(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 732 012**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/68 (2008.01)
C12P 19/34 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/US2014/026163**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14160254**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14774536 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2971175**

(54) Título: **Minimización de errores utilizando uracil-ADN-N-glicosilasa**

(30) Prioridad:

14.03.2013 US 201361782698 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.11.2019

(73) Titular/es:

ABBOTT MOLECULAR INC. (100.0%)
1300 E. Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018, US

(72) Inventor/es:

SHAH, ANKUR y
CHOI, WON

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

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

Minimización de errores utilizando uracil-ADN-N-glicosilasa

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] Aquí se incluye tecnología relativa a modificación enzimática de ácidos nucleicos y en particular, pero no exclusivamente, a los métodos, kits y composiciones relacionados con el uso de uracil-ADN-N-glicosilasa para minimizar o eliminar los errores en una secuencia de ADN debida a la desaminación de residuos de citosina.

ANTECEDENTES

[0002] Los cambios en el pH, temperatura, fuerza iónica, presión, etc., se utilizan a menudo en procesos de biología molecular y ensayos para efectuar cambios en componentes de la muestra, tales como ácidos nucleicos, proteínas, cofactores, etc. Sin embargo, algunas manipulaciones biológicas moleculares de componentes de muestra particulares (por ejemplo, una proteína particular) producen efectos indeseables en otros componentes de muestra (por ejemplo, un ácido nucleico). Por ejemplo, el uso de una enzima activada por calor para la biología molecular requiere un período de calentamiento (por ejemplo, de 10 a 20 minutos a 95°C) para activar la enzima. Durante este calentamiento, los ácidos nucleicos (p.ej., ADN) presentes en la muestra también se calientan. Calentar un ácido nucleico induce la desaminación de la citosina (ver, por ejemplo, Lindahl y Nyberg (1974) "Deamización inducida por el calor de residuos de citosina en el ácido desoxirribonucleico, Bioquimica 13 (16): 3405), que resulta en conversión de la base de citosina a una base de uracilo. Mientras que una base de citosina se combina con una guanina, una base de uracilo se combina con una adenina. Como tal, la base de uracilo codifica una adenina durante la síntesis de una cadena de ADN complementaria. Este error inicial en una cadena de ADN da como resultado una mutación de G a A y/o una mutación de C a T en las cadenas de ADN que luego se sintetizan a partir de la plantilla dañada.

[0003] Mientras que una molécula de ADN de cadena simple con 2 millones de bases experimentará un solo evento de desaminación que implica citosina cada 2,8 horas a pH 7,4 y 37°C, de una incubación de 95°C del ADN induce la desaminación de la citosina a una velocidad que es aproximadamente 2×10^{-7} eventos de desaminación por segundo (véase, por ejemplo, Lindahl y Nyberg, supra). Según esta tasa, el calentamiento del ADN durante 10 minutos a 95°C provoca la conversión de una citosina en un uracilo en aproximadamente 1 de cada 8333 citosinas. En consecuencia, esta tasa es relevante ya que las muestras biológicas moleculares a menudo comprenden más de un millón (o incluso más de mil millones) de residuos de citosina. Esta conversión es un problema para los ensayos de detección de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en los que los SNP seleccionados para la detección son conversiones de G a A o de C a T. Por ejemplo, aproximadamente 1 de cada 8333 copias de una secuencia de tipo salvaje se convertiría en una copia mutante durante la activación por calor y, por lo tanto, generaría un resultado falso positivo de que el SNP estaba presente en la muestra. Como resultado, se necesitan tecnologías para abordar la desaminación térmica de los ácidos nucleicos en procesos biológicos moleculares.

[0004] El documento WO 2007/120627 discute métodos y composiciones para reparar un polinucleótido utilizando una ADN ligasa, al menos una endonucleasa, así como un cofactor seleccionado de NAD + o ATP. Pruvost *et al.* 2005 analiza la minimización de la contaminación del ADN en muestras antiguas de ADN usando una uracil-N-glucosilasa. El documento WO 2011/106315 discute procesos automatizados para aislar, amplificar y analizar una secuencia de ácido nucleico diana que puede estar presente en una muestra de prueba de fluido.

RESUMEN

[0005] Por consiguiente, se describe en este documento tecnología relacionada con la modificación enzimática de ácidos nucleicos y en particular, pero no exclusivamente, con métodos y composiciones relacionadas con el uso de uracil-ADN-N-glicosilasa (una enzima "UDG", típicamente codificado por un gen llamado UNG) para minimizar o eliminar errores en una secuencia de ADN debido a la desaminación de residuos de citosina (por ejemplo, como resultado del calentamiento del ADN). Las glicosilasas de uracil-ADN evitan la fijación de mutaciones de C a U y de G a A en el ADN replicado al eliminar el uracilo de las moléculas de ADN antes de que puedan servir como plantillas para la síntesis de ADN. La uracil-ADN-N-glicosilasa rompe el enlace N-glicosílico que conecta la base de uracilo con el esqueleto del ADN al sacar la base dañada de la doble hélice y escindir el enlace N-glicosídico, eliminando así la base de nitrógeno dañada y dejando intacto el esqueleto de azúcar y fosfato. Como resultado de este proceso, se produce un sitio abásico (también llamado sitio apurínico/apirimidínico o sitio AP) en la cadena de ADN.

[0006] Sitios abásicos causan polimerasas a la parada. Bajo algunas condiciones, los sitios abásicos producen roturas en una cadena de ADN (por ejemplo, espontáneamente y/o por la acción de una enzima que escinde los ácidos nucleicos en un sitio abásico). En cualquier caso, una polimerasa no pasa por el sitio abásico y, por lo tanto, no introduce una base en una hebra complementaria opuesta al sitio abásico. Como resultado, la polimerasa no produce una cadena de ADN mutante complementaria a una plantilla de ADN dañada, que resulta de cebar con un cebador de oligonucleótido dañado, o como resultado de otros ácidos nucleicos dañados en varios métodos biológicos moleculares. Por lo tanto, la base dañada no causa una proliferación de secuencias mutantes en una muestra. Sin esta actividad, la U resultante de la C dañada guía a una polimerasa para incorporar una A en lugar de

una G en la cadena complementaria opuesta durante la síntesis de ADN; Las siguientes rondas de síntesis incorporan una T opuesta a la errante A. Como resultado, el evento de desaminación inicial da como resultado la fijación de la mutación de C a T y de G a A en todas las copias subsiguientes. La digestión de las bases de C da como resultado mutaciones en poblaciones naturales.

[0007] Además, la desaminación de bases C que produce bases U es significativamente problemática en métodos que sintéticamente amplifican los ácidos nucleicos, por ejemplo, en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una reacción en cadena de la ligasa, una reacción de extensión del cebador, y en otras reacciones de amplificación como se describe con más detalle a continuación. Como ejemplo, durante una PCR se produce exponencialmente la amplificación del ADN. Como resultado, los eventos menores que representan una pequeña proporción de los ácidos nucleicos en una muestra, como la desaminación de una única base C en una sola cadena de ADN, se amplifican y se representan en cantidades significativas durante la PCR y en el producto final de PCR, Además, los efectos de meseta en los ciclos posteriores de una PCR dan como resultado la sobre representación de especies inicialmente pequeñas de ácidos nucleicos en el producto final amplificado. Estos problemas de desaminación se ven agravados por los periodos de calentamiento durante el termociclado asociado a la PCR que se sabe que inducen la desaminación de las bases C.

[0008] Por consiguiente, la tecnología descrita en el presente documento se refiere a enzimas que reconocen y eliminan las bases U del ADN. En algunas realizaciones, la enzima se aísla de un organismo estable al calor. Las enzimas estables al calor son producidas por varios procesos y la tecnología no está limitada por la fuente de la enzima estable al calor. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la enzima termoestable es una enzima aislada de un organismo termofílico (por ejemplo, un miembro termofílico de la Archaea, como *Archaeglobus fulgidis*).

[0009] La tecnología abarca composiciones, métodos y mezclas de reacción que comprenden (o que comprenden el uso de) una enzima nativa estable al calor que reconoce y elimina bases U de ADN, por ejemplo, un nativo calor estable uracil-ADN-N-glicosilasa; una enzima estable al calor recombinante que reconoce y elimina las bases U del ADN, por ejemplo, una uracil-ADN-N-glicosilasa resistente al calor, una enzima estable al calor de tipo salvaje que reconoce y elimina las bases U del ADN, por ejemplo, una uracil-ADN-N-glicosilasa estable al calor de tipo salvaje; una enzima estable al calor mutante que reconoce y elimina las bases U del ADN, por ejemplo, una uracil-ADN-N-glicosilasa estable al calor mutante; y/o una enzima termoestable diseñada que reconoce y elimina las bases U del ADN, por ejemplo, una uracil-ADN-N-glicosilasa termoestable diseñada.

[0010] En algunas realizaciones, la enzima se aísla de un organismo mesófila y es una enzima termoestable. En algunas realizaciones, una enzima estable al calor se produce a partir de una enzima menos estable al calor por métodos como la mutagénesis aleatoria, el modelado in silico, la mutagénesis racional (dirigida), el diseño racional de la enzima (dirigida), la evolución in vitro (por ejemplo, SELEX), etc. En algunas realizaciones, la enzima es una enzima estable al frío (por ejemplo, aislada de un organismo psicrofílico o criófilo) que también es estable al calor. En algunas realizaciones, la enzima es una uracil-ADN-N-glicosilasa (una "UDG" o una "UNG").

[0011] Uracil-ADN-N-glicosilasas de calor estable están disponibles comercialmente. Además, se conocen las secuencias de nucleótidos y/o las secuencias de aminoácidos de varias uracil-ADN-N-glicosilasas estables al calor y las secuencias de genomas de muchos organismos, incluidos muchos termófilos. Como tal, uno puede comprar una uracil-ADN-N-glicosilasa estable al calor o aislar una uracil-ADN-N-glicosilasa estable al calor de un organismo basado en secuencias conocidas de nucleótidos y/o proteínas y secuencias genómicas disponibles, por ejemplo, por PCR (por ejemplo, utilizando cebadores dirigidos a regiones conservadas, utilizando cebadores degenerados), métodos de sonda o por síntesis completa in vitro. Los termófilos se distinguen de los mesófilos por características tales como su temperatura de crecimiento óptima (por ejemplo, que es más alta que la temperatura de crecimiento óptima de un mesófilo) y características genómicas (por ejemplo, como un mayor contenido de GC).

[0012] Como tal, en algunas realizaciones de la tecnología incluye métodos y composiciones relacionadas con un UDG estable al calor que conserva su actividad durante los períodos de calentamiento, por ejemplo, durante las etapas de calentamiento de una PCR, las etapas de calentamiento de una reacción de secuenciación, las etapas de calentamiento de la preparación de la muestra y/o durante la incubación a alta temperatura, por ejemplo, a 60°C o más, 70°C o más, 80°C o más, a 90°C o más, o a 95°C o más. Por ejemplo, algunos métodos de PCR utilizan una polimerasa activada por calor, como una polimerasa Taq activada por calor. A menudo, la polimerasa permanece inactiva hasta que se calienta a 95°C o más. Durante este período de calentamiento, se produce la desaminación de las bases C.

[0013] La tecnología es ampliamente aplicable para minimizar o eliminar errores de secuencia en un ácido nucleico debido a la desaminación de las citosinas, por ejemplo, como resultado de cualquier calentamiento del ácido nucleico en una muestra. El calentamiento de las muestras a menudo se realiza en técnicas de biología molecular utilizadas para preparar muestras, por ejemplo, para aislar y preparar ácidos nucleicos y otras biomoléculas. Por ejemplo, la preparación de ácidos nucleicos a partir de muestras embebidas en parafina fijadas con formalina (muestras FFPE) a menudo se asocia con períodos de calentamiento que producen la desaparición de la citosina y errores asociados en las secuencias de los ácidos nucleicos aislados de las muestras FFPE. Como otro ejemplo, el calentamiento se usa a menudo para preparar ácidos nucleicos para la secuenciación (por ejemplo, en la

preparación de bibliotecas de secuenciación) y durante las propias reacciones de secuenciación. Por consiguiente, la tecnología es aplicable a las tecnologías de secuenciación existentes y a las tecnologías de secuenciación aún por desarrollar, por ejemplo, métodos de preparación y protocolos asociados con la secuenciación de Sanger y Maxam, tecnologías de secuenciación de Segunda generación (también conocida como Próxima generación o Próxima generación), Tercera generación (también conocida como Next-Next-Gen), o Cuarta generación (también conocida como N3-Gen) que incluyen, pero no se limitan a, pirosecuenciación, secuenciación por ligación, secuenciación de una sola molécula, secuencia por síntesis (SBS), molécula SBS masiva clonal paralela, única paralela masiva, tiempo real de molécula única paralela masiva, tecnología de nanopóreo paralelo de molécula única masiva en tiempo real, métodos que utilizan guías de onda de modo cero, etc. Morozova y Marra proporcionan una revisión de algunas de estas tecnologías en Genómica. 92: 255 (2008). Las tecnologías ejemplares son métodos que incluyen pasos de amplificación, como la pirosecuenciación comercializada por Roche como las plataformas tecnológicas 454 (por ejemplo, GS 20 y GS FLX), la plataforma Solexa comercializada por Illumina y la plataforma comercializada de Detección y Ligado de Oligonucleótidos Soportados (SOLiD) comercializada Por Applied Biosystems. Otros enfoques, también conocidos como secuenciación de una sola molécula, se ejemplifican en la plataforma HeliScope comercializada por Helicos BioSciences, y están surgiendo plataformas (p.ej., secuenciación de nanoporos, detección basada en pH de eventos de incorporación de nucleótidos, tecnologías Xpandomer) comercializadas por VisiGen, Oxford Nanopore Technologies Ltd., Life Technologies/Ion Torrent y Pacific Biosciences, respectivamente.

[0014] La tecnología también se relaciona con métodos asociados con la preparación de muestras, tales como la restricción digestión, amplificación del genoma, la fragmentación, reparación final, ligadura (por ejemplo, ligadura de enlazador), la separación de cadenas, la fusión de estructuras secundarias y/o terciarias, eliminación de contaminantes, eliminación de proteínas, lisis celular, preparación de ácidos nucleicos a partir de tejidos y/o células y/o fluidos biológicos, unión a un soporte sólido, cebado con cebador, etc.

[0015] La tecnología también encuentra uso en las tecnologías de micromatrices, las tecnologías de detección de sonda (por ejemplo, métodos secantes tales como transferencia de Southern, transferencia de Northern, dot-blot, slot-blot, ensayos de protección de la hibridación, etc.).

[0016] Los métodos de amplificación de ácido nucleico a menudo incorporan calentamiento de muestras. Los ejemplos de técnicas de amplificación de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), amplificación mediada por transcripción (TMA), reacción en cadena de la ligasa (LCR), cadena amplificación por desplazamiento (SDA) y amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA). Los expertos en la materia reconocerán que ciertas técnicas de amplificación (por ejemplo, PCR) requieren que el ARN se revierta al ADN antes de la amplificación (por ejemplo, RT-PCR), mientras que otras técnicas de ampliamplificaciónn directamente el ARN (por ejemplo, TMA y NASBA).

[0017] La reacción en cadena de la polimerasa (Pat. N^{os} 4.683.195, 4.683.202, 4.800.159 y 4.965.188), comúnmente referida como PCR, usa múltiples ciclos de denaturación, hibridación de pares de cebadores a las cadenas opuestas, y extensión del cebador para incrementar exponencialmente los números de copias de una secuencia de ácido nucleico diana. En una variación llamada RT-PCR, la transcriptasa inversa (RT) se usa para hacer un ADN complementario (ADNc) a partir de ARNm, y luego el ADNc se amplifica por PCR para producir múltiples copias de ADN. Para otras diversas permutaciones de la PCR, ver, por ejemplo, la patente de EE.UU. N^{os} 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159; Mullis y otros, Meth. Enzymol. 155: 335 (1987); y, Murakawa et al., ADN 7: 287 (1988.

