

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 695 580**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2016 PCT/US2016/037918**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2017 WO17007586**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2016 E 16787706 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 3134554**

54 Título: **Método para reducir la amplificación de dímeros de cebadores**

30 Prioridad:

07.07.2015 US 201562189686 P

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

09.01.2019

73 Titular/es:

**PILLAR BIOSCIENCES INC. (100.0%)
12 Michigan Drive
Natick, Massachusetts 01760, US**

72 Inventor/es:

**WANG, ZHAOHUI y
SONG, GANG**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 695 580 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para reducir la amplificación de dímeros de cebadores

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método para reducir la amplificación de dímeros de cebadores en una reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) múltiple.

Antecedentes de la invención

10 La PCR múltiple consiste en múltiples conjuntos de cebadores dentro de una sola mezcla de PCR para producir amplicones que son específicos de diferentes secuencias de ADN. Al dirigirse a múltiples genes a la vez, se puede obtener información adicional a partir de un solo ensayo que de otra manera requeriría varias veces los reactivos y los esfuerzos para realizarlo.

15 Uno de los principales obstáculos que pueden disminuir la sensibilidad del ensayo de la PCR múltiple es la acumulación de dímeros de cebadores (PD, por sus siglas en inglés). Un PD consiste en moléculas de cebadores que se hibridan entre sí debido a cadenas de bases complementarias, particularmente en los extremos 3' de los cebadores. La presencia de muchos pares de cebadores en concentraciones muy altas en las reacciones de PCR múltiple aumenta las posibilidades de formación de dímeros de cebadores. Una vez formados, los PD cortos tienden a amplificarse de manera muy eficiente, inhibiendo potencialmente la amplificación de las secuencias de ADN deseadas por la utilización masiva de cebadores y otros reactivos. La formación de PD puede reducirse mediante una combinación de diferentes enfoques, incluidos el diseño especial de cebadores y los métodos de modificación, el uso de polimerasa Taq de arranque en caliente, los aditivos de PCR y las condiciones de ciclos de PCR optimizadas.

20 Se han descrito métodos de diseño y modificación de cebadores para reducir la formación de PD. Brownie et al (Nucleic Acids Res, 25 (16): 3235-41, 1997) describen sistemas no dimerizados asistidos por homo-etiquetado (HANDS, por sus siglas en inglés: *Homo-Tag Assisted Non-Dimer System*). En la PCR HANDS, todos los cebadores específicos diana contienen una secuencia de cola común en sus extremos 5' a baja concentración y se mezclan con un único cebador específico de cola a una concentración más alta. Después de al menos dos ciclos de PCR diana específica, la temperatura de hibridación se eleva para los ciclos de amplificación posteriores que son impulsados completamente por el cebador específico de cola. En consecuencia, las cadenas sencillas de todos los productos de PCR, incluidos los amplicones deseados y productos secundarios como el PD, tienen extremos 5' y 3' complementarios que conducen a la formación de las mismas estructuras de tallo-bucle. Debido a las altas concentraciones locales de las secuencias de cola, las estructuras de tallo-bucle formadas en productos cortos, como el PD, son muy estables y superan la subsiguiente hibridación del cebador específico de cola, lo que da como resultado la inhibición de la amplificación del PD. Sin embargo, con la misma secuencia de cola en cada extremo de todos los cebadores, este método requiere que los amplicones diana sean lo suficientemente largos como para minimizar los efectos inhibitorios de los bucles en el tallo en los productos objetivo correctos. Dependiendo de la longitud y la composición de los amplicones diana en una PCR altamente multiplicada, la estrechez en el bucle del tallo de cada amplicón varía, lo que puede llevar a una amplificación significativamente desequilibrada. Además, el bucle en el tallo puede no ser lo suficientemente estable como para inhibir la formación de PD entre los cebadores largos.

40 El documento de patente US nº 5,792,607 (Backman et al) y de solicitud de patente US nº de publicación 20140329245 describen un método que utiliza la endonucleasa IV para separar los 3' no extensibles modificados de los cebadores para activar los cebadores tras la hibridación específica cebador-molde. Dobosy et al. (BMC Biotechnol. 11: 80, 2011) describen un método de PCR dependiente de RNasa H (rhPCR, por sus siglas en inglés) que utiliza RNAasa H para separar una única base de ARN posicionada cerca del extremo 3' de los cebadores bloqueados para activar los cebadores en la hibridación específica cebador-molde. Este método se comercializó recientemente por IDT (Integrated DNA Technologies, solicitud de patente US nº de publicación 2009/0325169, PCT/US2012/030413). Todas estas estrategias requieren bases modificadas en los cebadores y enzimas adicionales para la activación del cebador, lo que da como resultado un mayor coste.

45 Peleg et al (Appl. Environ. Microbiol., 75: 6393-6398, 2009; WO/2009/004630) describen que los cebadores quiméricos de ADN-ARN en la PCR reducen la formación de PD. Se ha descrito que el cebador de oligonucleótido de cebado doble (DPO, por sus siglas en inglés) (Seegene Technologies) reduce la formación de PD en PCR (Chun et al., Nucleic Acids Res. 35 (6): e40, 2007). El DPO comprende dos regiones de cebado separadas (el extremo 5' estabilizador y el extremo 3' determinador) unidas por un enlazador de polideoxinosina. Las hibridaciones no específicas de los cebadores, como el PD, se reducen en el extremo 3' del cebador DPO debido a la estructura "burbuja" que comprende los enlaces de hidrógeno débiles del enlazador de polideoxinosina. Las bases de ARN anteriores en los cebadores quiméricos y el enlazador de polideoxinosina en los cebadores DPO aumentan significativamente la complejidad y el coste de la fabricación de cebadores.

