

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 718**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.01.2006 PCT/US2006/000406**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.07.2006 WO06074334**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2006 E 06717583 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 1833995**

54 Título: **Identificación de dianas de ARN usando helicasas**

30 Prioridad:

05.01.2005 US 641419 P

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

24.11.2017

73 Titular/es:

**BIOHELIX CORPORATION (100.0%)
32 TOZER ROAD
BEVERLY, MA 01915, US**

72 Inventor/es:

**KONG, HUIMIN y
TANG, WEN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 643 718 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

Identificación de dianas de ARN usando helicasas

Antecedentes

5 Es deseable la identificación de dianas de ARN usando métodos de amplificación en aplicaciones que incluyen: aplicaciones de diagnóstico de patógenos basados en ARN como los virus de ARN; y el seguimiento de los niveles de expresión génica, por ejemplo, la desregulación de genes del cáncer. Como el número de copias de transcritos de ARN de un gen expresado es generalmente mayor que el propio gen, la amplificación de dianas de ARN puede aumentar en gran medida la sensibilidad de diagnóstico para el gen y de este modo superar los problemas causados por la insuficiente sensibilidad en algunas reacciones de amplificación. Las técnicas de amplificación de ARN se describen por ejemplo en las Pat. de E.E.U.U. Nos. 5.322.770, 5.624.833, y 6.794.177. Estos métodos requieren generalmente una etapa de transcriptasa inversa seguida de una etapa de amplificación. Aunque la RT-PCR es extremadamente sensible para la detección de dianas de ARN, el formato es similar a la reacción de PCR en sí y requiere un equipo termociclador caro para su realización. (Véase, por ejemplo, Pat. de E.E.U.U. No. 6.794.177).

10 La amplificación de dianas de ARN también se puede realizar en una etapa sin ciclos de temperatura en combinación con transcripción inversa (RT) y una plataforma de amplificación isotérmica. Un ejemplo es la amplificación inversa de la transcripción por desplazamiento de cadena (RT-SDA) en la que se usan una transcriptasa inversa y la plataforma de SDA para amplificar dianas de ARN en una etapa isotérmica (Pat. de E.E.U.U. No. 5.916.779). Sin embargo, como la SDA, la RT-SDA requiere ácidos nucleicos modificados y más de un par de cebadores para una realización eficaz.

15 Se puede hacer referencia, por ejemplo también al documento WO 2004/027025 A, que se refiere a la amplificación de ácidos nucleicos dependiente de helicasa, y a E.E.U.U. 2005/0069926, que se refiere a la transcripción inversa amplificada con helicasa.

Compendio de la invención

20 Una realización de la invención incluye un método para identificar una molécula de ARN que incluye: (a) sintetizar un ADNc a partir de la molécula de ARN mediante RT para formar un dúplex de ARN/ADN; (b) separar al menos parcialmente el dúplex en un ADNc y un ARN usando una helicasa termoestable; (c) amplificar el ADNc; y (d) caracterizar el ADNc para determinar la identidad de la molécula de ARN. En ejemplos particulares del método, la RT se consigue por medio de una transcriptasa inversa o una ADN polimerasa con actividad RT. Además o alternativamente, se puede lograr la amplificación del ADNc mediante amplificación dependiente de helicasa (HDA), amplificación isotérmica mediada por bucle, amplificación en círculo rodante, amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

25 En una realización de la invención, el ARN y el dúplex de ADN/ARN se pueden reutilizar para la RT y la amplificación en un ciclo repetitivo. Se puede lograr el método completo en un tampón único en un único recipiente de reacción o alternativamente se puede lograr usando tampones separados para algunas o todas las etapas. Por ejemplo, las etapas (a) y (b) se pueden realizar en un único tampón o en diferentes tampones que pueden diferir del tampón o tampones usados para las etapas (b) y (c).

30 En una realización del método, no se añade una proteína de unión a cadena sencilla como se describe en la solicitud de patente de E.E.U.U. 2004-0058378 no se añade en la etapa (b) o (c) anteriores. Por consiguiente, el método utiliza una helicasa en una mezcla de reacción que está esencialmente libre de una proteína de unión a cadena sencilla. La helicasa termoestable tiene una actividad eficaz en ausencia de una proteína de unión a cadena sencilla.

35 En una realización de la invención, se proporciona un método para amplificar exponencialmente y selectivamente una diana de ácido nucleico que incluye: (a) proporcionar moldes de cadena sencilla del ácido nucleico diana a amplificar; (b) añadir cebadores de oligonucleótidos para hibridar con los moldes de la etapa (a); (c) sintetizar un producto de extensión de los cebadores de oligonucleótidos que son complementarios a los moldes, por medio de una ADN polimerasa para formar un dúplex; (d) poner en contacto el dúplex de la etapa (c) con una helicasa termoestable para desenrollar el dúplex; y (e) repetir las etapas (b)-(d) para amplificar exponencialmente y selectivamente el ácido nucleico diana. En un ejemplo del método, la helicasa termoestable se utiliza en ausencia de una proteína de unión a cadena sencilla.

40 En una realización de la invención, se proporciona un kit que incluye una helicasa termoestable, una transcriptasa inversa, una ADN polimerasa y un tampón que contiene al menos tres reactivos seleccionados del grupo que consiste en: una sal de magnesio, una sal de sodio, dNTP, y dATP; el kit contiene instrucciones para usar en la amplificación de un ADN en una reacción que no incluye una proteína de unión a cadena sencilla. El tampón puede tener por ejemplo un pH en el intervalo de pH 8- pH 10. En otros ejemplos del kit, la polimerasa puede ser la polimerasa Bst y/o la helicasa termoestable puede ser la helicasa Tte-UvrD.

55

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un diagrama esquemático de una reacción de RT-HDA.

La etapa 1 muestra la unión de un único cebador a un ARN diana.

5 La etapa 2 muestra la síntesis de una primera cadena de ADNc mediante RT de la diana de ARN usando una transcriptasa inversa o una polimerasa con propiedades de RT.

La etapa 3 muestra la helicasa (triángulos negros) desenrollando el dúplex de ADN/ARN en al menos los ácidos nucleicos de cadena sencilla.