[0018] La amplificación mediada por transcripción (Pat. N^{os} 5,480,784 y 5,399,491), comúnmente referida como TMA, sintetiza múltiples copias de una secuencia de ácido nucleico diana autocatalíticamente bajo condiciones de temperatura sustancialmente constantes, la fuerza iónica, y pH en donde múltiples copias de ARN de la secuencia diana generan copias adicionales de manera autocatalítica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N^{os} 5.399.491 y 5.824.518. En una variación descrita en la publicación de EE.UU. N^{o} 20060046265, TMA incorpora opcionalmente el uso de restos de bloqueo, restos de terminación y otros restos de modificación para mejorar la sensibilidad y precisión del proceso de TMA.

[0019] La reacción en cadena de la ligasa (Weiss, R., Science 254: 1292 (1991), denominada comúnmente como LCR, utiliza dos conjuntos de oligonucleótidos de ADN complementarios que hibridan con regiones adyacentes del ácido nucleico diana. Los oligonucleótidos de ADN están unidos covalentemente por una ADN ligasa en ciclos repetidos de desnaturalización térmica, hibridación y ligadura para producir un producto de oligonucleótido ligado de doble cadena detectable.

[0020] La amplificación del desplazamiento de hebra (Walker, G. et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 89: 392-396 (1992); Patente de Estados Unidos Nº 5.270.184 y 5.455.166), comúnmente denominada SDA, utiliza ciclos de recocido de pares de secuencias de cebadores para cadenas opuestas de una secuencia diana, extensión del cebador en presencia de un dNTPaS para producir un producto de extensión de cebador hemifosforotiado duplex, sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción hemimodificado y extensión del cebador mediada por polímero desde el extremo 3' de la mella para desplazar una hebra existente y producir una hebra para la siguiente

ronda de recocido, mella y desplazamiento de la hebra del cebador, lo que resulta en una amplificación geométrica del producto. La SDA termofílica (tSDA) utiliza endenucleasas termofílicas y polimerasas a temperaturas más altas en esencialmente el mismo método (Patente EP Nº 0 684 315).

[0021] Otros métodos de amplificación incluyen, por ejemplo: amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (patente de Estados Unidos Nº 5.130.238.), comúnmente conocido como NASBA; uno que usa una ARN replicasa para amplificar la propia molécula de la sonda (Lizardi et al., BioTechnol. 6: 1197 (1988), comúnmente denominada Qβ replicasa; un método de amplificación basado en la transcripción (Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 1173 (1989)), y la representación de secuencias autosostenida (Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 87: 1874 (1990)). Para una discusión más detallada de los métodos de amplificación conocidos, consulte, por ejemplo, Persing, David H., "Técnicas de amplificación de ácido núcico in vitro" en Microbiología médica de diagnóstico: Principios y aplicaciones (Persing et al., Eds.), Pp. 51-87 (Sociedad Americana de Microbiología, Washington, DC (1993)).

[0022] En algunas realizaciones, la amplificación es método de amplificación isotérmica. En algunas realizaciones, los métodos de amplificación son amplificación en fase sólida, amplificación polónica, amplificación de colonias, PCR en emulsión, RCA de perlas, RCA de superficie, SDA de superficie, etc., como reconocerá un experto en la técnica. En algunas realizaciones, se utilizan métodos de amplificación que dan como resultado la amplificación de moléculas de ADN libres en solución o atadas a una matriz adecuada por un solo extremo de la molécula de ADN. En algunas realizaciones, los métodos que se basan en la PCR de puente, donde ambos cebadores de PCR están unidos a una superficie (ver, por ejemplo, los documentos WO 2000/018957, US 7,972,820; 7,790,418 y Adesi y otros, Nucleic Acids Research (2000): 28 (20): E87) se utilizan. En algunos casos, los métodos descritos aquí pueden crear una "tecnología de colonia de polimerasa", o "polonia", en referencia a una amplificación múltiple que mantiene el agrupamiento espacial de amplicones idénticos. Estos incluyen, por ejemplo, polonías in situ (Mitra y Church, Nucleic Acid Research 27, e34, 15 de diciembre de 1999), amplificación de círculo rodante in situ (RCA) (Lizardi et al., Nature Genetics 19, 225, julio de 1998), PCR de puente (US Pat. Nº 5,641,658), PCR de picotitulación (Leamon et al., Electrophoresis 24, 3769, noviembre de 2003) y PCR de emulsión (Dressman et al., PNAS 100, 8817, 22 de julio de 2003).

[0023] La tecnología no está limitada en el tipo (por ejemplo, con respecto a su tamaño, propósito, origen (p.ej. natural o sintético), etc.) de ácido nucleico que está dañado (por ejemplo, mediante la desaminación de la citosina (por ejemplo, desaminación de la citosina inducida por el calor u otra (por ejemplo, inducida por el pH) o incorporación de uracilo en el ADN) y posteriormente se expone a una enzima que elimina el uracilo de un ácido nucleico (por ejemplo, un UDG). Por ejemplo, en algunos procedimientos se daña una sonda, oligonucleótido, cebador, enlazador, genoma, amplicón, plásmido u otro ácido nucleico, por ejemplo, comprende una citosina desaminada, por ejemplo, como resultado del calentamiento. La tecnología abarca la minimización o eliminación de los errores que surgen de estos tipos de ácidos nucleicos dañados.

[0024] Como tal, la tecnología se refiere a un calor estable UDG que retiene la actividad durante y después de una incubación a alta temperatura para activar una polimerasa (por ejemplo, una incubación de 10 minutos a 95°C para activar una polimerasa Taq). Además, la tecnología se relaciona con un UDG estable al calor que se activa a una temperatura alta para evitar el recocido del cebador y la extensión de la hebra durante la PCR. En particular, el UDG elimina las bases U del ADN antes de que una polimerasa coloque una adenina frente al uracilo. La tecnología no está limitada en el UDG que encuentra uso en las composiciones, métodos y usos relacionados. Como tal, cualquier UDG estable o enzima con actividad similar encuentra uso en la tecnología. Como tal, la tecnología proporciona métodos para aumentar la sensibilidad y reducir las tasas de falsos positivos en ensayos de biología molecular que se relacionan con la determinación de una secuencia de ADN. En particular, la tecnología proporciona métodos para aumentar la sensibilidad y reducir las tasas de falsos positivos en ensayos de biología molecular que detectan mutación G a A y/o Ca T como en un ensayo de detección de SNP basado en PCR.

[0025] Las realizaciones de la tecnología incluyen kits para usar uracil-ADN-N-glicosilasa para minimizar o eliminar errores en una secuencia de ADN debido a la desaminación de residuos de citosina. Las realizaciones del kit comprenden uno o más recipientes (por ejemplo, viales, ampollas, botellas, paquetes y similares) que contienen una polimerasa activada por el calor (por ejemplo, una polimerasa para PCR, por ejemplo, PCR en tiempo real) y una enzima estable al calor que reconoce y elimina las bases U del ADN, por ejemplo, una uracil-ADN-N-glicosilasa estable al calor. Algunas realizaciones incluyen una enzima que escinde un ácido nucleico en un sitio abásico (por ejemplo, una nucleasa, por ejemplo, una nucleasa estable al calor). En algunas realizaciones, una única enzima proporciona tanto la actividad de eliminación de uracilo como la actividad de nucleasa; en algunas realizaciones, una enzima proporciona la actividad de eliminación de uracilo y una segunda enzima proporciona la actividad de nucleasa.

[0026] En algunas realizaciones de dichos kits, una composición comprende una mezcla de las dos enzimas (por ejemplo, una polimerasa activa de calor y una enzima termoestable que reconoce y elimina bases U de ADN) y algunas formas de realización de dichos kits comprende dos composiciones, una que comprende una polimerasa termoactiva y una segunda que comprende una enzima estable al calor que reconoce y elimina las bases U del ADN. En los kits que comprenden dos composiciones, las dos composiciones se pueden mezclar antes de usarse,

por ejemplo, en una proporción definida descrita por un protocolo provisto con el kit. Otras realizaciones de kits comprenden un ácido nucleico de control, por ejemplo, para realizaciones de kits que encuentran uso en la detección de mutaciones en ácidos nucleicos (como un ensayo para determinar la presencia de un SNP). Los ejemplos de ácidos nucleicos de control son un ácido nucleico que comprende la secuencia de tipo salvaje en la ubicación de SNP (por ejemplo, un control negativo) y uno o más ácidos nucleicos que comprenden una secuencia mutante en la ubicación de SNP (por ejemplo, un control positivo). Las realizaciones del kit también pueden comprender un ácido nucleico que no está relacionado con el ácido nucleico que es el sujeto del ensayo, por ejemplo, un ácido nucleico que sirve como control de referencia interno para normalizar la cantidad de amplicón producido o la actividad de la Enzima UDG. Por ejemplo, algunos ácidos nucleicos de control son moléculas de ADN sintético que comprenden una o más bases de uracilo para proporcionar un control positivo de la actividad de UDG.

[0027] La tecnología abarca composiciones que son mezclas de reacción. Por ejemplo, las realizaciones de la tecnología incluyen una mezcla de reacción que comprende una polimerasa activada por calor y una enzima estable al calor que reconoce y elimina las bases U del ADN, por ejemplo, una uracil-ADN-N-glicosilasa estable al calor. En algunas realizaciones, la polimerasa activada por calor es una polimerasa estable al calor. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende una polimerasa termoestable y polimerizable de manera activa, p.ej., una polimerasa que agrega nucleótidos a una cadena de un ácido nucleico en la síntesis de un ácido nucleico como un ácido nucleico ADN o ARN. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende una enzima estable al calor que reconoce y elimina las bases U del ADN, por ejemplo, una uracil-ADN-N-glicosilasa estable al calor, que está eliminando de forma activa las bases U del ADN.

[0028] Las realizaciones de la tecnología relacionada con las mezclas de reacción incluyen una mezcla de reacción que comprende una enzima estable al calor que reconoce y elimina las bases en U del ADN, por ejemplo, una uracil-ADN-N-glicosilasa estable al calor en una cantidad de 0,1 unidades, en una cantidad de 1,0 unidades a 2,0 unidades, o en cantidades de más de 2,0 unidades (por ejemplo, 2,5 unidades, 3,0 unidades, 4,0 unidades, 5,0 unidades, 10 unidades, 20 unidades o más). Las formas de realización relacionadas del método comprenden el uso de una enzima estable al calor que reconoce y elimina las bases de U del ADN, por ejemplo, una uracil-ADN-N-glicosilasa estable al calor, en una cantidad de 0,1 unidades, en una cantidad de 1,0 unidades a 2,0 unidades, o en cantidades de más de 2,0 unidades (por ejemplo, 2,5 unidades, 3,0 unidades, 4,0 unidades, 5,0 unidades, 10 unidades, 20 unidades o más).

[0029] Además, las realizaciones de la tecnología relacionada a mezclas de reacción (y métodos relacionados con el uso de mezclas de reacción) incluyen una mezcla de reacción que comprende una enzima termoestable que reconoce y elimina bases U de ADN, por ejemplo, una uracil-ADN-N-glucosilasa termoestable, en una cantidad o en una concentración que es suficiente para eliminar las bases U del ADN y minimizar y/o evitar la proliferación de mutaciones (p.ej., resultantes de la desaminación, p.ej., desaminación inducida por calor, de citosinas), p.ej., en una reacción de amplificación. Además, las realizaciones de la tecnología relacionada con las mezclas de reacción incluyen una mezcla de reacción que comprende una enzima estable al calor que reconoce y elimina las bases U del ADN, por ejemplo, una uracil-ADN-N-glicosilasa estable al calor, en una cantidad o a una concentración que es suficiente para minimizar o eliminar errores en una secuencia de ADN debido a la desaminación de residuos de citosina. Otras realizaciones incluyen mezclas de reacción que comprenden una enzima estable al calor que reconoce y elimina las bases U del ADN, por ejemplo, una uracil-ADN-N-glicosilasa estable al calor, durante y después de un período de activación por calor de una polimerasa a una tasa de al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, o al menos igual o sin cambios con respecto a la velocidad a la que la enzima termoestable que reconoce y elimina las bases U del ADN, por ejemplo, una uracil-ADN-N-glicosilasa estable al calor, elimina las bases U antes del período de activación por calor del calor activado por polimerasa. Por ejemplo, las realizaciones incluyen una mezcla de reacción que comprende una enzima estable al calor que reconoce y elimina las bases U del ADN, por ejemplo, una uracil-ADN-N-glicosilolasa estable al calor, que tiene una actividad durante y después del calor - la activación de una polimerasa activada por calor que es al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, o al menos igual a o sin cambios con respecto a la actividad de la enzima termoestable que reconoce y elimina las bases U del ADN, por ejemplo, una uracil-ADN-N-glicosilasa estable al calor, antes de la activación por calor de una polimerasa activada por el calor.

[0030] Las realizaciones relacionadas comprenden añadir una enzima estable al calor que reconoce y elimina bases U de ADN a una composición que no comprenden previamente una enzima tal. Las realizaciones adicionales se refieren a la adición de al menos 0,1 unidades de una enzima termoestable que reconoce y elimina las bases U del ADN a una composición que comprende menos de 0,1 unidades de dicha enzima, por ejemplo, que comprende menos de 0,1 unidades antes de la adición proporcionada por la presente tecnología para proporcionar una mezcla o composición de reacción de acuerdo con la presente tecnología.

[0031] Algunas realizaciones de método relacionadas comprenden la comparación de los productos de las reacciones (por ejemplo, reacciones de amplificación) que comprenden una enzima termoestable que recononoce y elimina bases U de ADN, por ejemplo, una uracil-ADN-N-glicosilasa estable al calor, a reacciones que no comprenden una enzima termoestable que reconoce y elimina las bases U del ADN, por ejemplo, una uracil-ADN-N-glicosilasa estable al calor. Por ejemplo, estas comparaciones o similares se realizan para verificar que la enzima

termoestable que reconoce y elimina las bases U del ADN está activa y/o se realiza como se espera en una reacción de amplificación, por ejemplo, los productos de una mezcla de reacción que comprende una enzima de calor estable que reconoce y elimina las bases U del ADN comprende menos mutaciones resultantes de la desaminación de las citosinas que los productos de una mezcla de reacción que no comprende una enzima termoestable que reconoce y elimina las bases U del ADN.

[0032] Por consiguiente, en el presente documento se describe una tecnología relacionada con un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana, comprendiendo el método proporcionar una muestra que comprende el ácido nucleico diana; agregar al menos 0,1 a 1 unidad de una uracil-ADN-glicosilolasa y una porción de la muestra a una mezcla de reacción; exponer la uracil-ADN-glicosilolasa a condiciones en las que la uracil-ADN-glicosilolasa escinde una base de uracilo de un ácido nucleico dañado, si está presente; termociclar la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana; y detectar el amplicón que comprende la secuencia diana. En algunas realizaciones, la uracil-ADN glucosilasa es una uracil-ADN-glicosilolasa termoestable. Además, se describen realizaciones en las que la mezcla de reacción comprende una polimerasa y el método comprende además exponer la mezcla de reacción a una temperatura que activa la polimerasa. La tecnología se refiere a la adición activa de una uracil-ADN-glicosilolasa a una mezcla de reacción, por ejemplo, para eliminar o minimizar los errores de secuencia detectados en un ensayo de detección de ácido nucleico, por ejemplo, que resultan de la desaminación de la citocina inducida por calor, tal como en una amplificación por PCR para detectar un SNP. Como tales, se describen realizaciones del método en las que una cantidad o concentración de la uracil-ADN-glicosilolasa es suficiente para eliminar el uracilo del ADN durante y/o después de un período de activación térmica de una polimerasa activada por calor a una velocidad que es de al menos el 30% de una tasa a la que la uracil-ADN-glicosilolasa elimina las bases antes del período de activación térmica de la polimerasa activada por calor. Como tal, en algunas realizaciones, el ácido nucleico dañado no se amplifica y/o no se detecta; en algunas realizaciones, el ácido nucleico dañado se amplifica menos que el ácido nucleico diana; en algunas realizaciones, el ácido nucleico dañado se detecta en un ciclo posterior al del ácido nucleico diana.