55 Scatterfield (J. Mol. Diagn., 16: 163-173, 2013) describe cebadores cooperativos que consisten en dos secuencias de ADN unidas a través de un enlazador de polietilenglicol, ya sea 5' a 5' o 5' a 3'. Los resultados indican que las reacciones de PCR singleplex que utilizan cebadores cooperativos reducen enormemente la propagación del cebador-cebador en presencia de dímeros de cebador agregados. El documento WO2008/118839 describe una PCR múltiple

que involucra cebadores específicos diana directos e inversos con colas 5' idénticas para suprimir la formación de dímeros de cebadores. A pesar de estos esfuerzos, la formación de PD sigue siendo un gran reto en la PCR múltiple. En particular, el nivel múltiple para el enriquecimiento diana en aplicaciones de secuenciación de segunda generación (NGS, por sus siglas en inglés) es extremadamente alto cuando cientos de o incluso miles de cebadores están presentes en el mismo grupo de reacción de PCR. Todos estos cebadores pueden potencialmente formar dímeros de cebadores.

Breve descripción de los dibujos.

FIG. 1A ilustra un primer ciclo y un segundo ciclo de PCR para la amplificación de dos secuencias diana, con t1F1, t2R1, t3F2 y t1F1^R2 como cebadores. FIG. 1B ilustra la interacción de F1 y R2, y la formación, amplificación e inhibición del dímero de cebadores.

FIG. 2 muestra que F1 y R2 tienen 7 bases complementarias en sus extremos 3' y forman un dímero de cebador.

FIG. 3 muestra los resultados de la electroforesis en gel de los productos de PCR mediante amplificación por PCR en 1 etapa (panel superior) y amplificación por PCR en 2 etapas (panel inferior). Carril 1: 1-ple amplicón 1, Carril 2: 1-ple amplicón 2, Carriles 3-8: 2-ple con cebador t1_F1^x_R2, donde x = 0, 3, 6, 9, 12, 15 nucleótidos, respectivamente. Carril M: escalera de ADN de 50 bases.

Descripción detallada del invento

Definición

Un "amplicón" es un fragmento de ADN o ARN que es la fuente y/o el producto de eventos de amplificación o replicación naturales o artificiales. En este contexto, "amplificación" se refiere a la producción de una o más copias de un fragmento genético o secuencia diana, específicamente el amplicón. Como producto de una reacción de amplificación, el amplicón se usa indistintamente con términos comunes de laboratorio, tales como producto de PCR.

Un "dímero de cebadores" (PD, por sus siglas en inglés) es un subproducto potencial en la PCR. Un PD consiste en moléculas cebadoras que se hibridan entre sí debido a las bases complementarias en los cebadores. El alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas. La presente invención se dirige a un método para reducir la amplificación de dímeros de cebadores en una reacción en cadena de polimerasa múltiple (PCR). Cuando un primer cebador directo (F1) y un segundo cebador inverso (R2) tienen una región complementaria en sus extremos 3', puede producirse la formación de un dímero de cebadores. Debido a las altas concentraciones de cebadores, la región complementaria puede ser tan corta como 2-3 nucleótidos para causar la amplificación del dímero de cebadores. Cuando la región complementaria es de al menos 4 o 5 nucleótidos, es casi seguro que se produce la amplificación del dímero de cebadores no deseado.

El presente método reduce el problema del dímero de cebadores cuando un primer cebador directo (F1) y un segundo cebador inverso (R2) tienen una región complementaria en sus extremos 3'. El método comprende las etapas de: (a) obtener una primera secuencia de ácidos nucleicos que comprende una posible primera formación. Debido a las altas concentraciones de cebadores, la región complementaria puede ser tan corta como 2-3 nucleótidos para causar la amplificación del dímero de cebadores. Cuando la región complementaria es de al menos 4 o 5 nucleótidos, es casi seguro que se produzca la amplificación del dímero de cebadores no deseada.

El presente método reduce el problema del dímero de cebadores cuando un primer cebador directo (F1) y un segundo cebador inverso (R2) tienen una región complementaria en sus extremos 3'. El método comprende las etapas de: (a) obtener una primera secuencia de ácidos nucleicos que comprende una primera etiqueta (t1) y un primer cebador directo (F1) complementario a un primer fragmento de ácido nucleico diana, (b) obtener una segunda secuencia de ácidos nucleicos que comprende una segunda etiqueta (t2) y un primer cebador inverso (R1) complementario al primer fragmento de ácido nucleico diana, (c) obtener una tercera secuencia de ácidos nucleicos que comprende una tercera etiqueta (t3) y un segundo cebador directo (F2) complementario a un segundo fragmento de ácido nucleico diana, (d) obtener una cuarta secuencia de ácidos nucleicos que comprende la primera etiqueta (t1), un segundo cebador inverso (R2) complementario al segundo fragmento de ácido nucleico y una secuencia parcial del extremo 5' (F1^), o una secuencia completa del primer cebador directo (F1) entre la primera etiqueta (t1) y el segundo cebador inverso (R2), (e) mezclar el primer y el segundo fragmento de ácido nucleico diana, la primera, la segunda, la tercera, y la cuarta secuencia de ácidos nucleicos, y una cantidad efectiva de reactivos necesarios para realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR); y (f) realizar PCR. La presente descripción incluye métodos que involucran los siguientes elementos:

F1, R1, F2, R2 son cebadores específicos de genes, que son complementarios a regiones específicas de ADN genómico (ADN o amplicones objetivo). La longitud de estos cebadores puede ser elegida por un experto en la técnica. En general, los cebadores específicos de genes tienen una longitud de 6-40, 10-50 o 10-100 nucleótidos. Por ejemplo, los cebadores específicos de genes pueden tener 15-30 nucleótidos.

