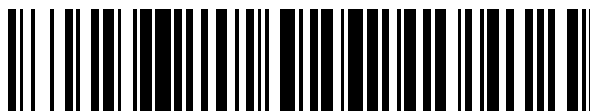


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 133**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6858 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2013** **PCT/KR2013/003185**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014** **WO14163225**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2013** **E 13881318 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018** **EP 2982762**

54 Título: **Método de amplificación de ácidos nucleicos usando cebador reactivo específico de alelo**

30 Prioridad:

01.04.2013 KR 20130035343

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

07.12.2018

73 Titular/es:

**GENOMICTREE, INC. (100.0%)
829 Tamnip-dong Yuseong-gu
Daejeon 305-510 , KR**

72 Inventor/es:

**AN, SUNG WHAN y
OH, TAE JEONG**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 693 133 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de amplificación de ácidos nucleicos usando cebador reactivo específico de alelo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para amplificar ácidos nucleicos usando un cebador reactivo específico de alelo (ASRP) diseñado para resolver los problemas de la PCR convencional específica de alelo, y más particularmente, a un método para detectar un ácido nucleico diana, comprendiendo el método amplificar el ácido nucleico diana en presencia de una ADN polimerasa que tiene actividad correctora de errores, y un cebador reactivo específico de alelo (ASRP) que comprende i) una secuencia de nucleótidos complementaria al ácido nucleico diana y ii) uno o más nucleótidos modificados ubicados en una región desde un nucleótido ubicado justo antes de un nucleótido no complementario a la dirección 5' del cebador, que se eliminarán por la actividad de corrección de errores de la ADN polimerasa cuando hay un nucleótido no complementario presente en el extremo 3', hasta un nucleótido ubicado en el extremo 5' del cebador, para que el nucleótido en el cebador reactivo específico de alelo no pueda actuar como cebador para una reacción de la polimerasa.

Antecedentes técnicos

20 Un polimorfismo de un único nucleótido (SNP) es una variación genética en una secuencia de ADN que se produce cuando un único nucleótido se reemplaza por uno de los otros tres nucleótidos. Produce diferencias entre individuos, tales como causas patógenas o respuestas a fármacos terapéuticos. La detección e identificación de polimorfismos de un único nucleótido ha recibido mucha atención, porque está ligado no solamente a medicinas personalizadas, sino también al desarrollo de nuevos fármacos.

25 Para la detección rápida de polimorfismo de un único nucleótido, se han usado diversos métodos de detección basados en tecnología de PCR en tiempo real. Los ejemplos típicos de estos métodos de detección incluyen ensayos usando colorantes fluorescentes que se intercalan en el ADN, ensayos usando sondas de ADN y ensayos usando sondas de PNA. Sin embargo, estos métodos tienen inconvenientes, porque el uso de colorantes fluorescentes que se intercalan en el ADN está limitado y se requiere el uso de un programa para analizar las curvas de fusión (Kirk M. Ririe *et al.*, *Analytical Biochemistry* 245:154, 1997; U. Hladnik *et al.*, *Clin Exp Med*, 2:105, 2002).

30 La ADN polimerasa con actividad de corrección de errores 3'→5' asegura una alta fidelidad en la replicación del ADN (Drake, J.W. *et al.*, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 33:339, 1968; Drake, J.W. *et al.*, *Nature*, 221:1128, 1968; Goodman, M.F. *et al. Genetics*, 148:1475, 1998) y se han encontrado muchas polimerasas con corrección de errores con actividad exonucleasa 3'.

35 La ADN polimerasa con actividad de corrección de errores asegura una alta fidelidad en la replicación del ADN *in vivo*, pero cuando se aplica una ADN polimerasa con actividad de corrección de errores a una reacción en cadena de la polimerasa con cebadores específicos de alelo convencionales, aparece un problema porque, como se elimina una base mal emparejada en el extremo 3', el extremo del cebador se prolonga independientemente de la hibridación completa o hibridación incompleta del cebador con el ADN usado como molde (Zhang, J. *et al.*, *Mol. Biotechnol.*, 24:105, 2003).

40 Debido a este problema, la actividad de la ADN polimerasa con corrección de errores se usó poco en estudios sobre la detección de mutaciones. Sin embargo, en los últimos años, ha habido estudios sobre un método de detección de una mutación en un ácido nucleico diana usando un método de modificación del extremo 3' de los cebadores, tal como un método de marcaje del extremo 3' de los cebadores o conjugación de un factor resistente a exonucleasa 3' al extremo 3', o un método de eliminación del grupo-OH del nucleótido en el extremo 3' o reemplazo del grupo-OH con otro resto (Zhang, J. *et al.*, *Current Drug Disc.*, 9:21, 2001; Bi, W.L. y Sambrook, P.J., *Nucleic Acids Res.*, 26:3073, 1998).

45 El documento US 2006/0172307 divulga un cebador específico de alelo modificado con fosforotioato. DI GIUSTO DANIEL A ET AL., NUCLEIC ACIDS RESEARCH, INFORMATION RETRIEVAL LTD, GB, vol. 32, n.º 3, 1 de enero de 2004, página e32, divulga un cebador específico de alelo que comprende un resto de LNA en la posición penúltima.

50 Por ejemplo, en el caso en que se marca el extremo 3' de un cebador, cuando el cebador se une de forma complementaria al ADN molde, se produce un producto de amplificación final mientras se mantiene el marcador en el extremo 3', pero cuando el cebador no empareja correctamente con el ADN molde, el marcador en el extremo 3' se elimina por la actividad de corrección de errores de la ADN polimerasa con corrección de errores y, por tanto, se produce un producto de amplificación final sin marcador, lo que indica que puede detectarse una mutación en presencia o ausencia del marcador. Basándose en este principio, los cebadores específicos de alelo que tienen extremos 3' modificados de diversas maneras, y la ADN polimerasa con actividad de corrección de errores, pueden aplicarse a diversas plataformas, incluyendo PCR en tiempo real, placa de múltiples pocillos y técnicas de micromatriz.

Por consiguiente, los autores de la presente invención han hecho amplios esfuerzos por detectar un ácido nucleico diana usando un cebador modificado en el extremo 3' y una ADN polimerasa que tiene actividad de corrección de errores y, como resultado, han descubierto que se amplifica específicamente un ácido nucleico diana usando un cebador reactivo específico de alelo (ASRP) en que se modifica un nucleótido en el extremo 3', en presencia de una ADN polimerasa que tiene actividad de corrección de errores, completando de ese modo la presente invención.

Divulgación de la invención

Problema técnico

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método de detección de un ácido nucleico diana usando un cebador reactivo específico de alelo (ASRP) que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria al ácido nucleico diana y en que uno o más nucleótidos modificados ubicados en una región desde un nucleótido ubicado justo antes de un nucleótido no complementario a la dirección 5' del cebador, que se eliminarán por la actividad de corrección de errores de la ADN polimerasa cuando hay un nucleótido no complementario presente en el extremo 3', hasta un nucleótido ubicado en el extremo 5' del cebador, para que el nucleótido en el cebador reactivo específico de alelo no pueda actuar como cebador para una reacción de la polimerasa, y un método para amplificar de forma selectiva un ácido nucleico diana a partir de una colección de ADN.

Solución técnica

Para conseguir el objetivo anterior, la presente invención proporciona un método para detectar un ácido nucleico diana, como se define en las reivindicaciones adjuntas, comprendiendo el método amplificar el ácido nucleico diana en presencia de una ADN polimerasa que tiene actividad de corrección de errores y un cebador reactivo específico de alelo (ASRP) que comprende i) una secuencia de nucleótidos complementaria al ácido nucleico diana y ii) uno o más nucleótidos modificados ubicados en una región desde un nucleótido ubicado justo antes de un nucleótido no complementario a la dirección 5' del cebador, que se eliminará por la actividad de corrección de errores de la ADN polimerasa cuando hay un nucleótido no complementario presente en el extremo 3', hasta un nucleótido ubicado en el extremo 5' del cebador, para que el nucleótido en el cebador reactivo específico de alelo no pueda actuar como cebador para una reacción de la polimerasa.

La presente divulgación también se refiere a un método de amplificación de un ácido nucleico diana empezando con una secuencia de nucleótidos específica de una colección de ADN, comprendiendo el método amplificar el ácido nucleico diana a partir de la colección de ADN en presencia de una ADN polimerasa que tiene actividad de corrección de errores y un cebador reactivo específico de alelo (ASRP) que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia adaptadora de la colección de ADN en su extremo 5', y en el extremo 3' de una secuencia de nucleótidos complementaria al ácido nucleico diana y uno o más nucleótidos modificados para que el nucleótido en el cebador reactivo específico de alelo no pueda actuar como cebador para una reacción de la polimerasa.

