex. El cebador en dirección 5' se une, pero no se extiende inmediatamente porque su región 3' se superpone al IO y debe primero migrar de rama. Está en competencia con la hebra de la plantilla saliente atada que compite con el cebador por la unión y el sistema permanece incompetente. También es posible que el extremo terminal en dirección 3' atado pueda migrar de rama hacia atrás cerrando el dúplex original después de que la recombinasa se haya despolimerizado, pero, de cualquier manera, el sistema no se amplificará adecuadamente.

35 3C: El DE migra de rama en el dúplex en dirección 3' y ya que la Tm del dúplex en dirección 3' restante está por debajo de la temperatura ambiente, se separa. La UVSX se despolimeriza y ya que el extremo terminal en dirección 5' se une al cebador, el dúplex se separa completamente.

3D: Esto permite que el cebador en dirección 3' se una y se extienda y también le dé al cebador en dirección 5' la oportunidad de migrar de rama y extenderse creando dos copias del dúplex.

40 Particularmente, cualquier artefacto de cebador necesitaría comprender una secuencia de unión para el DE. Puesto que el DE está compuesto de elementos que no son sustratos para una polimerasa, esto no ocurre.

La Figura 4 muestra un método de amplificación que utiliza un oligonucleótido de complemento inverso de tal manera que no se pueden formar productos no específicos.

45 4A: Los elementos de este sistema se muestran como I-IV. Una plantilla dúplex se muestra como líneas punteadas. I representa un cebador en dirección 5'; II un oligonucleótido intermedio con bases no afines en su extremo terminal 3'; III complemento inverso con bases no afines en su extremo terminal 3' y IV un cebador en dirección 3'.

En este sistema ambos cebadores terminales tienen una longitud que está por encima de la temperatura de fusión crítica del sistema y, por consiguiente, no formarán artefactos no específicos a menos que el artefacto no específico sea idéntico a la plantilla objetivo.

50 El cebador en dirección 5' se superpone al IO en la misma dirección. El cebador en dirección 3' no se superpone al IO, sino que se superpone a un elemento adicional, el RC. El RC no es ni una polimerasa ni un sustrato de recombinasa y se superpone tanto al cebador en dirección 3' como al IO. Como tal, el cebador en dirección 3' comprende el extremo terminal 3' con una secuencia idéntica a una región del área 5' del RC. El RC comprende una secuencia 5' similar a la del cebador en dirección 3' y una secuencia 3' complementaria al IO.

Todos los elementos monocatenarios del sistema excepto para el DE se recubren con GP32. UVSY, que es un cofactor para UVSX, también cubre estos elementos. Los elementos recubiertos tienen una capacidad reducida para la migración de rama. UVSX cubre de manera competente sólo el IO puesto que sólo este elemento comprende una longitud suficiente para inducir el proceso.

5 4B: El IO recubierto con recombinasa invade la fusión dúplex del extremo terminal en dirección 5' puesto que está por debajo de la temperatura crítica. El extremo terminal en dirección 3' no se funde ya que está por encima de la temperatura crítica y también porque UVSX se polimeriza sobre esta zona sujetando el dúplex. El cebador en dirección 5' se une, pero no se extiende inmediatamente porque su región 3' se superpone al IO y debe primero migrar de rama. Está en competencia con la hebra de plantilla saliente atada que compete con el cebador por la unión y el sistema permanece incompetente.

10 4C: El UVSX se despolimeriza, pero la hebra dúplex permanece parcialmente fundida. Esto permite al RC unirse al IO y luego migrar de rama dentro del dúplex en dirección 3'.

15 4D: Dado que el dúplex restante está por debajo de la temperatura crítica, se separa y desaparece. Esto permite que el cebador en dirección 3' se una y se extienda y también le dé al cebador en dirección 3' y en dirección 5' la oportunidad de migrar de rama y extenderse creando dos copias del dúplex.

Sondas

20 Cualquiera de los métodos descritos anteriormente puede comprender además controlar la amplificación midiendo una señal detectable. El sistema de detección puede estar unido a uno o más oligonucleótidos que forman parte del sistema de amplificación. El sistema de detección puede ser fluorogénico. Una secuencia puede ser generada durante la amplificación que es afín con el sistema generador de señales.

25 Numerosos sistemas de detección basados en sonda son conocidos en la técnica y se describen en otra parte, por ejemplo, el documento WO 2006/087574. Estos sistemas consisten usualmente en oligonucleótidos fluorescentes de doble marca que comprenden un par FRET de un fluoróforo y una fracción aceptora que puede ser un fluoróforo o un inhibidor fluorescente. La secuencia de unión a la sonda puede ser parte del amplicón en dirección 3' del IO como se muestra en la Figura 2 o puede ser parte de los cebadores, IO, el RC y/o el DE. Todos estos elementos pueden comprender bases no afines y éstas pueden diseñarse de tal manera que sean capturadas por elementos exógenos para localizar unidades amplificadas. Esto es común a los sistemas de flujo lateral.

30 Los colorantes de intercalación tales como Sybr Green I y tiazol naranja son capaces de señalar el proceso general de amplificación de ADN. Alternativamente o adicionalmente puede usarse una sonda que señale la amplificación de un amplicón particular. Dado que tales sistemas basados en sondas pueden usarse para multiplexar varios procesos de amplificación en un solo tubo. Esto se logra utilizando sondas para cada sistema con diferentes tipos de salida. Esto se ejemplifica por diferentes longitudes de onda de emisión fluorescente para cada sonda. La multiplexación es también una parte importante del proceso de inclusión de controles experimentales internos negativos y positivos.

Ejemplos de sistemas de sondas incluyen los siguientes:

35 (a) Se puede unir un fluoróforo al cebador y éste se puede usar como un aceptor FRET, donde el sistema incluye un colorante de intercalación general.

40 (b) El fluoróforo puede estar unido al cebador de tal manera que existe un cambio detectable en la fluorescencia cuando el cebador se incorpora en el producto de amplificación. Esto puede conseguirse colocando dos o más fluoróforos en estrecha proximidad de manera que se autoinactiven o se inactiven al estado fundamental hasta que se incorporan en un producto de amplificación.

(c) Un fluoróforo y un fluoróforo inactivador o aceptor pueden incorporarse en el IO o su DE de tal manera que existe un cambio detectable en la fluorescencia cuando se incorpora IO en un producto de amplificación.

45 (d) Un par aceptor/inactivador de fluoróforo (FRET) se puede insertar en un elemento del sistema de amplificación de tal manera que están separados por un elemento escindible y donde las fracciones del par FRET están separadas por el elemento escindible y donde el elemento escindible se activa mediante una nucleasa específica del dúplex. Si el elemento se incorpora en un producto de amplificación, entonces la escisión de este elemento inducirá la separación completa del par FRET aumentando consecuentemente la fluorescencia del sistema. El elemento escindible puede ser parte del IO o puede ser parte del sistema cebador o un elemento adicional añadido y afín al amplicón del sistema. Cuando el elemento escindible es parte del sistema cebador entonces el elemento escindible puede estar en el extremo 5' del sitio de unión del cebador o en el extremo 3' del sitio de unión del cebador. Si el elemento escindible se coloca en el extremo 3' de la región de unión de las fracciones, entonces puede ser ventajoso situar bases no afines de tres cebadores en el elemento escindible y estas bases pueden comprender la unión ya sea del fluoróforo o de un aceptor/inhibidor. Un cebador con estas cualidades puede ser diseñado de tal manera que no forme parte del sistema de amplificación de la plantilla, pero se incluirá en cualquier amplificación artefacto. Un cebador con estas cualidades puede utilizarse como un control negativo, por ejemplo, cuando tiene un área afín al IO en o cerca de su extremo terminal 3', dando como resultado los artefactos descritos en la Figura 5.