F1^ es la porción 5' de las secuencias del cebador F1 que están etiquetadas en el extremo 5' del cebador R2; F1^ puede ser una secuencia completa o parcial de F1. La longitud de F1^ puede depender de su contenido en GC, que

afecta a su punto de fusión cuando se hibrida con bases complementarias. En una realización, la secuencia parcial de F1[^] es 1-20, 1-10, o 1-5 nucleótidos más corta que F1. En una realización, la secuencia parcial de F1[^] contiene 10-50, 20-80, 30-70, 40-90, o 50-90% de la secuencia F1. En otra realización, la secuencia parcial de F1[^] contiene 3-30, o 5-20, u 8-15 nucleótidos.

5 Las etiquetas t1, t2 y t3 son secuencias de etiquetas universales que no se unen a los ADN diana. En una realización, las etiquetas t2 y t3 tienen secuencias idénticas. En otra realización, t2 y t3 son diferentes, es decir, no son 100% idénticos. Ambas etiquetas t2 y t3 son diferentes de la etiqueta t1.

10 Las FIGs. 1A y 1B se utilizan con fines ilustrativos y la presente invención no pretende limitarse únicamente a los dibujos. FIG. 1A muestra una amplificación de PCR típica con dos secuencias diana que no tienen regiones superpuestas. FIG. 1B muestra la formación de PD por los cebadores F1 y R2 y la inhibición de la acumulación de PD por la estructura tallo-bucle.

15 FIG. 1B ilustra cómo la presente invención evita la amplificación exponencial de un dímero de cebadores. En la FIG. 1B, un cebador directo F1 y un cebador inverso R2 tienen una región complementaria en sus extremos 3'. Después del ciclo 1, se forman las cadenas PD 1 y PD 2. En el Ciclo 2, en el lado izquierdo, la cadena PD 2 forma un bucle en el tallo, en el que t1 y F1[^] se hibridan con sus contrapartes complementarias respectivamente para formar un tallo, y los nucleótidos restantes forman un bucle. Debido a las altas concentraciones locales de t1 y F1[^] y sus contrapartes complementarias respectivas, p. ej., están en la misma cadena PD 2 y están cerca entre sí, la formación del bucle en el tallo es más favorable que la hibridación con un cebador t1F1 separado; por lo tanto, la hibridación del cebador adicional se bloquea, y no se puede obtener ningún producto de amplificación adicional de la cadena PD 2. La presencia de F1[^] es importante para bloquear completamente la hibridación del cebador (t1_F1) con la cadena PD 2 y luego la amplificación de la cadena PD 2. Sin F1[^], el cebador t1_F1 puede superar la estructura del tallo que contiene solo t1 y luego hibridar con la cadena PD 2. Con la adición de F1[^], el cebador t1_F1 ya no puede superar la estructura del tallo que contiene t1_F1[^] para hibridar con la cadena PD 2.

25 En el ciclo 2 de la FIG. 1B, en el lado derecho, similar a la cadena PD 2, la cadena PD 1 también forma un bucle en el tallo, en el que t1 y F1[^] se hibridan con sus contrapartes complementarias respectivamente para formar un tallo, y los nucleótidos restantes forman un bucle. Debido a la mayor longitud y, por lo tanto, a un mayor punto de fusión del cebador R2 etiquetado (t1_F1[^]_R2), este cebador puede superar a t1_F1[^] en el tallo para la hibridación, y puede obtenerse una posible amplificación lineal para la cadena PD 1. La FIG. 1B ilustra la invención de que con el diseño del cebador de t1F1 y t1_F1[^]_R2, el PD a lo sumo se amplificaría linealmente para una cadena, y no se amplificaría exponencialmente.

30 En la etapa (f) del presente método, la PCR se puede realizar en un paso (una condición de ciclo) o en dos pasos (dos condiciones de ciclo diferentes). En la PCR de dos pasos, la temperatura de hibridación se incrementa en la segunda condición de ciclo, lo que reduce aún más la formación del dímero de cebadores.

35 En un paso, la PCR comprende las etapas de: (f1) activar la ADN polimerasa y los ADN desnaturizantes en la mezcla de (e), y (f2) ciclar la mezcla de (f1) a través de las etapas de desnaturización, hibridación y extensión del cebador de la PCR varias veces para obtener productos de amplificación.

40 En dos pasos, la PCR comprende las etapas de: (f-i) activar la ADN polimerasa y los ADN desnaturizantes en la mezcla de (e), (f-ii) ciclar la mezcla de (f-i) a través de desnaturización, hibridación y etapas de extensión del cebador de la PCR al menos dos veces, y (f-iii) ciclar la mezcla de (f-i) a través de las etapas de desnaturización, hibridación y extensión del cebador de la PCR a una temperatura de hibridación más alta que la de la etapa (f-ii) para obtener productos de amplificación.