La presente divulgación también se refiere a un método para detectar un ácido nucleico diana, comprendiendo el método amplificar el ácido nucleico diana en presencia de: (i) un cebador reactivo específico de alelo (ASRP) que comprende una secuencia de marcaje que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria al ácido nucleico diana en su extremo 5', un único nucleótido modificado y una secuencia de nucleótidos complementaria al ácido nucleico diana, teniendo el cebador reactivo específico de alelo (ASRP) uno o más nucleótidos modificados en un extremo 3', para que el nucleótido en el cebador reactivo específico de alelo no pueda actuar como cebador para una reacción de la polimerasa; (ii) una secuencia de marcaje y un molde indicador que comprende una parte de la secuencia de nucleótidos complementaria al ácido nucleico diana; y (iii) una ADN polimerasa que tiene actividad exonucleasa 3'→5'.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra un sistema de detección que utiliza un cebador reactivo específico de alelo (ASRP).

La figura 2 muestra los resultados de realizar experimentos de amplificación por PCR usando un cebador general y el ASRP para detectar una mutación de un único nucleótido.

La figura 3 muestra los resultados de realizar experimentos de amplificación por PCR usando un cebador general y el ASRP para detectar metilación.

La figura 4 es un diagrama esquemático que muestra un proceso de amplificación de un ADN diana partiendo de una secuencia de nucleótidos deseada de una colección de ADN usando un cebador reactivo específico de alelo (ASRP).

La figura 5 es un diagrama esquemático que muestra un sistema de detección que usa un cebador reactivo específico de alelo (ASRP) que comprende una secuencia de marcaje, un único nucleótido modificado y una secuencia específica de diana complementaria a un ácido nucleico diana, y una ADN polimerasa que tiene actividad exonucleasa 3'→5' y sin actividad de corrección de errores.

Mejor modo para realizar la invención

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la invención.

En líneas generales, la nomenclatura usada en este documento es bien conocida y habitualmente usada en la técnica.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para detectar un ácido nucleico diana, comprendiendo el método amplificar el ácido nucleico diana en presencia de una ADN polimerasa que tiene actividad de corrección de errores, y un cebador reactivo específico de alelo (ASRP) que comprende i) una secuencia de nucleótidos complementaria al ácido nucleico diana y ii) uno o más nucleótidos modificados ubicados en una región desde un nucleótido ubicado justo antes de un nucleótido no complementario a la dirección 5' del cebador, que se eliminará por la actividad de corrección de errores de la ADN polimerasa cuando hay un nucleótido no complementario presente en el extremo 3', hasta un nucleótido ubicado en el extremo 5' del cebador, para que el nucleótido en el cebador reactivo específico de alelo no pueda actuar como cebador para una reacción de la polimerasa.

El cebador reactivo específico de alelo (a partir de ahora en este documento mencionado como "ASRP") que se usa en la presente invención es un cebador diseñado para resolver los problemas de las PCR convencionales específicas de alelo. De acuerdo con la presente invención, puede amplificarse específicamente un ácido nucleico diana usando una ADN polimerasa que tiene actividad de corrección de errores y un cebador reactivo específico de alelo que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria al ácido nucleico diana para que pueda amplificar específicamente un alelo deseado y uno o más nucleótidos modificados ubicados en una región de un nucleótido ubicado justo antes de un nucleótido no complementario a la dirección 5' del cebador, que se eliminará por la actividad de corrección de errores de la ADN polimerasa cuando hay un nucleótido no complementario presente en el extremo 3', hasta un nucleótido ubicado en el extremo 5' del cebador, para que el nucleótido en el cebador reactivo específico de alelo no pueda actuar como cebador para reacción de la polimerasa.

Como se usa en este documento, la expresión "ácido nucleico diana" se refiere a la secuencia de ácido nucleico (ADN o ARN) a detectar, y el ácido nucleico diana se hibrida con un cebador o una sonda en condiciones de hibridación, atemperado o amplificación. La expresión "ácido nucleico diana" se usa indistintamente con la expresión "secuencia de ácido nucleico diana" o "secuencia diana" como se usa en este documento.

Como se usa en este documento, el término "hibridación" significa que ácidos nucleicos monocatenarios complementarios forman un ácido nucleico bicatenario. La hibridación puede producirse cuando la complementariedad entre dos hebras de ácido nucleico es perfecta (acoplamiento perfecto) o cuando existe algún resto mal emparejado. El nivel de complementariedad para la hibridación puede variar dependiendo de las condiciones de hibridación, particularmente la temperatura.

En la presente invención, el cebador reactivo específico de alelo se caracteriza porque, si un nucleótido está ubicado al lado por la parte 3' del nucleótido modificado del cebador reactivo específico de alelo es complementario a un ácido nucleico diana, no se elimina por la actividad de corrección de errores de la ADN polimerasa, y si el nucleótido no es complementario al ácido nucleico diana, se elimina por la actividad de corrección de errores de la ADN polimerasa y, por tanto, el nucleótido modificado permanece en el extremo 3'.

En la presente invención, la ADN polimerasa que tiene actividad de corrección de errores puede tener actividad exonucleasa 3'→5'.

En la presente invención, el nucleótido modificado de modo que el nucleótido en el cebador reactivo específico de alelo no pueda actuar como cebador para una reacción de la polimerasa, puede ser un nucleótido sustituido con al menos uno seleccionado del grupo que consiste en desoxinucleótido y desoxinucleótido invertido (inverso). En un ejemplo de la presente invención, se usó un ASRP en que el nucleótido en el extremo 3' está sustituido con desoxinucleótido, pero o se limita y puede usarse cualquier método de modificación convencional de nucleótidos conocido en la técnica.

El método para detectar un ácido nucleico diana de acuerdo con la presente invención comprende específicamente las etapas de: (a) mezclar e hibridar el ácido nucleico diana con un cebador reactivo específico de alelo (ASRP) para obtener un producto de hibridación; (b) amplificar el ácido nucleico diana en el producto de hibridación en presencia de una ADN polimerasa que tiene actividad de corrección de errores; y (c) detectar el ácido nucleico diana basándose en la presencia o ausencia de un producto de amplificación del ácido nucleico diana.

En la presente invención, para la amplificación específica de diana en presencia de ASRP, debe usarse una ADN polimerasa con exonucleasa de corrección de errores 3'→5'. En presencia de la enzima ADN polimerasa, cuando un cebador general se une a un ADN molde (ácido nucleico diana) y si el extremo 3' del cebador es complementario al ADN molde, una reacción de la ADN polimerasa prosigue en la dirección 5'→3' sin corrección de errores (figura 1A), mientras que cuando uno o más nucleótidos en el extremo 3' no son complementarios al molde, se realiza una reacción de corrección de errores que escinde todos los nucleótidos independientemente de la cantidad de

nucleótidos no complementarios, y entonces se sintetiza una nueva secuencia de nucleótidos complementaria al molde (figura 1B). En el caso en que se use el ASRP de acuerdo con la presente invención, cuando el extremo 3' del cebador es complementario al molde, una reacción de la ADN polimerasa prosigue en la dirección 5'→3' sin corrección de errores (figura 1C), como el uso del cebador general, mientras que cuando los nucleótidos en el extremo 3' no son complementarios al molde, todos los nucleótidos no complementarios se eliminan por una reacción de corrección de errores independientemente de la cantidad de nucleótidos no complementarios (figura 1D). Después de completarse la reacción de corrección de errores, el desoxinucleótido permanece en el extremo 3' y se detiene la reacción de la ADN polimerasa, porque el ASRP que tiene esta estructura no puede actuar como cebador para una reacción de la polimerasa. Por tanto, cuando se usa una combinación de una ADN polimerasa que tiene actividad de corrección de errores y el ASRP para inducir una reacción de la ADN polimerasa, únicamente un ADN molde que tiene una secuencia específica puede amplificarse de forma selectiva, porque el ASRP causa la reacción de la polimerasa únicamente cuando cumple una complementariedad de molde con el mismo.

En la presente invención, la concentración del cebador reactivo específico de alelo (ASRP) puede ser 0,1-20 M, y la amplificación en la etapa (b) puede realizarse por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En la presente invención, si el cebador reactivo específico de alelo es complementario al ácido nucleico diana, se produce un producto de amplificación del ácido nucleico diana (emparejamiento/activo) y si el cebador reactivo específico de alelo no es complementario al ácido nucleico diana, los nucleótidos mal emparejados se eliminan por la actividad de corrección de errores de la ADN polimerasa, y el producto de amplificación del ácido nucleico diana no se produce debido al nucleótido modificado que permanece en el extremo 3' del cebador (emparejamiento incorrecto/inactivo).

En la presente invención, el ácido nucleico diana puede ser ADN o ARN, y puede detectarse una mutación o un patógeno usando el método de detección de ácido nucleico diana de la presente invención.