[0033] La tecnología no está limitada en el método de detección utilizado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la detección comprende utilizar una sonda marcada. En algunas realizaciones, la detección comprende la secuenciación; en algunas realizaciones, la detección comprende el uso de espectrometría de masas; en algunas realizaciones, la detección comprende la composición de la base. En algunas realizaciones, la detección comprende determinar un patrón de restricción. En algunas realizaciones, la detección comprende el uso de una endonucleasa de colgajo y una o más sondas específicas de alelo (por ejemplo, en un ensayo Invader; ver, por ejemplo, Olivier (2005) "El ensayo Invader para el genotipado de SNP" Mutat. Res. 573: 103-10). Y, en algunas realizaciones, la detección comprende una técnica de separación tal como cromatografía, electroforesis en gel y similares.

[0034] En algunas realizaciones,a la tecnología se refiere a ADN dañados por el calor, por ejemplo, que resulta de una incubación por calor de una polimerasa activada por calor. Como tal, en algunas realizaciones de la tecnología, la polimerasa es una polimerasa activada por calor. En algunas realizaciones, un ácido nucleico dañado está presente y comprende una base de uracilo; en algunas realizaciones, un ácido nucleico dañado está presente y comprende una citosina desaminada.

[0035] En algunas realizaciones, la secuencia diana es un polimorfismo de un solo nucleótido, por ejemplo, en algunas realizaciones, la secuencia diana comprende una citosina o una guanina.

[0036] En algunas realizaciones, la tecnología se relaciona con un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana (por ejemplo, un SNP y/o que comprende una guanina y/o una citosina), comprendiendo el método proporcionar una muestra que comprende el ácido nucleico diana; agregando al menos 0,1 a 1,0 unidades de una enzima que elimina el uracilo del ADN (por ejemplo, una uracil-ADN-glicosilasa, por ejemplo, una uracil-ADN-glicosilolasa, por ejemplo, en una cantidad o concentración suficiente para eliminar el uracilo del ADN durante y/o después de un período de activación por calor de una polimerasa activada por calor a una tasa de al menos el 30% de la velocidad a la que la uracil-ADN-glicosilolasa elimina las bases antes del período de activación por calor de la polimerasa activada por calor) y una porción de la muestra a una mezcla de reacción; exponer la uracil-ADN-glicosilolasa a condiciones en las que la uracil-ADN-glicosilolasa escinde una base de uracilo de un ácido nucleico dañado (por ejemplo, que comprende una base de uracilo, por ejemplo, una citosina desaminada), si está presente; reciclar la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana; y poner en contacto el amplificador con una sonda de ácido nucleico (por ejemplo, una sonda marcada) específica para la secuencia diana, en donde el ácido nucleico diana se detecta si la sonda hibrida con la secuencia diana; y/o el ácido nucleico dañado no se amplifica y/o no se detecta; y/o el ácido nucleico dañado se amplifica menos que el ácido nucleico diana.

[0037] En algunas realizaciones, la tecnología se refiere a un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana, comprendiendo el procedimiento la proporción de una muestra que comprende el ácido nucleico diana; la adición de al menos 0,1 a 1,0 unidades de una uracil-ADN-glicosilolasa (por ejemplo, una uracil-ADN-glicosilolasa termoestable) y una porción de la muestra a una mezcla de reacción que comprende una polimerasa (por ejemplo, una polimerasa activada por calor); exponer la uracil-ADN-glicosilolasa a condiciones en las que la uracil-ADN-glicosilolasa escinde una base de uracilo de un ácido nucleico dañado, si está presente;

exponiendo la mezcla de reacción a una temperatura que activa la polimerasa; termociclar la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana; y poner en contacto el amplicón con una sonda de ácido nucleico específica para la secuencia diana, en la que el ácido nucleico diana detecta si la sonda hibrida con la secuencia diana.

[0038] En algunas realizaciones, la tecnología se refiere a un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana (por ejemplo, un SNP y/o que comprende una guanina y/o una citosina), comprendiendo el método proporcionar una muestra que comprende el ácido nucleico diana; agregando al menos 0,1 a 1,0 unidades de una enzima que elimina el uracilo del ADN y escinde el ADN en sitios abásicos (por ejemplo, una uracil-ADN-glicosilolasa, por ejemplo, una uracil-ADN-glicosilolasa termoestable, por ejemplo, en una cantidad o concentración que es suficiente para eliminar el uracilo del ADN durante y/o después de un período de activación térmica de una polimerasa activada por calor a una tasa de al menos el 30% de la velocidad a la que la uracil-ADN-glicosilolasa elimina las bases antes del período de activación de calor de la polimerasa activada por calor) y una porción de la muestra a una mezcla de reacción; exponer la uracil-ADN-glicosilolasa a condiciones en las que la uracil-ADN-glicosilolasa escinde una base de uracilo de un ácido nucleico dañado (por ejemplo, que comprende una base de uracilo, por ejemplo, una citosina desaminada), si está presente; termociclar la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana; y poner en contacto el amplicón con una sonda de ácido nucleico (por ejemplo, una sonda marcada) específica para la secuencia diana, en la que el ácido nucleico diana se detecta si la sonda hibrida con la secuencia diana; y/o el ácido nucleico dañado no se amplifica y/o no se detecta; y/o el ácido nucleico dañado se amplifica menos que el ácido nucleico diana.

[0039] En algunas realizaciones, la tecnología se refiere a un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana (por ejemplo, un SNP y/o que comprende una guanina y/o una citosina), comprendiendo el método la proporción de una muestra que comprende el ácido nucleico diana; agregando al menos 0,1 a 1,0 unidades de una enzima que elimina el uracilo del ADN (por ejemplo, una uracil-ADN-glicosilolasa, por ejemplo, una uracil-ADN-glicosilolasa, por ejemplo, en una cantidad o concentración suficiente para eliminar el uracilo del ADN durante y/o después de un período de activación por calor de una polimerasa activada por calor a una tasa de al menos el 30% de la velocidad a la que la uracil-ADN-glicosilolasa elimina las bases antes del período de activación por calor de la polimerasa activada por calor), una enzima que escinde el ADN en un sitio abásico (por ejemplo, una endonucleasa), y una porción de la muestra en una mezcla de reacción; exponer la uracil-ADN-glicosilolasa a condiciones en las cuales la uracil-ADN-glicosilolasa escinde una base de uracilo de un ácido nucleico dañado (por ejemplo, que comprende una base de uracilo, por ejemplo, una citosina desaminada), si está presente; termociclar la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana; y poner en contacto el amplicón con una sonda de ácido nucleico (por ejemplo, una sonda marcada) específica para la secuencia diana, en la que el ácido nucleico diana se detecta si la sonda hibrida con la secuencia diana; y/o el ácido nucleico dañado no se amplifica y/o no se detecta; y/o el ácido nucleico dañado se amplifica menos que el ácido nucleico diana.

[0040] La tecnología se refiere a minimizar los errores de secuencia en amplicones como se detecta por una reacción de secuenciación. Por consiguiente, algunas realizaciones incluyen un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana, comprendiendo el método proporcionar una muestra que comprende el ácido nucleico diana; agregar al menos 0,1 a 1,0 unidades de una enzima que elimina el uracilo del ADN y una porción de la muestra a una mezcla de reacción; exponer la enzima a condiciones en las que la enzima extrae una base de uracilo de un ácido nucleico dañado, si está presente; reciclar la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana; y secuenciando el amplicón para determinar una secuencia de ácido nucleico del amplicón, en donde el ácido nucleico diana se detecta cuando la secuencia de ácido nucleico del amplicón comprende la secuencia diana.

[0041] La tecnología se refiere a minimizar los errores de secuencia en amplicones tal como se detecta mediante una técnica de espectrometría de masas. Por consiguiente, algunas realizaciones incluyen un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana, comprendiendo el método: proporcionar una muestra que comprende el ácido nucleico diana; agregar al menos 0,1 a 1,0 unidades de una enzima que elimina el uracilo del ADN y una porción de la muestra a una mezcla de reacción; exponer la enzima a condiciones en las que la enzima extrae una base de uracilo de un ácido nucleico dañado, si está presente; termociclar la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana; y hacer la prueba del amplicón por espectrometría de masas para determinar una composición química del amplicón, en donde el ácido nucleico diana se detecta cuando la composición química del amplicón coincide con una composición química de la secuencia diana.

[0042] La tecnología se refiere a minimizar los errores de secuencia en amplicones como se detecta por análisis de restricción (por ejemplo, el uso de una enzima de restricción para producir un patrón de restricción, tal como en el análisis de RFLP). Por consiguiente, algunas realizaciones incluyen un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana, comprendiendo el método proporcionar una muestra que comprende el ácido núclico diana; agregar al menos 0,1 a 1,0 unidades de una enzima que elimina el uracilo del ADN y una porción de la muestra a una mezcla de reacción; exponer la enzima a condiciones en las que la enzima extrae una base de uracilo de un ácido nucleico dañado, si está presente; termociclar la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana; y poner en contacto el amplicón con una endonucleasa de restricción para producir un patrón de restricción, en el que el ácido nucleico diana se detecta cuando el patrón de restricción del amplicón

coincide con un patrón de restricción de la secuencia diana.

[0043] La tecnología se refiere a minimizar los errores de secuencia en amplicones cuándo se detectan por un ensayo Invader. Por consiguiente, algunas realizaciones incluyen un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana, comprendiendo el método proporcionar una muestra que comprende el ácido nucleico diana; agregar al menos 0,1 a 1,0 unidades de una enzima que elimina el uracilo del ADN y una porción de la muestra a una mezcla de reacción; exponer la enzima a condiciones en las que la enzima extrae una base de uracilo de un ácido nucleico dañado, si está presente; reciclar la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana; y poner en contacto el amplicón con una endonucleasa de colgajo, en donde el ácido nucleico diana se detecta cuando se detecta un producto de escisión de endonucleasa de colgajo.

[0044] La tecnología se refiere a minimizar los errores de secuencia en amplicones como se detecta por un ensayo de extensión del cebador. Por consiguiente, algunas realizaciones incluyen un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende una secuencia de diana, comprendiendo el método proporcionar una muestra que comprende el ácido nucleico diana; agregar al menos 0,1 a 1,0 unidades de una enzima que elimina el uracilo del ADN y una porción de la muestra a una mezcla de reacción; exponer la enzima a condiciones en las que la enzima extrae una base de uracilo de un ácido nucleico dañado, si está presente; reciclar la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana; y poner en contacto el amplicón con un cebador para un ensayo de extensión del cebador, un nucleótido y una polimerasa, en donde el ácido nucleico diana se detecta cuando la polimerasa agrega el nucleótido al cebador.

[0045] La tecnología se refiere a minimizar los errores de secuencia en amplicones como se detecta por una reacción de detección de ligación. Por consiguiente, algunas realizaciones incluyen un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana, comprendiendo el método proporcionar una muestra que comprende el ácido nucleico diana; agregar al menos 0,1 a 1,0 unidades de una enzima que elimina el uracilo del ADN y una porción de la muestra a una mezcla de reacción; exponer la enzima a condiciones en las que la enzima extrae una base de uracilo de un ácido nucleico dañado, si está presente; termociclar la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana; y poner en contacto el amplicón con un primer oligonucleótido, un segundo oligonucleótido y una ligasa, en donde el ácido nucleico diana se detecta cuando la ligasa liga los oligonucleótidos primero y segundo.

[0046] La tecnología se refiere a minimizar los errores de secuencia en amplicones como se detecta por una propiedad física del amplicón (por ejemplo, la determinación de una temperatura de fusión y/o perfil de fusión, por ejemplo, mediante análisis de curva de fusión de alta resolución, por polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP), por cromatografía líquida de alta resolución y/o de alto rendimiento (HPLC) (p.ej., HPLC por drenaje), por electroforesis (p.ej., electroforesis en gel, p.ej., electroforesis en gel con gradiente de temperatura), etc. Por consiguiente, algunas realizaciones incluyen un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana, comprendiendo el método la proporción de una muestra que comprende el ácido nucleico diana; agregar al menos 0,1 a 1,0 unidades de una enzima que elimina el uracilo del ADN y una porción de la muestra a una mezcla de reacción; exponiendo la enzima a condiciones en las que la enzima escinde una base de uracilo de un ácido nucleico dañado, si está presente; termociclando la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana y determinar una propiedad física del amplicón, en donde el ácido nucleico diana se detecta cuando la propiedad física del amplificador coincide con la propiedad física de la secuencia diana.

[0047] En algunas realizaciones, la tecnología permite la eliminación, reducción y/o minimización errores de secuencia en un ácido nucleico, por ejemplo, un amplicón que se produce por una PCR. Los errores de secuencia en un amplicón se pueden cuantificar de varias maneras. Por ejemplo, la secuencia del amplicón (por ejemplo, una secuencia diana del amplicón) puede alinearse o compararse con una secuencia conocida del ácido nucleico diana (por ejemplo, en comparación con una base de datos o mediante otras técnicas bioinformáticas) para determinar una serie de desajustes entre la secuencia de amplicón y la secuencia conocida. De esta manera, se determinan los desajustes para los amplicones producidos de acuerdo con la tecnología (p.ej., en presencia de una enzima que elimina el uracilo de un ácido nucleico) y para los amplicones producidos por métodos convencionales (p.ej., sin una enzima que retire el uracilo de un ácido nucleico) produce una medida cuantitativa y/o cualitativa de eliminación, reducción y/o minimización de errores de secuencia en un ácido nucleico por la tecnología.

[0048] Por consiguiente, en algunas realizaciones se incluye un método de amplificación para minimizar errores de secuencia en un amplicón que comprende una secuencia diana, comprendiendo el método proporcionar una muestra que comprende un ácido nucleico diana que comprende la secuencia diana; agregar al menos 0,1 a 1,0 unidades de una enzima que elimina el uracilo del ADN y una porción de la muestra a una mezcla de reacción; exponer la enzima a condiciones en las que la enzima escinde una base de uracilo de un ácido nucleico dañado, si está presente; y termociclar la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana, en donde el amplicón comprende menos errores de secuencia resultantes de la desaminación de la citosina en relación con el amplicón producido en ausencia de al menos 0,1 a 1,0 unidades de una enzima que elimina el uracilo del ADN.

[0049] Algunas realizaciones incluyen un método de amplificación para minimizar errores de secuencia en un amplicón que comprende una secuencia diana, comprendiendo el método proporcionar una muestra que comprende un ácido nucleico diana que comprende la secuencia diana; agregar al menos 0,1 a 1,0 unidades de una enzima que elimina el uracilo del ADN y una porción de la muestra a una mezcla de reacción; exponer la enzima a condiciones en las que la enzima extrae una base de uracilo de un ácido nucleico dañado, si está presente; y termociclando la mezcla de reacción para producir un amplificador que comprende la secuencia diana, en donde un primer número de desajustes en la secuencia diana del amplicón determinado por alineación o comparación con la secuencia diana del ácido nucleico diana en la muestra es menor que un segundo número de desajustes en la secuencia diana de un amplicón producido en ausencia de la enzima que elimina el uracilo del ADN determinado por alineación o comparación con la secuencia diana del ácido nucleico diana en la muestra.

[0050] Las realizaciones adicionales permiten el tratamiento de un ácido nucleico antes de la amplificación para eliminar cualesquiera bases de uracilo que están presentes en la muestra de ácido nucleico antes de la amplificación (por ejemplo, como resultado de otros métodos y/o manipulación de la muestra). Por consiguiente, en el presente documento se describen realizaciones de un método de amplificación para minimizar errores de secuencia en un amplicón que comprende una secuencia de destino, comprendiendo el método proporcionar una muestra que comprende un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de destino; agregar al menos 0,1 a 1,0 unidades de una enzima que elimina el uracilo del ADN y una porción de la muestra a una mezcla de reacción; exponiendo la enzima condiciones en las que la enzima extrae una base de uracilo de un ácido nucleico dañado, si está presente, antes del termociclado de la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana, en donde el amplicón comprende menos errores de secuencia resultantes de la desaminación de la citosina relativa al amplicón producido en ausencia de al menos 0,1 a 1,0 unidades de una enzima que elimina el uracilo del ADN.