- La enzima de escisión se ejemplifica mediante una RNasaH o 8-oxoguanina o una endonucleasa abásica. Típicamente, el elemento escindible comprenderá ARN, 8-oxoguanina o un sitio abásico. La familia de enzimas RNasaHIII que incluye aquella de *T. kodakaraensis* reconoce un único sustrato de ARN en un dúplex ADN-ARN y permite que se inserte una única base de ARN en su elemento afín. Además, la enzima de escisión puede ser una
- 5 exonucleasa 5'- ' tal como el gen 6 T7 y en este caso el sistema está protegido de la acción de esta enzima mediante la aplicación de elementos fosforotioato excepto el aspecto 5' del oligonucleótido que contiene el fluoróforo que se escinde.
- Cuando el elemento escindible se inserta en el cebador entonces puede estar en el lado 5' del sitio de unión de la plantilla del cebador o 3' a este sitio. Cuando la base escindible está en el extremo 3' del sitio de unión del cebador
- 10 entonces puede colocarse sobre la última base afín o cualquiera de los lados de esta base. Todas las bases 3' de este elemento pueden ser no afines a la plantilla y el extremo terminal 3' puede ser bloqueado para extenderse hasta que actúe sobre la RNasaH u otras endonucleasas. Claramente, es importante que después de la escisión el donador o aceptor de fluoróforo se elimine de la proximidad de su compañero y esto se consigue asegurando que la temperatura de fusión en un lado de la unidad de escisión esté por debajo de la temperatura ambiente del sistema.
- 15 (e) El fluoróforo y el fluoróforo inactivador o aceptor pueden incorporarse en diferentes elementos de tal manera que existe un cambio detectable en la fluorescencia cuando se incorpora en una unidad de amplificación.
- Ejemplos
- Protocolo
- Reactivos y soluciones:
- 20 UVSX y UVSY se purificaron tal como se describió anteriormente (Timothy Formosa y Bruce M. Alberts, JBC Vol. 261, 6107-6118, 1986).
- RNasaHIII-KOD-I se purificó como se describió previamente (Haruki M., et al., J. Bacteriol, 1998 diciembre 1980 (23): 6207-14).
- Los ensayos se ensamblaron a partir de los siguientes concentrados.
- 25 Regulador de magnesio. Tris 100 mM, acetato de Mg 100 mM; DTT 20 mM; PH 8,0
- (di- Tris-) Fosfocreatina 500 mM (Sigma) pH hasta 7,8 con hidróxido de amonio.
- DTT 200 mM en H₂O
- BSA 100x (10 mg/mL) en H₂O
- Sal disódica de ATP 100 mM (Jena Biosciences) en H₂O
- 30 DNTP 10 mM (Sigma D7295)
- PEG 1000 al 50% (p/v) (Fluka) en H₂O
- Sacarosa 2 M (Fluka) en H₂O
- Creatina quinasa, Tipo I a partir de músculo de conejo (Sigma C3755) disuelta en 10 u/μl en glicerol al 40%/KAc 50 mM pH 8
- 35 Mioquinasa, de músculo de pollo (Sigma M3003)
- Disuelto hasta 9 u/μL (200x) en glicerol al 40%/H₂O
- Pirofosfatasa (Sigma 11643) Disuelto hasta 0,4 u/μL (200x) en glicerol al 40%/H₂O
- Sacarosa fosforilasa (Sigma S0937) Se disolvió hasta 0,4 u/μL en glicerol al 40%/H₂O
- UVSX, UVSY; 100 μM en acetato de K 300 mM; glicerol al 50%.
- 40 Gp32 (NEB, 10 mg/mL)
- Klenow, exo⁻ (Jena Biosciences, 50 u/μL) utilizado a una concentración final de 0,05 u/μL

ES 2 642 940 T3

Componente	Concentración final de reacción
Tris pH 8	10 mM
Acetato de Mg	10 mM
BSA**	0,1 mg/mL
DTT**	5 mM
DMSO**	5%
PEG 1000**	5%
Sacarosa**	150 mM
ATP	2mM
dNTP	200 µM
Sybr Green*	1:100.000
Oligonucleótidos	Como se muestra en los ejemplos
GP32	0,5 µM
Fosfocreatina (diTRIS) pH hasta 7,8 con KOH	75 mM
Creatina Quinasa	1µM
Mioquinasa**	1µM
Pirofosfatasa**	1µM
UVSY	1,5 µM
UVSX	1,5 µM
Sacarosa fosforilasa**	1µM
Klenow	0,1µM
ADN plantilla	Como se muestra en los ejemplos
** = componentes que se encuentra que optimizan, pero que no son esenciales para la amplificación.	

5 Se añadió plantilla de ensayo a una mezcla de los componentes de reacción excepto por UVSX y Klenow. Los componentes de reacción se incubaron con una muestra de ensayo durante 5 minutos a la temperatura de trabajo (40° C) y se añadieron UVSX y Klenow. Los volúmenes totales de muestra fueron de 20 µL colocados en placas de microtitulación de 384 pocillos de bajo volumen. La fluorescencia se evaluó en un BMG-fluostar-II. La fluorescencia se controló a intervalos de un minuto por excitación a 480 nm y leyendo la emisión a 520 nm para la fluorescencia Sybr Green (a menos que se indique lo contrario).

Ejemplo 1: Sistema de dos cebadores, sin oligonucleótido intermedio (sistema de la técnica anterior)

10 El protocolo utilizado es el mismo que aquel descrito anteriormente a menos que se indique lo contrario. Los constituyentes de oligonucleótidos comprendían dos cebadores a una concentración final de 150 nM junto con la plantilla A. Las configuraciones plantilla/cebador se muestran en la Figura 6A. Las concentraciones de la plantilla A eran 1 nM a menos que se indique otra cosa y la amplificación fue seguida por fluorescencia Sybr Green.

15 Los resultados se muestran en la Figura 6B. En este sistema de dos cebadores, se produjo amplificación cuando la longitud del cebador era igual o superior a 32 bases (U32 + D32; U35 + D35 y U40 + D40). No se produjo ninguna amplificación con los cebadores de 23 y 20 bases (U23 + D23 y U20 + D20). Los artefactos del dímero de cebador ocurrieron como se muestra para los cebadores de 40 bases (sin plantilla). Estos artefactos surgieron generalmente al mismo tiempo que las concentraciones de plantilla de 10 pM y esto limitó la sensibilidad de la técnica a este nivel.

Ejemplo 2: Sistema de tres cebadores (utilizando dos cebadores y un oligonucleótido intermedio no extensible)

20 El protocolo utilizado es el mismo que el descrito anteriormente a menos que se indique lo contrario. Las configuraciones plantilla/oligonucleótido/cebador se muestran en la Figura 7A. Los cebadores fueron U16 y D16

utilizados a una concentración de 200 nM cada uno. Las concentraciones de oligonucleótidos intermedio fueron 150 nM y las concentraciones de plantilla fueron 100 fM. La señal fue producida por fluorescencia Sybr Green.

5 La Figura 7B muestra la amplificación del sistema de tres oligonucleótidos configurado como se muestra en la Figura 7A usando cebadores en dirección 5' y en dirección 3' U16 y D16 respectivamente. La amplificación se consigue con cebadores de 16 bases de longitud y es dependiente del oligonucleótido no extensible (IO). El sistema es menos propenso a los artefactos. Los cebadores de 16 pares de bases son capaces de amplificar si el oligo intermedio es afín (IO1 + cebadores + plantilla 1; IO2 + cebadores + plantilla 2). Los cebadores no se amplificarán solos (cebadores solamente); ni amplificarán intermedios solamente (sin cebadores). Los artefactos pueden ocurrir en ausencia de plantilla en algunos sistemas limitando la sensibilidad hasta entre 1 y 10 fM produciendo una sensibilidad mil veces mayor que un sistema de dos cebadores.

Ejemplo 3: Los cebadores en un sistema tripartito deben estar por debajo de 20 bases de longitud bajo las condiciones usadas (dependiendo de la temperatura de fusión del cebador y de la temperatura ambiente y de los agentes de desnaturalización)

15 El protocolo utilizado es el mismo que el descrito anteriormente a menos que se indique lo contrario. Se utilizaron cebadores de varias longitudes a una concentración de 200 nM cada uno. Se usó oligonucleótido intermedio (IO1) a 150 nM y la concentración de la plantilla fue 100 fM. La señal fue producida por fluorescencia Sybr Green.

Los resultados se muestran en la Figura 8. Los cebadores de 12, 14 y 16 bases amplificaron eficientemente. El conjunto de cebadores de 18 bases amplificó menos eficientemente y el conjunto de cebadores de 20 bases no se amplificó y por lo tanto no formaría artefactos.

20 Ejemplo 4: Los artefactos pueden ser anulados usando elementos en dirección 3' metilados en el oligonucleótido intermedio

25 El protocolo utilizado es el mismo que el descrito anteriormente a menos que se indique lo contrario. Las configuraciones plantilla/oligonucleótido/cebador se muestran en la Figura 9A. Se usaron cebadores a una concentración de 300 nM cada uno. Se usó oligonucleótido intermedio (IO1) a 150 nM y la concentración de la plantilla fue 10 pM. La señal fue producida por fluorescencia Sybr Green.

30 En el sistema de tres cebadores los cebadores más largos (20 pares de bases) son incapaces de amplificar (IO1 + U20 + D20 y IO1met + U20 + D20) ya que las regiones en dirección 5' y en dirección 3' del oligonucleótido intermedio invasor son demasiado largas para separar y permitir que los cebadores se unan. Además, después de que se completa el evento de unión del oligonucleótido intermedio y la recombinasa se despolimerice (se desprende del oligonucleótido), el dúplex, que no está completamente separado, tiende a cerrarse de nuevo mediante migración de rama.

Si el cebador en dirección 3' es largo y el cebador en dirección 5' es corto, entonces la amplificación es lenta (IO1 + U16 + D20) pero visible. Esto se debe a que la región en dirección 5' se separa cuando el IO invade permitiendo que el cebador en dirección 5' se una, pero tiene que competir con el dúplex parcialmente atado durante la extensión.

35 Si el cebador en dirección 5' es largo, pero se superpone al intermedio, entonces también se observa alguna amplificación lenta con un cebador largo en dirección 3' (IO1 + U20superpuesto + D20). Esto se debe a que, aunque el cebador es largo, la región de la plantilla amplificada en dirección 5' del IO permanece corta (véase la Figura 9A).

40 Si el cebador en dirección 3' es largo y un elemento en dirección 3' metilado se incorpora en el intermedio (IO1met + U16 + D20 y IO1met + U20superpuesto + D20) entonces la tasa de amplificación se incrementa hasta aquella similar a un cebador en dirección 3' corto. Esto se debe a que la región metilada del IO migra de rama en la región en dirección 3' del dúplex, acortando el dúplex restante, separando la hebra de dúplex lo que permite que el cebador se una y libere la extensión del cebador en dirección 5' de la competición con una plantilla parcialmente atada. El elemento metilado debe ser afín y, por tanto, capaz de migrar de rama ya que IO1Met2 + U20superpuesto + D20 no muestra amplificación acelerada. Este es el caso incluso cuando el cebador en dirección 5' es largo si se superpone al intermedio (IO1met + U20superpuesto + D20).