Cuando el método de la presente invención se usa para detectar una mutación, puede detectarse no solamente un polimorfismo de un único nucleótido, sino también una mutación causada por la sustitución, eliminación o inserción de un nucleótido del ácido nucleico diana. Además, si no hay mutación presente en el ácido nucleico diana, se producirá un producto de amplificación del ácido nucleico diana, y si hay una mutación presente en el ácido nucleico diana, el producto de amplificación del ácido nucleico diana no se producirá.

En un ejemplo de la presente invención, para detectar una mutación usando el cebador reactivo específico de alelo (ASRP) de la presente invención, se realizó un experimento sobre la detección de la mutación puntual somática *BRAFV600E* que es una mutación típica de células cancerosas. Como resultado, pudo observarse que, cuando se usaba un cebador general, no solamente se producía amplificación de la mutación *BRAFV600E* (carril 2 en la figura 2), sino también amplificación no específica de *BRAF* de tipo silvestre (carril 1 en la figura 2). Sin embargo, cuando se realizaba PCR usando el ASRP el *BRAF* de tipo silvestre usado como molde no se amplificaba (carril 5 en la figura 2) y solamente se amplificaba la mutación *BRAFV600E* usada como molde (carril 4 en la figura 2).

El método de detección de un patógeno usando el método de la presente invención se caracteriza porque el producto de amplificación del ácido nucleico diana se produce en presencia de un patógeno, y no se produce en ausencia de un patógeno. El patógeno que se usa en la presente invención es un microorganismo que causa enfermedad, y puede seleccionarse del grupo que consiste en virus, eubacterias, hongos y protozoos, pero no se limita a ellos, e incluye cualquier organismo que infecte seres humanos o animales para causar directamente una enfermedad.

Además, el método de detección de ácido nucleico diana de la presente invención puede usarse para detectar un gen metilado en citosina. En este caso, se produce un producto de amplificación de un ácido nucleico diana, metilado, y no se produce un producto de amplificación de un ácido nucleico diana, no metilado.

Como se usa en este documento, el término "metilación" significa que se adhiere un grupo metilo al carbono-5 del anillo de citosina para formar 5-metilcitosina (5-mC). La 5-metilcitosina siempre se adhiere únicamente al C de un dinucleótido CG (5'-mCG-3') y este CG se expresa frecuentemente como CpG. La metilación de este CpG inhibe la expresión de una secuencia repetitiva en genomas, tal como alu o transposón. Además, CpG es un sitio donde se produce cambio epigenético en células de mamífero muy frecuentemente. El 5-mC de este CpG se desamina de forma natural en T y, por tanto, el CpG en genomas de mamífero muestra una frecuencia de únicamente un 1 %, que es muy inferior a una frecuencia normal ($1/4 \times 1/4 = 6,25 \%$).

Las regiones en que CpG está excepcionalmente integrado se conocen como islas CpG. Las islas CpG se refieren a sitios que son de 0,2-3 kb de longitud y tienen un contenido de C+G de más de un 50 % y una relación CpG de más de un 3,75 %. Hay aproximadamente 45 000 islas CpG en el genoma humano y se encuentran principalmente en regiones promotoras que regulan la expresión de los genes. Realmente, las islas CpG existen en los promotores de genes constitutivos que representan aproximadamente un 50 % de los genes humanos (Cross, S. & Bird, A.P., *Curr. Opin. Gene Develop.*, 5:309, 1995).

El método para detectar un ácido nucleico diana metilado de acuerdo con la presente invención comprende específicamente las etapas de: (a) tratar química o enzimáticamente el ácido nucleico diana para convertir un nucleótido de citosina no metilado en uracilo u otros nucleótidos diferentes de citosinas sin convertir un nucleótido de citosina metilado; (b) mezclar e hibridar el ácido nucleico diana tratado química o enzimáticamente con un cebador reactivo específico de alelo (ASRP) para obtener un producto de hibridación, y amplificar el producto diana en el producto de hibridación en presencia de una ADN polimerasa que tiene actividad de corrección de errores; y (c) detectar la metilación del ácido nucleico diana basándose en la presencia o ausencia de un producto de amplificación del ácido nucleico diana.

El método de detección de la metilación del ácido nucleico diana usando el ASRP de acuerdo con la presente invención comprende una etapa de tratamiento químico o enzimático del ácido nucleico diana para convertir un nucleótido de citosina no metilado en uracilo u otros nucleótidos diferentes de citosinas sin convertir un nucleótido de citosina metilado. Para la detección de un ácido nucleico metilado, debe usarse una ADN polimerasa con exonucleasa de corrección de errores 3'→5'. Cuando un cebador general se une a un molde y el extremo 3' del cebador es complementario a un ácido nucleico diana, metilado, una reacción de la ADN polimerasa prosigue en la dirección 5'→3' sin corrección de errores. Cuando un nucleótido de citosina no metilado se convierte en uracilo u otros nucleótidos diferentes de citosina, incluso si el nucleótido en el extremo 3' no es complementario al molde, se realiza una reacción de corrección de errores que escinde el nucleótido no complementario por la actividad de corrección de errores de la ADN polimerasa, y después se sintetiza una nueva secuencia de nucleótidos complementaria al molde.

En el caso en que se use el ASRP de acuerdo con la presente invención, cuando el extremo 3' del cebador es complementario al ácido nucleico diana metilado, una reacción de la ADN polimerasa prosigue en la dirección 5'→3' sin corrección de errores, mientras que cuando un nucleótido de citosina metilado se convierte en uracilo u otros nucleótidos diferentes de citosina y los nucleótidos en el extremo 3' del cebador no son complementarios al molde, los nucleótidos no complementarios se eliminan por la reacción de corrección de errores de la ADN polimerasa. Después de completarse la reacción de corrección de errores, el desoxinucleótido permanece en el extremo 3'. Y la reacción de la ADN polimerasa se detiene, porque el ASRP que tiene esta estructura no puede actuar como cebador para la reacción de la ADN polimerasa.

En otro ejemplo de la presente invención, para detectar un gen metilado usando el cebador reactivo específico de alelo (ASRP) de la presente invención, se realizó un experimento sobre la detección de metilación del gen *SDC2* humano. Como resultado, se demuestra que, cuando se usaba un cebador general, aparecía un producto de amplificación tanto en *SDC2* (carril 1 en la figura 3) como en *SDC2* no metilado (carril 2 en la figura 3) incluso cuando se usaba un cebador específico de metilación, mientras que cuando se usaba un ASRP específico de metilación de *SDC2*, se observaba un producto de amplificación específico en *SDC2* metilado (carril 4 en la figura 3), pero no se producía amplificación en *SDC2* no metilado (carril 5 en la figura 3).

En la presente invención, un compuesto para convertir un nucleótido de citosina no metilado en uracilo puede ser bisulfito. *SDC2* usado en un ejemplo de la presente invención era un gen sintetizado usando una secuencia de nucleótidos en que se cambió un nucleótido de citosina en uracilo, y se omitió un proceso de tratamiento con bisulfito en el ejemplo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de amplificación de un ácido nucleico diana que inicia con una secuencia de nucleótidos específica de una colección de ADN, comprendiendo el método amplificar el ácido nucleico específico de la colección de ADN en presencia de una ADN polimerasa que tiene actividad de corrección de errores y un cebador reactivo específico de alelo (ASRP) que comprende, en su extremo 5', una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia adaptadora de la colección de ADN y comprende, en su extremo 3', una secuencia de nucleótidos complementaria al ácido nucleico diana y el uno o más nucleótidos modificados para que el nucleótido en el cebador reactivo específico de alelo no pueda actuar como cebador para una reacción de la polimerasa.

Como se usa en este documento, la expresión "colección de ADN" se refiere a una colección de una cantidad suficiente de clones de modo que incluya todos los genes individuales presentes en un organismo específico. Una colección de ADN genómico se construye aislando el ADN celular total, digiriendo parcialmente el ADN aislado y clonando los fragmentos producidos en vectores. Como vector, se usa BAC, YAC, fósomido, cósmido o similares, en que puede clonarse un gen más grande o un grupo de genes, aunque también se usa un plásmido que se ha usado en líneas generales.

En la presente invención, un fragmento de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico diana puede amplificarse de forma selectiva a partir de una colección de ADN. De acuerdo con el método de presente invención, puede amplificarse un ácido nucleico diana que tiene una secuencia de nucleótidos específica a partir de una colección de secuenciación de la siguiente generación (NGS) usando un cebador reactivo específico de alelo.