10 La etapa 4 muestra la adición de al menos un segundo cebador de modo que el primer y el segundo cebador se unan a los límites de la secuencia de ácido nucleico de interés con el fin de permitir la amplificación de la secuencia de ADN entre los cebadores.

La etapa 5-1 muestra cómo el ARN de cadena sencilla desplazado o el ARN diana original sufre una reacción de RT (repetiendo las etapas 1-4).

La etapa 5-2 muestra cómo se une el cebador a la cadena sencilla de ADN (ssADN) permitiendo que se produzca la amplificación por HDA o por otro tipo de amplificación.

15 Las etapas 6-9 muestran etapas durante la amplificación.

La etapa 6 muestra cómo es desenrollado el dúplex de ADN ya sea por calor o por HDA u otros medios.

La etapa 7 muestra los cebadores uniéndose al ssADN.

La etapa 8 muestra la extensión de las ADN polimerasas a partir de los cebadores.

La etapa 9 muestra que los productos de amplificación entran en la siguiente ronda de amplificación.

20 Líneas discontinuas: ARN; Líneas gruesas sólidas: ADN; Líneas con flechas: cebadores. Triángulos negros: helicasas; rectángulos grises: transcriptasas inversas; círculos grises: ADN polimerasas.

La Figura 2 muestra los resultados del gel de electroforesis (agarosa al 2%) del ARN de GAPDH amplificado en una reacción en dos etapas.

25 Se realizó la reacción de RT-HDA de dos etapas en dos tubos de reacción diferentes. La síntesis de la primera cadena de ADNc se llevó a cabo usando el Kit ProtoScript® (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA) y 1 µg de ARN humano total. La primera cadena del producto sintetizado de ADNc se diluyó entonces y se amplificó en presencia de Tte-UvrD (helicasa) y ADN polimerasa *Bst* en un volumen total de 50 µl. Se analizaron diez µl de cada muestra en el gel. Los porcentajes de producto de primera cadena de ADNc sintetizado variaron como se indica en los carriles 2-7.

30 Carril 1: 200 ng de Escalera de ADN de Bajo Peso Molecular (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA);

Carril 2: 1%;

Carril 3: 0,1%;

Carril 4: 0,01%;

Carril 5: 0,001%;

35 Carril 6: 0,0001%;

Carril 7: 0.

La Figura 3 muestra los resultados del gel de electroforesis (agarosa al 2%) de ARN de GAPDH amplificado a partir de diferentes cantidades de ARN total humano en una reacción de dos etapas.

40 La reacción de dos etapas RT-HDA se realizó en un tubo de reacción. La RT-HDA se llevó a cabo mezclando Tte-UvrD, transcriptasa inversa M-MuLV, ADN polimerasa *Bst*, y tampón HDA termofílico (tHDA) en un tubo en un volumen total de 50 µl, se incubó a 42°C durante 5 minutos seguido por 65°C durante 60 minutos. Se analizaron 10 µl de cada muestra en el gel. Las cantidades de ARN total en los carriles 1-8 son las siguientes:

Carriles 1, 2, 3: 100 ng;

Carril 4: 10 ng;

ES 2 643 718 T3

Carril 5: 1 ng;

Carril 6: 100 ng;

Carril 7: 10 pg;

Carril 8: 0;

- 5 Carril 9: 200 ng de Escalera de ADN de Bajo Peso Molecular (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA).

Los dos primeros carriles son a partir de reacciones de control sin transcriptasa inversa o helicasa respectivamente.

La Figura 4 muestra los resultados del gel de electroforesis (agarosa al 2%) de ARN de GAPDH amplificado a partir de diferentes cantidades de ARN total humano en una reacción de dos etapas.

- 10 Se realizó la reacción RT-HDA de una etapa en un único recipiente de reacción. La RT-HDA se llevó a cabo mezclando transcriptasa inversa SuperScript™ III, Tte-UvrD (Invitrogen, Carlsbad, CA), ADN polimerasa *Bst*, y tampón tHDA en un tubo con un volumen total de 50 μ l y se incubaron a 62,5°C durante 60 minutos. Se analizaron 10 μ l de cada muestra en el gel. Las cantidades de ARN total son:

Carril 1: 200 ng de Escalera de ADN de Bajo Peso Molecular (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA);

Carril 2: 100 ng;

- 15 Carril 3: 10 ng;

Carril 4: 1 ng;

Carril 5: 100 pg;

Carril 6: 0.

- 20 La Figura 5 muestra los resultados del gel de electroforesis (agarosa al 2%) de ARN de GAPDH amplificado a partir de diferentes cantidades de ARN total humano usando una reacción de RT-HDA de una etapa modificada.

La RT-HDA se llevó a cabo mediante primero desnaturalizar la Mezcla A que contiene ARN molde y una par de cebadores específicos de GAPDH a 95°C durante 2 minutos. Se añadió después la Mezcla B que contiene transcriptasa inversa ThermoScript™, Tte-UvrD (Invitrogen, CA), ADN polimerasa *Bst* a la Mezcla A y se incubó a 65°C durante 120 minutos. Se analizaron 10 μ l en el gel. Las cantidades de ARN total son:

- 25 Carril 1: 250 ng de Escalera de ADN de Bajo Peso Molecular (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA);

Carril 2: 200 ng;

Carril 3: 20 ng;

Carril 4: 2 ng;

Carril 5: 200 pg;

- 30 Carril 6: 20 pg;

Carril 7: 2 pg;

Carril 8: 0.

- 35 La Figura 6 muestra la detección de Enterovirus usando una RT-HDA modificada de una sola etapa, varias cantidades de ARN de Enterovirus y electroforesis en gel de agarosa al 2 %. La RT-HDA se llevó a cabo como se describe en la Figura 5 usando un par de cebadores específicos de Enterovirus. Se analizaron 10 μ l en el gel. Las cantidades de ARN de Enterovirus (producto EV) son:

Carril 1: 4.000 copias;

Carril 2: 400 copias;

Carril 3: 40 copias;

- 40 Carril 4: 0.