45 En la PCR en dos pasos, en la etapa (f-ii), la mezcla de ácidos nucleicos y reactivos se hace pasar por el ciclo de PCR de las etapas de desnaturización, hibridación y extensión del cebador al menos dos veces, como 2-5 veces. En la etapa (f-iii), la mezcla de (f) se hace pasar por más ciclos de PCR de desnaturización, hibridación y extensión del cebador; esta vez a una temperatura de hibridación superior a la de la etapa (f-ii). Por ejemplo, la temperatura de hibridación en la etapa (f-iii) es aproximadamente 4-35°C, o 5-25°C, o 6-20°C, o 6-15°C más alta que la temperatura de hibridación en la etapa (f-ii). Por ejemplo, la primera temperatura de los primeros ciclos de hibridación y extensión (etapa f-ii) es de 58-62°C, por ejemplo, 60°C, y la segunda temperatura de los segundos ciclos de hibridación y extensión (etapa f-iii) es 66-70°C, por ejemplo, 68°C.

50 En la PCR en dos pasos, la temperatura de hibridación en el segundo paso (f-iii) se incrementa para evitar la iniciación repetida de dímeros de cebadores. Después del primer paso de PCR (f-ii), cada producto de secuencia diana amplificada se alarga por las etiquetas en ambos extremos y en consecuencia las regiones de hibridación se alargan por las etiquetas. Por lo tanto, aumentar las temperaturas de hibridación en el segundo paso no afectará la hibridación del cebador a ADN diana específico. Sin embargo, el aumento de las temperaturas de hibridación en el segundo paso reducirá la iniciación de dímeros de cebadores, en el que las regiones complementarias siguen teniendo la misma longitud.

55 Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención. Estos ejemplos pretenden ser meramente ilustrativos de la presente invención y no deben considerarse limitativos.

Ejemplos

La Tabla 1 muestra las secuencias de oligonucleótidos utilizadas en los siguientes ejemplos.

Tabla 1

Oligo_ID ^a	Secuencia*	Tamaño de la dirección (nt)	Amplicón
1: F1	AAAATGATGAAAGTGACAGTTCAG	FWD 24	Amplicón1
2: R1	CCCATGGAAAACAGTTCATGTATTA	REV 24	Amplicón1
3: F2	CATGGACTTTTACAAAACCCATATC	FWD 25	Amplicón2
4: R2	AGCCCACTTCATTAGTACTGGAAC	REV 24	Amplicón2
5: t1	caacgatcgtcgaaattcgc	20	NR
6: t2	tacacgacgctcttcgatct	21	NR
7: t1_F1	caacgatcgtcgaaattcgc AAAATGATGAAAGTGACAGTTCAG	FWD 44	Amplicón1
8: t2_R1	tacacgacgctcttcgatct CCCATGGAAAACAGTTCATGTATTA	REV 45	Amplicón1
9:t1_F1^0_R2	caacgatcgtcgaaattcgc AGCCCACTTCATTAGTACTGGAAC	REV 44	Amplicón2
10:t1_F1^3_R2	caacgatcgtcgaaattcgc <u>AAA</u> AGCCCACTTCATTAGTACTGGAAC	REV 47	
11:t1_F1^6_R2	caacgatcgtcgaaattcgc <u>AAAATG</u> AGCCCACTTCATTAGTACTGGAAC	REV 50	Amplicón2
12:t1_F1^9_R2	caacgatcgtcgaaattcgc <u>AAAATGATG</u> AGCCCACTTCATTAGTACTGGAAC	REV 53	Amplicón2
13:t1_F1^12_R2	caacgatcgtcgaaattcgc <u>AAAATGATGAAG</u> AGCCCACTTCATTAGTACTGGAAC	REV 56	
14:t1_F1^15_P2	caacgatcgtcgaaattcgc <u>AAAATGATGAAGTGA</u> AGCCCACTTCATTAGTACTGGAAC	REV 59	Amplicón2
15:t2_F2	tacacgacgctcttcgatct CATGGACTTTTACAAAACCCATATC	FWD 46	Amplicón2
* La minúscula indica secuencias de etiquetas; El subrayado indica secuencias de F1 parciales insertadas en R2; Las secuencias en mayúsculas sin etiquetar son secuencias específicas de genes.			

5 Oligo 1-4 en la Tabla 1 son cebadores diana específicos para el gen BRCA1 Amplicón1 y Amplicón2 sin las secuencias etiquetadoras; Amplicón1 y Amplicón2 no tienen secuencias superpuestas. Oligo 5-6 son secuencias de etiquetas de Illumina TSCA secuencias de etiquetas. Oligo 7-15 son los cebadores etiquetados utilizados en los Ejemplos 1-3.

F1 y R2 tienen 7 bases complementarias en sus extremos 3'y forman un heterodímero como se muestra en la FIG. 2.

La Tabla 2 muestra los tamaños de los amplicones, incluida la PD, y las ubicaciones en el genoma humano 19.

Tabla 2

Nombre de Amplicón	Gen	Chr hg19	Inicio hg19	Fin hg19	Tamaño específico del gen (pb)	Tamaño con etiqueta (pb) *
Amplicón1 (A1)	BRCA1	chr17	41199461	41199792	332	373
Amplicón2 (A2)	BRCA1	chr17	41244382	41244637	256	297
Dímero F1 + R2	N/A	N/A	N/A	N/A	41	81

* Los tamaños solo reflejan los amplicones usando cebadores que están etiquetados con t1 y t2 sin F1^

La Tabla 3 muestra información para las combinaciones de cebadores en los Ejemplos 1, 2 y 3.