45 A pesar de la rápida amplificación utilizando cebadores largos y el intermedio metilado, si el cebador largo en dirección 5' no se superpone al intermedio, entonces no hay amplificación ni artefactos (IO1met + U20 + D20). Es probable que esto se deba al concepto de que cuando la región en dirección 5' permanece intacta, la amplificación debe ser iniciada por el cebador en dirección 3'. La región en dirección 3' del intermedio tiende a estar cubierta en recombinasa hasta que la recombinasa se despolimeriza y consecuentemente no puede unirse al cebador hasta que la recombinasa se ha despolimerizado, momento en el que el dúplex se ha cerrado por migración de rama. Estas observaciones demuestran que es posible una rápida amplificación usando un oligonucleótido intermedio metilado y cebadores largos y se basa en una región metilada afín del intermedio. Dado que la región afín de las fracciones metiladas no son sustratos para una polimerasa, los artefactos no son posibles.

55 Ejemplo 5 - El sistema de tres oligonucleótidos puede amplificarse a partir de ADN derivado biológicamente

El protocolo utilizado es el mismo que el descrito anteriormente a menos que se indique lo contrario y el oligonucleótido son como se muestra en la leyenda y configurados como se muestra en la Figura 9A. Se usaron cebadores a una concentración de 300 nM cada uno. Se usó oligonucleótido intermedio (IO1) a 150 nM y la concentración de la plantilla fue de 1fM. La plantilla1 con una secuencia agct sensible a ALU1 adicional inmediatamente en dirección 5' del oligonucleótido se insertó en el vector plasmídico PXero-2 mediante IDT-DNA (San-Diego). La señal fue producida por la fluorescencia Sybr Green. El plásmido se escindió con ALU1 usando 0,1 µg de plásmido en 100 µL (1 nM) y se digirió durante 30 minutos a 37°C con 5 unidades de ALU1 (New England Biolabs) en regulador NEB 4. La plantilla del plásmido se diluyó posteriormente en agua como se describe en el procedimiento operativo estándar.

La amplificación de esta plantilla1 insertada en el plásmido se comparó con la de la plantilla sintética y también con el plásmido escindido inmediatamente en dirección 5' de la secuencia de la plantilla. Como se discutió anteriormente (ejemplo 4), la región de la plantilla en dirección 5' del oligonucleótido intermedio necesita ser corta para una amplificación eficiente. En un sistema biológico, la plantilla objetivo suele ser parte de una secuencia larga de ADN y el dúplex en dirección 5' del oligonucleótido intermedio puede ser más largo que el deseado para una amplificación eficiente. Esto podría efectuar el primer ciclo de amplificación en tales sistemas a menos que la plantilla se caliente antes de la amplificación, haciendo que la plantilla sea de hebra sencilla. La importancia de esta cuestión se evaluó utilizando ADN plasmídico.

Los resultados se muestran en la Figura 10. Hubo un retraso de varios minutos para la amplificación del plásmido y un retardo menor cuando el plásmido se escindió en dirección 5' de la plantilla. Puede ser que el superbobinado negativo del plásmido facilite la primera ronda de amplificación, sin embargo, un plásmido escindido en dirección 3' de la plantilla también produjo amplificación después de un retardo similar. Alternativamente, la aspiración ocasional del dúplex puede haber permitido la amplificación después de un retraso. Se observó la amplificación del control sin plantilla, pero esto fue después de que se hubiera detectado una sola molécula de la plantilla. Es probable que la porción metilada de IO1 se copiara a una velocidad muy lenta por la polimerasa formando eventualmente un artefacto. Había solamente una base metilada única entre la superposición del terminal del cebador con la región metilada del producto intermedio y la porción de ADN del producto intermedio que pudo haber permitido una lectura eventual en esta área. En experimentos posteriores el número de bases entre el cebador y la porción de ADN del intermedio se aumentó para evitar toda amplificación artefacto.

Ejemplo 6: La sensibilidad del sistema usando un intermedio metilado puede estar al nivel de una sola molécula

El protocolo utilizado es el mismo que el descrito anteriormente a menos que se indique lo contrario. Los oligonucleótidos utilizados fueron U20superpuesto, plantilla1, IO1metextra y D20retroceso. Esta configuración se usó para evitar cualquier evento de amplificación artefacto ya que el IO1metextra comprende bases adicionales de ARN 2' metiladas en comparación con IO1met que disminuye adicionalmente la oportunidad del cebador en dirección 3' para copiar a través de las bases adicionales 2'-metiladas hasta el punto en que esto se vuelve poco plausible. La configuración del oligonucleótido se muestra en la Figura 9A. La señal fue producida por la fluorescencia Sybr Green.

Los resultados se muestran en las Figuras 11A y 11B. En la Figura 11A se utilizó el intermedio a 75 nM mientras que en la Figura 11B se utilizó el intermedio a 150 nM. Las concentraciones de cebador fueron de 200 nM. En la Figura 11A se añadieron 1 millón, 1000 y cien moléculas. En la Figura 11B, el ensayo comprendía la adición de 10, 5, 0,5, 0,05 y 0 moléculas de plantilla 1 a cada ensayo de tal manera que 0,5 moléculas tuvieran 1/2 probabilidad de contener una sola molécula. Se prepararon tres muestras de cada concentración y se mostraron los resultados. Todas las muestras con 10 y cinco moléculas amplificadas. Una de las tres muestras que tenían 1/2 probabilidad de contener una molécula amplificada (la muestra con amplificación retrasada). No se amplificaron otras muestras.

Ejemplo 7 - Los agentes de aglomeración pueden mejorar la cinética del sistema

El protocolo utilizado es el mismo que el descrito en el Ejemplo 1 a menos que se indique lo contrario. Los oligonucleótidos son como se muestra en la leyenda y configurados como se muestra en la Figura 9A. Los cebadores fueron U16 y D16 utilizados a una concentración de 200 nM cada uno. Las concentraciones de oligonucleótidos intermedios (IO1) fueron 150 nM y la concentración de la plantilla 1 fue 100 pM. La señal fue producida por la fluorescencia Sybr Green.

Los resultados se muestran en la Figura 12. El sistema era viable sin agentes de aglomeración, pero amplificado de manera más eficiente en presencia de diferentes tipos de PEG o albúmina como se ha informado previamente (Reddy MK et al., *Methods Enzymol*, 1995, 262: 466-76, Lavery P et al., *JBC* 1992, 26713, 9307-9314, WO2008/035205).

Ejemplo 8: La amplificación puede ser interrogada mediante sondas en lugar de Sybr Green con el fin de multiplexar la reacción o con el propósito de incorporar controles positivos y negativos

El protocolo utilizado es el mismo que el descrito en el Ejemplo 1 a menos que se indique lo contrario. Los oligonucleótidos utilizados fueron U20superpuesto (200 nM), plantilla 1, IO1met (75 nM) y una mezcla de D20 y D20 sonda a las concentraciones de 100 nM cada uno. La concentración de la plantilla fue de 100 fM. La configuración

del oligonucleótido se muestra en la Figura 9A. RNasaH de *T. Kodakaraensis* se añadió a una concentración final de 1 nM junto con los otros componentes. El sistema se excita y se lee a 480/520 nm para evaluar la amplificación o 540/600 nm para interrogar la escisión de la sonda. La sonda se incorporó como parte del sistema de cebadores en dirección 3'. El cebador comprendía una región afin de la plantilla, una base de ARN y una región no afin bloqueada en su extremo terminal 3'. La base de ARN se escindió mediante RNasaHIII cuando el cebador se unió a la plantilla permitiendo que el cebador se extendiera. Dado que el cebador comprendía un inactivador y un fluoróforo a cada lado de la base de ARN, se separaron por escisión de la base de ARN produciendo una señal. La Figura 13 muestra tanto la señal producida por Sybr Green como la señal inducida por la sonda.

- 5
- 10
- 15

Secuencias

U40	GTTACGATTGTCCTAATGGAGAGTGAGTTGTGATGATGTC
U35	GATTGTCCTAATGGAGAGTGAGTTGTGATGATGTC
U32	TGTCCTAATGGAGAGTGAGTTGTGATGATGTC
U23-superpuesto	GAGTTGTGATGATGTC ATTCGCA
U23	CGAGAGTGAGTTGTGATGATGTC
U20	GAGTGAGTTGTGATGATGTC
U18	GTGAGTTGTGATGATGTC
U15	AGTTGTGATGATGTC
U12	TGTGATGATGTC
D40	TCTGGCATGTTACAAGGTCAAGATGAACCAACCACTTATA
D35	CATGTTACAAGGTCAAGATGAACCAACCACTTATA
D32	GTTACAAGGTCAAGATGAACCAACCACTTATA
D23	TCAAGATGAACCAACCACTTATA
D20	AGATGAACCAACCACTTATA
D18	ATGAACCAACCACTTATA
D16	GAACCAACCACTTATA
D14	ACCAACCACTTATA
D12	CAACCACTTATA
D20retroceso	GGTCAAGATGAACCAACCAC

X = base bloqueada que comprende un espaciador 3' amino-6-carbono -

- 20 X = ARN 2'-O-metilo

X = base de ARN

TQ es una T unida a un BHQ2

TF es una T unida a tetrametilrodamina (TAMRA)