El método de amplificación de un ácido nucleico diana que tiene una secuencia de nucleótidos específica a partir de

una colección de ADN de acuerdo con la presente invención comprende específicamente las etapas de: (a) digerir de forma aleatoria un ADN genómico y ligar una secuencia adaptadora de secuenciación tanto al extremo 5' como al extremo 3' de los fragmentos de ADN digeridos para preparar una colección de ADN; (b) mezclar e hibridar la colección de ADN con un cebador reactivo específico de alelo (ASRP), en el que el cebador reactivo específico de alelo (ASRP) comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia adaptadora de la colección de ADN y uno o más nucleótidos modificados ubicados en una región desde un nucleótido ubicado justo antes de un nucleótido no complementario a la dirección 5' del cebador, que se eliminará por la actividad de corrección de errores de la ADN polimerasa cuando hay un nucleótido no complementario presente en el extremo 3', hasta un nucleótido ubicado en el extremo 5' del cebador, para que el nucleótido en el cebador reactivo específico de alelo no pueda actuar como cebador para una reacción de la polimerasa; y (c) realizar amplificación partiendo de una secuencia de nucleótidos específica en el producto de hibridación en presencia de una ADN polimerasa que tiene actividad de corrección de errores. En el método, si el ácido nucleico diana está presente en la colección de ADN, se une de forma complementaria al cebador reactivo específico de alelo para producir un producto de amplificación, y si el ácido nucleico diana no es complementario al cebador reactivo específico de alelo, el nucleótido no complementario se elimina por la actividad de corrección de errores de la ADN polimerasa, y no se produce un producto de amplificación debido a los nucleótidos modificados restantes en el extremo 3'.

De acuerdo con el método de la presente invención, puede realizarse secuenciación de la siguiente generación (NGS) digiriendo de forma aleatoria un ADN genómico para preparar fragmentos de ADN, ligando una secuencia adaptadora de secuenciación tanto al extremo 5' como al extremo 3' de los fragmentos de ADN para construir una colección de ADN y amplificando de forma selectiva los fragmentos de ADN que tienen una secuencia de nucleótidos específica a partir de la colección de ADN. Como se muestra en la figura 4A, se construye una colección, cuando uno o más de los nucleótidos ubicados en el lado 3' del nucleótido modificado, seleccionado entre nucleótidos que incluyen un segundo nucleótido a un nucleótido en el extremo 5' del adaptador para la secuenciación, es no complementario, por ejemplo, si N (A, T, C, G) (1.º nucleótido ubicado justo antes del nucleótido en el extremo de la secuencia adaptadora) es complementario a ASRP, la colección se amplifica sin corrección de errores, si no es complementario, el nucleótido se elimina por corrección de errores y no se produce la polimerización. Por lo tanto, de acuerdo con este proceso, únicamente los fragmentos de ADN que contienen un fragmento de ADN genómico partiendo de un nucleótido específico pueden amplificarse selectivamente a partir de una colección de ADN.

De acuerdo con la presente invención, un ácido nucleico diana metilado puede amplificarse a partir de una colección de ADN. Específicamente, el método para la amplificación de un ácido nucleico diana metilado comprende las etapas de: (a) tratar química o enzimáticamente un ADN genómico para convertir un nucleótido de citosina no metilado en uracilo u otros nucleótidos sin convertir un nucleótido de citosina metilado; (b) digerir de forma aleatoria el ADN genómico y ligar un adaptador de secuenciación tanto al extremo 5' como al extremo 3' de los fragmentos de ADN digeridos para construir una colección de ADN; (c) mezclar e hibridar la colección de ADN con un cebador reactivo específico de alelo (ASRP), en el que el ASRP comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia adaptadora de la colección de ADN y en el extremo 3', una citosina y uno o más nucleótidos modificados para que el nucleótido en el cebador reactivo específico de alelo no pueda actuar como cebador para una reacción de la polimerasa; y (d) amplificar un fragmento de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico diana metilado en el producto de hibridación en presencia de una ADN polimerasa que tiene actividad de corrección de errores, en el que se amplifica un ácido nucleico diana metilado y no se amplifica un ácido nucleico diana no metilado.

Cuando tiene que realizarse secuenciación de la siguiente generación (NGS) después del tratamiento de un ADN genómico con bisulfito, la secuenciación de la siguiente generación (NGS) puede realizarse amplificando selectivamente fragmentos de ADN que tienen una secuencia de nucleótidos metilados usando el método de la presente invención a partir de una colección construida por ligamiento de una secuencia de secuenciación tanto al extremo 5' como al extremo 3'. Como se muestra en la figura 4B, cuando se amplifica una colección construida usando un ADN genómico tratado con bisulfito con una ADN polimerasa que tiene actividad de corrección de errores usando un ASRP preparado para que tenga una secuencia adaptadora en el extremo 5' y una secuencia de nucleótidos modificada por desoxinucleótido y una secuencia de citosina (C) metilada en el extremo 3', si el primer nucleótido del fragmento de ADN en la colección de ADN es una citosina metilada, el fragmento de ADN se amplifica sin corrección de errores, y si el nucleótido no es complementario, se elimina por una reacción de corrección de errores y el fragmento de ADN no se amplifica debido al nucleótido modificado restante en el extremo 3'. Por lo tanto, de acuerdo con este proceso, pueden amplificarse selectivamente fragmentos de ADN que comprenden un fragmento de ADN metilado a partir de una colección de ADN.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método para detectar un ácido nucleico diana, comprendiendo el método amplificar el ácido nucleico diana en presencia de: (i) un cebador reactivo específico de alelo (ASRP) que comprende, en su extremo 5', una secuencia de marcaje que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria al ácido nucleico diana, un único nucleótido modificado y una secuencia de nucleótidos complementaria al ácido nucleico diana, teniendo el cebador reactivo específico de alelo (ASRP) un extremo 3' modificado de modo que el cebador no pueda actuar como cebador para la ADN polimerasa; (ii) un molde indicador que comprende una secuencia de marcaje y una parte de la secuencia de nucleótidos complementaria al

ácido nucleico diana; y (iii) una ADN polimerasa que tiene actividad exonucleasa 3'→5'.

En la presente invención, la secuencia de marcaje del cebador reactivo específico de alelo puede consistir en 15-30 nucleótidos y el nucleótido único modificado no puede actuar como cebador para la ADN polimerasa.

El molde indicador de acuerdo con la presente invención comprende, en el extremo 3', una secuencia de nucleótidos que puede unirse a la secuencia de marcaje y un único nucleótido (N: A, T, C o G) que puede unirse de forma complementaria a una secuencia de nucleótidos complementaria al ácido nucleico diana (secuencia específica de diana) y comprende, en el extremo 5', una secuencia artificial que tiene un tamaño de 20 pb o más.

El método para detectar un ácido nucleico diana de acuerdo con la presente invención comprende específicamente las etapas de: (a) mezclar e hibridar el ácido nucleico diana con: (i) un cebador reactivo específico de alelo (ASRP) que comprende una secuencia de marcaje que comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria al ácido nucleico diana en el extremo 5', un único nucleótido modificado y una secuencia de nucleótidos complementaria al ácido nucleico diana y tiene uno o más nucleótidos modificados en el extremo 3', para que el nucleótido en el cebador reactivo específico de alelo no pueda actuar como cebador para una reacción de la polimerasa; (ii) una secuencia de marcaje y un molde indicador que comprende una parte de la secuencia de nucleótidos complementaria al ácido nucleico diana; y (iii) un cebador complementario al ácido nucleico diana; (b) retirar una parte del cebador reactivo específico de alelo, que incluye la secuencia de marcaje del extremo 5' que no hibrida con el ácido nucleico diana, mediante una ADN polimerasa que tiene actividad exonucleasa 3'→5', seguido por hibridación con el molde indicador; y (c) amplificar el molde indicador hibridado y detectar el ácido nucleico diana basándose en la presencia o ausencia de un producto de amplificación del molde indicador. En este método, si el ácido nucleico diana no está presente o el ácido nucleico diana contiene una mutación, se produce un producto de amplificación del molde indicador, y si el ácido nucleico diana está presente no se produce el producto de amplificación.

Como se muestra en la figura 5, en la presente invención, para realizar PCR usando una ADN polimerasa que tiene actividad exonucleasa 3'→5', se construyó un cebador reactivo específico de alelo que puede unirse de forma complementaria a la parte central de un molde (ácido nucleico diana) además de ambos cebadores de los extremos. El cebador reactivo específico de alelo de la presente invención tiene un extremo 3' modificado de modo que no puede actuar como cebador para la ADN polimerasa y un cebador en una reacción de PCR. Al extremo 5' del cebador reactivo específico de alelo se le une una secuencia de marcaje que se une a un molde indicador para su uso como molde para PCR secundaria y que puede actuar como cebador de PCR. A la secuencia de marcaje, se le une un único nucleótido modificado en desoxinucleótido (dN: dA, dT, dG o dC) y una secuencia de nucleótidos complementaria al ácido nucleico diana (secuencia específica de diana).

