

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 427**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6844 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2015 PCT/EP2015/062430**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15185655**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2015 E 15726183 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3152324**

54 Título: **Método de amplificación de ADN basado en invasión de cadena**

30 Prioridad:

05.06.2014 GB 201410022

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

30.07.2020

73 Titular/es:

**ORION DIAGNOSTICA OY (100.0%)
Koivu Mankkaan tie 6 B
02200 Espoo, FI**

72 Inventor/es:

**EBOIGBODIN, KEVIN y
BRUMMER, MIRKO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 776 427 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de amplificación de ADN basado en invasión de cadena

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a métodos de amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana que comprende invasión de cadena. La invención se refiere adicionalmente a kits y composiciones adecuados para su uso en tales métodos.

10

Antecedentes de la invención

Los métodos para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana mediante invasión de cadena se han descrito por ejemplo en W02009/150467. La invasión de la secuencia de ácido nucleico diana se ve mediada por un solo oligonucleótido de invasión de cadena, que abre un dúplex diana para permitir la unión de los cebadores tanto en dirección 5' como en dirección 3'.

15

Smulevitch et al., (1996) Nat Biotechnol 14, 1700-4 investiga la capacidad de los ADN y los conjugados de oligonucleótidos para actuar en la invasión de cadena.

20

Piepenburg et al., (2006) PLoS Biol 4, e204 investiga utilizando la amplificación por recombinasa polimerasa (RPA) para detectar secuencias de ADN. En el documento WO 03/072805 se desvelan métodos de RPA similares.

El documento WO 2014/173963 desvela la utilización de un método de amplificación basado en invasión de cadena en la detección de *Clostridium difficile* toxígeno.

25

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Amplificación de un ADN diana utilizando dos oligonucleótidos de invasión con configuración de oligonucleótido de invasión paralela, configuración de oligonucleótido de invasión antiparalela o configuración antiparalela inversa. OI1 - primer oligonucleótido de invasión de cadena; OI2 - segundo oligonucleótido de invasión de cadena. Cebador-D - cebador directo o en dirección 5'; Cebador-I - cebador inverso o en dirección 3'. El extremo no elongable de OI1 y de OI2 se muestra como una línea discontinua.

30

Figura 2: Amplificación de un ADN diana utilizando dos oligonucleótidos de invasión. Los gráficos de amplificación se muestran para la (a) configuración de oligonucleótido de invasión paralela, (c) configuración de oligonucleótido de invasión antiparalela y (e) configuración de oligonucleótido de invasión inversa antiparalela. Se presentan las reacciones duplicadas. La amplificación se monitorizó mediante la detección de Sybr Green I. El eje X para los gráficos de amplificación: tiempo (minutos), Eje Y: fluorescencia de Sybr Green I (intensidad de fluorescencia, unidades arbitrarias). La especificidad de las reacciones se calculó adicionalmente con análisis de curva de fusión. Los análisis de curvas de fusión se muestran en (b) para la configuración de oligonucleótido de invasión paralela, (d) para la configuración de oligonucleótido de invasión antiparalela y (f) para configuración de oligonucleótido de invasión inversa antiparalela. Eje X para los análisis de curvas de fusión: Temperatura (grados centígrados), Eje Y (-d/fluorescencia/d(temperatura), unidades arbitrarias).

35

40

Figura 3: Amplificación de ADN diana utilizando dos oligonucleótidos de invasión. Las reacciones se realizaron con dos oligonucleótidos de invasión complementarios o con un oligonucleótido de invasión complementario y un oligonucleótido de invasión no complementario. Ejes X e Y para los gráficos de amplificación como en la Figura 2. (a) muestra resultados con la configuración paralela de oligonucleótidos utilizados. (b) muestra resultados con configuración antiparalela de oligonucleótidos. Se presentan las reacciones duplicadas.

45

Figura 4: Especificidad de cebadores en la reacción de amplificación utilizando dos oligonucleótidos de invasión. Las reacciones se realizaron con cebadores complementarios directos e inversos o con un cebador complementario directo y no complementario. La concentración del ADN diana fue 1pM. Ejes X e Y para el gráfico de amplificación como en la Figura 2.