ES 2 642 940 T3

IO1 TGAGCATAGACGGC
ATTCGCAGATCCAGTCAGCAGTTCTTCTCACTCTTCAA

IO2 GAGGCTAAGGAAT
ACACGCAAAGGCGGCTTGGTGTCTTTTCAGTTCTTCAA

IO1met TGAGCATAGACGGC
ATTCGCAGATCCAGTCAGCAGTTCTTCTCACTCTTCAA *GTATAG*

IO1met extra TGAGCATAGACGGC
ATTCGCAGATCCAGTCAGCAGTTCTTCTCACTCTTCAA *GTATAAGTGGGA*

IO1met2 TGAGCATAGACGGC
ATTCGCAGATCCAGTCAGCAGTTCTTCTCACTCTTCAA *TTCTAG*

Plantilla A GTTACGATTGTCCTAATGGAGAGTGAGTTGTGATGATGTC
CTGTATAAGTGGTTGGTTCATCTTGACCTTGTAACATGCCAG

Plantilla 1 GTTACGATTGTCCTAATGGAGAGTGAGTTGTGATGATGTC
ATTCGCAGATCCAGTCAGCAGTTCTTCTCACTCTTCAA
GTATAAGTGGTTGGTTCATCTTGACCTTGTAACATGCCAG

Plantilla 2 GTTACGATTGTCCTAATGGAGAGTGAGTTGTGATGATGTC
ACACGCAAAGGCGGCTTGGTGTCTTTTCAGTTCTTCAA
GTATAAGTGGTTGGTTCATCTTGACCTTGTAACATGCCAG

D20sonda AGATGAACCAACCAC(TQ)TATATTT(TF)TTT
D20sonda2 T(TF)TTTTTAGA(TQ)GAACCAACCCTTATA

Listado de secuencias

- <110> GeneForm Technologies
- 5 <120> Amplificación isotérmica del ácido nucleico
- <130> HB/P41597WO
- <150> GB0810650.2
- <151> 2008-06-11
- <160> 30
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 40
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 15 <220>
- <223> cebador U40
- <400> 1
- gttacgattg tcctaattgga gagtgagttg tgatgatgtc 40
- <210> 2
- 20 <211> 35

<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador U35
5 <400> 2
gattgtccta atggagagtg agttgtgatg atgtc 35
<210> 3
<211> 32
<212> ADN
10 <213> Artificial
<220>
<223> cebador U32
<400> 3
tgtccta atg gagagtgagt tgtgatgatg tc 32
15 <210> 4
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
20 <223> cebador U23-superpuesto
<400> 4
gagttgtgat gatgtcattc gca 23
<210> 5
<211> 23
25 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador U23
<400> 5
30 cgagagtgag ttgtgatgat gtc 23
<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
35 <220>
<223> cebador U20
<400> 6

gagtgagttg tgatgatgc 20
<210> 7
<211> 18
<212> ADN
5 <213> Artificial
<220>
<223> cebador U18
<400> 7
gtgagttg atgatgc 18
10 <210> 8
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
15 <223> cebador U15
<400> 8
agttgatg atgc 15
<210> 9
<211> 12
20 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador U12
<400> 9
25 tgtgatg tc 12
<210> 10
<211> 40
<212> ADN
<213> Artificial
30 <220>
<223> cebador D40
<400> 10
tctggcatgt tacaaggta agatgaacca accactata 40
<210> 11
35 <211> 35
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador D35
<400> 11
catgtacaa ggtcaagatg aaccaaccac ttata 35

5 <210> 12
<211> 32
<212> ADN
<213> Artificial
<220>

10 <223> cebador D32
<400> 12
gttacaaggt caagatgaac caaccactta ta 32
<210> 13
<211> 23

15 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador D23
<400> 13

20 tcaagatgaa ccaaccactt ata 23
<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> cebador D20
<400> 14
agatgaacca accactata 20
<210> 15

30 <211> 18
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador D18

35 <400> 15
atgaaccaac cactata 18
<210> 16

<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
5 <223> cebador D16
<400> 16
gaaccaacca ttata 16
<210> 17
<211> 14
10 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador D14
<400> 17
15 accaaccact tata 14
<210> 18
<211> 12
<212> ADN
<213> Artificial
20 <220>
<223> cebador D12
<400> 18
caaccactta ta 12
<210> 19
25 <211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador D20retroceso
30 <400> 19
gtcaagatg aaccaaccac 20
<210> 20
<211> 52
<212> ADN
35 <213> Artificial
<220>
<223> oligonucleótido IO1

- <220>
<221> base modificada
<222> (52)..(52)
<223> base bloqueada que comprende espaciador 3' amino-6carbono
- 5 <400> 20
tgagcataga cggcattcgc agatccagtc agcagttctt ctactcttc aa 52
<210> 21
<211> 51
<212> ADN
- 10 <213> Artificial
<220>
<223> oligonucleótido 102
<220>
<221> base modificada
- 15 <222> (51)..(51)
<223> espaciador 3' amino-6carbono
<220>
<221> base modificada
<222> (51)..(51)
- 20 <223> base bloqueada que comprende espaciador 3' amino-6carbono
<400> 21
gaggctaagg aatacacgca aaggcggctt ggtgttcttt cagttctca a 51
<210> 22
<211> 58
- 25 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> oligonucleótido IO1met
<220>
- 30 <221> ARN diversos
<222> (53)..(57)
<223> ARN 2'-O-metilo
<220>
<221> base modificada
- 35 <222> (58)..(58)
<223> base bloqueada que comprende espaciador 3' amino-6carbono
<400> 22

tgagcataga cggcattcgc agatccagtc agcagttctt ctcactcttc aagtatag 58
 <210> 23
 <211> 63
 <212> ADN
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido IO1met extra
 <220>
 <221> ARN diversos
 10 <222> (53)..(62)
 <223> ARN 2'-O-metilo
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (63)..(63)
 15 <223> base bloqueada que comprende espaciador 3' amino-6carbono
 <400> 23
 tgagcataga cggcattcgc agatccagtc agcagttctt ctcactcttc aagtataagt 60
 gga 63
 <210> 24
 <211> 58
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido IO1met2
 <220>
 25 <221> ARN diversos
 <222> (53)..(57)
 <223> ARN 2'-O-metilo
 <220>
 <221> base modificada
 30 <222> (58)..(58)
 <223> base bloqueada que comprende espaciador 3' amino-6carbono
 <400> 24
 tgagcataga cggcattcgc agatccagtc agcagttctt ctcactcttc aattctag 58
 <210> 25
 35 <211> 82
 <212> ADN

ES 2 642 940 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Plantilla A	
	<400> 25	
5	gttacgattg tcctaatagga gagtgagttg tgatgatgtc ctgtataagt ggttggttca	60
	tcttgacctt gtaacatgcc ag	82
	<210> 26	
	<211> 118	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Plantilla 1	
	<400> 26	
	gttacgattg tcctaatagga gagtgagttg tgatgatgtc attcgcagat ccagtcagca	60
	gttcttctca ctcttcaagt ataagtggtt ggttcatctt gaccttgtaa catgccag	118
15	<210> 27	
	<211> 118	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Plantilla 2	
	<400> 27	
	gttacgattg tcctaatagga gagtgagttg tgatgatgtc acacgcaaag gcggcttggt	60
	gttctttcag ttcttcaagt ataagtggtt ggttcatctt gaccttgtaa catgccag	118
	<210> 28	
	<211> 27	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> D20sonda	
	<220>	
30	<221> base modificada	
	<222> (16)..(16)	
	<223> BHQ2-base modificada	
	<220>	
	<221> ARN diversos	

- <222> (20)..(20)
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (24)..(24)
- 5 <223> Tetrametilrodamina (TAMRA) - base modificada
 <400> 28
 agatgaacca accactata tttttt 27
 <210> 29
 <211> 27
- 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> D20sonda2
 <220>
- 15 <221> base modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> Tetrametilrodamina (TAMRA) - base modificada
 <220>
 <221> ARN diversos
- 20 <222> (7)..(7)
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (11)..(11)
 <223> BHQ2 - base modificada
- 25 <400> 29
 ttttttaga tgaaccaacc actata 27
 <210> 30
 <211> 4
 <212> ADN
- 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia sensible a ALU1
 <400> 30
 agct 4
- 35