Tabla 3

ID de carril	Nombre	Mezcla de cebador de PCR *				Dímero F1_R2
		Amplicón1 (A1)		Amplicón2 (A2)		Componentes del tallo: Tamaño del tallo (nt)
1	1-ple A1	t1_F1	t2_R1			Irrelevante
2	1-ple A2			t2_F2	t1_F1^0_R2	
3	2-ple	t1_F1	t2_R1	t2_F2	t1_F1^0_R2	t1_sólo; -20
4		t1_F1	t2_R1	t2_F2	t1_F1^3_R2	t1_F1^3; -23
M	Escala de 50 bp					
5	2-ple	t1_F1	t2_R1	t2_F2	t1_F1^6_R2	t1_F1^6; -26
6		t1_F1	t2_R1	t2_F2	t1_F1^9_R2	t1_F1^9; -29
7		t1_F1	t2_R1	t2_F2	t1_F1^12_R2	t1_F1^12; 32
8		t1_F1	t2_R1	t2_F2	t1_F1^15_R2	t1_F1^15; 36

* Los cebadores de interacción, que contienen F1 y R2, se muestran en negrita en la mezcla de cebadores de PCR 2-ple

5 Ejemplo 1: Amplificación por PCR de 1 etapa

Una mezcla de reacción de PCR típica de 25 µL de PCR específica de gen incluyó: 2 µL de ADN genómico humano (Promega Cat# G3041, diluido a 5 ng/µL usando un tampón de bajo TE (USB Cat# 75793)), 12,5 µL de 2x Master Mix (Qiagen Cat# 206413), 8,5 µL de agua libre de nucleasas, y 2 µL de la mezcla de cebadores específicos del gen (2,5 µM cada uno, ver Tabla 3 para obtener información sobre mezclas y la Tabla 1 para las secuencias de oligonucleótidos).

Las reacciones de PCR 1-ple y 2-ple se realizaron en un termociclador de la siguiente manera:

1 Ciclo 95°C 15 min Activación enzimática y desnaturalización inicial del ADN

30 Ciclos 95°C 30 s Desnaturalización

60°C 90 s Hibridación/extensión

1 Ciclo 72°C 5 min Extensión final

1 Ciclo 8°C Mantenimiento

En este ejemplo, la temperatura de hibridación y extensión se mantuvo constante durante el ciclo; por lo tanto, se refirió como amplificación de PCR de 1 etapa.

Ejemplo 2: Amplificación por PCR de 2 etapas

5 Se utilizaron mezclas de reacción de PCR similares a las del Ejemplo 1, pero con un protocolo de ciclaje de PCR de 2 etapas en un termociclador. Los primeros cinco ciclos de hibridación y extensión se realizaron a 60 C, la misma temperatura utilizada en el Ejemplo 1; los siguientes 25 ciclos de hibridación y extensión se realizaron a una temperatura aumentada de 68°C para inhibir la iniciación de dímeros de cebador.

El protocolo de PCR de 2 etapas se enumera de la siguiente manera:

1 Ciclo	95°C	15 min	Activación enzimática y desnaturalización inicial del ADN
5 Ciclos	95°C	30 s	Desnaturalización
	60°C	90 s	Hibridación/extensión
25 Ciclos	95°C	30 s	Desnaturalización
	68°C	90 s	Hibridación/extensión a una temperatura mayor
1 Ciclo	72°C	5 min	Extensión final
1 Ciclo	8°C		Mantenimiento

Ejemplo 3: electroforesis en gel de agarosa

10 Los productos de PCR se analizaron en un dispositivo E-Base (Life Technologies). Se mezclaron 2 µL de cada producto de PCR con 18 µL de agua libre de nucleasas y luego se cargaron directamente en un 2% de E-gel. Se realizó una electroforesis de ADN de productos de PCR diluidos y una escalera de ADN de 50 pb (Invitrogen Cat# 10488-043). Al final del experimento, se capturó una imagen digital del gel por un E-gel Imager (Life Technologies). Los resultados se muestran en la FIG. 3.

15 En la FIG. 3, el panel superior muestra los resultados del protocolo de PCR de 1 etapa (Ejemplo 1) y el panel inferior muestra los resultados del protocolo de PCR de 2 etapas (Ejemplo 2). Los carriles 1 y 2 son PCR 1-ple que muestran los tamaños de los amplicones 1 y 2. Las reacciones restantes son todas PCR 2-ple (carriles 3-8). Cuando estos dos amplicones se múltiplicaron juntos, debido a la fuerte interacción de los extremos 3 'de F1 y R2, los amplicones del dímero F1 + R2 se formaron y dominaron la reacción de PCR (como se muestra en las Carriles 3) tanto en las condiciones de PCR en 1 etapa como en las de PCR en 2 etapas. Las estructuras de tallo formadas en la PD en los carriles 4-8 contienen secuencias t1 (20 nt) además de 3, 6, 9, 12 y 15 nucleótidos de la parte 5' del extremo de las secuencias F1, respectivamente. La introducción de secuencias de F1 parciales redujo la cantidad de dímero detectada en los carriles 4-8 en comparación con el carril 3 (sin secuencia de F1). Cuando las amplificaciones del dímero se inhibieron suficientemente, los amplicones diana se volvieron detectables (Carril 6 en el panel superior y Carril 5 en el panel inferior). Cuando se alcanzó una inhibición casi completa de las amplificaciones del dímero en el carril 7-8 en ambos paneles, los dos productos de los amplicones diana dominaron las reacciones.