Carril 5: 250 ng de Escalera de ADN de Bajo Peso Molecular (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA);

Descripción detallada de la invención

5 Presentes realizaciones de la invención combinan transcripción inversa de ARN con una helicasa y una etapa posterior de amplificación del ADNc resultante en un único recipiente de reacción o en una pluralidad de recipientes de reacción. La etapa de amplificación es opcionalmente una HDA pero puede alternativamente ser una reacción en cadena de la polimerasa, una amplificación isotérmica mediada por bucle o una amplificación de círculo rodante. La RT-HDA se puede realizar isotérmicamente a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 20°C-75°C, por ejemplo en el intervalo entre 60°C-65°C. En una realización de la invención, la RT-HDA se puede realizar para detectar o cuantificar ARN donde la HDA reemplaza a la PCR en los protocolos de amplificación como RT-HDA a tiempo real, RT-HDA relativa, HDA competitiva y RT-HDA comparativa.

10 El ARN se puede amplificar en una reacción o una serie de reacciones que incluyen RT, desnaturalización dependiente de helicasa termoestable y amplificación. Cuando la reacción se produce en un único recipiente de reacción, es deseable utilizar un único tampón. No se aplica esta limitación cuando se amplifica el ARN en una serie de reacciones que se producen en diferentes recipientes de reacción. Una ventaja de llevar a cabo las reacciones en un único recipiente de reacción es que las copias de ADNc de una secuencia de ARN diana actúan como un molde para la amplificación de ADN al mismo tiempo que se genera más ADNc a partir del ARN liberado del dúplex de ADN/ARN por RT.

15 En una realización de la invención, el proceso de amplificación es una amplificación dependiente de helicasa (véase solicitud de patente de E.E.U.U. 2004/0058378). En este enfoque, la amplificación puede ocurrir en presencia de una preparación de helicasa, que incluye al menos una helicasa, una fuente de energía como nucleótidos trifosfato y una proteína de unión a cadena sencilla. La preparación de helicasa se combina con ADN polimerasa, desoxirribonucleótidos y cebadores para dar lugar a la HDA. Donde se usa una helicasa termoestable, puede no requerirse una preparación de helicasa. La helicasa termoestable puede no requerir una proteína de unión a cadena sencilla pero puede combinarse con una polimerasa, desoxirribonucleótidos y cebadores para influir en la HDA (véanse Ejemplos 1-5).

20 Ejemplos de ARNs diana incluyen cualquier ARN obtenido de una célula o virus como ARN mensajero, ARN de transferencia, ARN ribosomal, ARN de doble cadena u otros ARNs que se producen en células o virus.

25 Una transcriptasa inversa adecuada para usar en realizaciones del presente método incluye cualquier enzima comercialmente disponible usada para transcriptasa inversa como M-MuLV, transcriptasa inversa del Virus de la Mieloblastosis Aviar (AMV), una transcriptasa inversa termoestable como transcriptasa inversa (SuperScript™, ThermoScript™ (Invitrogen, Carlsbad, CA), o Transcriptor (Roche, Basilea, Suiza) o una polimerasa con actividad de transcriptasa inversa como la polimerasa Tth.

30 Las helicastas para usar en realizaciones del método son enzimas capaces de desenrollar el ADN de doble cadena a temperaturas normales (mesofílicas) o elevadas (termoestables). Las helicastas son abundantes en la naturaleza y existe una extensa literatura sobre sus propiedades. Han sido identificadas en procariotas, eucariotas y arqueas y como otras enzimas, algunas son termoestables (temperatura de reacción preferida por encima de aproximadamente 60°C) mientras otras son termolábiles (temperatura de reacción preferida entre aproximadamente 20°C-37°C). Una ventaja de las helicastas termoestables como la helicasa Tte-UvrD es que no requieren una proteína de unión a cadena sencilla, que se requiere por una helicasa termolábil. Mientras que el número de ejemplos que se podrían proporcionar es extenso, la helicasa Tte-UvrD es representativa de las helicastas termoestables en general y enseña a una persona experta en la técnica cómo llevar a cabo la invención. Ejemplos de helicastas termolábiles incluyen helicastas tipo UvrD como helicasa UvrD de *E. coli*, helicasa RecBCD, y helicasa del gen 4 de T7 y helicastas termoestables como helicasa Tte-UvrD (solicitud de patente de E.E.U.U. 20040058378).

35 Ejemplos de una ADN polimerasa adecuada incluyen ADN polimerasa I del fragmento Klenow de *E. coli*, ADN polimerasa de T7 (Sequenase, USB Corporation, Cleveland, Ohio), ADN polimerasa Vent® (exo⁻) (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA), fragmento largo de la ADN polimerasa Bst, y ADN polimerasa Phusion (Finnzymes, Espoo, Finlandia). Preferiblemente, la ADN polimerasa carece de actividad exonucleasa 5' a 3' y posee actividad de desplazamiento de cadena.

40 La transcriptasa inversa, la desnaturalización inducida por helicasa y opcionalmente una HDA pueden ocurrir en un solo recipiente de reacción en un único tampón. En una realización, el tampón contiene Tris-HCl 20 mM, pH 8,3-8,8, contiene MgCl₂ 3-5 mM, KCl 10 mM, NaCl 20-40 mM, dNTP 0,4 mM, y dATP o ATP 3 mM.

45 La temperatura de la reacción está preferiblemente sesgada hacia la temperatura óptima para la reacción de la helicasa. Sin embargo, si la transcriptasa inversa es sensible al calor, se puede modificar la temperatura en consecuencia.

50 Es preferible realizar la RT-HDA en un único recipiente de reacción. En dicho sistema, se generan y se amplifican simultáneamente copias de ADNc a partir de ARN diana usando una helicasa, una transcriptasa inversa, y una ADN polimerasa. La primera cadena de ADNc se sintetiza primero por una transcriptasa inversa (SuperScript™, ThermoScript™ (Invitrogen, Carlsbad, CA), o una transcriptasa inversa Transcriptor (Roche, Basilea, Suiza) cuando

la RT y la amplificación suceden en un único recipiente de reacción (Fig. 1, etapas 1 & 2). El dúplex de ARN-ADN de la RT es desenrollado al menos parcialmente por las helicasas generando moldes de ARN y de ADN de cadena sencilla (Fig. 1, etapas 3 & 4). En una realización de la invención, la helicasa desenrolla la longitud completa del dúplex ARN/ADN. El ARN de cadena sencilla entra en una siguiente ronda de reacción de RT (Fig. 1, etapa 5-1) generando más ADNc de primera cadena. El ssADN es convertido en ADN de doble cadena por la ADN polimerasa (Fig. 1, etapa 5-2) y amplificado simultáneamente en la reacción de HDA (Fig. 1, etapas 6-9). Este proceso se repite en sí mismo para lograr la amplificación exponencial de la secuencia diana de ARN (Fig. 1). Se prefieren las helicasas que desenrollan ambos dúplex ARN-ADN y los dúplex de ADN en reacciones que ocurren en un único recipiente de reacción. Estas helicasas incluyen una helicasa UvrD u homólogo de la misma, por ejemplo una helicasa Tte-UvrD termoestable.