50

Figura 5: Reacción de compatibilidad utilizando dos oligonucleótidos con sondas diana específicas. (a) Muestra la representación esquemática de configuraciones que apoyan el uso de sondas diana específicas. (b) y (c) muestran la amplificación y la detección en tiempo real de ADN diana con (b) dos oligonucleótidos de invasión o (c) un solo oligonucleótido de invasión (SIBA). Se consiguió la monitorización en tiempo real o la amplificación con Sybr green I o una sonda diana específica, como se muestra en los marcadores para las trazas. Eje X para cada gráfico: Tiempo (minutos). Eje Y: fluorescencia de Sybr green I o sonda (unidades arbitrarias).

55

Figura 6: Resistencia de (a) reacción utilizando dos oligonucleótidos de invasión y (b) reacción estándar utilizando un solo oligonucleótido de invasión (SIBA) para la detección de amplificación no específica. El SIBA estándar resultó menos resistente a la detección de amplificación no específica con cebadores cortos que la amplificación llevada a cabo con dos oligonucleótidos de invasión. La concentración de ADN diana fue 1 pM para los cebadores largos y 1 fM para los cebadores cortos. La amplificación se monitorizó utilizando Sybr green I o una sonda que tiene un sitio de unión no solapante con el sitio de unión de los oligonucleótidos de invasión de cadena o cebadores. Eje X para cada gráfico: Tiempo (minutos). Eje Y: fluorescencia de Sybr green I o sonda (unidades arbitrarias). (a) muestra la monitorización de amplificación con

60

65

Sybr green I o una sonda durante la amplificación con dos oligonucleótidos de invasión. (b) muestra la monitorización de amplificación con Sybr green I en SIBA.

Figura 7: Amplificación de un ADN diana de un ADN de plásmido usando dos oligonucleótidos de invasión de cadena. El plásmido de ADN se usó directamente o se trató con la enzima de restricción EcoRV-HF. La amplificación se monitorizó usando Sybr green I. Eje X: Tiempo (minutos). Eje Y: fluorescencia de Sybr green I (unidades arbitrarias).

Figura 8: Amplificación de un ADN diana que tiene dos sitios de invasión idénticos. Las reacciones se realizaron con un solo oligonucleótido de invasión que se une a ambos sitios de invasión del ADN diana. (a), (c), (e) y (g) muestran gráficos de amplificación para la monitorización en tiempo real de la amplificación de ADN diana usando Sybr green I. (b), (d), (f) y (h) muestran los análisis de curva de fusión correspondientes. (i) muestra la electroforesis no desnaturante de los productos de reacción. a) y b): configuración paralela de oligonucleótidos de invasión utilizados para amplificar un ADN diana dúplex de 324 pares de bases. (c) y (d): configuración paralela de oligonucleótidos de invasión utilizados para amplificar un ADN diana. (e) y (f): configuración antiparalela de oligonucleótidos de invasión utilizados para amplificar un ADN diana. (g) y (h): configuración antiparalela inversa de oligonucleótidos de invasión utilizados para amplificar un ADN diana. (i) configuración antiparalela de oligonucleótidos de invasión utilizados para amplificar un ADN diana. Ejes X e Y para los gráficos de amplificación y análisis de curva de fusión como en la Figura 2. La monitorización a tiempo real de amplificación de ADN diana se consiguió usando Sybr green I. (i) Carriles para electroforesis: Carril 1, BioRad EZ Carga 20 pb Regla Molecular; carriles 2-6 copiados 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 y 10^3 respectivamente; carril 7, control de agua.

Figura 9: sistema basado en FRET para la monitorización en tiempo real de la invasión y la amplificación: (a) representación esquemática de cebadores marcados y oligonucleótidos de invasión. (b) Monitorización a tiempo real de invasión y amplificación y detección de ADN diana utilizando oligonucleótidos marcados de FRET en configuración paralela. Eje X para (b): Tiempo (minutos). Eje Y: fluorescencia de la sonda (unidades arbitrarias).

Figura 10: Sensibilidad de la amplificación basada en invasión de cadena utilizando dos oligonucleótidos de invasión de cadena. La sensibilidad se calculó con tres ensayos diferentes utilizando diluciones seriadas de 10^6 a 1 copia de ADN diana. La monitorización a tiempo real de la amplificación de ADN diana se consiguió utilizando Sybr green I. Gráficos de amplificación: (a) Ensayo 1 (b) Ensayo 2 y (c) Ensayo 3. eje X: Tiempo (minutos). Eje Y: fluorescencia de Sybr green I (unidades arbitrarias).