20 La invención, y la manera y el proceso de hacerla y usarla, se describen ahora en términos tan completos, claros, concisos y exactos que permiten a cualquier persona experta en la técnica a la que pertenece, hacer y usar la misma. Debe entenderse que lo anterior describe realizaciones preferidas de la presente invención y que pueden realizarse modificaciones en las mismas sin apartarse del alcance de la presente invención como se expone en las reivindicaciones. Para señalar particularmente y reclamar claramente el tema considerado como invención, las siguientes reivindicaciones concluyen la especificación.

Listado de secuencias

- 35 <110> WANG, Zhaohui SONG, Gang
- <120> Método para reducir la amplificación de dímeros de cebadores
- <130> 113970-8002.WO01
- 40 <150>US 62/189,686
- <151> 2015-07-07
- <160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 1
 aaaatgatga agtgacagtt ccag 24

15 <210> 2
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 2
 cccatggaaa cagttcatgt atta 24

25 <210> 3
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 3
 catggacttt tacaaaacct atac 25

35 <210> 4
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

40 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

45 <400> 4
 agcccacttc attagtactg gaac 24

50 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

55 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 5
 caacgatcgt cgaaattcgc 20

60 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

65 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

	<400> 6 tacacgacgc tcttccgatc t	21
5	<210> 7 <211> 44 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido sintético	
	<400> 7 caacgatcgt cgaaattcgc aaaatgatga agtgacagtt ccag	44
15	<210> 8 <211> 45 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20	<220> <223> oligonucleótido sintético	
25	<400> 8 tacacgacgc tcttccgatc tccatggaa acagttcatg tatta	45
30	<210> 9 <211> 44 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> oligonucleótido sintético	
35	<400> 9 caacgatcgt cgaaattcgc agcccacttc attagtactg gaac	44
40	<210> 10 <211> 47 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> oligonucleótido sintético	
45	<400> 10 caacgatcgt cgaaattcgc aaaagccac ttcattagta ctggaac	47
50	<210> 11 <211> 50 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> oligonucleótido sintético	
55	<400> 11 caacgatcgt cgaaattcgc aaaatgagcc cacttcatta gtactggaac	50
60	<210> 12 <211> 53 <212> ADN <213> secuencia artificial	
65	<220> <223> oligonucleótido sintético	

ES 2 695 580 T3

<400> 12
caacgatcgt cgaaattcgc aaaatgatga gccactca ttagtactgg aac 53

5 <210> 13
<211> 56
<212> ADN
<213> secuencia artificial

10 <220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 13
caacgatcgt cgaaattcgc aaaatgatga agagcccact tcattagtac tggaac 56

15 <210> 14
<211> 59
<212> ADN
<213> secuencia artificial

20 <220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 14
caacgatcgt cgaaattcgc aaaatgatga agtgaagccc acttcattag tactggaac 59

25 <210> 15
<211> 46
<212> ADN
<213> secuencia artificial

30 <220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 15
tacacgacgc tctccgatc tcatggactt ttacaaaacc catatc 46

35

REIVINDICACIONES

1. Un método para reducir la amplificación de dímeros de cebadores en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple, que comprende las etapas de:
- 5 (a) obtener una primera secuencia de ácido nucleico que comprende una primera etiqueta (t1) y un primer cebador directo (F1) complementario a una cadena de un primer fragmento de ácido nucleico diana de doble cadena,
- (b) obtener una segunda secuencia de ácidos nucleicos que comprende una segunda etiqueta (t2) y un primer cebador inverso (R1) complementario a la otra cadena del primer fragmento de ácido nucleico diana de doble cadena,
- 10 (c) obtener una tercera secuencia de ácidos nucleicos que comprende una tercera etiqueta (t3) y un segundo cebador directo (F2) complementario a una cadena de un segundo fragmento de ácido nucleico diana de doble cadena,
- (d) obtener una cuarta secuencia de ácidos nucleicos que comprende la primera etiqueta (t1), un segundo cebador inverso (R2) complementario a la otra cadena del segundo fragmento de ácido nucleico diana de doble cadena, y una secuencia parcial del extremo 5' (F1[^]) o una secuencia completa del primer cebador directo (F1) entre la primera etiqueta (t1) y el segundo cebador inverso (R2), en el que el primer cebador directo (F1) y el segundo cebador inverso (R2) tienen una región complementaria en sus extremos 3', F1[^] tiene 3-30 nucleótidos o 40-90% de la secuencia F1,
- 15 (e) mezclar el primer y el segundo fragmentos de ácido nucleico diana, la primera, la segunda, la tercera y la cuarta secuencias de ácidos nucleicos, y una cantidad efectiva de reactivos necesarios para realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR); y
- 20 (f) realizar la PCR.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa (f) comprende:
- (f1) activar la ADN polimerasa y los ADN desnaturalizantes en la mezcla de (e),
- 25 (f2) ciclar la mezcla de (f1) a través de las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión del cebador de PCR varias veces para obtener productos de amplificación.
3. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa (f) comprende:
- (f-i) activar la ADN polimerasa y los ADN desnaturalizantes en la mezcla de (e),
- (f-ii) ciclar la mezcla de (f-i) a través de las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión del cebador de la PCR al menos dos veces, y
- 30 (f-iii) ciclar la mezcla de (f-ii) a través de las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión del cebador de la PCR varias veces a una temperatura de hibridación más alta que la de la etapa (f-ii) para obtener productos de amplificación.
4. El método según la reivindicación 3, en el que la temperatura de hibridación en la etapa (f-iii) es 4-35°C más alta que la temperatura de hibridación en la etapa (f-ii).
- 35 5. El método según la reivindicación 1, en el que las etiquetas t3 y t2 tienen la misma secuencia.
6. Método según la reivindicación 1, en el que la secuencia de ambas etiquetas t3 y t2 es diferente de la secuencia de la etiqueta t1.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 4, en el que F1[^] tiene 3-30 nucleótidos de la secuencia F1 desde el extremo 5'.
- 40 8. El método según la reivindicación 1 o 4, en el que F1[^] tiene 40-90% de la secuencia F1 desde el extremo 5'.
9. El método según la reivindicación 1, en el que F1, F2, R1 y R2 son cebadores específicos de gen.