Alternativamente, la RT-HDA se puede llevar a cabo en dos reacciones diferentes en el mismo o diferentes recipientes de reacción. Por ejemplo, la RT puede ser ejecutada a una temperatura preferida para la transcriptasa inversa seleccionada y la amplificación se puede realizar a una temperatura preferida para la reacción de la helicasa. Un ejemplo de una reacción en dos fases implica hacer copias de ADNc usando la transcriptasa inversa M-MuLV a por ejemplo 42°C (37°C-50°C para la RT) durante aproximadamente 3-10 minutos, más particularmente 5 minutos, en una primera etapa seguida de amplificación en una segunda etapa usando la reacción de HDA termofílica a aproximadamente 62°C-66°C para la tHDA, más particularmente, aproximadamente a 65°C durante aproximadamente 60-120 minutos.

Cuando se usan dos sistemas de tampón diferentes para la RT-HDA, (uno para la RT y el otro para la etapa de amplificación), la primera cadena de ADNc se sintetiza por una transcriptasa inversa en presencia de ya sea un cebador oligo-dT o un cebador específico de secuencia complementario a la secuencia de ARN diana. En una realización de la invención, el tampón de RT en un método de dos fases es Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 10 mM. AMV: Tris-acetato 50 mM, pH 8,4, acetato potásico 75 mM, acetato magnésico 8 mM, DTT 10 mM, dNTPs, y ARN diana. A continuación se transfieren alícuotas de copias de ADNc de la reacción de RT a un segundo tampón de reacción y posteriormente se amplifican en presencia de una helicasa y una polimerasa.

Se puede caracterizar el producto de ADNc con el fin de identificar la muestra de ARN original mediante métodos que son bien conocidos en la técnica como secuenciación y comparaciones de bases de datos, hibridación que implica por ejemplo chips de ADN como el proporcionado en un chip por Nanogen, San Diego, CA y cualquier tecnología de sonda adecuada que incluye el uso de tecnología de Baliza Molecular y Taqman® (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Ejemplos

Ejemplo 1: RT-HDA en dos recipientes de reacción/de dos tampones

En este ejemplo, se usó ARN total humano como sustrato de ácido nucleico y se convierte primero en un producto de ADNc de cadena sencilla usando el Kit ProtoScript® de New England Biolabs (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA).

La reacción se estableció mediante la combinación de:

1 µl de ARN total humano (1 µg/µl)

2 µl de cebador dT₂₃VN (50 µM, New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)

4 µl de dNTP (2,5 mM)

9 µl de H₂O libre de nucleasa

e iniciada por incubación a 70°C durante 5 min, y mantenida después en hielo.

Los siguientes reactivos se añadieron a continuación al tubo de reacción:

2 µl de tampón RT 10X (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)

1 µl de inhibidor de RNasa (10 unidades/µl)

1 µl de transcriptasa inversa M-MuLV (25 unidades/µl)

La reacción de RT se incubó a 42°C durante 1 hora, seguido de 95°C durante 5 min. A continuación se añadió 1 µl de RNasa H (2 unidades/µl) y la reacción de RT se incubó adicionalmente a 37°C durante 20 min, seguido de 95°C durante 5 min. El producto de RT se diluyó entonces en 50 µl con dH₂O. A continuación se preparó una dilución seriada de este producto de RT diluido. A cada tiempo, se diluyeron adicionalmente 5 µl del producto de RT previamente diluido en 50 µl con dH₂O. En la reacción de tHDA posterior, se usaron una pareja de cebadores,

ES 2 643 718 T3

GAPDF1 y GAPDR1, que específicamente se dirigen al gen GAPDH para la amplificación. Las reacciones de tHDA se iniciaron combinando los siguientes componentes en la mezcla de reacción A con un volumen total de 25 µl:

2,5 µl de tampón tHDA libre de Mg 10X (véase a continuación *)

5 µl de producto RT serialmente diluido (0,0001% a 1% de producto RT)

5 0,5 µl de cebador GAPDF1 10 µM (SEQ ID NO: 1)

0,5 µl de cebador GAPDR1 10 µM (SEQ ID NO: 2)

16,5 µl de dH₂O

25 µl de mezcla de reacción B también se prepararon mezclando:

2,5 µl de tampón tHDA libre de Mg 10X (véase a continuación)

10 1,75 µl de MgSO₄ 100 mM

2 µl de NaCl 500 mM

2 µl de dNTP 10 mM

1,5 µl de dATP 100 mM

2,5 µl de ADN polimerasa Bst, LF (8 unidades/µl; New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)

15 1 µl de helicasa Tte-UvrD (100 ng/µl)

11,75 µl de dH₂O

*tampón tHDA libre de Mg 10X contiene KCl 100 mM, (NH₄)₂SO₄ 100 mM, Tris-HCl 200 mM (pH 8,8 a 25°C), Tritón X-100 al 1%.

20 La mezcla de reacción A se calentó durante 2 min a 95°C, y luego 3 min a 65°C. Se añadió a continuación mezcla B recién hecha a la mezcla A y se incubó a 65°C durante 75 min. Los productos de amplificación se analizaron en un gel de agarosa al 2% (Fig. 2). Se observó una banda alrededor de 100 pb en el carril 2 (1% o 10 ng del ARN total de entrada inicial) y en el carril 3 (0,1% o 1 ng del ARN total de entrada inicial) en el gel de agarosa de acuerdo con el tamaño predicho de 96 pb.