[0051] Algunas realizaciones incluyen un método de amplificación para minimizar errores de secuencia en un amplicón que comprende una secuencia diana, comprendiendo el método proporcionar una muestra que comprende un ácido nucleico diana que comprende la secuencia diana; agregar al menos 0,1 a 1,0 unidades de una enzima que elimina el uracilo del ADN y una porción de la muestra a una mezcla de reacción; Exponer la enzima a condiciones en las que la enzima escinde una base de uracilo de un ácido nucleico dañado, si está presente, antes del termociclado de la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana, en donde un primer número de desajustes en la secuencia diana de el amplicón determinado por alineación o comparación con la secuencia diana del ácido nucleico diana en la muestra es menor que un segundo número de desajustes en la secuencia diana de un amplicón producido en ausencia de la enzima que elimina el uracilo del ADN determinado por alineación o comparación con la secuencia diana del ácido nucleico diana en la muestra.

[0052] Algunas realizaciones incluyen un método para la detección de un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana, comprendiendo el método proporcionar una muestra que comprende el ácido nucleico diana; agregar al menos 0,1 a 1,0 unidades de una enzima que elimina el uracilo del ADN y también escinde el ADN en un sitio abásico y una porción de la muestra a una mezcla de reacción; exponer la enzima a condiciones en las que la enzima escinde una base de uracilo de un ácido nucleico dañado y escinde el ácido nucleico dañado, si está presente; termociclar la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana; y detectar el amplicón que comprende la secuencia diana.

[0053] Algunas realizaciones incluyen un método para la detección de un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana, comprendiendo el método proporcionar una muestra que comprende el ácido nucleico diana; agregar al menos 0,1 a 1,0 unidades de una enzima que elimina el uracilo del ADN, una enzima que corta el ADN en un sitio abásico, y una porción de la muestra a una mezcla de reacción; la exposición de la enzima a condiciones en las que la enzima que elimina el uracilo del ADN extrae una base de uracilo de un ácido nucleico dañado y la enzima que corta el ADN en un sitio abásico corta el ácido nucleico dañado, si está presente; termociclar la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana; y detectar el amplicón que comprende la secuencia diana.

[0054] En otras realizaciones se dan a conocer una composición que comprende un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana, una polimerasa, una uracilo-ADN-glicosilasa, y un ácido nucleico dañado que comprende una base de uracilo. En algunas realizaciones, la uracil-ADN-glicosilolasa es una uracil-ADN-glicosilolasa mostable. En algunas realizaciones, la composición comprende además una sonda específica para la secuencia diana. Algunas realizaciones particulares revelan que la polimerasa es una polimerasa activada por calor. En ciertas realizaciones, un amplicón resulta de una reacción de amplificación; por consiguiente, en algunas realizaciones, las composiciones de tecnología comprenden además un amplicón que comprende la secuencia diana. Las realizaciones se refieren a la detección de SNP; como tal, en algunas realizaciones, la secuencia diana comprende un polimorfismo de un solo nucleótido. Y, en algunas realizaciones, la secuencia diana comprende una citosina o una guanina.

[0055] En algunas realizaciones se dan a conocer una composición que comprende un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana (por ejemplo, que comprende un SNP, por ejemplo, que comprende una citosina y/o una guanina), una polimerasa (por ejemplo, una polimerasa térmicamente activado), una uracil-ADN-glicosilolasa (por ejemplo, una uracil-ADN-glicosilolasa termoestable), por ejemplo, al menos 0,1 a 1,0 unidades de una uracil-

ADN-glicosilolasa, un ácido nucleico dañado que comprende una base de uracilo, una sonda (por ejemplo, sonda etiquetada) específica para la secuencia diana, y un amplicón que comprende la secuencia diana (p.ej., que comprende un SNP, p.ej., que comprende una citosina y/o una guanina).

[0056] En algunas realizaciones se dan a conocer una composición que comprende un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana (por ejemplo, que comprende un SNP, por ejemplo, que comprende una citosina y/o una guanina), una polimerasa (por ejemplo, una polimerasa térmicamente activado), una uracil-ADN-glicosilolasa (por ejemplo, una uracil-ADN-glicosilolasa termoestable), por ejemplo, una cantidad o concentración de la uracil-ADN-glicosilolasa que es suficiente para eliminar el uracilo del ADN durante y/o después de un período de calor activación de una polimerasa activada por calor a una tasa que es al menos 30% de una tasa a la cual la uracil-ADN-glicosilolasa elimina las bases antes del período de activación por calor de la polimerasa activada por calor, un ácido nucleico dañado que comprende una base de uracilo, una sonda (por ejemplo, una sonda marcada) específica para la secuencia diana y un amplicón que comprende la secuencia diana (por ejemplo, que comprende un SNP, por ejemplo, que comprende una citosina y/o una guanina).

[0057] En algunas realizaciones se describen composiciones que comprenden un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana (por ejemplo, que comprende un SNP, por ejemplo, que comprende una citosina y/o una guanina), una polimerasa (por ejemplo, un calor activa la polimerasa), una uracil-ADN-glicosilolasa (por ejemplo, una uracil-ADN-glicosilolasa termoestable), por ejemplo, una cantidad o concentración de la uracil-ADN-glicosilolasa que es suficiente para eliminar el uracilo del ácido nucleico dañado durante y/o después de un período de activación por calor de la polimerasa activada por calor, un ácido nucleico dañado que comprende una base de uracilo, una sonda (por ejemplo, una sonda marcada) específica para la secuencia diana y un amplicón que comprende la secuencia diana (por ejemplo, que comprende un SNP, por ejemplo, que comprende una citosina y/o una guanina).

[0058] La tecnología incluye formas de realización de una composición que comprende al menos 0,1 a 1,0 unidades de la uracilo-ADN-glicosilasa. La tecnología incluye realizaciones de una composición que comprende una cantidad o concentración de la uracil-ADN-glicosilolasa que es suficiente para eliminar el uracilo del ADN durante y/o después de un período de calentamiento (por ejemplo, durante la activación por calor de una polimerasa activada por calor) a una tasa de al menos el 30% de la tasa a la que la uracil-ADN-glicosilolasa elimina bases previas al periodo de calentamiento. La tecnología incluye realizaciones de una composición que comprende una cantidad o concentración de la uracil-ADN-glicosilolasa que es suficiente para eliminar una cantidad de uracilo del ADN durante y/o después de un período de calentamiento (por ejemplo, durante la activación térmica de una polimerasa activada por calor) que es una cantidad de al menos el 30% de la cantidad de bases de uracilo que la glucosilasa uracil-ADN elimina antes del período de calentamiento. Como tal, la tecnología incluye realizaciones de una composición que comprende una cantidad o concentración de la uracilo-ADN-glicosilasa que es suficiente para eliminar el uracilo del ácido nucleico dañado durante y/o después de un período de activación por calor de la polimerasa activada por calor.

[0059] Las realizaciones del kit están abarcadas por la tecnología. Por ejemplo, en este documento se proporcionan realizaciones de un kit para detectar un ácido nucleico, en el que el kit comprende un primer recipiente que comprende una polimerasa activada por calor y un segundo recipiente que comprende una uracil-ADN-glicosilolasa termoestable. En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente que comprende una polimerasa activada por calor y una uracil-ADN-glicosilolasa termoestable. Algunas realizaciones proporcionan un kit que comprende además un ácido nucleico de control, por ejemplo, como se describe en el presente documento. Algunas realizaciones proporcionan un kit para detectar un ácido nucleico, comprendiendo el kit un primer recipiente que comprende una polimerasa activada por calor; un segundo recipiente que comprende una uracil-ADN-glicosilolasa termoestable; y el kit que comprende además un ácido nucleico de control. Algunas realizaciones proporcionan un kit para detectar un ácido nucleico, comprendiendo el kit un recipiente que comprende una polimerasa activada por calor y una uracil-ADN-glicosilolasa termoestable, y comprendiendo el kit además un ácido nucleico de control.

[0060] Las realizaciones de la tecnología incluyen un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana, comprendiendo el método proporcionar una muestra que comprende el ácido nucleico diana; agregar al menos 0,1 a 1,0 unidades de una uracil-ADN-glicosilolasa y una porción de la muestra a una mezcla de reacción; exponer la uracil-ADN-glicosilolasa a condiciones en las que la uracil-ADN-glicosilolasa escinde una base de uracilo de un ácido nucleico dañado, si está presente; termociclar la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana; y detectar el amplicón que comprende la secuencia diana.

[0061] Las realizaciones de la tecnología incluyen un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana, comprendiendo el método proporcionar una muestra que comprende el ácido nucleico diana; agregar al menos 0,1 a 1,0 unidades de una uracil-ADN-glicosilolasa termoestable y una porción de la muestra a una mezcla de reacción; exponer la uracil-ADN-glicosilolasa termoestable a condiciones en las que la uracil-ADN-glicosilolasa termoestable extrae una base de uracilo de un ácido nucleico dañado, si está presente; termociclando la mezcla de reacción producir una amplicón que comprende la secuencia diana; y detectar el amplicón que comprende la secuencia diana.

[0062] Las realizaciones de la tecnología incluyen un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana (por ejemplo, un SNP, p.ej., que comprende una citosina o guanina), comprendiendo el método proporcionar una muestra que comprende el ácido nucleico diana; agregar al menos 0,1 a 1,0 unidades de una uracil-ADN-glicosilolasa y una porción de la muestra a una mezcla de reacción (por ejemplo, que comprende una polimerasa; por ejemplo, una polimerasa activada por calor; por ejemplo, una calefacción por calor activada por polimerasa de calor estable); exponer la uracil-ADN-glicosilolasa a condiciones en las que la uracil-ADN-glicosilolasa escinde una base de uracilo de un ácido nucleico dañado, si está presente (por ejemplo, un ADN dañado por calor, por ejemplo, un ADN que comprende una citosina desaminada que resulta de, por ejemplo, desaminación inducida por calor, por ejemplo, como ocurre durante la PCR, por ejemplo, durante la incubación por calor de una polimerasa activada por calor); termociclar la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana; y detectar el amplicón que comprende la secuencia diana (por ejemplo, detectar el amplicón utilizando una sonda marcada; secuenciar el amplicón; adquirir los datos de espectrometría de masas del amplicón; detectar el amplicón mediante electroforesis y/o determinar una composición de base del amplicón).

[0063] Las realizaciones de la tecnología incluyen un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana (por ejemplo, un SNP, p.ej., que comprende una citosina o guanina), comprendiendo el método proporcionar una muestra que comprende el ácido nucleico diana; agregar al menos 0,1 a 1,0 unidades de una uracil-ADN-glicosilolasa y una porción de la muestra a una mezcla de reacción (por ejemplo, que comprende una polimerasa; por ejemplo, una polimerasa activada por calor; por ejemplo, una polimerasa activada por calor de calor estable); exponer la mezcla de reacción a una temperatura que active la polimerasa activada por calor; exponer la uracil-ADN-glicosilolasa a condiciones en las que la uracil-ADN-glicosilolasa escinde una base de uracilo de un ácido nucleico dañado, si está presente (por ejemplo, un ADN dañado por calor, por ejemplo, un ADN que comprende una citosina desaminada que resulta de, por ejemplo, desaminación inducida por calor, por ejemplo, como ocurre durante la PCR, por ejemplo, durante la incubación por calor de una polimerasa activada por calor); termociclar la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana; y detectar el amplicón que comprende la secuencia diana (por ejemplo, detectar el amplificador usando una sonda marcada; secuenciar el amplicón; adquirir datos de espectrometría de masas del amplicón y/o determinar una composición de la base del amplicón).

[0064] Las realizaciones de la tecnología incluyen un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana (por ejemplo, un SNP, p.ej., que comprende una citosina o guanina), comprendiendo el método proporcionar una muestra que comprende el ácido nucleico diana; agregar una cantidad o concentración de una uracil-ADN-glicosilolasa que sea suficiente para eliminar el uracilo del ADN durante y/o después de un período de activación térmica de una polimerasa activada por calor a una tasa de al menos 30% de la tasa en la que la uracil-ADN-glicosilolasa elimina las bases antes del período de activación por calor de la polimerasa activada por calor y una porción de la muestra a una mezcla de reacción (por ejemplo, que comprende una polimerasa; por ejemplo, una polimerasa activada por calor; por ejemplo, una polimerasa termoestable activada por calor); exponer la mezcla de reacción a una temperatura que active la polimerasa activada por calor; exponer la uracil-ADN-glicosilolasa a condiciones en las que la uracil-ADN-glicosilolasa escinde una base de uracilo de un ácido nucleico dañado, si está presente (por ejemplo, un ADN dañado por calor, por ejemplo, un ADN que comprende una citosina desaminada que resulta de, por ejemplo, desaminación inducida por calor, por ejemplo, como ocurre durante la PCR, por ejemplo, durante la incubación por calor de una polimerasa activada por calor); termociclar la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana; y detectar el amplicón que comprende la secuencia diana (por ejemplo, detectar el amplicón utilizando una sonda marcada; secuenciar el amplicón; adquirir datos de espectrometría de masas del amplicón y/o determinar una composición de la base del amplicón).

[0065] Las realizaciones de la tecnología incluyen un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana (por ejemplo, un SNP, p.ej., que comprende una citosina o guanina), comprendiendo el método proporcionar una muestra que comprende el ácido nucleico diana; agregar una cantidad o concentración de una uracil-ADN-glicosilolasa que sea suficiente para eliminar el uracilo del ADN durante y/o después de un período de activación térmica de una polimerasa activada por calor a una tasa de al menos 30% de la tasa en la que la uracil-ADN-glicosilolasa elimina las bases antes del período de activación por calor de la polimerasa activada por el calor y una porción de la muestra a una mezcla de reacción (por ejemplo, que comprende una polimerasa; por ejemplo, una polimerasa activada por el calor; por ejemplo, una polimerasa termoestable activada por calor); exponer la mezcla de reacción a una temperatura que active la polimerasa activada por calor; exponer la uracil-ADN-glicosilolasa a condiciones en las que la uracil-ADN-glicosilolasa escinde una base de uracilo de un ácido nucleico dañado, si está presente (por ejemplo, un ADN dañado por calor, por ejemplo, un ADN que comprende una citosina desaminada que resulta de, por ejemplo, desaminación inducida por calor, por ejemplo, como ocurre durante la PCR, por ejemplo, durante la incubación por calor de una polimerasa activada por calor); termociclar la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana; y detectar el amplicón que comprende la secuencia diana (por ejemplo, detectar el amplicón utilizando una sonda marcada; secuenciar el amplicón; adquirir datos de espectrometría de masas del amplicón y/o determinar una composición de la base del amplicón), en donde el ácido nucleico dañado no se amplifica y/o no se detecta; y/o el ácido nucleico dañado se amplifica menos que el ácido nucleico diana.

[0066] Las realizaciones de la tecnología incluyen una composición que comprende un ácido nucleico diana que

comprende una secuencia diana, una polimerasa, una uracil-ADN-glicosilolasa termoestable y un ácido nucleico dañado que comprende una base de uracilo. Las realizaciones de la tecnología incluyen una composición que comprende un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana, una polimerasa, una uracil-ADN-glicosilolasa termoestable, una sonda específica para la secuencia diana, y un ácido nucleico dañado que comprende una base de uracilo. Las realizaciones de la tecnología incluyen una composición que comprende un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana, una polimerasa, una uracilo-ADN-glicosilasa, una sonda específica para la secuencia diana y un ácido nucleico dañado que comprende una base de uracilo.

[0067] Las realizaciones de la tecnología incluyen una composición que comprende un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana, una polimerasa (por ejemplo, una polimerasa activada por calor), una uracil-ADN-glicosilolasa termoestable y un amplicón que comprende la secuencia diana.

[0068] Algunas realizaciones incluyen una composición que comprende una enzima que escinde un ácido nucleico en un sitio abásico, por ejemplo, una nucleasa, por ejemplo, una nucleasa termoestable.

[0069] Las realizaciones de la tecnología incluyen una composición que comprende un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana (por ejemplo, que comprende un SNP, por ejemplo, que comprende una citosina o una guanina), una polimerasa (por ejemplo, una activada por calor y/o polimerasa estable al calor), al menos 0,1 a 1,0 unidades (por ejemplo, al menos 0,1 unidades, al menos 1,0 unidades, al menos 2,0 unidades, al menos 2,5 unidades, al menos 3,0 unidades, al menos 4,0 unidades, al menos 5,0 unidades, al menos 10 unidades, al menos 20 unidades o más) de una uracil-ADN-glicosilolasa termoestable, y un ácido nucleico dañado que comprende una base de uracilo.