Cebado específico multi-objetivo

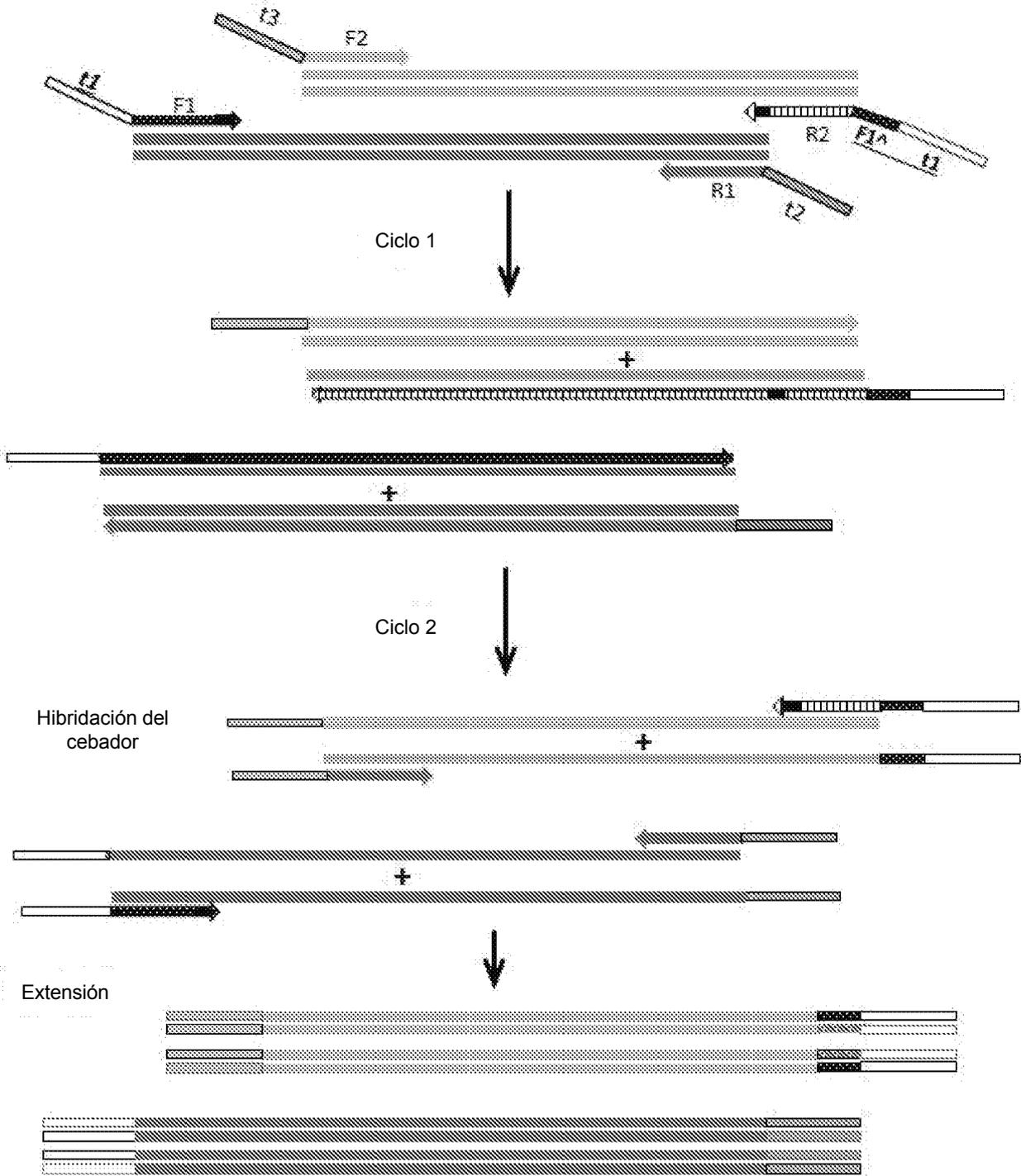
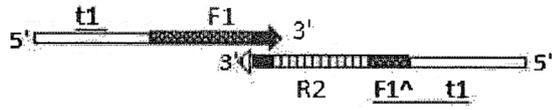