Ejemplo 2: RT-HDA en un recipiente de reacción/de dos tampones

25 En este ejemplo, la síntesis de primera cadena de ADNc se acopló con la reacción de tHDA en un tubo usando dos etapas de incubación. Se usaron para la amplificación diferentes cantidades de ARN total humano que van desde 10 pg a 100 ng y un par de cebadores específicos, GAPDF1 y GAPDR1, del gen GAPDG.

La reacción con un volumen total de 50 µl se creó en un tubo combinando:

5 µl de tampón tHDA libre de Mg

30 1 µl de cantidad variable de ARN total humano (10 pg-100 ng)

0,5 µl de cebador GAPDF1 10 µM (SEQ ID NO: 1)

0,5 µl de cebador GAPDR1 10 µM (SEQ ID NO: 2)

1,75 µl de MgSO₄ 100 mM

2 µl de NaCl 500 mM

35 2 µl de dNTP 10 mM

1,5 µl de dATP 100 mM

1 µl de inhibidor de RNasa (10 unidades/µl)

1 µl de transcriptasa inversa M-MuIV (25 unidades/µl)

2,5 µl de ADN polimerasa Bst, LF (8 unidades/µl; New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)

1 µl de helicasa Tte-UvrD (100 ng/µl)

30,25 µl de dH₂O libre de nucleasa

5 La reacción de RT-HDA se llevó a cabo a 42°C durante 5 min, seguido de 65°C durante 60 min. Los productos de amplificación se analizaron en un gel de agarosa al 2% (Fig. 3). Se observó una fuerte banda de aproximadamente 100 pb en presencia de 100 ng de ARN total inicial (carril 3) y 10 ng de ARN total inicial (carril 4) en un gel de agarosa. Se observó también una banda débil de aproximadamente 100 pb en presencia de 1 ng (carril 5) de ARN total inicial en el gel de agarosa. El tamaño del fragmento de ADN observado estaba de acuerdo con el tamaño predicho de la diana de 96 pb. Cuando la cantidad de ARN total de entrada estaba por debajo de 1 ng, solamente se observó amplificación no específica en forma de dímero de cebador (carriles 6 a 8). Además, cuando se omitió la transcriptasa inversa (carril 1) o la helicasa (carril 2) de la reacción, no se observó amplificación, sugiriendo que la amplificación depende tanto de la función RT como de la de HDA.

Ejemplo 3: RT-HDA en un recipiente de reacción/de un tampón

15 En este ejemplo, se seleccionó una transcriptasa inversa con mayor estabilidad térmica y se acoplaron la síntesis de la primera cadena de ADNc y la amplificación isotérmica de ADN dependiente de helicasa y se llevaron a cabo en un tubo y en una etapa. Se usaron para la amplificación diferentes cantidades de ARN total humano que van desde 100 pg a 100 ng y un par de cebadores específicos, GAPDF1 y GAPDR1, del gen GAPDH.

La reacción con un volumen total de 50 µl se creó en un tubo combinando:

5 µl de tampón tHDA libre de Mg

1 µl de cantidad variable de ARN total humano (100 pg-100 ng)

20 0,5 µl de cebador GAPDF1 10 µM (SEQ ID NO: 1)

0,5 µl de cebador GAPDR1 10 µM (SEQ ID NO: 2)

1,75 µl de MgSO₄ 100 mM

2 µl de NaCl 500 mM

2 µl de dNTP 10 mM

25 1,5 µl de dATP 100 mM

1 µl de transcriptasa inversa SuperScript™ III (200 unidades/µl, Invitrogen, Carlsbad, CA)

2,5 µl de ADN polimerasa Bst, LF (8 unidades/µl; New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)

1 µl de helicasa Tte-UvrD (100 ng/µl)

31,25 µl de dH₂O libre de nucleasa

30 La reacción RT-HDA se llevó a cabo en una etapa a 62,5°C durante 60 min. Los productos de amplificación se analizaron en un gel de agarosa al 2% (Fig. 4). En presencia de 100 ng (carril 2) o 10 ng (carril 3) de ARN total inicial, se observó un fragmento de ADN de aproximadamente 100 pb en el gel de agarosa de acuerdo con el tamaño predicho de la diana de 96 pb. Cuando la cantidad de ARN total de entrada estaba por debajo de 10 ng, solamente se observó amplificación no específica en forma de dímero de cebador (carriles 4-6).

35 Ejemplo 4: RT-HDA modificada de un tampón

40 En este ejemplo, se aplicó una etapa de desnaturalización separada implicada en la desnaturalización del ARN molde y cebadores para disminuir la amplificación no específica. Se seleccionó una transcriptasa inversa con una mayor estabilidad térmica a 65°C y se acoplaron la síntesis de la primera cadena de ADNc y la amplificación isotérmica de ADN dependiente de helicasa y se llevaron a cabo en un tubo y en una etapa. Se usaron para la amplificación diferentes cantidades de ARN total humano que van de 2 pg a 200 ng y un par de cebadores específicos, GAPDF3 y GAPDR3, situados en diferentes exones del gen GAPDH.

La reacción con un volumen total de 50 ml se creó haciendo primero la Mezcla A y la Mezcla B. La Mezcla A se preparó en un microtubo estéril combinando:

2,5 µl de tampón RT-HDA 10X (véase a continuación*)

45 2 µl de cantidad variable de ARN total humano (2 pg-200 ng)

ES 2 643 718 T3

0,375 µl de cebador GAPDF3 10 mM (SEQ ID NO: 3)

0,375 µl de cebador GAPDR3 10 mM (SEQ ID NO: 4)

19,75 µl de H₂O libre de nucleasa

Volumen total: 25 µl

- 5 Para la reacción de control negativo, reemplazar 2 µl de H₂O libre de nucleasa con el ARN total.

La Mezcla B se preparó en otro microtubo estéril combinando:

2,5 µl de tampón RT-HDA 10X (véase a continuación*)

1,75 µl de MgSO₄ 100 mM

4 µl de NaCl 500 mM

- 10 2 µl de dNTP 10 mM

1,5 µl de dATP 100 mM

0,5 µl de inhibidor de RNasa (40 unidades/µl, New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)

0,7 µl de transcriptasa inversa ThermoScript (15 unidades/µl, Invitrogen)

2,5 µl de ADN polimerasa Bst, LF (8 unidades/µl; New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)

- 15 1 µl de helicasa Tte-UvrD (150 ng/µl)

8,55 µl de dH₂O libre de nucleasa

Volumen total: 25 µl

*tampón RT-HDA 10X contiene KCl 100 mM, Tris-HCl 200 mM (pH 8,8 a 25°C).