[0070] Las realizaciones de la tecnología incluyen una composición que comprende un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana (por ejemplo, que comprende un SNP, por ejemplo, que comprende una citosina o una guanina), una polimerasa (por ejemplo, una activada por calor y (o polimerasa estable al calor), al menos una cantidad o concentración de una uracil-ADN-glicosilolasa que es suficiente para eliminar el uracilo de un ADN durante y/o después de un período de activación por calor de una polimerasa activada por calor a una velocidad que es al menos el 30% de una tasa a la que la uracil-ADN-glicosilolasa elimina las bases antes del período de activación térmica de la polimerasa termoestable de una uracil-ADN-glicosilolasa termoestable, y un ácido nucleico dañado que comprende una base de uracilo.

[0071] Las realizaciones de la tecnología incluyen una composición que comprende un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana (por ejemplo, que comprende un SNP, por ejemplo, que comprende una citosina o una guanina), una polimerasa (por ejemplo, una polimerasa activada por calor o estable al calor), al menos una cantidad o concentración de una uracil-ADN-glicosilolasa que es suficiente para eliminar el uracilo de un ácido nucleico dañado durante y/o después de un período de activación por calor de la polimerasa activada por calor y un ácido nucleico dañado que comprende una base de uracilo.

[0072] Se proporcionan realizaciones del kit que comprenden un primer recipiente que comprende una polimerasa activado por calor, un segundo recipiente que comprende una uracilo-ADN-glicosilasa termoestable, y un ácido nucleico de control (por ejemplo, un control positivo y/o un control negativo). Se proporcionan realizaciones de kit que comprenden un recipiente que comprende una polimerasa activada por calor y una uracil-ADN-glicosilolasa termoestable; y un ácido nucleico de control (por ejemplo, un control positivo y/o un control negativo).

[0073] Las realizaciones adicionales serán evidentes para las personas expertas en la técnica relevante en base a las enseñanzas contenidas en este documento. Por ejemplo, aunque la tecnología se describe en relación con las enzimas termoestables (p.ej., UDG) utilizadas para minimizar los errores debidos a las modificaciones del ADN inducidas por el calor (p.ej., la desaminación de las bases C para formar bases U), la tecnología también se relaciona con otras enzimas estables en una variedad de condiciones en las que tienen lugar modificaciones similares del ADN. Por ejemplo, la tecnología contempla el uso de enzimas estables a pH alto o bajo donde ocurre una desaminación similar (p.ej., de bases C). Por ejemplo, algunas polimerasas se activan por un cambio en el pH en lugar de la activación por calor (aunque, en algunas realizaciones, el cambio en el pH se efectúa por un cambio en la temperatura), y la tecnología abarca una enzima de pH estable para eliminar el uracilo de un ácido nucleico (por ejemplo, un uracilo que se produce como resultado de un cambio en el pH, por ejemplo, como resultado de la desaminación de la citosina inducida por el pH). La tecnología contempla de manera similar las enzimas que son estables en varios ambientes para contrarrestar los efectos de la presión, la fuerza iónica, los solventes orgánicos y otros químicos, etc. sobre las bases de ADN.

[0074] Algunas realizaciones permiten la evaluación de la variación genética (por ejemplo, mediante la detección de uno o más SNP) mediante la generación de una señal específica de la secuencia, la grabación de la señal específica de la secuencia, y el análisis de la señal. En particular, algunas realizaciones comprenden procesar datos sin procesar (por ejemplo, datos sin procesar cuantitativos o cualitativos) para identificar SNP, frecuencias de SNP y/o patrones de expresión específicos del tejido y/o niveles de expresión de los SNP. Ver, por ejemplo, Wang et al (2007) "SNP y análisis de mutación" Adv. Exp. Medicina. Biol. 593: 105-16.

[0075] La tecnología también encuentra uso en la eliminación de uracilo de otros ácidos nucleicos, por ejemplo, en ácidos nucleicos naturales, tales como uracilos introducidos en los ácidos nucleicos durante la diversificación de anticuerpos o el cambio de clase.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0076] Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente tecnología se entenderán mejor con respecto a los siguientes dibujos:

La Figura 1A es una gráfica de PCR en tiempo real de la detección de KRAS mutante G12D en 42 repeticiones de 5 ng de ADN genómico humano que contiene 100% de secuencia de KRAS de tipo salvaje (cabezas de flecha) y 6 repeticiones de 5 ng de ADN genómico humano que contiene 1 % de la secuencia KRAS mutante G12D (flecha) realizada en ausencia de UDG. El eje x representa el número de ciclo de la PCR y el eje y representa las unidades de fluorescencia relativas.

La Figura 1B es un análisis de MaxRatio del experimento realizado en 1A (ver, por ejemplo, Shain y Clements (2008), "Un nuevo método para el análisis cuantitativo y cualitativo robusto de la PCR en tiempo real" Nucl. Acids Res. 36: e91). El eje x representa el número de ciclo (análogo a Ct) y el eje y representan la MaxRatio. Cada réplica se grafica individualmente.

La Figura 1C es un gráfico de PCR en tiempo real de la detección de KRAS mutantes por G12D en 42 repeticiones de 5 ng de genoma humano 24 que contiene 100% de secuencia KRAS de tipo salvaje (cabeza de flecha) y 6 réplicas de 5 ng de ADN genómico humano que contiene 1% de G12D secuencia KRAS mutante (flecha) realizadas en presencia de UDG. El eje x representa el número de ciclo de la PCR y el eje y representa las unidades de fluorescencia relativas.

La Figura 1D es un análisis de MaxRatio del experimento realizado en 1C. El eje x representa el número de ciclo (análogo a Ct) y el eje y representa la MaxRatio. Cada réplica se traza individualmente.

La Figura 2A es una gráfica de PCR en tiempo real de la detección de KRAS mutante G13D en 42 repeticiones de 5 ng de ADN genómico humano que contiene 100% de secuencia de KRAS de tipo salvaje (cabezas de flecha) y 6 repeticiones de 5 ng de ADN genómico humano que contiene 1 % de secuencia de KRAS mutante G13D (flecha) realizada en ausencia de UDG. El eje x representa el número de ciclo de la PCR y el eje y representa las unidades de fluorescencia relativas.

La Figura 2B es un análisis de MaxRatio del experimento realizado en 2A. El eje x representa el número de ciclo (análogo a Ct) y el eje y representa la MaxRatio. Cada réplica se traza individualmente.

La Figura 2C es una gráfica de PCR en tiempo real de la detección de KRAS mutante G13D en 42 repeticiones de 5 ng de ADN genómico humano que contiene 100% de secuencia de KRAS de tipo salvaje (cabezas de flecha) y 6 repeticiones de 5 ng de ADN genético humano que contiene 1% de secuencia KRAS mutante G13D (flecha) realizada en presencia de UDG. El eje x representa el número de ciclo de la PCR y el eje y representa las unidades de fluorescencia relativas.

La Figura 2D es un análisis de MaxRatio del experimento realizado en 2C. El eje x representa el número de ciclo (análogo a Ct) y el eje y representa la MaxRatio. Cada reparto se grafica individualmente.

La Figura 3A es una gráfica de PCR en tiempo real de la detección de KRAS mutante G12D en 12 réplicas que van de 50 ng a 400 ng de ADN genómico humano que contiene 100% de secuencia KRAS de tipo salvaje (cabezas de flecha) y 12 réplicas que van de 50 ng a 400 ng de ADN genético humano que contiene 1% de secuencia KRAS mutante G12D (flecha) realizado en ausencia de UDG. El eje x representa el número de ciclo de la PCR y el eje y representa las unidades de fluorescencia relativas.

La Figura 3B es un análisis de MaxRatio del experimento realizado en 3A. El eje x representa el número de ciclo (análogo a Ct) y el eje y representa la MaxRatio. Cada reparto se grafica individualmente.

La Figura 3C es una gráfica de PCR en tiempo real de la detección de KRAS mutante G12D en 12 réplicas que van desde 50 ng a 400 ng de ADN genómico humano que contiene 100% de secuencia KRAS de tipo salvaje (punta de flecha) y 12 réplicas que varían de 50 ng a 400 ng de ADN genómico humano que contiene 1% de secuencia KRAS mutante G12D (flecha) realizada en presencia de UDG. El eje x representa el número de ciclo de la PCR y el eje y representa las unidades de fluorescencia relativas.

La Figura 3D es un análisis de MaxRatio del experimento realizado en 3C. El eje x representa el número de ciclo (análogo a Ct) y la y el eje representa el MaxRatio. Cada réplica se grafica individualmente.

[0077] Ha de entenderse que las figuras no están necesariamente dibujadas a escala, ni son los objetos en las figuras necesariamente dibujados a escala en relación entre sí. Las figuras son representaciones que pretenden brindar claridad y comprensión a diversas realizaciones de aparatos, sistemas y métodos descritos en este documento. Siempre que sea posible, se utilizarán los mismos números de referencia en todos los dibujos para referirse a partes iguales o similares. Además, debe apreciarse que los dibujos no tienen la intención de limitar el alcance de las presentes enseñanzas de ninguna manera.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0078] En el presente documento se describe una tecnología relacionada con la modificación enzimática de ácidos nucleicos y en particular, pero no exclusivamente, con métodos y composiciones relacionados con el uso de uracil-ADN-N-glicosilasa para minimizar o eliminar errores en una secuencia de ADN debido a desaminación de residuos

de citosina.

[0079] Los encabezados de sección usados en el presente documento son para propósitos organizacionales solamente y no deben interpretarse como limitantes de la materia diana descrita en cualquier forma.

[0080] En esta descripción detallada de las diversas formas de realización, para fines de explicación, numerosos detalles específicos se exponen para proporcionar una comprensión exhaustiva de las realizaciones descritas. Un experto en la técnica apreciará, sin embargo, que estas diversas realizaciones pueden practicarse con o sin estos detalles específicos. En otros casos, las estructuras y dispositivos se muestran en forma de diagrama de bloques. Además, un experto en la técnica puede apreciar fácilmente que las secuencias específicas en las que se presentan y realizan los métodos son ilustrativas y se contempla que las secuencias pueden variar.

Resumen de la invención

[0081] La presente invención proporciona una composición que comprende un ácido nucleico diana que comprende: a) una secuencia diana, b) una polimerasa activada por calor, c) al menos uno de: i) una enzima estable al calor que elimina el uracilo a partir de ADN y se unirá ADN en un sitio abásico; ii) una enzima termoestable que elimina el uracilo del ADN y una enzima que escinde el ADN en un sitio abásico o iii) una uracil-ADN-glicosilolasa estable al calor, y d) un ácido nucleico dañado que comprende una base de uracilo.

[0082] La presente invención también proporciona un kit para la detección un ácido nucleico, comprendiendo el kit:

a) un primer recipiente que comprende una polimerasa activada por calor; y un segundo recipiente que comprende una uracil-ADN-glicosilolasa termoestable; o
b) un recipiente que comprende una polimerasa activada por calor y una uracil-ADN-glicosilolasa termoestable;
c) un primer recipiente que comprende una polimerasa activada por calor; y un segundo recipiente que comprende una enzima estable al calor que elimina el uracilo del ADN;
d) un primer recipiente que comprende una polimerasa activada por calor; y un segundo recipiente que comprende una enzima estable al calor que elimina el uracilo del ADN y que corta el ADN en un sitio abásico;
e) un primer recipiente que comprende una polimerasa activada por calor; un segundo recipiente que comprende una enzima termoestable que elimina el uracilo del ADN; y un tercer recipiente que comprende una enzima que escinde el ADN en un sitio abásico; o
f) un primer recipiente que comprende una polimerasa activada por calor; y un segundo recipiente que comprende una enzima estable al calor que elimina el uracilo del ADN y una enzima que escinde el ADN en un sitio abásico.

[0083] La presente invención también proporciona un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana, comprendiendo el método:

a) proporcionar una muestra que comprende el ácido nucleico diana;
b) agregar al menos uno de: i) una enzima estable al calor que elimina el uracilo del ADN y corta el ADN en un sitio abásico; ii) una enzima estable al calor que elimina el uracilo del ADN y una enzima que escinde el ADN en un sitio abásico o iii) una uracil-ADN glucosilasa estable al calor;
c) extirpar una base de uracilo de un ácido nucleico dañado, si está presente;
d) termociclar la mezcla de reacción para producir un amplicón que comprende la secuencia diana; y
e) detectar el amplicón que comprende la secuencia diana en la que el ácido nucleico dañado no se amplifica, no se detecta y/o se amplifica menos que el ácido nucleico diana, si está presente.

Definiciones

[0084] Para facilitar la comprensión de la tecnología actual, un número de términos y frases se definen a continuación. Definiciones adicionales se exponen a lo largo de la descripción detallada.

[0085] A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, los siguientes términos toman los significados explícitamente asociados en este documento, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. La frase "en una realización" como se usa en el presente documento no se refiere necesariamente a la misma realización, aunque puede hacerlo. Además, la frase "en otra realización" como se usa en el presente documento no se refiere necesariamente a una realización diferente, aunque puede ser así. Por lo tanto, como se describe a continuación, varias realizaciones de la invención se pueden combinar fácilmente.

[0086] Además, tal como se utiliza aquí, el término "o" es un "o" de operador incluido y es equivalente a la expresión "y/o" a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. El término "basado en" no es exclusivo y permite ser basado en factores adicionales no descritos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, a lo largo de la especificación, el significado de "un", "una", “el” y "ella" incluye referencias plurales. El significado de "en"

incluye "en" y "sobre".

[0087] Tal como se utiliza aquí, el término "molécula de ácido nucleico" se refiere a cualquier ácido nucleico que contiene la molécula, incluyendo, pero no limitado a, ADN o ARN. El término abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN que incluyen, entre otros, 4-acetil-citosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroxil-metilo) uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetil-aminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetil-aminometil-iluracilo, dihidrouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudo-uracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetil-guanina, 2-metil-adenina, 2-metilguanina, 3-metil-citosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxi-amino-metil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarbonil-metiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético metiléster, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, ácido N-uracil-5-oxiacético metiléster, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina.

[0088] Como se usa en este documento, un "ácido nucleico dañado" incluye, por ejemplo, un ADN que comprende una base desaminada (por ejemplo, una citosina desaminada) o un ADN que comprende una base de uracilo.

[0089] Tal como se utiliza aquí, el término "nucleobase" es en sinónimo con otros términos en uso en la técnica incluyendo "nucleótido", "desoxinucleótido", "residuo de nucleótido", "residuo desoxinucleótido", "nucleótido trifosfato (NTP), o desoxinucleótido trifosfato (dNTP). Como se usa en este documento, una nucleobase incluye resultados naturales y modificados, como se describe en este documento.

[0090] Es bien sabido que el ADN (ácido desoxirribonucleico) es una cadena de nucleótidos que consiste en 4 tipos de nucleótidos; A (adenina), T (timina), C (citosina) y G (guanina), y ese ARN (ácido ribonucleico) se compone de 4 tipos de nucleótidos; A, U (uracilo), G y C. También se sabe que todos estos 5 tipos de nucleótidos se unen específicamente entre sí en combinaciones denominadas pares complementarios de bases. Es decir, los pares de adenina (A) con timina (T) (en el caso del ARN, sin embargo, los pares de adenina (A) con uracilo (U)) y la citosina (C) con guanina (G), para que cada uno estos pares de bases forman una doble hebra. En algunos casos, se hace referencia a uno o más nucleótidos de acuerdo con los siguientes: R (G o A), Y (T/ o C), M (A o C), K (G o T/U), S (G o C), W (A o T/U), B (G o Cor T/U), D (A o G o T/U), H (A o C o T/U), V (A o G o C), o N (A o G o C o T/U), hueco (-).