En la presente invención, si el nucleótido (N) ubicado en el lado 3' del nucleótido único modificado (dN) del cebador reactivo específico de alelo se empareja con el ácido nucleico diana, se genera un fragmento que comprende el nucleótido único modificado (dN) ligado al extremo 3' de la secuencia de marcaje mediante la ADN polimerasa que tiene actividad exonucleasa 3'→5'. Este fragmento puede unirse de forma complementaria al molde indicador, pero no sucede la amplificación del fragmento y no se produce un producto de amplificación del fragmento, porque el nucleótido en el extremo 3' está modificado en desoxinucleótido. Sin embargo, el nucleótido (N) ubicado en el lado 3' del nucleótido único modificado (dN) del cebador reactivo específico de alelo se empareja de forma incorrecta con la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico diana debido a una mutación del ácido nucleico diana, el nucleótido único modificado (dN) en el extremo 3' de la secuencia de marcaje y el nucleótido (N: A, T, G o C) ubicado en el lado 3' del nucleótido único modificado (dN) se eliminan en un estado ligado por la ADN polimerasa que tiene actividad exonucleasa 3'→5' y, por tanto, se genera un fragmento que puede unirse de forma complementaria a la placa indicadora. Este fragmento se une de forma complementaria al molde indicador y se adhiere un nucleótido general (N), no un nucleótido modificado, al extremo 3' del fragmento. Por tanto, sucede la amplificación del fragmento y se produce un producto de amplificación del fragmento.

En la presente invención, el ácido nucleico diana puede ser ADN o ARN y el método de detección de ácido nucleico diana de la presente invención puede usarse para detectar una mutación.

Cuando el método de la presente invención se usa para detectar una mutación, puede detectarse no solamente un polimorfismo de un único nucleótido, sino también una mutación causada por la sustitución, eliminación o inserción de un nucleótido. Además, si no hay presente ninguna mutación en el ácido nucleico diana, se produce un producto de amplificación del molde indicador, y si hay presente una mutación en el ácido nucleico diana, no se produce el producto de amplificación del molde indicador.

Puede prepararse un kit que contiene el cebador reactivo específico de alelo (ASRP) de la presente invención. El kit puede configurarse de diversas maneras dependiendo del uso pretendido. Preferiblemente, el kit puede usarse para la detección de una mutación en un ácido nucleico diana, la detección de metilación de un ácido nucleico diana y la amplificación selectiva de un ácido nucleico diana a partir de una colección de ADN.

El kit puede comprender una ADN polimerasa que tiene actividad de corrección de errores o una ADN polimerasa

que tiene actividad exonucleasa 3'→5' de pendiendo del uso pretendido, y puede comprender opcionalmente reactivos requeridos para la reacción de PCR de amplificación de la diana (por ejemplo, reacción de PCR), tal como tampón y desoxirribonucleótido-5-trifosfato. Opcionalmente, el kit también puede comprender diversas moléculas polinucleotídicas, diversos tampones, reactivos y anticuerpos para inhibir la actividad de la ADN polimerasa.

En el kit, la cantidad óptima de reactivos para su uso en las reacciones específicas puede determinarse por los expertos en la materia a partir de la divulgación de la memoria descriptiva. Típicamente, el kit se prepara como un paquete o compartimento diferente que contiene los componentes mencionados anteriormente.

Ejemplos

A partir de ahora en este documento, la presente invención se describirá en mayor detalle con referencia a los ejemplos. Será obvio para los expertos en la materia que estos ejemplos son con fines ilustrativos únicamente y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención. Por tanto, el alcance sustancial de la presente invención se definirá por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: Detección de la mutación *BRAFV600E* usando ASRP

Para detectar una mutación usando el cebador reactivo específico de alelo (ASRP) de la presente invención, se realizó un experimento sobre la detección de la mutación puntual somática (*BRAFV600ET1799A*) que es una mutación típica de células cancerosas.

Para preparar una mutación (*BRAFV600E* (SEQ ID NO: 2) de *BRAF* de tipo silvestre (cinasa Raf de tipo B; SEQ ID NO: 1), se sintetizó un gen *BRAFV600E* que tenía una mutación T a A (Bioneer, Corea), y se clonó en un vector plasmídico pTOP TA V2 (Enzynomics, Corea) usando un kit central TOPcloner TA (Enzynomics, Corea) (Bioneer, Corea). Para la amplificación de la mutación puntual *BRAFV600E*, se sintetizó un cebador general directo (SEQ ID NO: 3) que tiene una secuencia complementaria a *BRAFV600E*, un cebador ASRP directo (SEQ ID NO: 4) que tiene una secuencia complementaria a *BRAFV600E* y que tiene una sustitución de desoxiguanina (dG) para el segundo nucleótido en el extremo 3', y un cebador inverso que tiene una secuencia complementaria a *BRAFV600E* (SEQ ID NO: 5) (Bioneer, Corea):

[SEQ ID NO: 3] 5'-GTGATTTTGGTCTAGCTACAGA-3'
[SEQ ID NO: 4] 5'-GTGATTTTGGTCTAGCTACA[dG]A-3'
[SEQ ID NO: 5] 5'-TTCTAGTAACTCAGCAGCATCTC-3'

Se usaron 10⁵ copias de plásmidos de *BRAF* de tipo silvestre y del mutante *BRAFV600E* como moldes para amplificación por PCR, y como ADN polimerasa que tiene actividad de corrección de errores 3'→5', se usó la polimerasa Pfu (polimerasa Power-Pfu HelixAmp™, Nanohelix, Corea). Se realizó PCR usando el termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Singapur) y las condiciones de PCR fueron las siguientes. Se añadieron 10⁵ copias de un molde, 2,5 µl de tampón Power-pfu 10x, 1 µl de mezcla de dNTP (10 mM), 1 µl de cada cebador (4 pmol/ul) y polimerasa Pfu (polimerasa Power-Pfu HelixAmp™, 1,25 unidades) a un volumen total de 25 µl, y después se realizó PCR en las condiciones mostradas en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Condiciones de reacción de PCR

Temperatura	Tiempo de reacción	
95 °C	5 min	1 ciclo
95 °C	20 s	40 ciclos
59 °C	40 s	
72 °C	40 s	
72 °C	5 min	
		1 ciclo

Se mezclaron 10 µl del producto de reacción de PCR con tinte de carga de ADN 5x y se cargaron en gel de agarosa al 3 % (agarosa SeaKem LE, Estados Unidos) y se analizó el tamaño del producto de amplificación.

Como resultado, pudo observarse que, cuando se usaba el cebador general, no se producía solamente la amplificación de la mutación *BRAFV600E* (carril 2 en la figura 2), sino también amplificación no específica de *BRAF* de tipo silvestre (carril 1 en la figura 2). Sin embargo, cuando se realizaba PCR usando el ASRP, no se amplificaba el *BRAF* de tipo silvestre usado como molde (carril 5 en la figura 2), y se amplificaba únicamente la mutación *BRAFV600E* usada como molde (carril 4 en la figura 2).

Ejemplo 2: Detección de metilación usando ASRP

Para detectar un gen metilado usando el cebador reactivo específico de alelo (ASRP) de la presente invención, se realizó un experimento sobre la detección de metilación en el gen *SDC2* humano.

Se construyó una secuencia de nucleótidos de *SDC2* metilado (Syndecan-2) (SEQ ID NO: 6) y una secuencia de nucleótidos de *SDC2* no metilado (SEQ ID NO: 7) mediante un método de síntesis génica (Bioneer, Corea) y se clonaron en vectores plasmídicos pTOP TA V2 (Enzymonics, Cores) usando un kit central TOPcloner TA (Enzymonics, Corea) (Bioneer, Corea). Para la amplificación de *SDC2* metilado, se sintetizó un cebador general directo (SEQ ID NO: 8) que tiene una secuencia complementaria a *SDC2* metilado, un cebador ASRP directo (SEQ ID NO: 9) que tiene una secuencia complementaria a *SDC2* metilado y que tiene una sustitución de desoxiguanina; dG) para el segundo nucleótido del extremo 3' y un cebador inverso (SEQ ID NO: 10) que tiene una secuencia complementaria a *SDC2* metilado:

[SEQ ID NO: 8] 5'-TAGAAATTAATAAGTGAGAGGGC-3'
 [SEQ ID NO: 9] 5'-TAGAAATTAATAAGTGAGAGG[dG]C-3'
 [SEQ ID NO: 10] 5'-GACTCAAACCTCGAAAACCTC-3'

Se usaron 10⁵ copias de plásmidos de *SDC2* metilado y *SDC2* no metilado como moldes para amplificación por PCR, y como ADN polimerasa que tiene actividad de corrección de errores 3'→5', se usó la polimerasa Pfu (polimerasa Power-Pfu HelixAmp™, Nanohelix, Corea). Se realizó PCR usando el termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Singapur) y las condiciones de PCR fueron las siguientes. Se añadieron 10⁵ copias de un molde, 2,5 µl de tampón Power-pfu 10x, 1 µl de mezcla de dNTP (10 mM), 1 µl de cada cebador (4 pmol/ul) y polimerasa Pfu (polimerasa Power-Pfu HelixAmp™, 1,25 unidades) a un volumen total de 25 µl, y después se realizó PCR en las condiciones mostradas en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Condiciones de reacción de PCR

Temperatura	Tiempo de reacción	
95 °C	5 min	1 ciclo
95 °C	20 s	40 ciclos
59 °C	40 s	
72 °C	40 s	
72 °C	5 min	1 ciclo

Se mezclaron 10 µl del producto de reacción de PCR con tinte de carga de ADN 5x y se cargaron en gel de agarosa al 3 % (agarosa SeaKem LE, Estados Unidos) y se analizó el tamaño del producto de amplificación.