- 20 La desnaturalización de la Mezcla A se llevó a cabo a 95°C durante 2 min. Después de enfriar la Mezcla A en hielo, se añadió la Mezcla B a la Mezcla A. La reacción RT-HDA se llevó a cabo en una etapa a 65°C durante 120 min. Los productos de amplificación se analizaron en un gel de agarosa al 2% (Fig. 5). En presencia de ARN total inicial tan alto como 200 ng a tan bajo como 2 pg (carriles 2-7), se observó un único fragmento de ADN de aproximadamente 100 pb en el gel de agarosa de acuerdo con el tamaño predicho de la diana de 95 pb. Se observó amplificación no específica de 2 ng a 200 ng de ARN total inicial (carriles 2-7) o del control no molde (carril 8). Esto indica que la RT-HDA modificada de una etapa para la detección del gen GAPDH funciona bien en un intervalo de al menos 5
- 25 logaritmos de ARN total.

Ejemplo 5: detección de ARN de Enterovirus

- 30 En este ejemplo, se aplicó el método RT-HDA de una sola etapa modificado descrito en el Ejemplo 4 en la detección de un virus de ARN de Enterovirus. Se usaron ARNs del Panel de Enterovirus Clear QC (Argene, Varilhes, Francia) que varía de 40 copias a 4.000 copias como moldes y se usaron un par de cebadores específicos, EVF1A y EVR1, dirigidos a la secuencia 5'-UTR conservada en todas las especies de Enterovirus como cebadores para la amplificación.

- 35 La purificación del Panel de Enterovirus Clear QC se llevó a cabo con el Mini Kit QIAamp Viral RNA (Qiagen, Valencia, CA). Se usaron 140 µl de cada muestra estándar de Enterovirus con una concentración de 10 copias/µl, 100 copias/µl y 1.000 copias/µl para la purificación y se eluyeron en 70 µl de tampón de elución. La RT-HDA de una sola etapa modificada con un volumen total de 50 µl se preparó haciendo primero la Mezcla A y la Mezcla B. La Mezcla A se preparó en un microtubo estéril combinando:

2,5 µl de tampón RT-HDA 10X (véase a continuación*)

2 µl de cantidad variable de ARN de Enterovirus(40-4.000 copias)

- 40 0,375 µl de cebador EVF1A 10 mM (SEQ ID NO: 5)

0,375 µl de cebador EVR1 10 mM (SEQ ID NO: 6)

19,75 µl de H₂O libre de nucleasa

ES 2 643 718 T3

Volumen total: 25 µl

Para la reacción de control negativo, reemplazar 2 µl de H₂O libre de nucleasa con el ARN de Enterovirus.

La Mezcla B se preparó en otro microtubo estéril combinando:

2,5 µl de tampón RT-HDA 10X (véase a continuación*)

- 5 1,75 µl de MgSO₄ 100 mM
2 µl de NaCl 500 mM
2 µl de dNTP 10 mM
1,5 µl de dATP 100 mM
0,5 µl de inhibidor de RNasa (40 unidades/µl, New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)
- 10 0,7 µl de transcriptasa inversa ThermoScript (15 unidades/µl, Invitrogen)
2,5 µl de ADN polimerasa Bst, LF (8 unidades/µl, New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)
1 µl de helicasa Tte-UvrD (150 ng/µl)
10,55 µl de H₂O libre de nucleasa

Volumen total: 25 µl

- 15 *el tampón RT-HDA 10X contiene KCl 100 mM, Tris-HCl 200 mM (pH 8,8 a 25°C).

- La desnaturalización de la Mezcla A se llevó a cabo a 95°C durante 2 min. Después de enfriar la Mezcla A en hielo, se añadió la Mezcla B a la Mezcla A. La reacción de RT-HDA se llevó a cabo en una etapa a 65°C durante 120 min. Los productos de amplificación se analizaron en un gel de agarosa al 2% (Fig. 6). En presencia de 4.000 copias (carril 1) y 400 copias (carril 2) de ARN de Enterovirus inicial, se observó un único fragmento de ADN de alrededor de 120 pb en el gel de agarosa de acuerdo con el tamaño Viral RNA de la diana predicho de 116 pb. No se observó amplificación a partir de 40 copias de ARN de Enterovirus inicial (carril 3). No se observó amplificación no específica de 4.000 copias a 40 copias de ARN de Enterovirus inicial (carriles 1-3) o a partir del control sin molde (carril 4).
- 20

Listado de secuencias

- <110> Biohelix Corporation Kong, Huimin Tang, Wen
- 25 <120> Amplificación de dianas de ARN por amplificación dependiente de Helicasa
<130> BH-002-PCT
<150> 60/641,419
<151> 2005-01-05
<160> 6
- 30 <170> PatentIn version 3.2
<210> 1
<211> 27
<212> ADN
<213> artificial
- 35 <220>
<223> cebador

<400> 1
acatgttcca atatgattcc acccatg 27
- 40 <210> 2
<211> 27
<212> ADN
<213> artificial

ES 2 643 718 T3

<220>
 <223> cebador

 <400> 2
 agatggtgat gggattcca ttgatga 27

 5 <210> 3
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 10 <223> cebador

 <400> 3
 actctggtaa agtggatatt gttgcca 27

 <210> 4
 <211> 27
 15 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 4
 20 ttgccatgg gtggaatcat attgaa 27