[0091] Los términos "proteína" y "polipéptido" se refieren a compuestos que comprenden aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos y se utilizan indistintamente. Códigos de aminoácidos convencionales de una letra y de tres letras se usan en este documento de la siguiente manera: alanina: Ala, A; Arginina: Arg, R; Asparagina: Asn, N; Aspartato: Asp, D; Cisteína: Cys, C; Glutamato: Glu, E; Glutamina: Gln, Q; Glicina: Gly, G; Histidina: His, H; Isoleucina: Ile, I; Leucina: Leu, L; Lisina: Lys, K; Metionina: Met, M; Fenilalanina: Phe, F; Prolina: Pro, P; Serina: Ser, S; Treonina: Thr, T; Triptófano: Trp, W; Tirosina: Tyr, Y; Valina: Val, V. Como se usa en este documento, los códigos Xaa y X se refieren a cualquier aminoácido.

[0092] Un "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico que incluye al menos dos unidades de monómero de ácido nucleico (por ejemplo, nucleótidos), típicamente más de tres unidades monoméricas, y más típicamente mayor que diez unidades de monómero. El tamaño exacto de un oligonucleótido generalmente depende de varios factores, incluida la función o uso final del oligonucleótido. Para ilustrar adicionalmente, los oligonucleótidos tienen típicamente menos de 200 residuos de largo (por ejemplo, entre 15 y 100), sin embargo, como se usa en el presente documento, el término también pretende abarcar cadenas de polinucleótidos más largas. Los oligonucleótidos se refieren a menudo por su longitud. Por ejemplo, un oligonucleótido de 24 residuos se denomina "24-mer". Típicamente, los monómeros de nucleósido están unidos por enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos, incluyendo fosforotioato, fosforoditioato, lenoate phosphorose-, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforanilidato, fosforamidato, y similares, incluyendo los contraiones asociados, por ejemplo, H^+, NH_4^+, Na^+, y similares, si tales contraiones están presentes. Además, los oligonucleótidos son típicamente monocatenarios. Los oligonucleótidos se preparan opcionalmente mediante cualquier método adecuado, que incluye, entre otros, el aislamiento de una secuencia existente o natural, la replicación o amplificación del ADN, la transcripción inversa, la clonación y la digestión de restricción de secuencias apropiadas, o la síntesis química directa por un método como el método de fosfotriéster de Narang et al. (1979) Meth Enzymol. 68: 90-99; El método del fosfodiéster de Brown et al. (1979) Meth Enzymol. 68: 109-151; El método de dietilfosforamidita de Beaucage et al. (1981) Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862; el método del triéster de Matteucci et al. (1981) J Am Chem Soc 103: 3185-3191; métodos de síntesis automatizados; o el método de soporte sólido de la patente de EE.UU. 4.458.066, titulada "PROCESO PARA PREPARAR POLINUCLEÓTIDOS", emitida el 3 de julio de 1984 a Caruthers et al., u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica.

[0093] Una "secuencia" de un biopolímero (por ejemplo, un ácido nucleico) se refiere a la orden y la identidad de unidades de monómero (por ejemplo, nucleótidos, etc.) en el biopolímero. La secuencia (por ejemplo, la secuencia de bases) de un ácido nucleico se lee típicamente en la dirección 5' a 3'.

[0094] El término "gen" se refiere a un ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) que comprende la secuencia de

codificación necesaria para la producción de un ARN, o una polipéptido o su precursor (por ejemplo, proinsulina). Un polipéptido funcional puede codificarse por una secuencia de codificación de longitud completa o por cualquier porción de la secuencia de codificación siempre que la actividad deseada o las propiedades funcionales (por ejemplo, actividad enzimática, unión a ligando, transducción de señales, etc.) se retienen del polipéptido. El término "porción" cuando se usa en referencia a un gen se refiere a fragmentos de ese gen. Los fragmentos pueden variar en tamaño desde unos pocos nucleótidos hasta la secuencia completa del gen menos un nucleótido. Por lo tanto, "un nucleótido que comprende al menos una porción de un gen" puede comprender fragmentos del gen o el gen completo.

[0095] El término "gen" también abarca las regiones codificantes de un gen estructural e incluye secuencias ubicadas adyacentes a la región codificante en ambos extremos 5' y 3' para una distancia de aproximadamente 1 kb en cada extremo de tal manera que el gen corresponde a la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias que están localizadas en 5’ de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias no traducidas en 5'. Las secuencias que están ubicadas en 3’ o en sentido descendente de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias no traducidas en 3'. El término "gen" abarca tanto el ADNc como las formas genómicas de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificante interrumpida con secuencias no codificantes denominadas "intrones" o "regiones intermedias" o "secuencias intermedias". Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en ARN núcido (ARNnn); los intrones pueden contener elementos reguladores tales como potenciadores. Los intrones se eliminan o se "empalman" de la transcripción nuclear o primaria; por lo tanto, los ingresos están ausentes en la transcripción del ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción para especificar la secuencia o el orden de los aminoácidos en un polipéptido naciente.

[0096] Además de los intrones que contienen, las formas genómicas de un gen también pueden incluir secuencias localizadas tanto en el extremo 5' y 3' de las secuencias que están presentes en el transcrito de ARN. Estas secuencias se denominan secuencias o regiones "flanqueantes" (estas secuencias flanqueantes están ubicadas 5’ o 3' con respecto a las secuencias no traducidas presentes en el transcrito de ARNm). La región flanqueante 5’ puede contener secuencias reguladoras tales como promotores y potenciadores que controlan o influyen en la transcripción del gen. La región flanqueante 3’ puede contener secuencias que dirigen la terminación de la transcripción, la escisión postranscripcional y la poliadenilación.

[0097] El término "secuencia de nucleótidos de interés" o "secuencia de ácido nucleico de interés" o "diana" o "ácido nucleico diana" se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos (por ejemplo, ARN o ADN), la manipulación de que puede considerarse deseable por cualquier motivo (por ejemplo, tratar una enfermedad, conferir cualidades mejoradas, etc.), por un experto en la técnica. Dichas secuencias de nucleótidos incluyen, entre otras, secuencias codificantes de genes estructurales (p.ej., genes informadores, genes marcadores de selección, oncogenes, genes de resistencia a fármacos, factores de crecimiento, etc.) y secuencias reguladoras no codificantes que no codifique un producto de ARNm o proteína (p.ej., secuencia promotora, secuencia de poliadenilación, secuencia de terminación, secuencia potenciadora, etc.)

[0098] Como se usa en este documento, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido, tanto si se produce de forma natural como en una digestión de restricción purificada o producida sintéticamente, que es capaz de actuar como un punto de inicio de síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico (por ejemplo, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como un biocatalizador (por ejemplo, una ADN polimerasa o similar) y a una temperatura y pH adecuados). El cebador es típicamente de una sola hebra para una máxima eficiencia en la amplificación, pero alternativamente puede ser de doble hebra. Si es de doble hebra, el cebador generalmente se trata primero para separar sus hebras antes de usarse para preparar productos de extensión. En algunas realizaciones, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador es suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente inductor. La longitud exacta de los cebadores dependerá de muchos factores, incluida la temperatura, la fuente del cebador y el uso del método.

[0099] Tal como se utiliza aquí, el término "amplicón" se refiere a un ácido nucleico generado utilizando un método de amplificación tal como se describe en el presente documento. El amplicón es típicamente ADN de doble cadena; sin embargo, un amplicón puede ser ARN y/o un ADN:ARN híbrido. En algunas realizaciones, el amplicón comprende ADN complementario al ARN, ADN o ADNc diana. En algunas realizaciones, los pares de cebadores están configurados para generar amplicones a partir de un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, después de la amplificación de la región diana utilizando los cebadores, los amplicones resultantes que tienen las secuencias del cebador se usan para generar la señal que detecta, identifica o analiza el ácido nucleico de la muestra analizada.

[0100] El término "amplificar" o "amplificación" en el contexto de ácidos nucleicos se refiere a la producción de copias múltiples de un polinucleótido, o una porción del polinucleótido, típicamente a partir de una pequeña cantidad del polinucleótido (por ejemplo, una sola molécula de polinucleótido), donde los productos de amplificación o amplicones son generalmente detectables. La amplificación de polinucleótidos abarca una variedad de procesos químicos y enzimáticos. La generación de múltiples copias de ADN a partir de una o unas pocas copias de una molécula de ADN diana o de plantilla durante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o una reacción en

cadena de la ligasa (LCR) son formas de amplificación. La amplificación no se limita a la duplicación estricta de la molécula de partida. Por ejemplo, la generación de múltiples moléculas de ADNc a partir de una cantidad limitada de ARN en una muestra que utiliza transcripción inversa (RT)-PCR es una forma de amplificación. Además, la generación de múltiples moléculas de ARN a partir de una única molécula de ADN durante el proceso de transcripción también es una forma de amplificación.

[0101] Como se usa en el presente documento, los términos "complementario" o "complementariedad" se usan en referencia a polinucleótidos (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de apareamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia 5'-AG-T-3' es complementaria a la secuencia 3'-TCA-5'. La complementariedad puede ser "parcial", en la que solo algunas de las bases de los ácidos nucleicos se combinan de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases. O bien, puede haber una complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre las cadenas de ácido nucleico tiene efectos significativos en la eficiencia y la fuerza de hibridación entre las cadenas de ácido nucleico. Esto es de particular importancia en las reacciones de amplificación, así como en los métodos de detección que dependen.

[0102] El término "tipo salvaje" cuando se hace en referencia a un gen se refiere a un gen que tiene las características de un gen aislado de una fuente natural. El término "tipo salvaje" cuando se hace en referencia a un producto genético (por ejemplo, un polipéptido) se refiere a un producto genético que tiene las características de un producto genético aislado de una fuente que se produce de forma natural. El término "que ocurre naturalmente" aplicado a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo (incluidos los virus) que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que el hombre no ha modificado intencionalmente en el laboratorio ocurre naturalmente. Un gen de tipo salvaje es con frecuencia el gen que se observa con mayor frecuencia en una población y, por lo tanto, se designa arbitrariamente como la forma "normal" o "de tipo salvaje" del gen. En contraste, el término "modificado" o "mutante" cuando se hace con referencia a un gen o a un producto génico se refiere, respectivamente, a un gen o a un producto genético que muestra modificaciones en la secuencia y/o propiedades funcionales (por ejemplo, características alteradas) en comparación con el gen de tipo salvaje o el producto génico. Se observa que los mutantes naturales pueden ser aislados; estos se identifican por el hecho de que tienen características alteradas cuando se comparan con el gen o producto genético de tipo salvaje.

[0103] El término "alelo" se refiere a diferentes variaciones de un gen; las variaciones incluyen, pero no se limitan a variantes y mutantes, loci polimórficos y loci polimórficos de un solo nucleótido (SNP), cambio de marco y mutaciones de empalme. Un alelo puede aparecer naturalmente en una población, o puede surgir durante la vida de cualquier individuo en particular de la población.

[0104] Por lo tanto, los términos "variante" y "mutante" cuando se usan en referencia a una secuencia de nucleótidos se refieren a una secuencia de ácido nucleico que difiere en uno o más nucleótidos de otra secuencia, generalmente relacionada con el ácido nucleótido. Una "variación" es una diferencia entre dos secuencias de nucleótidos diferentes; típicamente, una secuencia es una secuencia de referencia.

[0105] Los términos "variante" y "mutante" cuando se usan en referencia a un polipéptido se refieren a una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o más aminoácidos de otro (una "sustitución" de un aminoácido por otro), polipéptido generalmente relacionado.

[0106] La nomenclatura utilizada para describir las variantes de ácidos nucleicos o proteínas especifica el tipo de mutación y cambios de bases o de aminoácidos. Para una sustitución de nucleótidos (por ejemplo, 76A>T), el número es la posición del nucleótido con respecto del extremo 5', la primera letra representa el nucleótido de tipo salvaje y la segunda letra representa el nucleótido que reemplazó al tipo salvaje. En el ejemplo dado, la adenina en la posición 76 fue reemplazada por una timina. Si se hace necesario diferenciar entre las mutaciones en el ADN genómico, el ADN mitocondrial, el ADN complementario (ADNc) y el ARN, se utiliza una convención simple. Por ejemplo, si la base número 100 de una secuencia de nucleótidos se muta de G a C, se escribirá como g.100G>C si la mutación se produjo en el ADN genómico, m.100G>C si se produjera la mutación en el ADN mitocondrial, c.100G>C si la mutación ocurrió en ADNc, o r.100g>c si la mutación ocurrió en el ARN.

[0107] Para la sustitución de aminoácidos (por ejemplo, D111E), la primera letra es el código de una letra del tipo de aminoácido salvaje, el número es la posición del aminoácido del extremo N-terminal, y la segunda letra es el código de una letra del aminoácido presente en la mutación. Las mutaciones sin sentido se representan con una X para el segundo aminoácido (por ejemplo, D111X). Para las supresiones de aminoácidos (por ejemplo, ΔF508, F508del), la letra griega Δ (delta) o las letras "del" indican una eliminación. La letra se refiere al aminoácido presente en el tipo salvaje y el número es la posición desde el extremo N del aminoácido donde está presente en el tipo salvaje. Las mutaciones intrónicas se designan por el número de intrón o la posición del ADNc y proporcionan un número positivo a partir del G del sitio donante de empalme de GT o un número negativo a partir del G del sitio aceptador de empalme de AG. g.3' + 7G>C denota la sustitución de G a C en nt +7 a nivel del ADN genómico. Cuando se conoce la secuencia genómica de longitud completa, la mutación se designa mejor por el número de nucleótidos de la secuencia de referencia genómica. Ver den Dunnen y Antonarakis, "Extensiones de nomenclatura de mutación y sugerencias para describir mutaciones complejas: una discusión". La mutación humana 15: 7-12 (2000); Ogino S, et

al., "Nomenclatura de mutación estándar en diagnósticos moleculares: desafíos prácticos y educativos", J. Mol. Diagn. 9 (1): 1-6 (febrero 2007).

[0108] Como se usa en este documento, los códigos de una letra para los aminoácidos se refieren a la nomenclatura estándar IUB como se describe en "IUPAC-IUB de Nomenclatura de aminoácidos y péptidos", publicado en Biochem. J., 1984, 219, 345-373; EUR. J. Biochem., 1984, 138, 9-37; 1985, 152, 1; Internat. J. Pept. Prot. Res., 1984, 24, siguiendo p. 84; J. Biol. Chem., 1985, 260, 14-42; Pure Appl. Chem., 1984, 56, 595-624; Aminoácidos y péptidos, 1985, 16, 387-410; y en Nomenclatura bioquímica y documentos relacionados, 2ª edición, Portland Press, 1992, pp. 39-67.

[0109] Como se usa en este documento, un "sitio abásico" se refiere a una ubicación en el ADN que no tiene ni una purina ni una base de pirimidina, o bien de forma espontánea o debido a daños en el ADN. Un sitio abásico también se conoce como un sitio apurínico/apirimidínico o un sitio AP. Los sitios abásicos se pueden formar por depuración espontánea, pero también ocurren como intermedios en la reparación de la base de la excisión. En este proceso, una glicosilasa de ADN (p.ej., UDG) reconoce una base dañada y corta el enlace N-glicosídico para liberar la base, dejando un sitio AP.

[0110] El término "ensayo de detección" se refiere a un ensayo para detectar la presencia o ausencia de un de tipo salvaje o secuencia de ácido nucleico variante (por ejemplo, mutación o polimorfismo) en un determinado alelo de un gen particular, o para detectar la presencia o ausencia de una proteína particular o la actividad o efecto de una proteína en particular o para detectar la presencia o ausencia de una variante de una proteína en particular.

[0111] El término "detectar", "detectado", o "detección" se refiere a un acto de determinar la existencia o presencia de uno o más objetivos (por ejemplo, un amplicón, un SNP, etc.) en una muestra.

[0112] El término "muestra" se utiliza en su sentido más amplio. En cierto sentido puede referirse a una célula o tejido animal. En otro sentido, pretende incluir un espécimen o cultivo obtenido de cualquier fuente, así como muestras biológicas y ambientales. Las muestras biológicas pueden obtenerse de plantas o animales (incluidos los humanos) y abarcar fluidos, sólidos, tejidos y gases. Las muestras ambientales incluyen material ambiental tal como materia superficial, suelo, agua y muestras industriales. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes de los tipos de muestra aplicables a la presente invención.