REIVINDICACIONES

1. Un kit para amplificación isotérmica de una molécula objetivo de ácido nucleico bicatenario que comprende:
- 5 (a) un cebador en dirección 5' y un cebador en dirección 3', comprendiendo cada uno una molécula de ADN monocatenario de menos de 30 nucleótidos, al menos una porción de la cual es complementaria a una secuencia de la molécula objetivo;
- (b) un oligonucleótido que comprende una molécula de ADN monocatenario de al menos 30 nucleótidos, en donde al menos una porción del oligonucleótido es complementaria a una porción de la secuencia objetivo que intervienen los cebadores en dirección 5' y en dirección 3', y en donde el oligonucleótido tiene un extremo terminal 3' no extensible;
- (c) una recombinasa;
- 10 en donde los cebadores en dirección 5' y en dirección 3' no amplifican la molécula objetivo independientemente del oligonucleótido, cuando el oligonucleótido se pone en contacto con la recombinasa, invade la molécula objetivo del ácido nucleico bicatenario, volviendo de este modo la región complementaria de la molécula objetivo y regiones adyacentes monocatenarias permitiendo de este modo que los cebadores tengan acceso a unirse al ADN monocatenario complementario sobre la molécula objetivo.
- 15 2. El kit de la reivindicación 1, en el que los cebadores en dirección 5' y en dirección 3' comprenden cada uno una molécula de ADN monocatenario de menos de 25 nucleótidos.
3. El kit de la reivindicación 1, en el que los cebadores en dirección 5' y en dirección 3' comprenden cada uno una molécula de ADN monocatenario de 15 a 23 nucleótidos.
- 20 4. El kit de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la recombinasa comprende una T4 recombinasa UvsX.
5. El kit de la reivindicación 4, en el que se incluyen proteínas accesorias de la recombinasa, tales como la proteína de unión monocatenaria gp32 y/o el agente de carga de la recombinasa UvsY.
6. El kit de cualquier reivindicación anterior, en el que el oligonucleótido facilita la separación del dúplex de la plantilla objetivo o el producto de la extensión del cebador sobre el ácido nucleico objetivo.
- 25 7. El kit de la reivindicación 6, que comprende además uno o más oligonucleótidos adicionales para facilitar la separación del dúplex objetivo mediante el oligonucleótido intermedio.
8. El kit de la reivindicación 7, en el que el oligonucleótido adicional se une a la hebra liberada por el oligonucleótido y la rama migra al ácido nucleico dúplex proximal.
- 30 9. El kit de cualquier reivindicación precedente, en el que el oligonucleótido comprende además un elemento en dirección 3' en su extremo terminal 3' que es complementario a la secuencia objetivo y que no es un sustrato de polimerasa.
10. El kit de la reivindicación 9, en el que el cebador en dirección 3' comprende una secuencia que es complementaria a la secuencia del elemento en dirección 3'.
- 35 11. El kit de cualquier reivindicación precedente que comprende además una polimerasa de desplazamiento de hebras.
12. El kit de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el cebador en dirección 5' comprende una secuencia que se solapa con el oligonucleótido.
13. El kit de cualquier reivindicación precedente que comprende además un sistema de detección para controlar la amplificación de la molécula objetivo midiendo una señal detectable.
- 40 14. El kit de la reivindicación 13, en el que el sistema de detección es:
- (a) un colorante de intercalación, preferiblemente SYBR Green, y/o
- (b) un sistema de sonda que comprende al menos un fluoróforo y opcionalmente que comprende además un inhibidor.