 <210> 5
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> artificial

 25 <220>
 <223> cebador

 <400> 5
 tcctccggcc cctgaatgcg gctaat 26

 <210> 6
 30 <211> 26
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador

 35 <400> 6
 cacggacacc caaagtagtc ggttcc 26

REIVINDICACIONES

1. Un método para la amplificación isotérmica dependiente de helicasa de una molécula de ARN en un único recipiente de reacción, comprendiendo el método:
- 5 (a) añadir a la molécula de ARN, una mezcla que comprende una transcriptasa inversa, una pluralidad de cebadores de oligonucleótidos, una polimerasa, y una preparación de helicasa que comprende una helicasa, un nucleótido trifosfato y una proteína de unión a cadena sencilla, en donde cuando la helicasa es una helicasa termoestable, la mezcla no comprende una proteína de unión a cadena sencilla;
- (b) transcribir inversamente el ARN para formar un dúplex ARN/ADNc y al menos separar parcialmente el dúplex en un ADNc y un ARN usando la helicasa; y
- 10 (c) amplificar el ADNc mediante amplificación dependiente de helicasa.
2. Un método según la reivindicación 1 en donde la transcripción inversa (RT) en (b) se origina a partir de una transcriptasa inversa o una ADN polimerasa con actividad RT.
3. Un método según la reivindicación 1 en donde la amplificación isotérmica sucede a una temperatura en el intervalo de 20 a 75°C.
- 15 4. Un método para identificar una molécula de ARN que comprende la amplificación isotérmica dependiente de helicasa del ARN en un único recipiente de reacción usando un método que comprende:
- 20 (a) añadir a la molécula de ARN, una mezcla que comprende una transcriptasa inversa, una pluralidad de cebadores de oligonucleótidos, y una o más polimerasas, y una preparación de helicasa que comprende una helicasa, un nucleótido trifosfato y una proteína de unión a cadena sencilla, en donde cuando la helicasa es una helicasa termoestable, la mezcla no comprende una proteína de unión a cadena sencilla;
- (b) transcribir inversamente el ARN para formar un dúplex de ARN/ADNc y al menos separar parcialmente el dúplex en un ADNc y un ARN usando la helicasa;
- (c) amplificar el ADNc mediante amplificación dependiente de helicasa; y
- (d) caracterizar el ADNc para determinar la identidad de la molécula de ARN.
- 25 5. Un método según la reivindicación 4 en donde la amplificación isotérmica sucede a una temperatura en el intervalo de 20 a 75°C.