FIG. 1A

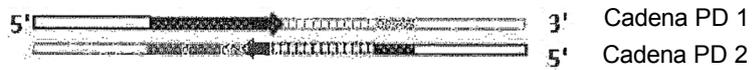
Interacción F1 & R2: Iniciación PD



Ciclo 1



Generación F1R2_PD

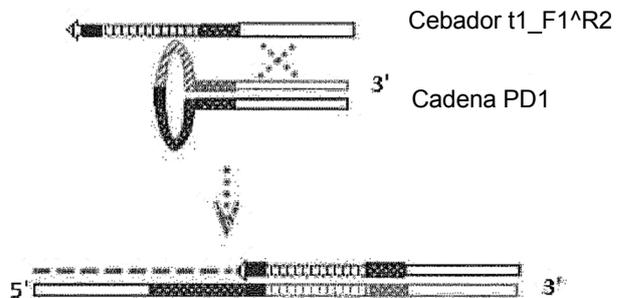
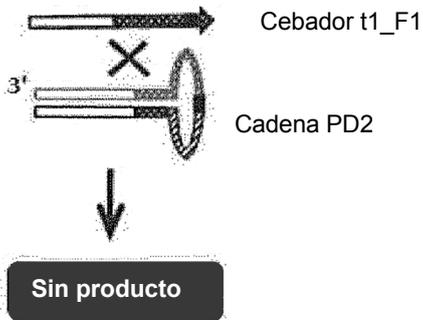


Se muestran las regiones complementarias correspondientes en las zonas más claras

Ciclo 2



Formación del bucle del tallo, inhibición de la amplificación, y repetición de la iniciación del PD (mostrado arriba)



Posible amplificación lineal

FIG. 1B

5' caacgatcgtcgaattcgcaaaatgatgaagtgacagttccag 3' t1-F1
|||||
t1-R2 3' CAAGTCATGATTACTTACCCGACgottaagctgtagcaac 5'

FIG. 2

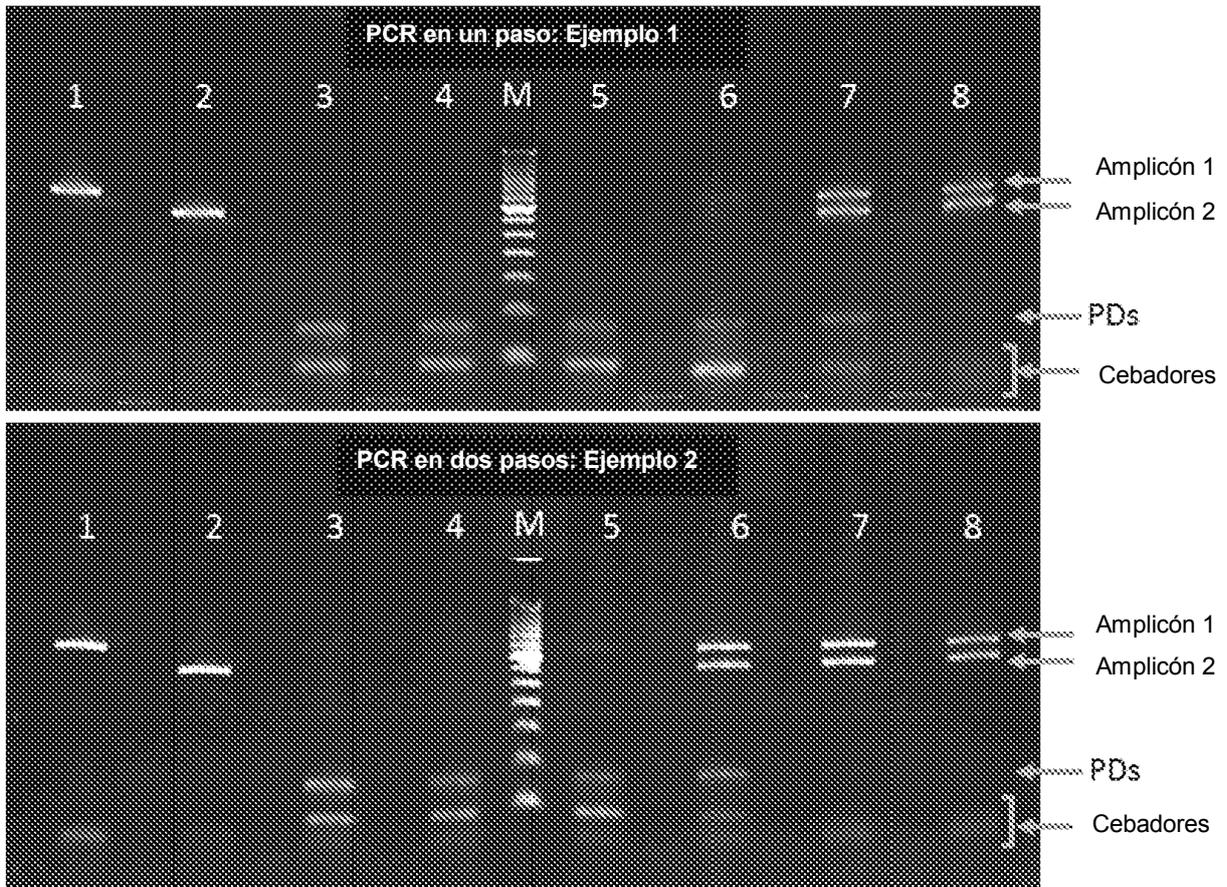


FIG. 3