[0113] Como se usa en este documento, un "UDG" es una uracilo-ADN-glicosilasa, también llamado una uracil-ADN N-glicosilasa. Las enzimas uracil-ADN N-glicosilasas escinden uracilo del ADN al dividir el enlace N-glicosídico entre la base de uracilo y la columna vertebral del azúcar. Esta escisión genera sitios abásicos que están bloqueados de la replicación por la ADN polimérica o que se evita que se conviertan en un sitio de hibridación. El ADN bicatenario y el ADN monocatenario son sustratos para la uracil-ADN N-glicosilasa. En algunos organismos, el gen que codifica una uracil-ADN N-glicosilasa se conoce como el gen "UNG".

[0114] Tal como se utiliza aquí, el término "estable al calor" o "termoestable" como se usa en referencia a una enzima, tal como una uracil-ADN N-glicosilasa, indica que la enzima es funcional o activa (por ejemplo, puede escindir el enlace N-glicosídico entre una base de uracilo y el esqueleto de azúcar en un ADN) a una temperatura elevada, por ejemplo, por encima de 45°C, preferiblemente por encima de 50°C, más preferiblemente por encima de 55°C, más preferiblemente por encima de 60°C, aún más preferiblemente por encima de 65°C, lo más preferiblemente por encima de 70°C, más preferiblemente por encima de 75°C, lo más preferiblemente por encima de 80°C, lo más preferiblemente por encima de 85°C, lo más preferiblemente por encima de 90°C, e incluso la mayoría preferiblemente por encima de 95°C. En algunas realizaciones, la uracil-ADN N-glicosilasa muestra una actividad óptima a una de las temperaturas indicadas anteriormente, por ejemplo, la temperatura óptima de la enzima se encuentra a una de las temperaturas indicadas anteriormente. La estabilidad de la temperatura de una uracil-ADN N-glicosilasa puede aumentarse en cierta medida mediante la formulación de la composición que comprende la Uracil-ADN N-glicosilasa, por ejemplo, en combinación con productos químicos estabilizadores o mediante la inmovilización de la enzima, o por modificación química, por ejemplo, reticulación, para preservar la enzima en su forma tridimensional activa.

[0115] Como se usa en este documento, una enzima "térmicamente estable" o "termoestable" permanece activa después de al menos 15 minutos, preferiblemente durante al menos 2 horas, más preferiblemente durante al menos 16 horas, más preferiblemente durante al menos 24 horas, más preferiblemente durante al menos 7 días, más preferiblemente durante al menos 10 días, incluso más preferiblemente durante al menos 14 días, lo más preferiblemente durante al menos 30 días, incluso lo más preferiblemente para al menos 50 días a la temperatura elevada y/o a la temperatura de actividad óptima. Generalmente, el nivel de actividad se mide usando un ensayo para medir la liberación de uracilo del ADN de doble cadena que contiene uracilo, por ejemplo, mediante la medición o control de la liberación de [^{3}H]-uracilo a partir de ADN. Por ejemplo, una definición de "unidad" de actividad de una Uracil-ADN N-glicosilasa estable al calor es la cantidad de Uracil-ADN N-glicosilasa estable al calor que cataliza la liberación de 60 pmol de uracilo por minuto desde de doble hebra, ADN que contiene uracilo, por ejemplo, en un 50 µl de reacción que contiene 0,2 µg de ADN (por ejemplo, en 10^4-10^5 cpm/µg) en 30 minutos a 65°C. La actividad puede compararse con la actividad enzimática antes de la elevación de la temperatura, obteniendo así la actividad

residual de la enzima o la actividad retenida por la enzima después del tratamiento térmico. Preferiblemente, la actividad residual es al menos el 30% después del tiempo dado a la temperatura elevada, más preferiblemente al menos el 40%, más preferiblemente al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 60%, incluso más preferiblemente al menos el 70%, lo más preferiblemente al menos el 80%, incluso lo más preferiblemente la actividad residual es al menos el 90%, y absolutamente más preferido el nivel de actividad residual es al menos igual o sin cambios después del tiempo dado a la temperatura elevada. Como tal, proporcionar "1 U" o "1 unidad" de la enzima se refiere a proporcionar una cantidad de la enzima (en combinación con cualquier otro componente, como un tampón, glicerol, etc., que acompaña a la enzima) que cataliza la liberación de 60 pmol de uracilo por minuto a partir de doble cadena, el ADN que contiene uracilo, por ejemplo, en un 50 µl de reacción que contiene 0,2 µg de ADN (por ejemplo, en 10^4-10^5 cpm/µg) en 30 minutos a 65°C o que serían catalizar la liberación de 60 pmol de uracilo por minuto a partir de doble cadena, uracilo que contiene ADN, por ejemplo, si se añade a un 50 µl de reacción que contiene 0,2 µg de ADN (por ejemplo, en 10^4-10^5 cpm/µg) e incubado durante 30 minutos a 65°C, independientemente de que la enzima se agregue o no a una reacción de 50 ml que contenga 0,2 µg de ADN (por ejemplo, a 10^4-10^5 cpm/µg) e incubado durante 30 minutos a 65°C.

[0116] Tal como se utiliza aquí, el término "activo" o "actividad" cuando se refiere a un UDG significa que UDG escinde el enlace N-glicosídico entre una base de uracilo y la cadena principal de azúcar en un ADN en algún nivel fisiológicamente relevante y detectable.

Realizaciones de la tecnología

[0117] Las realizaciones de la tecnología se refieren a métodos para procesar una muestra que comprende un ácido nucleico en el que la muestra se calienta, por ejemplo, a 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 95°C, 97°C o más, por ejemplo, durante 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 60 minutos o más. En particular, la tecnología se refiere a la adición de una Uracil-ADN N-glicosilasa a dichas muestras para minimizar o eliminar la detección subsiguiente de errores de secuencia causados por la desaminación térmica de las citosinas durante el período de calentamiento.

[0118] Un ejemplo común en el que una muestra que comprende un ácido nucleico se calienta a estas temperaturas es el uso de la "PCR de arranque en caliente" para minimizar las interacciones de cebadores no específicos con las plantillas y la actividad significativa que tienen las polimerasas termofílicas a temperatura ambiente (por ejemplo, polimerasa de ADN AmpliTaq Gold™; ver, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N^{os} 5.773.258; 6.183.998). Estos métodos utilizaron una polimerasa termoestable, típicamente una ADN polimerasa Taq, que está inactiva a temperaturas cercanas a la temperatura ambiente pero que está activa a temperaturas más altas. En particular, la polimerasa termoestable está químicamente reticulada para inactivar la enzima. La naturaleza de los reticuladores y los enlaces químicos formados en estos métodos son reversibles y la polimerasa intercambiable reticulada se reactiva calentando la polimerasa antes de la reacción durante un tiempo predeterminado a 95°C. Otras enzimas de la PCR de arranque en caliente se desactivan con anticuerpos o aptámeros de ácido nucleico que se unen e inhiben la polimerasa a bajas temperaturas, pero se liberan de la enzima activa a temperaturas más altas. La tecnología descrita en el presente documento se relaciona en algunos aspectos con el uso de polimerasas activadas por calor en la PCR y el uso de un UDG termoestable en la muestra para minimizar la generación y detección de errores de secuencia resultantes de la desaminación de citosinas durante la incubación a alta temperatura.

[0119] Por lo tanto, en algunas realizaciones, la tecnología comprende el uso de un UDG que tiene actividad a 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 95°C, o 97°C o más durante y después de la exposición a esa temperatura durante 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos o 60 minutos o más. En algunas realizaciones, la UDG es una enzima aislada de un organismo termofílico, tal como un miembro termofílico de la Archaea o Bacteria. En algunas realizaciones, la UDG es una variante de una UDG mesófila que comprende sustituciones de aminoácidos que confieren una mayor termoestabilidad con respecto a la UDG de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el UDG se ha producido por mutación aleatoria, modelada y diseño racional o evolución in vitro. La tecnología contempla el uso de un UDG termoestable independientemente de su fuente.

[0120] En algunas realizaciones, la UDG está presente en una muestra que comprende un ácido nucleico antes de la adición de una polimerasa y de alta temperatura de incubación de la polimerasa (por ejemplo, para activarlo). La muestra que comprende el UDG y el ácido nucleico se incuba a una temperatura a la que el UDG está activo (por ejemplo, 65°C) para eliminar las bases U del ácido nucleico que pueden estar presentes antes de la activación a alta temperatura de la polimerasa. En algunas realizaciones, la UDG está presente en la muestra que comprende un ácido nucleico y una polimerasa durante la incubación a alta temperatura para activar la polimerasa.

[0121] La tecnología se refiere a la eliminación de bases U a partir de ADN antes de la amplificación de ADN. Esta escisión genera sitios abásicos que están bloqueados para la replicación por la ADN polimerasa. Como resultado, la polimerasa no replica la cadena de ADN dañada y la mutación de C a U no se propaga en la población de amplicones durante la amplificación por PCR. Aunque la descripción en este documento se refiere a ciertas realizaciones ilustradas, debe entenderse que estas realizaciones se presentan a modo de ejemplo y no a modo de limitación. Se proporcionan ejemplos experimentales para describir realizaciones ejemplares de la tecnología.

[0122] Algunas realizaciones de la tecnología abarcan composiciones, métodos, usos, kits y sistemas relacionados con una enzima o actividad enzimática que produce una ruptura en un ácido nucleico en un sitio abásico, por ejemplo, un sitio abásico producido por una enzima que elimina el uracilo del ADN. En algunas realizaciones, la enzima que causa una ruptura en un ácido nucleico en un sitio abásico es una enzima termoestable. En algunas realizaciones, la enzima es una endo-nucleasa que escinde el ADN en un sitio abásico, por ejemplo, una endonucleasa apurínica/apirimidínica termoestable de *Thermus thermophilus* como un *Tth* Endo IV, por ejemplo, suministrada por New England Biolabs. Dicha enzima hidroliza el ADN en un sitio abásico en el primer enlace fosfodiéster 5' con la lesión dejando un hidroxilo 3' y un 5'-fosfato deoxiroxido en el extremo 5'. Algunas enzimas también tienen una actividad 3'-diesterasa. Además, en algunas realizaciones, tanto la N-glicosilasa como las actividades de escisión son proporcionadas por una sola enzima. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la enzima es un homólogo de *E. coli* Endonuclease III (Nth). En algunas realizaciones, la enzima es termoestable. Esta enzima tiene tanto una N-glicosilasa como una actividad liasa (escisión). La actividad N-glicosilasa libera pirimidinas dañadas del ADN (por ejemplo, una citosina desaminada), generando un sitio abásico; luego, la actividad de la lisasa corta el sitio abásico resultante para producir una ruptura en la cadena de ácido nucleico. La enzima también reconoce y escinde los sitios abásicos que no resultan de su actividad N-glicosilasa (por ejemplo, los sitios abásicos producidos por una enzima que elimina el uracilo del ADN, por ejemplo, un UDG). En algunas realizaciones, la enzima se aísla de un termófilo tal como *Thermotoga maritima,* por ejemplo, *Tma* Endonuclease III como lo proporciona New England Biolabs.

Ejemplos

Identificación de mutaciones en KRAS

[0123] Durante el desarrollo de formas de realización de la tecnología dada a conocer en el presente documento, los experimentos se realizaron para ensayar una enzima UDG estable al calor para reducir la incidencia de errores en la detección de mutantes KRAS por PCR. Las mutaciones en KRAS están asociadas con cánceres humanos y, por lo tanto, KRAS es un objetivo de muchos diagnósticos de cáncer. En particular, algunos cánceres están asociados con mutaciones que introducen una sustitución de aminoácidos en la posición 12 o 13 de KRAS, que son residuos de glicina codificados por los codones GGT y GGC en la secuencia del gen KRAS de tipo salvaje. Las sustituciones prevalentes que resultan de mutaciones en el gen KRAS incluyen una mutación de la G de tipo salvaje en la posición 35 a una A (c.35G>A) en el gen KRAS que resulta en una sustitución de la glicina de tipo salvaje en posición 12 a un ácido aspártico (p.G12D) en la proteína KRAS; una mutación de la G de tipo salvaje en la posición 38 a una A (c.38G>A) en el gen KRAS que resulta en una sustitución de la glicina de tipo salvaje en la posición 13 a un ácido aspártico (p.G13D) en la proteína KRAS; una mutación de la G de tipo salvaje en la posición 34 a una A (c.34G>A) en el gen KRAS que resulta en una sustitución de la glicina de tipo salvaje en la posición 12 a una serina (p.G12S) en la proteína KRAS; y una mutación de la G de tipo salvaje en la posición 37 a una A (c.37G>A) en el gen KRAS que resulta en una sustitución de la glicina de tipo salvaje en la posición 13 a una serina (p.G13S) en la Proteína KRAS. Se conocen otras mutaciones y sustituciones; el experimento se centró en la detección de G12D, G13D, G12S y G13S.

[0124] Estas mutaciones se producen de este modo debido a una G a una mutación en la cadena codificante o debido a una mutación C a T en la hebra no codificante. Mientras que las mutaciones de C a T ocurren naturalmente y pueden estar presentes en una muestra, también se producen a partir de una muestra de tipo salvaje mediante la desaminación térmica del residuo de C opuesto a la G en la posición 34, 35, 37 o 38 en la secuencia codificante KRAS. Como tal, la desaminación térmica produce resultados falsos positivos de que las secuencias KRAS mutantes están presentes en muestras de tipo salvaje. Tal resultado puede resultar en un diagnóstico falso de cáncer.

[0125] En consecuencia, se realizaron experimentos para ensayar la hipótesis de que la desaminación inducida por calor de C a U genera copias únicas de secuencias de genes mutantes KRAS de G a A en muestras que contienen solo dianas de tipo salvaje. Los amplicones mutantes generados a partir de estas copias únicas en una muestra de tipo salvaje son detectados por una sonda específica de alelo G13D y, por lo tanto, producen una señal en una muestra de tipo salvaje que es comparable a una señal producida por una muestra mutante de G13D. Cuatro observaciones principales apoyan esta hipótesis:

1) La incidencia de falsos positivos en muestras de tipo salvaje es proporcional al número de copia de entrada. Por ejemplo, una serie de 24 muestras, cada una de las cuales comprende 6000 copias de una secuencia de tipo salvaje, da como resultado aproximadamente 10 de las 24 muestras que arrojan resultados falsos positivos para mutaciones de KRAS, mientras que el mismo experimento utiliza muestras que comprenden 600 copias de la naturaleza. La secuencia de tipos en cada muestra da como resultado aproximadamente 1 de los 24 pocillos que se muestran falsamente positivos para secuencias KRAS mutantes. Esta tasa de ocurrencia de falsos positivos es consistente con la tasa publicada de desaminación de citosina a 95°C (Lindahl y Nyberg, supra); 2) el C_t de detectar un falso positivo en una PCR en tiempo real es consistente con lo que se espera para la amplificación de una sola copia;
3) la secuenciación de ADN de las muestras con ensayos que se muestran falsamente positivos para KRAS mutante identifica la secuencia mutante; y

4) la activación de la polimerasa Taq aparte de la muestra que comprende el objetivo de ADN (de modo que el objetivo no se incuba a 95°C) reduce en gran medida la incidencia de falsos positivos.

[0126] En base a estos datos, se realizaron experimentos para ensayar una uracil-ADN-N-glicosilasa estable al calor (UDG) para mejorar la especificidad/sensibilidad del ensayo.

[0127] Los experimentos utilizaron PCR para amplificar la región del gen KRAS que comprende los codones G12 y G13 del ADN de la plantilla de entrada que comprende una secuencia KRAS de tipo salvaje o una secuencia KRAS mutante. Luego se utilizaron sondas marcadas específicas para las secuencias mutantes para detectar la presencia de secuencias mutantes en las muestras amplificadas.