Como resultado, pudo observarse que, cuando se usaba el cebador general, no se producía solamente la amplificación de la mutación *BRAFV600E* (carril 2 en la figura 2), sino también amplificación no específica de *BRAF* de tipo silvestre (carril 1 en la figura 2). Sin embargo, cuando se realizaba PCR usando el ASRP, no se amplificaba el *BRAF* de tipo silvestre usado como molde (carril 5 en la figura 2), y se amplificaba únicamente la mutación *BRAFV600E* usada como molde (carril 4 en la figura 2).

Como resultado, se demostró que, cuando se usaba el cebador general, aparecía un producto de amplificación tanto en *SDC2* metilado (carril 1 en la figura 3) como *SDC2* no metilado (carril 2 en la figura 3) incluso cuando se usaba el cebador específico de metilación, mientras que cuando se usaba el ASRP específico de metilación de *SDC2*, se observaba un producto de amplificación específico en *SDC2* metilado (carril 4 en la figura 3), pero no se producía amplificación en *SDC2* no metilado (carril 5 en la figura 3).

Aplicabilidad industrial

Como se describe anteriormente, el método de detección que usa el cebador reactivo específico de alelo (ASRP) de acuerdo con la presente invención es una técnica que tiene una especificidad muy alta de amplificación debido a las características de ASRP y una ADN polimerasa con corrección de errores. El método de detección puede detectar de forma eficaz mutaciones (mutaciones puntuales, inserción, eliminación, etc.) incluyendo un polimorfismo de un único nucleótido (SNP) y también puede usarse para detectar metilación de CpG después de tratamiento con bisulfito o para amplificar y detectar un ADN diana partiendo de una secuencia de nucleótidos deseada de una colección de ADN.

Aunque la presente invención se ha descrito en detalle con referencia a las características específicas, será evidente para los expertos en la materia que esta descripción es únicamente para una realización preferida y no limita el alcance de la presente invención. Por tanto, el alcance sustancial de la presente invención se definirá por las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	Genomictree	
5	<120>	Método de amplificación de ácido nucleico usando cebadores de reacción específicos de alelo	
	<130>	PP-B1218	
	<150>	KR10-2013-0035343	
	<151>	01-04-2013	
	<160>	10	
	<170>	KopatentIn 2.0	
10	<210>	1	
	<211>	352	
	<212>	ADN	
	<213>	BRAF (cinasa Raf de tipo B)	
	<400>	1	
	tatagaaatt	agatctcttta cctaaactct tcataatgct tgctctgata ggaaaatgag	60
	atctactggt	ttcctttact tactacacct cagatatatt tcttcatgaa gacctcacag	120
	taaaaatagg	tgatttttggc ctagctacag tgaaatctcg atggagtggg tcccatcagt	180
	ttgaacagtt	gtctggatcc attttgtgga tggtaagaat tgaggctatt ttccactga	240
	ttaaattttt	ggccctgaga tgctgctgag ttactagaaa gtcattgaag gtctcaacta	300
15	tagtattttc	atagttccca gtattcacaa aaatcagtgt tcttattttt ta	352
	<210>	2	
	<211>	352	
	<212>	ADN	
	<213>	BRAF (cinasa Raf de tipo B)V600E	
20	<400>	2	
	tatagaaatt	agatctcttta cctaaactct tcataatgct tgctctgata ggaaaatgag	60
	atctactggt	ttcctttact tactacacct cagatatatt tcttcatgaa gacctcacag	120
	taaaaatagg	tgatttttggc ctagctacag agaaatctcg atggagtggg tcccatcagt	180
	ttgaacagtt	gtctggatcc attttgtgga tggtaagaat tgaggctatt ttccactga	240
	ttaaattttt	ggccctgaga tgctgctgag ttactagaaa gtcattgaag gtctcaacta	300
	tagtattttc	atagttccca gtattcacaa aaatcagtgt tcttattttt ta	352
	<210>	3	
	<211>	22	
25	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
30	<223>	cebador directo de BRAFV600E	
	<400>	3	
	gtgatttttg	totagctaca ga	22

	<210>	4					
	<211>	22					
	<212>	ADN					
	<213>	Secuencia artificial					
5	<220>						
	<223>	ASRP directo de BRAFV600E					
	<220>						
	<221>	misc_difference					
	<222>	(21)					
	<223>	desoxiguanina					
10	<400>	4					
	gtgatttttg	tctagctaca	ga	22			
	<210>	5					
	<211>	23					
	<212>	ADN					
15	<213>	Secuencia artificial					
	<220>						
	<223>	cebador inverso de BRAFV600E					
20	<400>	5					
	ttctagtaac	tcagcagcat	ctc	23			
	<210>	6					
	<211>	350					
	<212>	ADN					
25	<213>	SDC2 con metilación					
	<400>	6					
	aaattagaaa	ttgaatttcg	gtacgggaaa	ggagttcgcg	gaggagtaaa	attatagtag	60
	agtaagaaga	gttttagaga	gtagtttttt	cggagtatta	atttcgtgtc	gggagtgtag	120
	aaattaataa	gtgagagggc	gtcgcgtttt	cggggcgtag	ttgcgggcgg	cgggagtagg	180
	cgtaggagga	ggaagcgagc	gttttcgagt	ttcgagttcg	agttttcgag	tttgagtcgt	240
	aatcgttcgc	gtattttgtt	tccgattcgt	gtgcgcgggt	tgcgtcgagc	gttgggtagg	300
	aggtttcgtt	ttgttttggt	tgtaagtagc	ggttgggagt	agtcggtttt		350
	<210>	7					
30	<211>	350					
	<212>	ADN					
	<213>	SDC2 sin metilación					
	<400>	7					
	aaattagaaa	ttgaattttg	gtatgggaaa	ggagtttgtg	gaggagtaaa	attatagtag	60
	agtaagaaga	gttttagaga	gtagtttttt	tggagtatta	attttgtgtt	gggagtgtag	120
35	aaattaataa	gtgagagggg	gttgtgtttt	tgggggtgtag	ttgtgggtgg	tgggagtagg	180
	tgtaggagga	ggaagtgagt	gtttttgagt	tttgagtttg	agtttttgag	tttgagttgt	240
	aattgttgtg	gtattttgtt	ttggatttgt	gtgtgtgggt	tgtgttgagt	gttgggtagg	300
	aggttttgtt	ttgttttggt	tgtaagtagt	ggttgggagt	agttggtttt		350

	<210>	8		
	<211>	23		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
5	<220>			
	<223>	cebador directo de SDC2 con metilación		
	<400>	8		
		tagaaattaa taagtgagag ggc		23
10	<210>	9		
	<211>	23		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
15	<220>			
	<223>	ASRP directo de SDC2 con metilación		
	<220>			
	<221>	misc_difference		
	<222>	(22)		
	<223>	desoxiguanina		
20	<400>	9		
		tagaaattaa taagtgagag ggc		23
25	<210>	10		
	<211>	19		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
30	<220>			
	<223>	cebador inverso de SDC2 con metilación		
	<400>	10		
		gactcaaact cgaaaactc		19