Breve descripción de las secuencias

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido de invasión.

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido de invasión.

SEQ ID NO: 3 es la secuencia de nucleótidos de un cebador de ADN.

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de nucleótidos de un cebador de ADN.

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de nucleótidos de un cebador de ADN.

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido de invasión no complementario.

SEQ ID NO: 7 es la secuencia de nucleótidos de un cebador de ADN no complementario.

SEQ ID NO: 8 es la secuencia de nucleótidos de una sonda.

SEQ ID NO: 9 es la secuencia de nucleótidos de una sonda.

SEQ ID NO: 10 es la secuencia de nucleótidos de un cebador de ADN.

SEQ ID NO: 11 es la secuencia de nucleótidos de un molde diana.

SEQ ID NO: 12 es la secuencia de nucleótidos de un molde diana.

SEQ ID NO: 13 es la secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido de invasión.

SEQ ID NO: 14 es la secuencia de nucleótidos de un cebador de ADN.

SEQ ID NO: 15 es la secuencia de nucleótidos de un cebador de ADN.

SEQ ID NO: 16 es la secuencia de nucleótidos de un molde diana.

SEQ ID NO: 17 es la secuencia de nucleótidos de un molde diana.

SEQ ID NO: 18 es la secuencia de nucleótidos de un molde diana.

SEQ ID NO: 19 es la secuencia de nucleótidos de un molde diana.

SEQ ID NO: 20 es la secuencia de nucleótidos de un molde diana.

SEQ ID NO: 21 es la secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido de invasión marcado.

SEQ ID NO: 22 es la secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido de invasión marcado.

SEQ ID NO: 23 es la secuencia de nucleótidos de un cebador marcado.

SEQ ID NO: 24 es la secuencia de nucleótidos de un cebador marcado.

SEQ ID NO: 25 es la secuencia de nucleótidos de un cebador de ADN.

SEQ ID NO: 26 es la secuencia de nucleótidos de un molde diana.

SEQ ID NO: 27 es la secuencia de nucleótidos de un adaptador.

SEQ ID NO: 28 es la secuencia de nucleótidos de un adaptador.

SEQ ID NO: 29 es la secuencia de nucleótidos de un adaptador.

SEQ ID NO: 30 es la secuencia de nucleótidos de un adaptador.

SEQ ID NO: 31 es la secuencia de nucleótidos de un adaptador.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un sistema para la invasión de cadena de una secuencia de ácido nucleico diana en al menos dos localizaciones. Los métodos de la invención utilizan uno o más oligonucleótidos de invasión de cadena para unirse e invadir regiones en dirección 5' y en dirección 3' de la secuencia de ácido nucleico diana, permitiendo la unión de cebadores en dirección 5' y en dirección 3' para efectuar la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana. El suministro para la invasión de cadena de una secuencia de ácido nucleico diana en una localización tanto en dirección 5' como en dirección 3' acopla cada evento de unión de cebador a un evento de invasión de cadena independiente y proporciona mayores posibilidades de utilización de secuencias de oligonucleótidos de invasión de cadena que no han solapado con cebadores de amplificación. La invasión de cadena mediada en dos localizaciones diferentes también proporciona ventajas para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos diana que son más largas que aquellas que pueden ser típicamente amplificadas desde un solo punto de invasión de cadena.

Adicionalmente, la misma especie de invasión de cadena puede invadir tanto en una localización en dirección 5' como en dirección 3', dado que las secuencias de unión adecuadas están presentes en ambas regiones de la secuencia diana. De forma similar, se puede utilizar una sola especie de cebador cuando una secuencia de unión adecuada está presente en ambas regiones de la secuencia diana. Estas realizaciones permiten la amplificación y la secuenciación de secuencias desconocidas cuando las regiones de unión conocidas (tales como las secuencias de adaptador) están presentes en un molde que comprende la secuencia diana. Se pueden designar también oligonucleótidos de invasión de cadena para unirse a regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' de una secuencia de ácido nucleico diana dúplex en configuraciones alternativas. Esto proporciona oportunidades para variar el diseño de secuencias para dirigir un amplicón particular para optimizar parámetros de amplificación. Asimismo, los oligonucleótidos de invasión de cadena y los cebadores pueden diseñarse para tener regiones de unión no solapantes de manera que una región del amplicón permanece libre para la unión de una sonda, reduciendo, por tanto, la competencia entre especies de oligonucleótidos para unirse al amplicón durante la amplificación y evitando la detección de productos de amplificación no específicos.

Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para la amplificación de una secuencia nucleica diana que comprende regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' para uno o más oligonucleótidos de invasión de cadena, en el que las regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' incorporan, cada una, una secuencia de adaptador, el método que comprende poner en contacto dicha secuencia de ácido nucleico diana con uno o más oligonucleótidos de invasión de cadena y uno o más cebadores capaces de amplificar la secuencia de ácido nucleico diana, en el que dichos uno o más oligonucleótidos de invasión de cadena se unen a las secuencias de adaptador para hacer las regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' de la secuencia de ácido nucleico diana monocatenarias para permitir la unión de dichos uno o más cebadores.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un kit en un método de la presente invención, en el que el kit comprende un oligonucleótido de invasión de cadena y uno o más cebadores y al menos un adaptador de ADN, en el que dicho oligonucleótido de invasión de cadena puede unirse al adaptador de ADN, cuando está presente, en una región de unión en dirección 5' y en una región de unión en dirección 3' de una secuencia de ácido nucleico diana y en el que dichos uno o más cebadores son capaces de amplificar dicha secuencia de ácido nucleico diana.

Por consiguiente, en el presente documento se describe un método para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana, dicho método que comprende poner en contacto dicha secuencia de ácido nucleico diana con al menos un cebador en dirección 5', al menos un cebador en dirección 3' y el primer y segundo oligonucleótidos de invasión de cadena en condiciones que promueven la amplificación de dicha secuencia de ácido nucleico diana, en el que el primer oligonucleótido de invasión de cadena hace una región de unión de la secuencia de ácido nucleico diana monocatenaria para permitir la unión del cebador en dirección 5' y el segundo oligonucleótido de invasión de cadena hace una región de unión en dirección 3' de la secuencia de un ácido nucleico diana monocatenaria para permitir la unión del cebador en dirección 3'.

La divulgación proporciona adicionalmente un método para la amplificación de una secuencia nucleica diana que comprende regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' para un oligonucleótido de invasión de cadena, que comprende poner en contacto dicha secuencia de ácido nucleico diana con un oligonucleótido de invasión de cadena y uno o más cebadores capaces de amplificar la secuencia de ácido nucleico diana, en el que el oligonucleótido de invasión de cadena hace las regiones de unión de oligonucleótidos de invasión de cadena en dirección 3' de la secuencia de ácido nucleico diana monocatenaria para permitir la unión de dichos uno o más cebadores.

La divulgación también proporciona un kit que comprende al menos un cebador en dirección 5' y al menos un cebador en dirección 3' para una secuencia de ácido nucleico diana y un primer y segundo oligonucleótidos de invasión de cadena, los cuales tienen regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' respectivamente en una secuencia de ácido nucleico diana.

La divulgación proporciona adicionalmente un kit que comprende un oligonucleótido que comprende uno o más cebadores y al menos un adaptador de ADN, en el que dicho oligonucleótido de invasión de cadena puede unirse al adaptador de ADN, cuando está presente, en una región de unión en dirección 5' y en una región de unión en dirección 3' de una secuencia de ácido nucleico diana y en el que dichos uno o más cebadores son capaces de

amplificar dicha secuencia de ácido nucleico diana.

La invención proporciona adicionalmente un método de amplificación de una secuencia de un ácido nucleico diana que comprende una región de secuencia desconocida que crea una secuencia de un ácido nucleico diana que comprende regiones de unión de oligonucleótidos de invasión de cadena en dirección 5' y en dirección 3' de dicha región de secuencia desconocida y llevar a cabo un método de la invención que emplea oligonucleótidos de invasión de cadena y cebadores para amplificar la secuencia de ácido nucleico diana.