Fig. 1

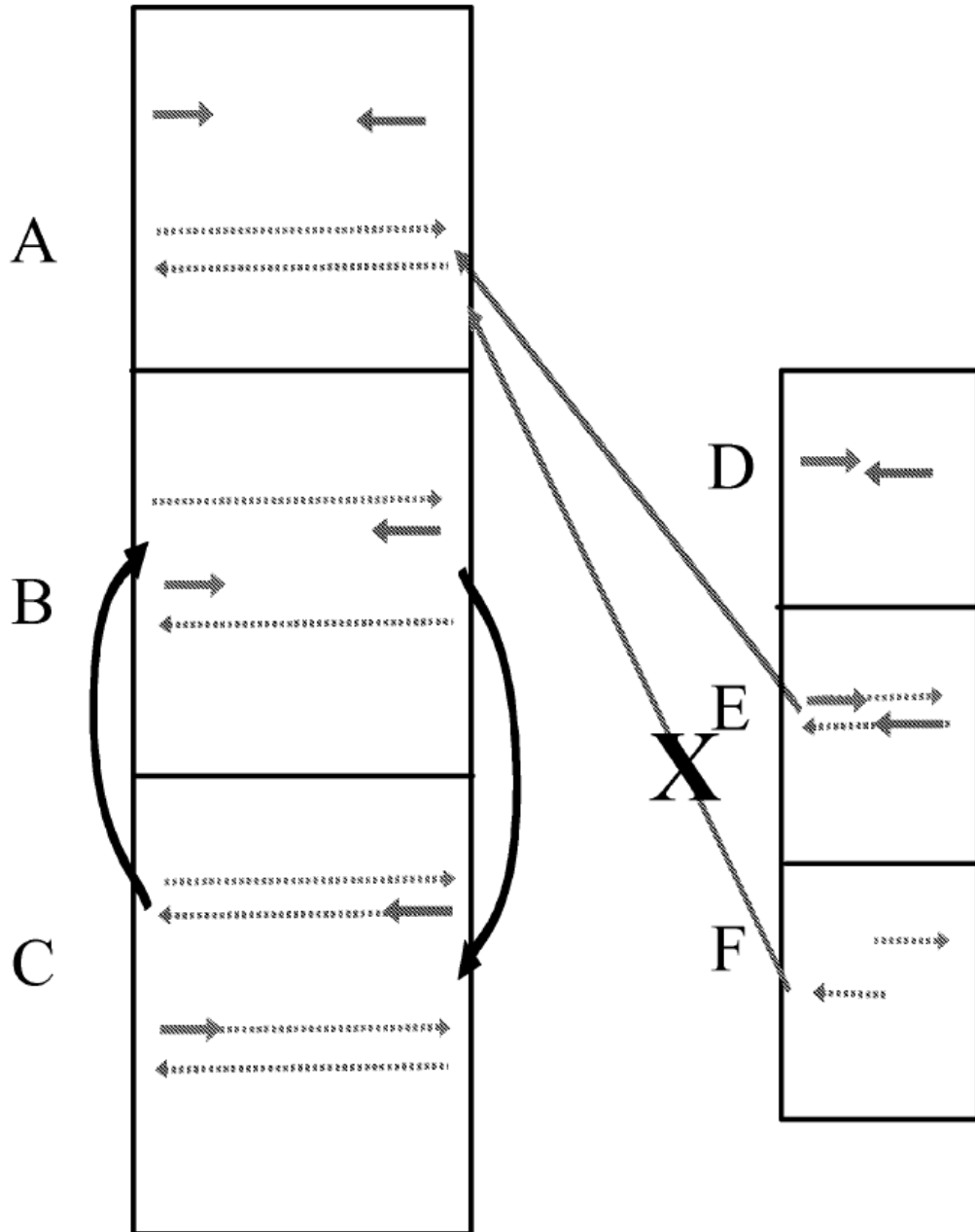


Fig. 2

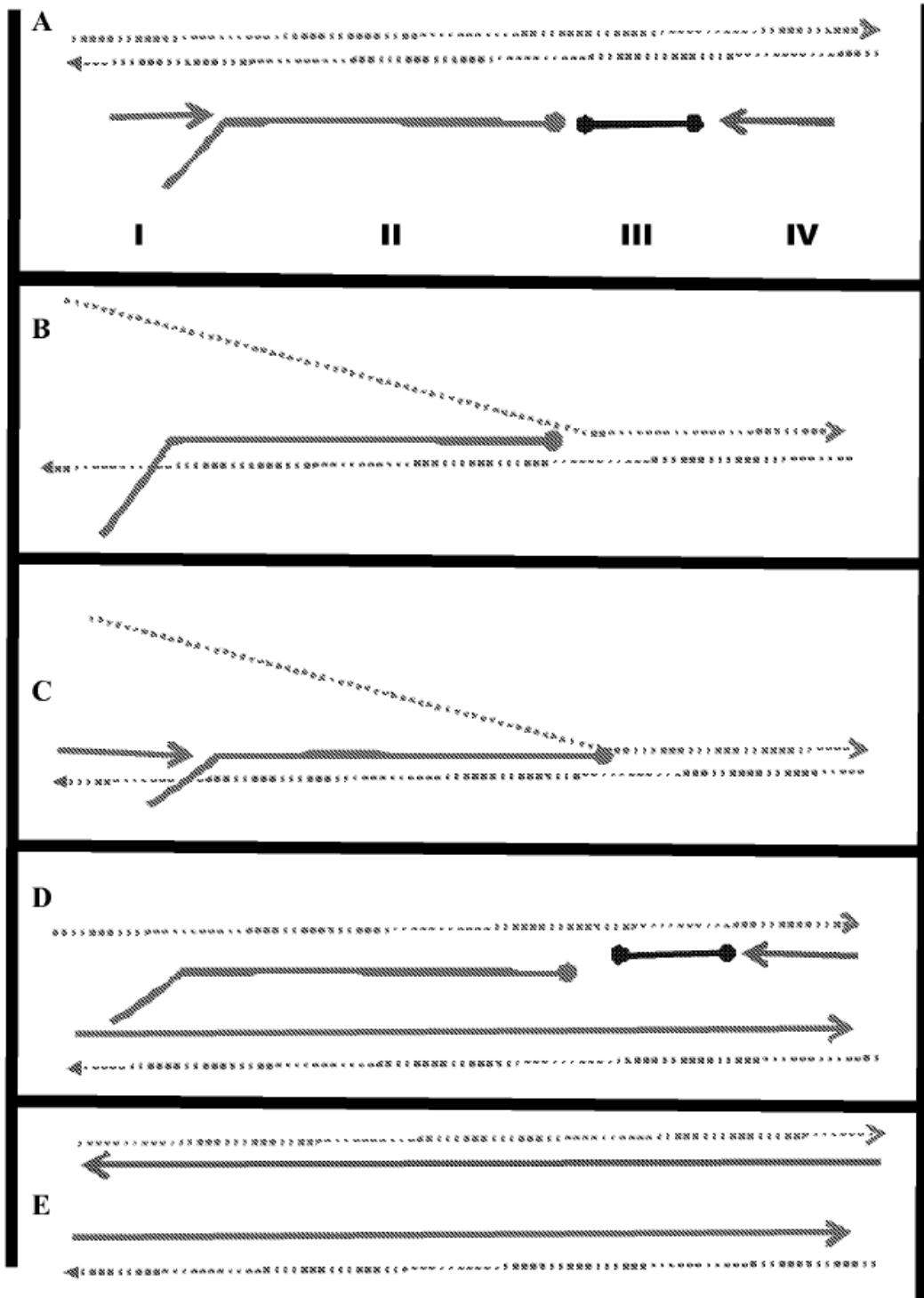


Fig. 3

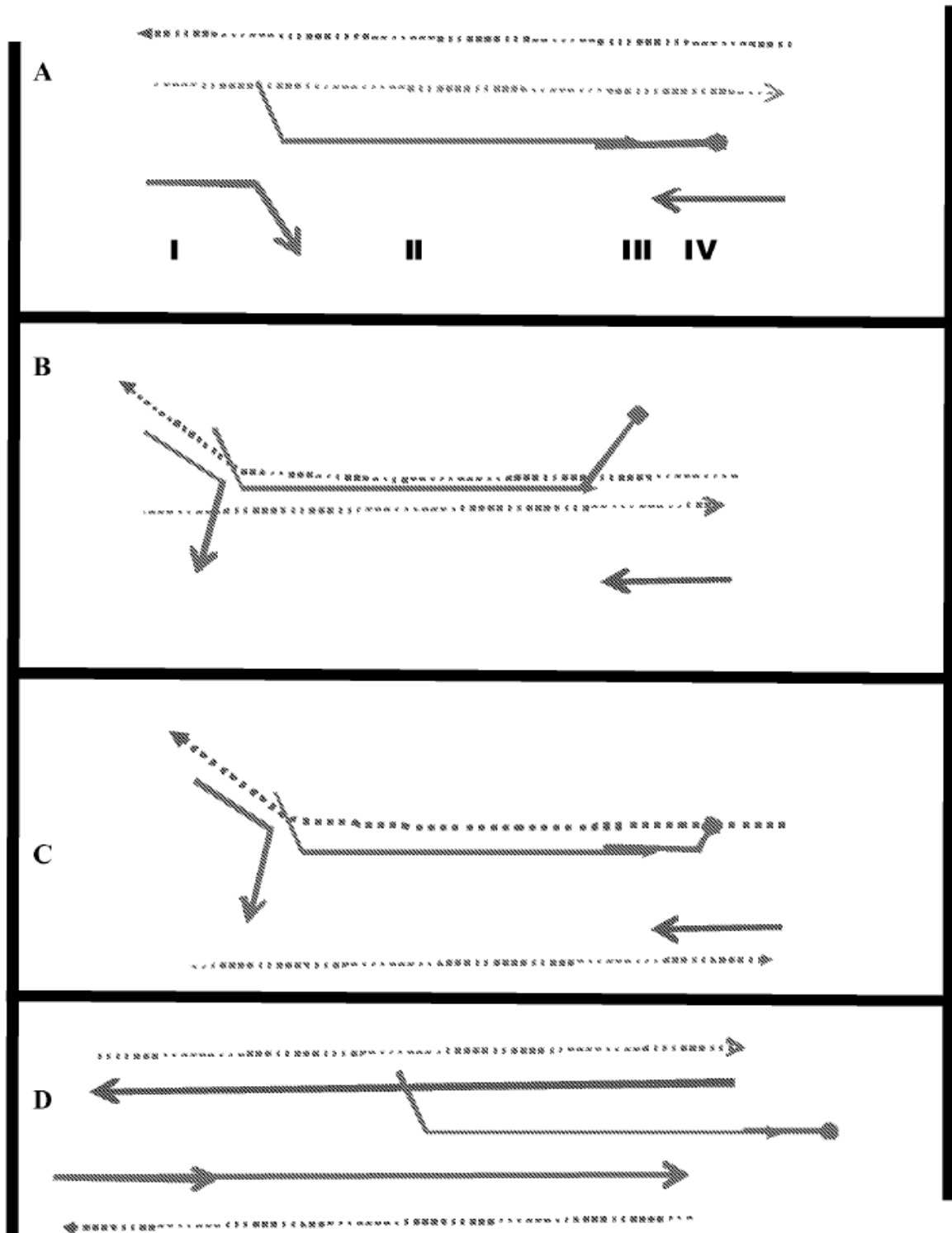


Fig. 4

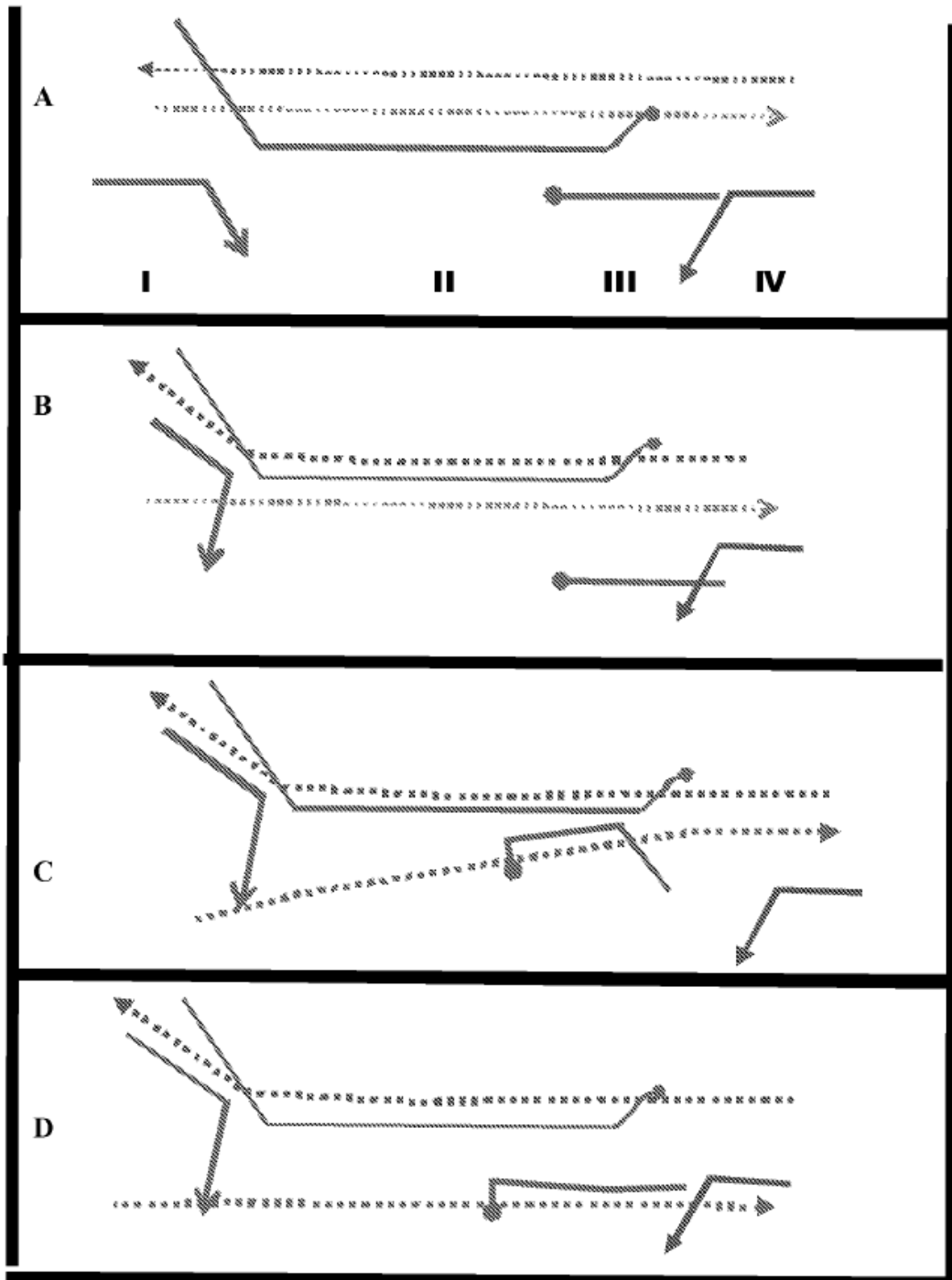


Fig. 5

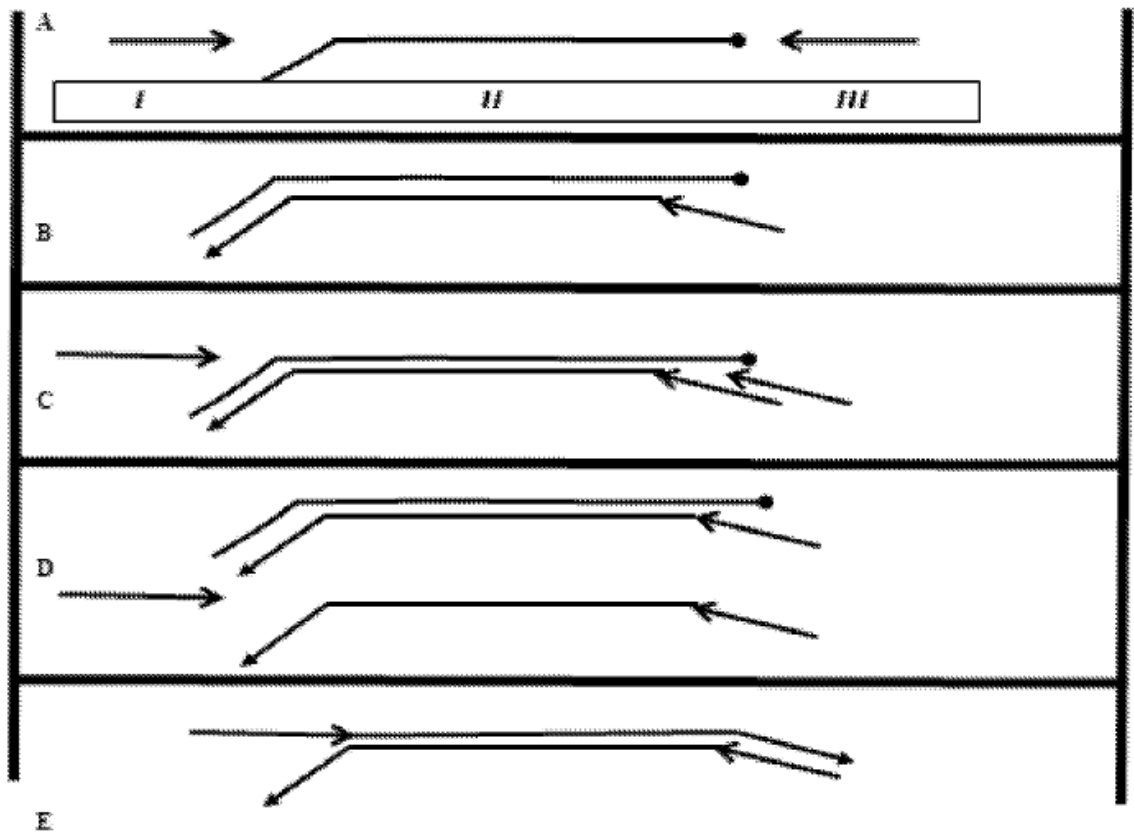