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar un ácido nucleico diana, comprendiendo el método amplificar el ácido nucleico diana en presencia de una ADN polimerasa que tiene actividad de corrección de errores, y un cebador reactivo específico de alelo (ASRP) que comprende i) una secuencia de nucleótidos complementaria al ácido nucleico diana y ii) un nucleótido sustituido con un 3'-desoxinucleótido,
 5 en el que se produce un producto de amplificación del ácido nucleico diana cuando el cebador reactivo específico de alelo es complementario al ácido nucleico diana, y
 cuando el cebador reactivo específico de alelo no es complementario al ácido nucleico diana, se elimina un
 10 nucleótido no complementario al ácido nucleico diana presente en el extremo 3' del cebador mediante la actividad de corrección de errores de la ADN polimerasa, y no se produce un producto de amplificación del ácido nucleico diana debido al 3'-desoxinucleótido que permanece en el extremo 3' del cebador.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la ADN polimerasa que tiene actividad de corrección de errores tiene
 15 actividad exonucleasa 3'→5'.
3. El método de la reivindicación 1, en el que un nucleótido ubicado al lado del 3'-desoxinucleótido y al extremo 3' del cebador reactivo específico de alelo no se elimina por la actividad de corrección de errores de la ADN polimerasa,
 cuando el nucleótido ubicado al lado del 3'-desoxinucleótido y el extremo 3' del cebador reactivo específico de alelo
 20 es complementario a un ácido nucleico diana, y
 un nucleótido ubicado al lado del 3'-desoxinucleótido y al extremo 3' del cebador reactivo específico de alelo se elimina y, por tanto, el 3'-desoxinucleótido permanece en el extremo 3', cuando el nucleótido ubicado al lado del desoxinucleótido y el extremo 3' no es complementario al ácido nucleico diana.
4. El método de la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
 25 (a) mezclar e hibridar el ácido nucleico diana con un cebador reactivo específico de alelo (ASRP) para obtener un producto de hibridación;
 (b) amplificar el ácido nucleico diana en el producto de hibridación en presencia de una ADN polimerasa que
 30 tiene actividad de corrección de errores; y
 (c) detectar el ácido nucleico diana basándose en la presencia o ausencia de un producto de amplificación del ácido nucleico diana.
5. El método de la reivindicación 4, en el que la concentración del cebador reactivo específico de alelo (ASRP) es
 35 0,1-20 M.
6. El método de la reivindicación 4, en el que la amplificación en la etapa (b) se realiza por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
7. El método de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico diana es ADN o ARN.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ácido nucleico diana tiene una mutación.
9. El método de la reivindicación 8, en el que la mutación está causada por la sustitución, delección o inserción de un
 45 nucleótido del ácido nucleico diana.
10. El método de la reivindicación 8, en el que se produce un producto de amplificación del ácido nucleico diana, cuando no hay ninguna mutación presente en el ácido nucleico diana, y
 no se produce un producto de amplificación del ácido nucleico diana cuando hay una mutación presente en el ácido
 50 nucleico diana.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ácido nucleico diana es de un patógeno.
12. El método de la reivindicación 11, en el que el patógeno se selecciona del grupo que consiste en virus,
 55 eubacterias y hongos.
13. El método de la reivindicación 11, en el que se produce un producto de amplificación del ácido nucleico diana en presencia de un patógeno, y no se produce en ausencia de un patógeno.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ácido nucleico diana tiene citosinas
 60 metiladas.
15. El método de la reivindicación 14, en el que el método para detectar el ácido nucleico diana metilado comprende las etapas de:
 65 (a) tratar química o enzimáticamente el ácido nucleico diana para convertir un nucleótido de citosina no metilado

en uracilo u otros nucleótidos sin convertir un nucleótido de citosina metilado;

(b) mezclar e hibridar el ácido nucleico diana, tratado química o enzimáticamente, a un cebador reactivo específico de alelo (ASRP) para obtener un producto de hibridación, y amplificar el producto diana en el producto de hibridación en presencia de una ADN polimerasa que tiene actividad de corrección de errores; y

5 (c) detectar la metilación del ácido nucleico diana basándose en la presencia o ausencia de un producto de amplificación del ácido nucleico diana.

16. El método de la reivindicación 15, en el que el ácido nucleico diana metilado produce un producto de amplificación, y un ácido nucleico diana no metilado no produce un producto de amplificación.