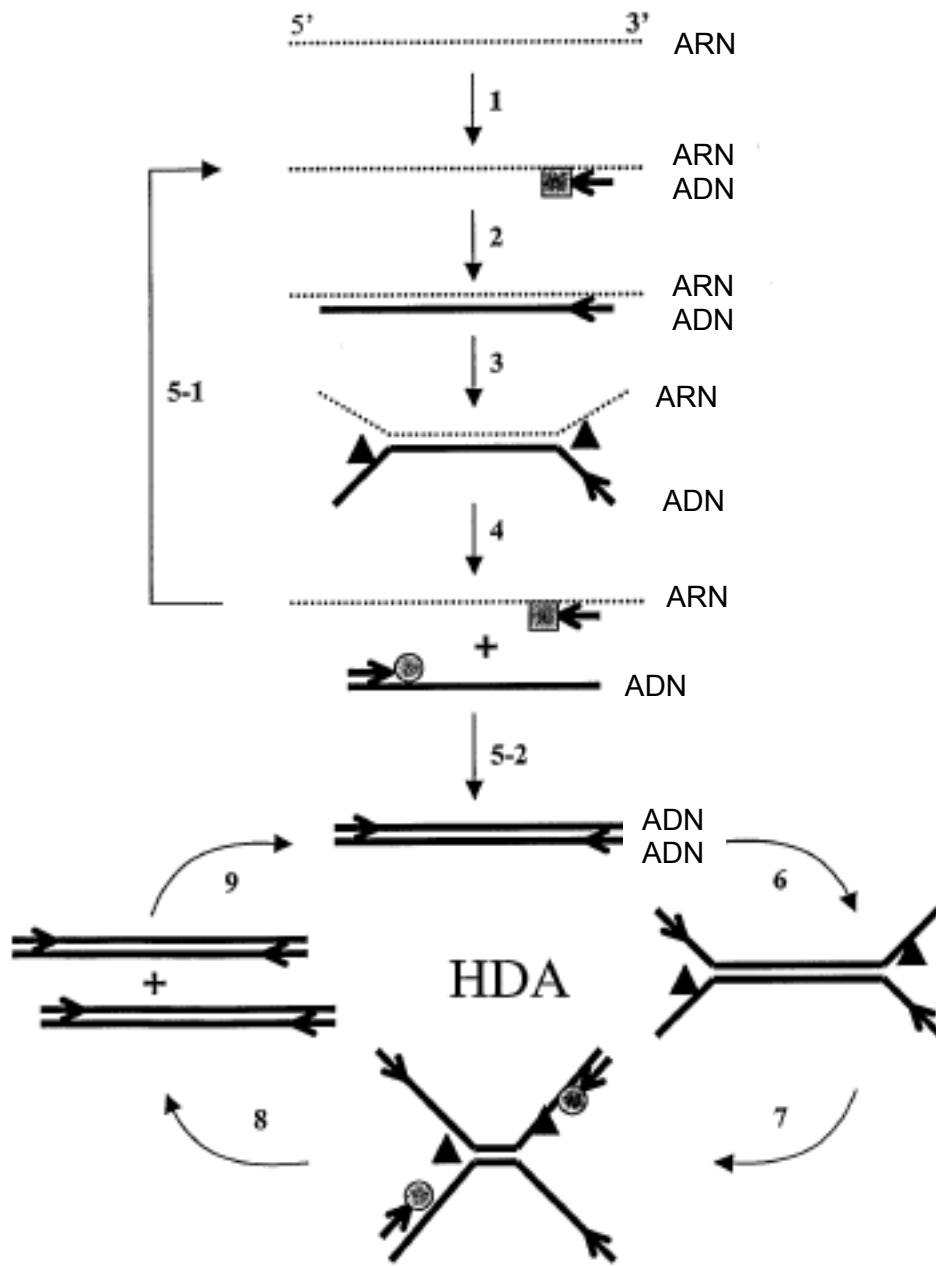


Figura 1

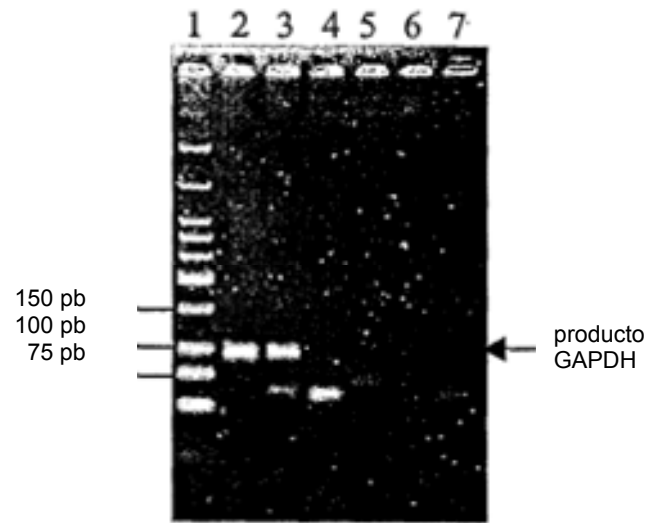


Figura 2

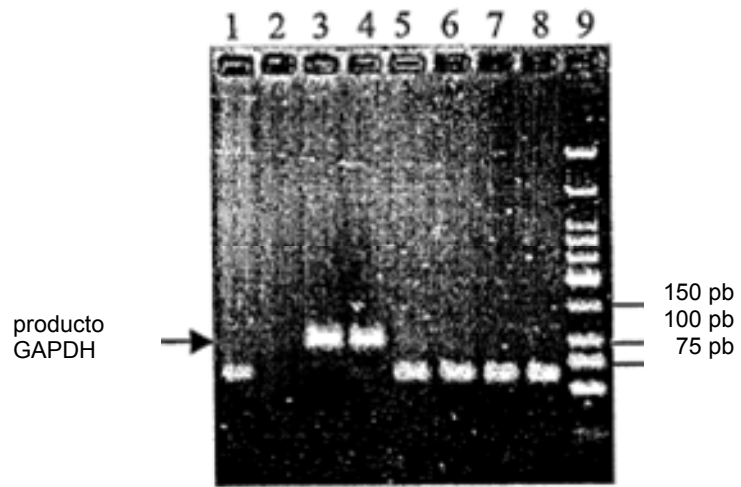


Figura 3

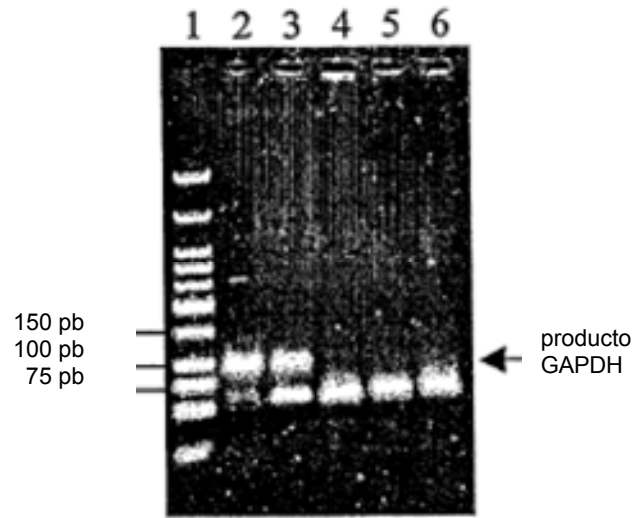


Figura 4

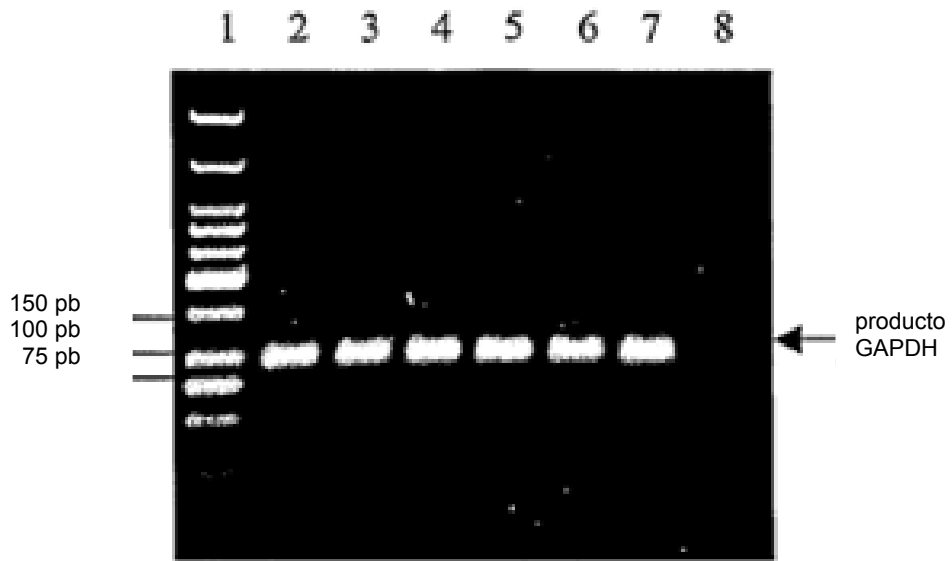


Figura 5

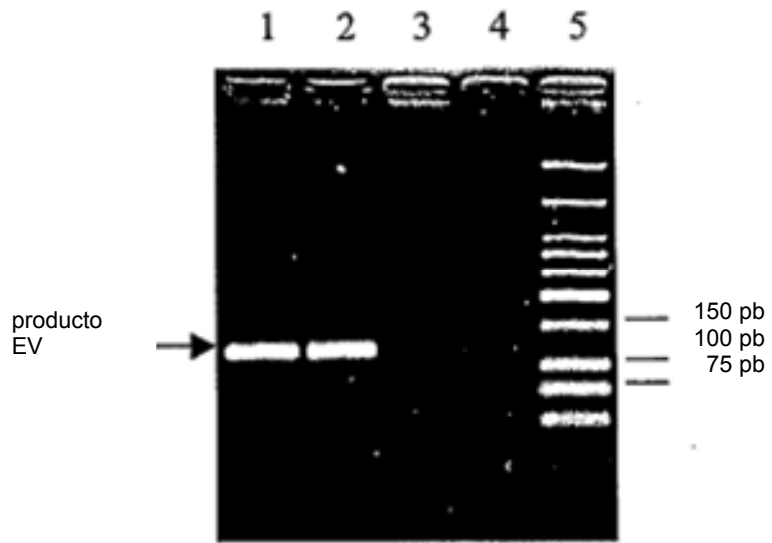


Figura 6