[0128] Los experimentos usaron PCR en tiempo real y análisis de MaxRatio como se describe en Shain y Clements (2008), "Un nuevo método para el análisis cuantitativo y cualitativo robusto de la PCR en tiempo real" Nucl. Acidos Res. 36: e91. En los gráficos de PCR en tiempo real que se muestran en los paneles A y C de las Figuras 1 a 3, el eje x representa el número de ciclo de la PCR y el eje y representa las unidades de fluorescencia relativas. En los gráficos de análisis de MaxRatio que se muestran en los paneles B y D de las Figuras 1 a 3, el eje x representa el número de ciclo (análogo a Ct) y el eje y representa la MaxRatio. Cada réplica de cada experimento se grafica individualmente en las figuras. Los experimentos con 100% de secuencia de KRAS de tipo salvaje se indican con cabezas de flecha y los experimentos con 1% de secuencia de KRAS mutante se indican con flechas.

[0129] En el primer experimento, 42 repeticiones de 5 ng de ADN genómico humano que contienen la secuencia KRAS de tipo salvaje 100% y 6 repeticiones de 5 ng de ADN genómico humano que contiene 1% de mutante G12D secuencia KRAS se ensayaron mediante PCR en tiempo real utilizando una sonda específica de G12D para la presencia de la secuencia mutante de G12D. El experimento se realizó en ausencia de UDG (Figuras 1A; 1B) y en presencia de 2 unidades de UDG (Figuras 1C; 1D).

[0130] En el segundo experimento, 42 repeticiones de 5 ng de ADN genómico humano que contienen 100% de secuencia KRAS de tipo salvaje y 6 repeticiones de 5 ng de ADN genómico humano que contiene 1% de mutante G13D secuencia KRAS se ensayaron por PCR de tiempo real usando una sonda específica de G13D para detectar la presencia de la secuencia mutante de G13D. El experimento se realizó en ausencia de UDG (Figuras 2A; 2B) y en presencia de 2 unidades de UDG (Figuras 2C; 2D).

[0131] En el tercer experimento, 12 repeticiones que van desde 50 ng a 400 ng de ADN genómico humano que contiene la secuencia KRAS de tipo salvaje 100% y 12 repeticiones que van desde 50 ng a 400 ng de ADN genómico humano que contiene 1% de secuencia de KRAS mutante de G12D se ensayaron mediante PCR en tiempo real usando una sonda específica de G12D para la presencia de la secuencia de mutante de G12D. El experimento se realizó en ausencia de UDG (Figuras 3A; 3B) y en presencia de 2 unidades de UDG (Figuras 3C; 3D).

[0132] Los experimentos usaron una UDG estable al calor, como glicosilasa *Afu* Uracil-ADN (UDG) de New England Biolabs, que es un homólogo termoestable de la glicosilasa Uracil-ADN *E. coli* aislada de *Archaeglobus fulgidis.* Se añadió una cantidad de glicerol al 50% a las muestras sin UDG que fue equivalente a la cantidad de glicerol agregado a las muestras a las que se agregó la enzima UDG en glicerol. Las condiciones de termociclado fueron: 1 ciclo de 93,5°C durante 10 minutos; 1 ciclo de 73,5°C durante 10 minutos; 3 ciclos de 92,0°C durante 15 segundos, 73,5°C durante 30 segundos y 61,0°C durante 60 segundos; seguido de 45 ciclos de 92°C durante 15 segundos y 61°C durante 90 segundos.

[0133] Los experimentos demostraron que un UDG estable al calor (por ejemplo, 2 unidades de un UDG estable al calor) redujo la incidencia de falsos positivos y retrasó la C_t de los eventos falsos positivos que ocurrieron. Para ensayar aún más la actividad de UDG, se evaluó UDG en una variedad de condiciones para evaluar si la especificidad y/o sensibilidad de la detección de KRAS de tipo salvaje y secuencias mutantes mejoraron en presencia de una uracil-ADN-N-glicosilasa de calor estable.

[0134] Los datos recopilados durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología descrita en el presente documento demuestran que la incidencia de falsos positivos se reduce en gran medida al incluir UDG en las muestras de ensayo. Estos datos demuestran que la inclusión de un UDG estable al calor en las muestras mejoró los resultados del ensayo. Estos datos demostraron que los falsos positivos fueron eliminados o minimizados; se detectaron falsos positivos a un valor de C_t considerablemente más alto, lo que proporcionó una mayor especificidad de ensayo.

[0135] Diversas modificaciones y variaciones de las composiciones, métodos y usos descritos de la tecnología serán evidentes para los expertos en la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un ácido nucleico diana que comprende: a) una secuencia diana, b) una polimerasa activada por calor, c) al menos una de: i) una enzima termoestable que elimina el uracilo del ADN y escinde el ADN en un sitio abasico ii) una enzima termoestable que elimina el uracilo del ADN y una enzima que escinde el ADN en un sitio abásico o iii) una uracil-ADN-glicosilolasa estable al calor, y d) un ácido nucleico dañado que comprende una base de uracilo.

2. La composición de la reivindicación 1, que comprende además una sonda específica para la secuencia diana.

3. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en la que la polimerasa activada por calor es polimerasa Taq.

4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 que comprende una cantidad o concentración de uracil-ADN-glicosilolasa que es suficiente para eliminar el uracilo del ADN durante y/o después de un período de activación térmica de una polimerasa activada por calor a una velocidad, es decir, al menos el 30% de una tasa a la que la uracil-ADN-glicosilolasa elimina las bases antes del período de activación por calor de la polimerasa activada por calor.

5. Un kit para detectar un ácido nucleico, el kit que comprende:

a) un primer recipiente que comprende una polimerasa activada por calor; y un segundo recipiente que comprende una uracil-ADN-glicosilolasa termoestable;
b) un recipiente que comprende una polimerasa activada por calor y una uracil-ADN glucosilasa termoestable;
c) un primer recipiente que comprende una polimerasa activada por calor; y un segundo recipiente que comprende una enzima estable al calor que elimina el uracilo del ADN;
d) un primer recipiente que comprende una polimerasa activada por calor; y un segundo recipiente que comprende una enzima estable al calor que elimina el uracilo del ADN y que corta el ADN en un sitio abásico;
e) un primer recipiente que comprende una polimerasa activada por calor; un segundo recipiente que comprende una enzima estable al calor que elimina el uracilo del ADN; y un tercer vaso que comprende una enzima que escinde el ADN en un sitio abásico; o
f) un primer recipiente que comprende una polimerasa activada por calor; y un segundo recipiente que comprende una enzima estable al calor que elimina el uracilo del ADN y una enzima que corta el ADN en un lugar abásico;

en donde el kit comprende además un ácido nucleico de control, en donde el ácido nucleico de control es un ácido nucleico de control positivo y/o un control de referencia interno, en donde dicho control de referencia interno comprende moléculas de ADN sintético que comprenden una o más bases de uracilo.

6. Un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana, comprendiendo el método:

a) proporcionar una muestra que comprende el ácido nucleico diana;
b) proporcionar un ácido nucleico de control positivo que comprende una o más bases de uracilo;
c) agregar al menos uno de: i) una enzima termoestable que elimina el uracilo del ADN y escinde el ADN en un sitio abásico; ii) una enzima termoestable que elimina el uracilo del ADN y una enzima que escinde el ADN en un sitio abásico o iii) una uracil-ADN-glicosilolasa estable al calor;
d) extirpar una base de uracilo de:

i) el ácido nucleico de control positivo; y
ii) de un ácido nucleico diana dañado, si está presente;

e) termociclar la mezcla de reacción para producir:

i) un amplicón que comprende la secuencia diana; y
ii) un amplicón que comprende la secuencia de ácido nucleico de control positivo; y

f) detectar el amplicón que comprende la secuencia diana

en donde el ácido nucleico dañado no se amplifica, no se detecta y/o se amplifica menos que el ácido nucleico diana, si está presente.

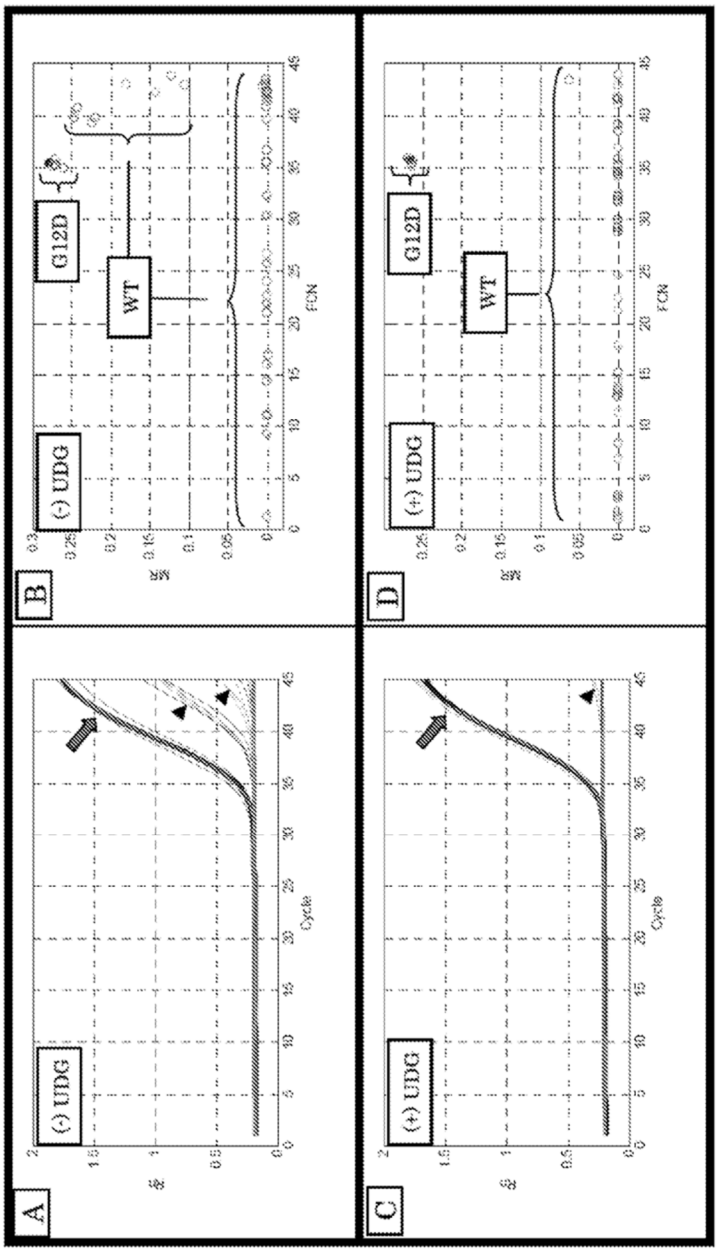

Figura 1

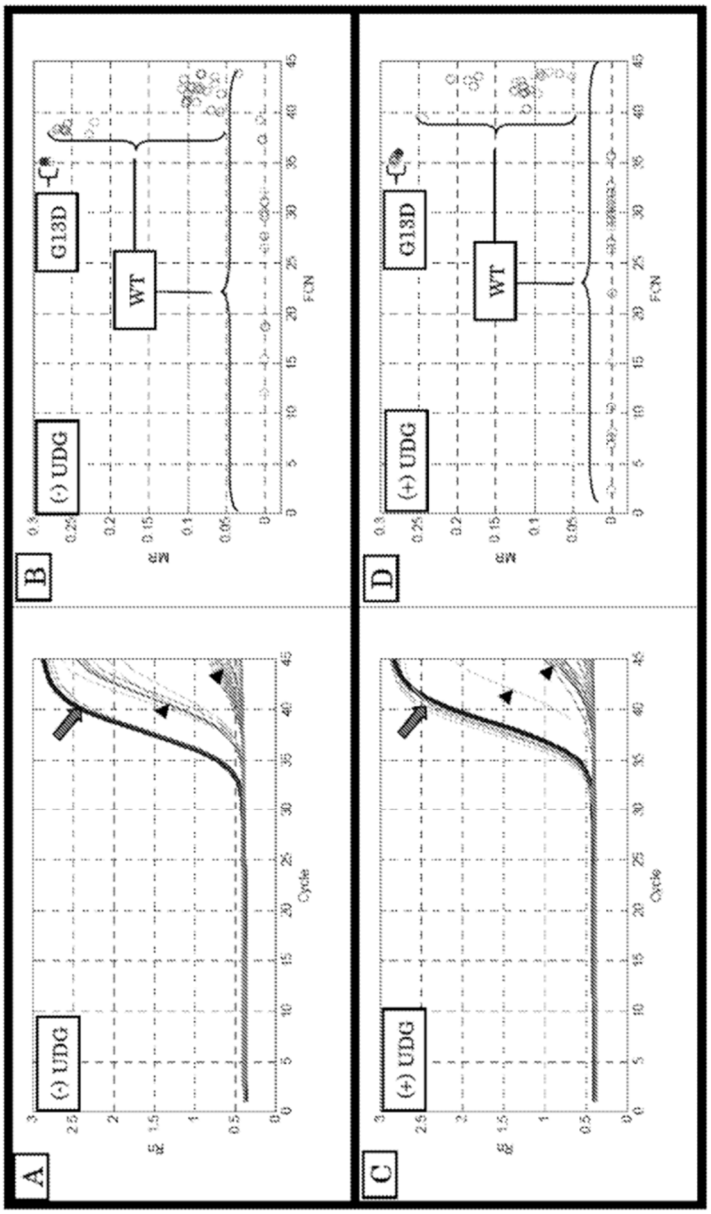

Figura 2

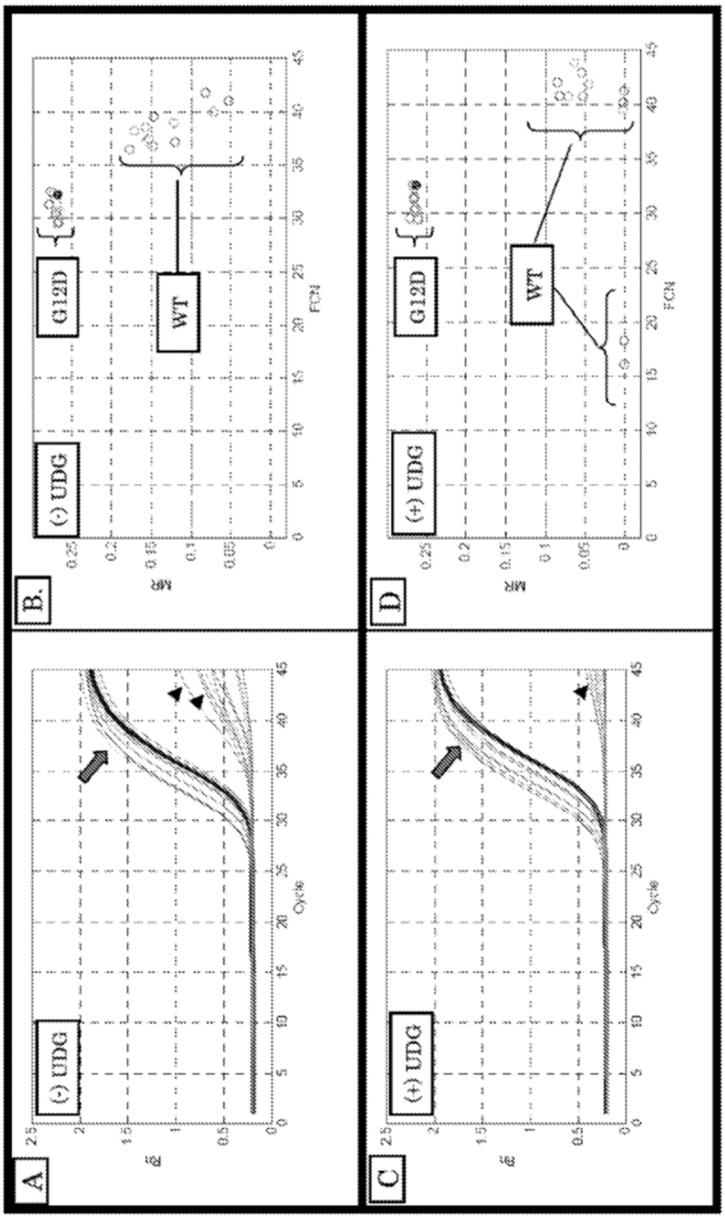
A
(-) UDG
Rn
Cycle
B.
(-) UDG
G12D
WT
MR
FCN
C
(+) UDG
Rn
Cycle
D
(+) UDG
G12D
WT
MR
FCN

Figura 3