Fig. 6

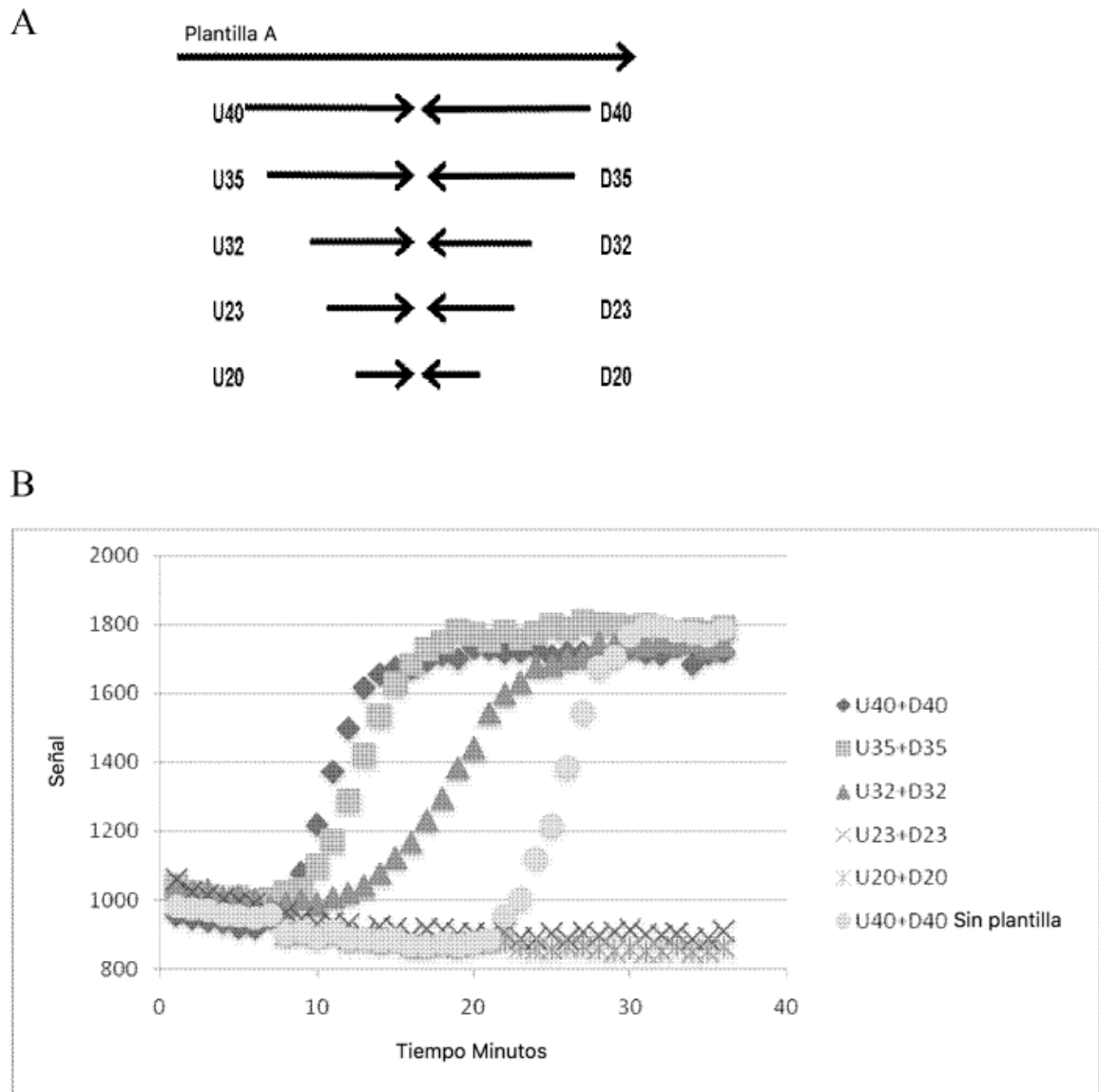
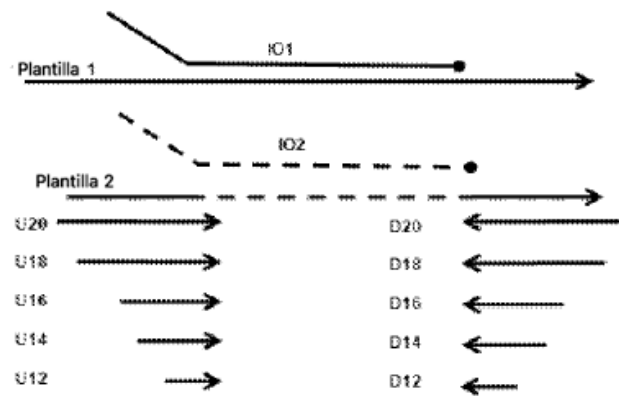


Fig. 7

A



B

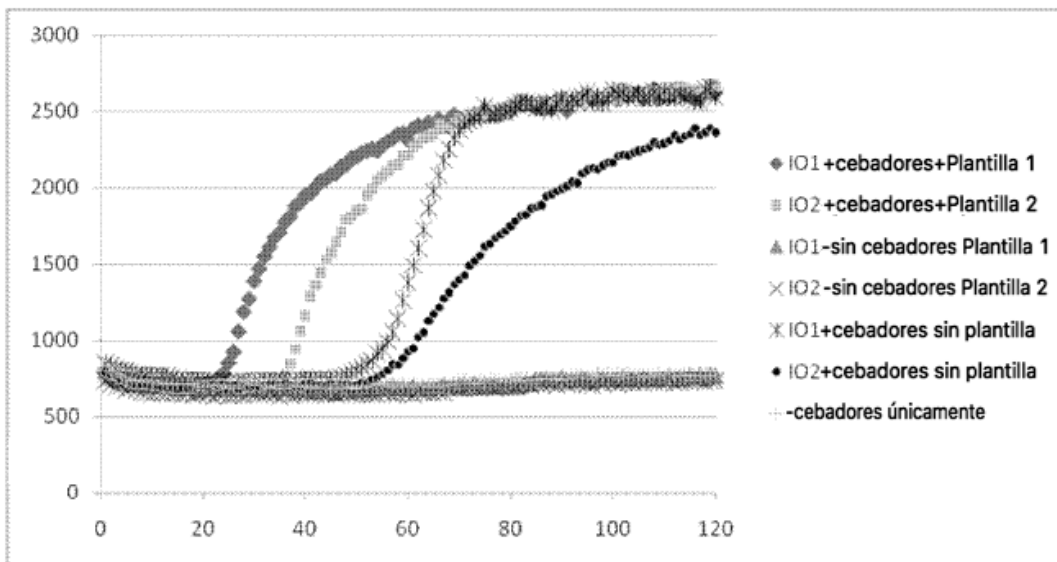


Fig. 8

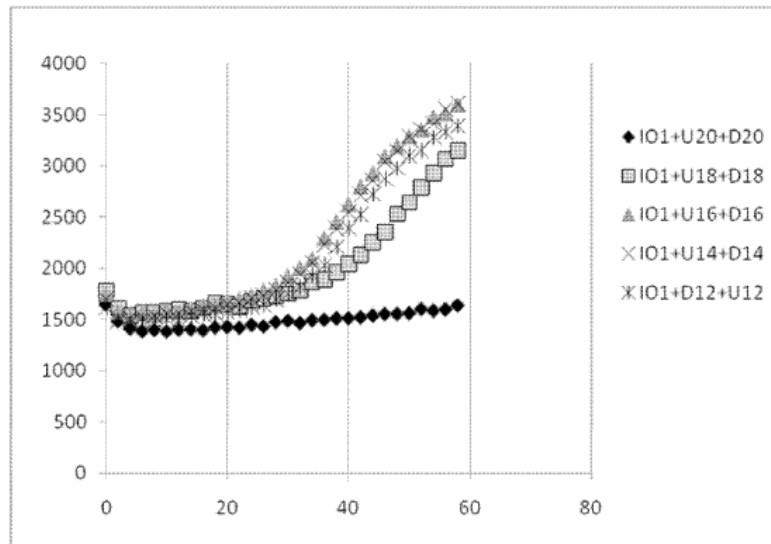
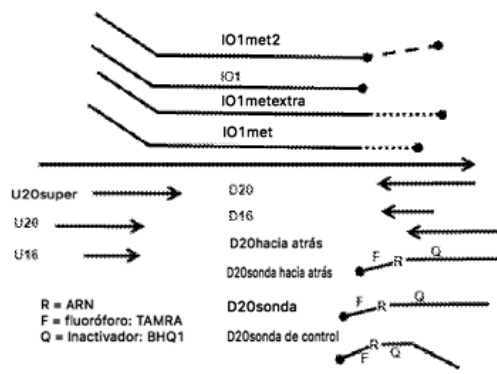