10

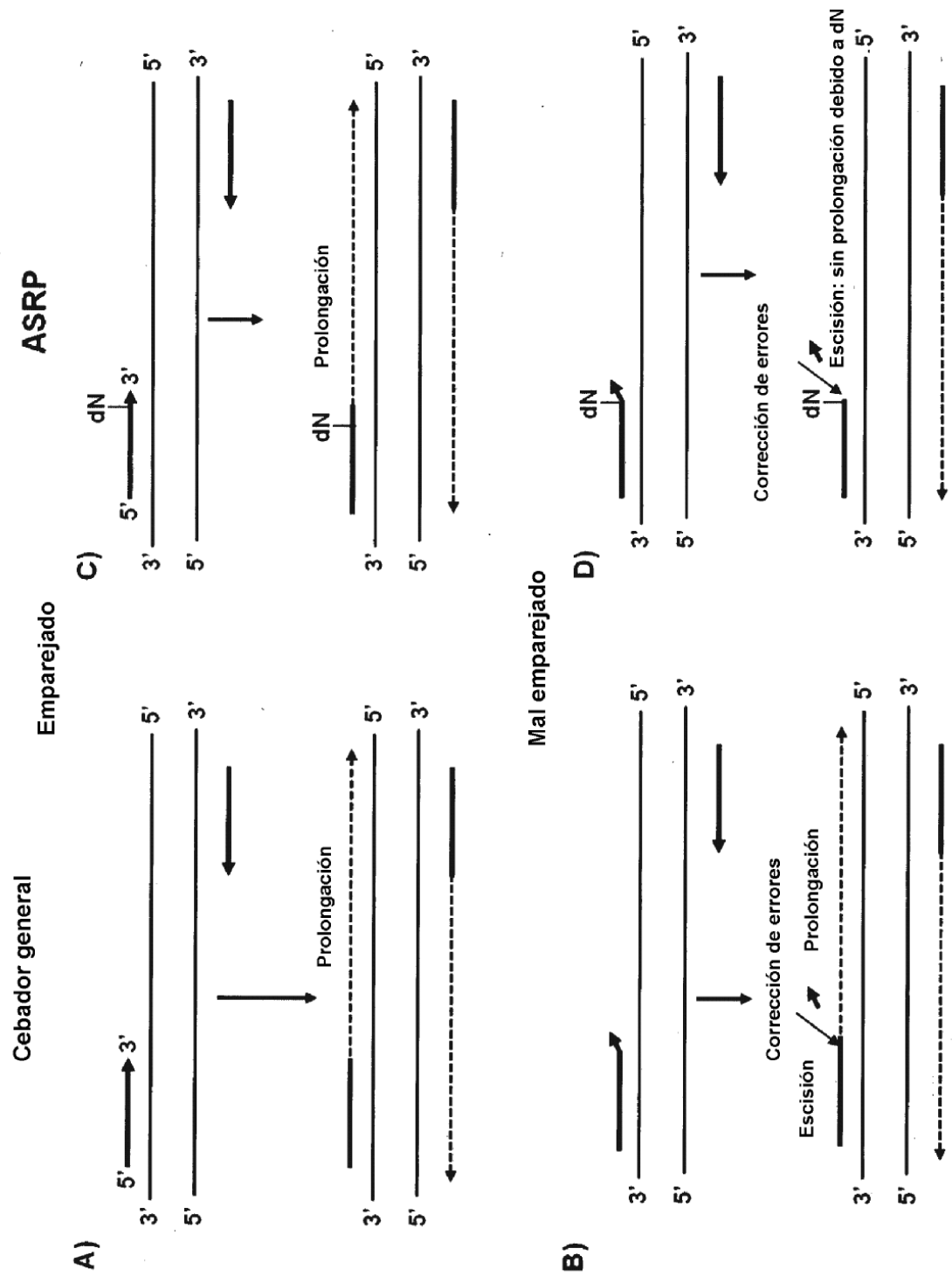


Fig.1

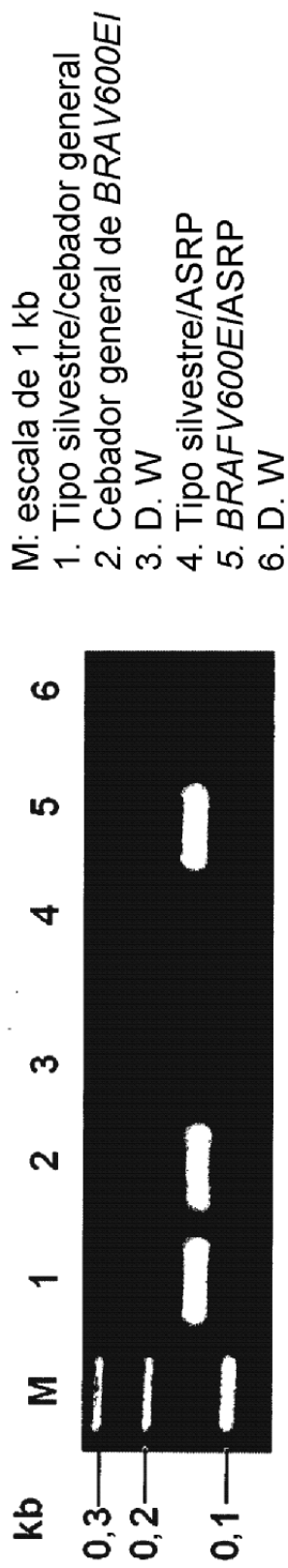


Fig.2

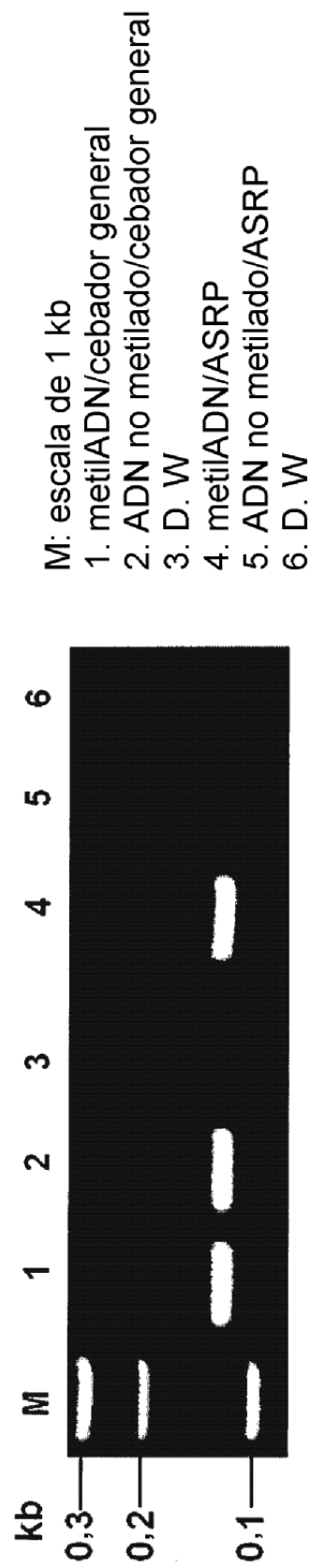
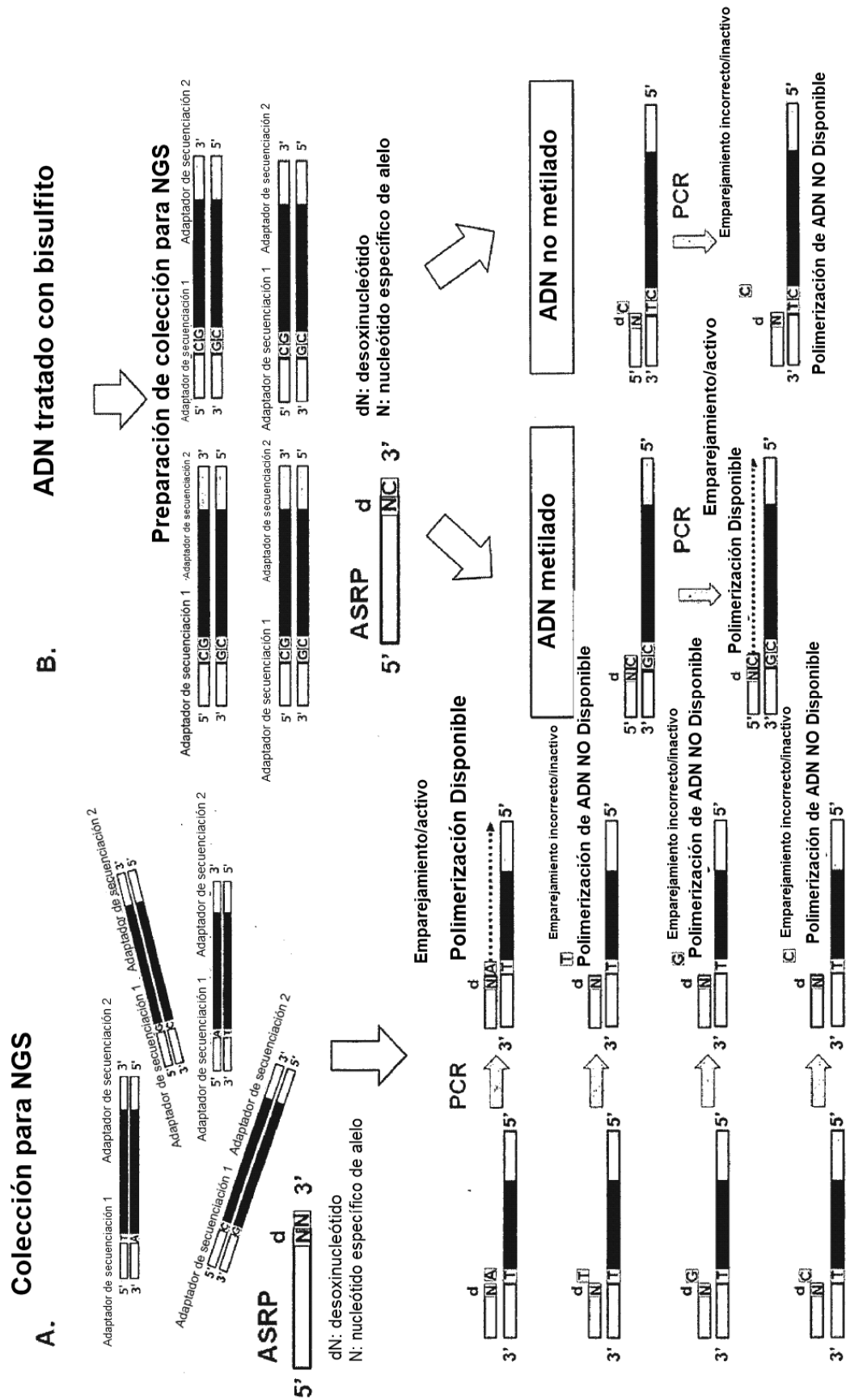


Fig.3



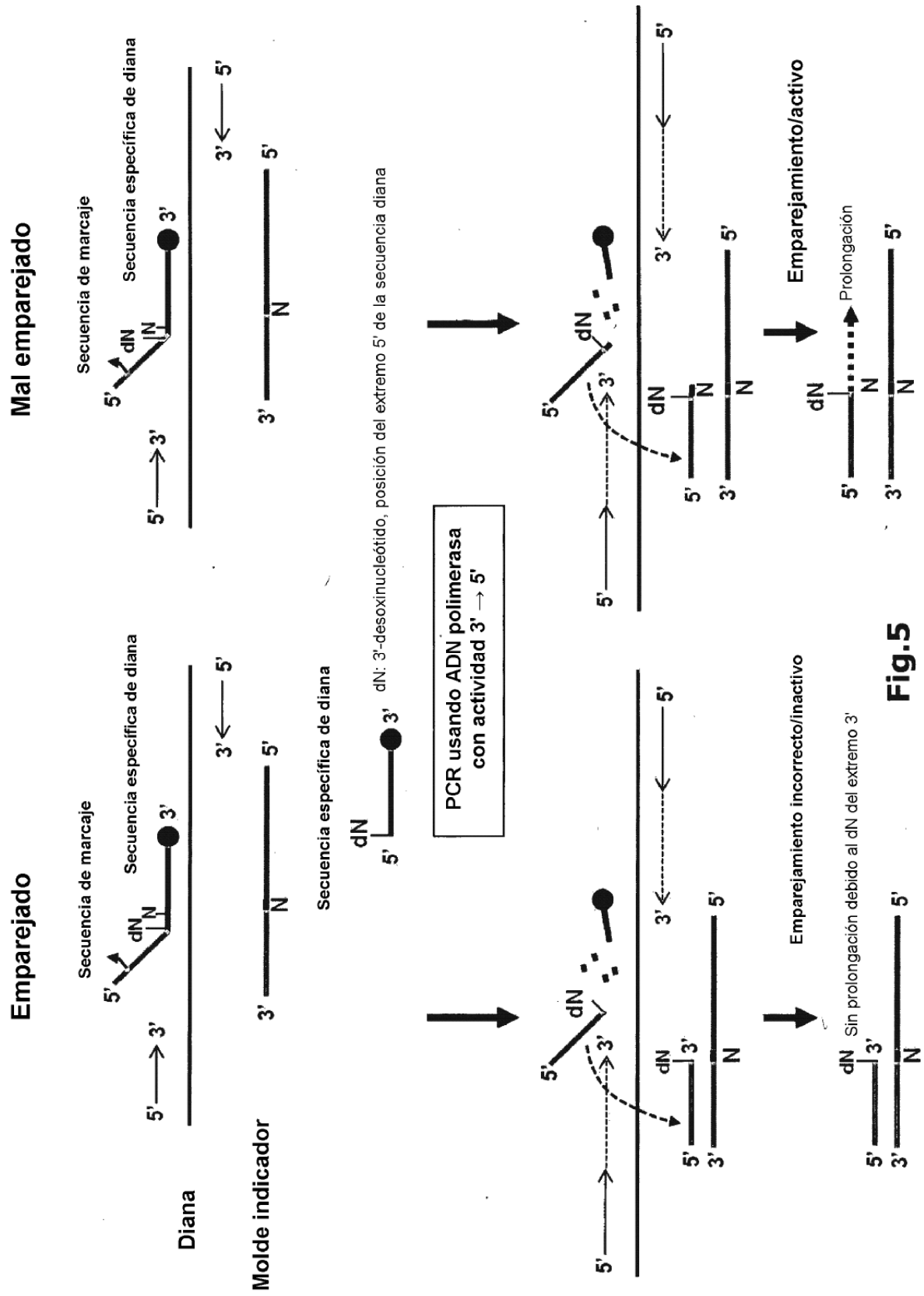


Fig.5