Fig. 9

A



B

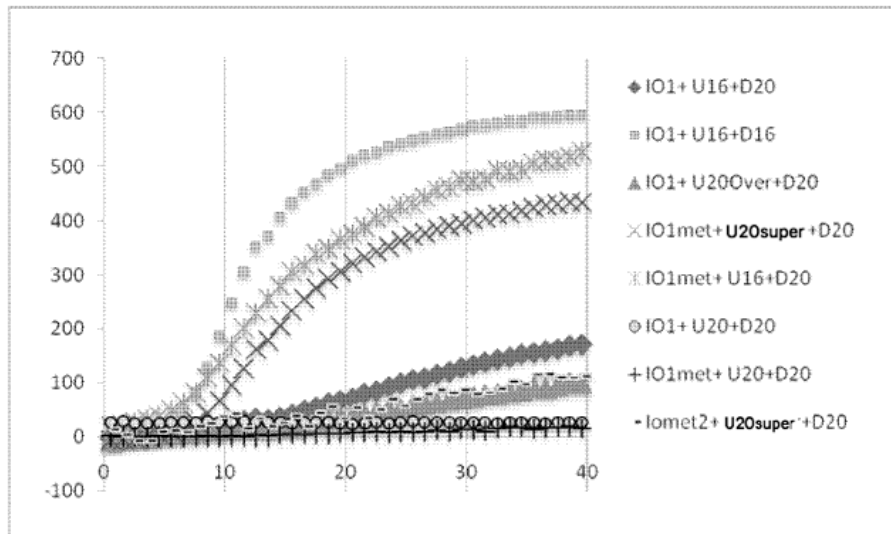


Fig. 10

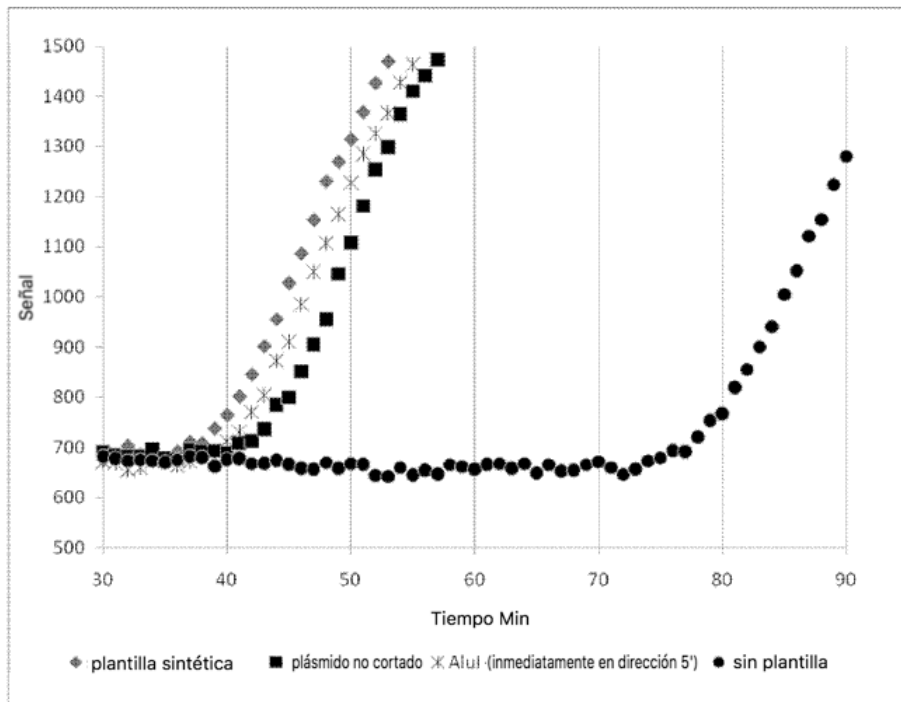


Fig. 11a

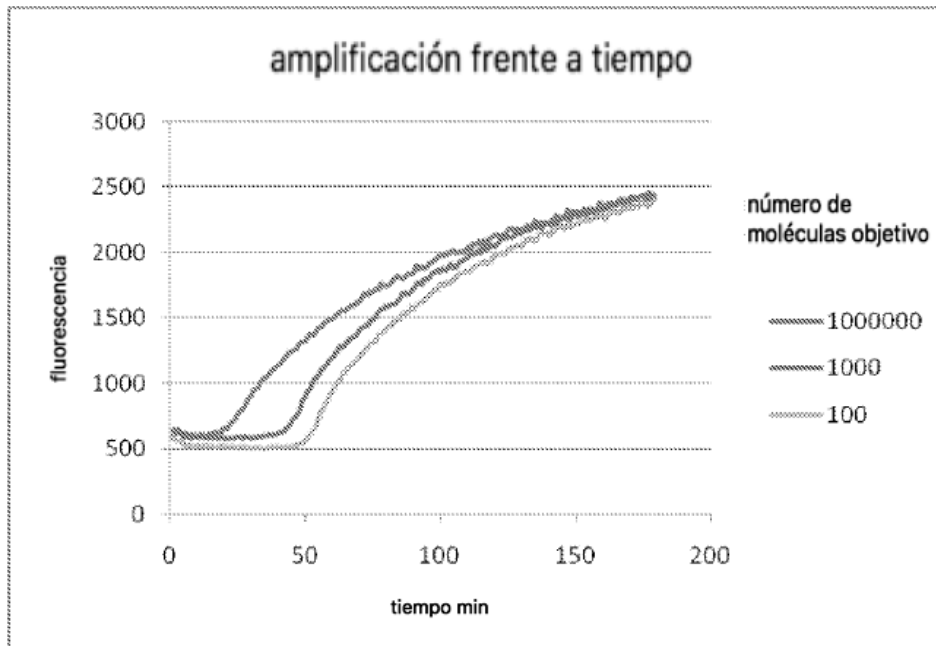


Fig. 11b

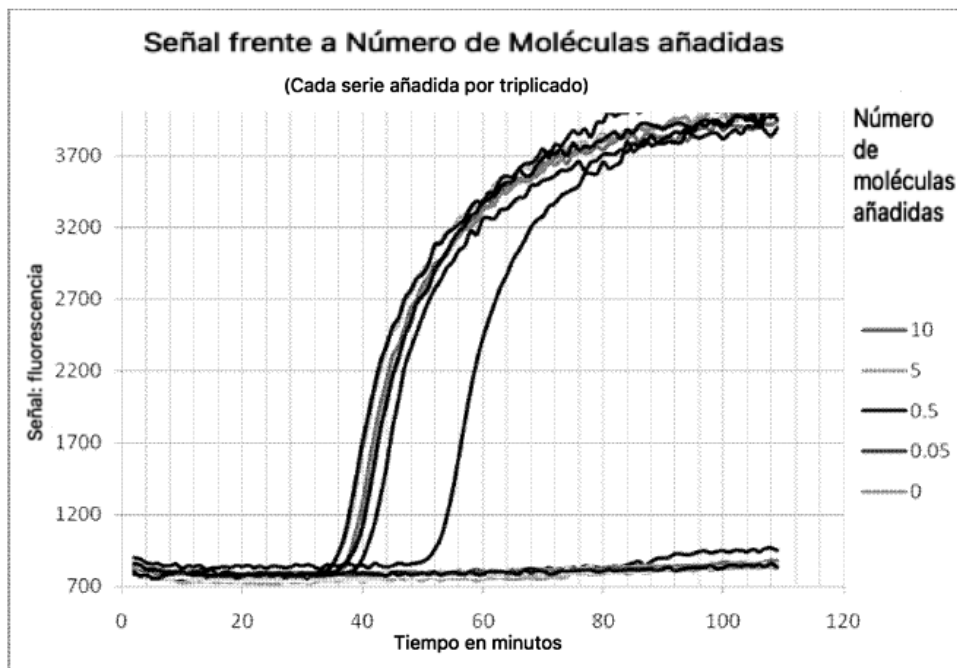


Fig. 12

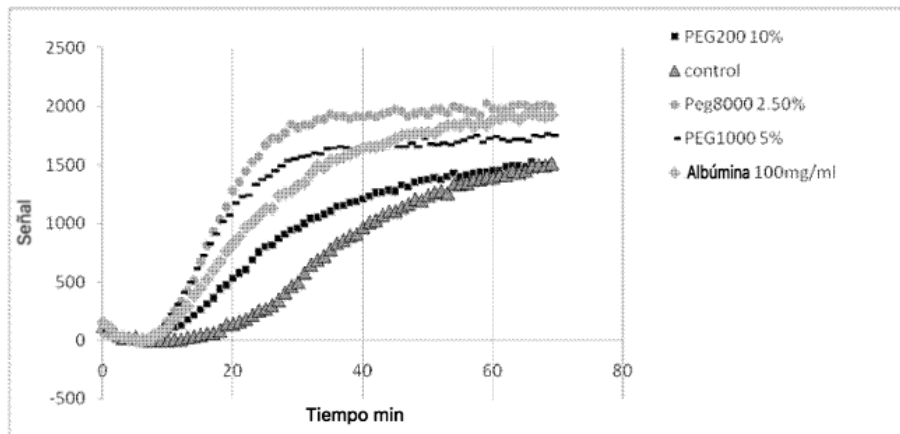


Fig. 13