La invención proporciona adicionalmente un método para determinar la secuencia de un ácido nucleico que comprende una región de secuencia desconocida, que comprende la creación de una secuencia de ácido nucleico diana que comprende regiones de unión de oligonucleótidos de invasión de cadena en dirección 5' y en dirección 3' de dicha región de secuencia desconocida, que lleva a cabo un método de la invención que emplea oligonucleótidos de invasión de cadena para amplificar la secuencia de un ácido nucleico diana y determinar la secuencia de dicha región de secuencia desconocida.

Descripción detallada de la invención

Debe entenderse que las aplicaciones diferentes de los métodos desvelados pueden adaptarse a las necesidades específicas de la técnica. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento tiene el fin únicamente de describir realizaciones particulares de la invención y no se pretende que sea limitante. Además, como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/a", "uno" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un polipéptido" incluye dos o más de tales polipéptidos y similares.

Métodos para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana

Los métodos de la invención proporcionan la amplificación de una secuencia de un ácido nucleico diana mediante la invasión de cadena de un ácido nucleico en dos sitios separados. La invasión de cadena en cada sitio, mediada por un oligonucleótido de invasión de cadena, hace la secuencia de ácido nucleico diana monocatenaria para permitir que se una un cebador. Los cebadores típicamente no son capaces de amplificar la secuencia de ácido nucleico diana cuando contactan con la misma, en ausencia de oligonucleótido(s) de invasión de cadena. En otras palabras, los cebadores no son capaces de unirse a sus regiones de unión en la secuencia de ácido nucleico diana, a menos que sus regiones de unión se expongan mediante oligonucleótidos de invasión de cadena, los cuales hacen sus regiones de unión monocatenarias. Los oligonucleótidos de invasión de cadena típicamente no son capaces de elongarse mediante una ADN polimerasa. En particular, los métodos de la presente invención preferentemente amplifican una secuencia de ácido nucleico diana en condiciones isotérmicas en las que una secuencia de ácido nucleico diana está presente en un dúplex de ácido nucleico. La invasión de cadena en al menos dos sitios del dúplex hace la secuencia de ácido nucleico diana monocatenaria en condiciones isotérmicas, permitiendo la amplificación basada en cebador.

Secuencia de ácido nucleico diana

La secuencia de ácido nucleico diana puede ser de cualquier origen y puede estar, por ejemplo, presente o no en la naturaleza. La secuencia de ácido nucleico puede comprender una secuencia conocida o regiones de secuencia conocida o desconocida. La secuencia de ácido nucleico diana puede ser humana, de mamífero, bacteriana o vírica. La secuencia de ácido nucleico diana puede ser una región de un gen o un cromosoma. La secuencia de ácido nucleico diana puede ser específica para un genotipo o un organismo (tal como un patógeno) para que sea detectada por la amplificación de ADN. La secuencia de ácido nucleico diana puede ser única para el genoma de una especie particular. Por tanto, la secuencia de ácido nucleico diana para detectar una especie particular típicamente diferirá de cualquier secuencia de ácido nucleico homóloga en una especie relacionada. Típicamente, la secuencia de ácido nucleico diana comprenderá varios emparejamientos erróneos con una secuencia de ácido nucleico homóloga en una especie relacionada. La secuencia de ácido nucleico diana puede ser una secuencia específica para una cepa particular de bacterias o un serotipo particular, aislado o clado de un virus.

La secuencia de ácido nucleico diana a ser detectada puede ser de cualquier tamaño y tener cualquier secuencia. La secuencia de ácido nucleico diana o amplicón es de una longitud suficiente para prestarse a la hibridación de los cebadores en dirección 5' y en dirección 3' y a la unión de oligonucleótido(s) de invasión de cadena en una forma adecuada para porciones de la secuencia diana en dirección 5' y en dirección 3'. El amplicón es típicamente de al menos 60 nucleótidos de longitud, más preferentemente de al menos 65 o al menos de 70 nucleótidos de longitud medidos desde el sitio 5' de unión al cebador en dirección 5' al sitio 5' de unión del cebador en dirección 3'. El amplicón puede tener aproximadamente de 60 a 80 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el amplicón puede tener más de 80, tal como más de 100 nucleótidos de longitud, tal como más de 150, 200, 300, 400, 500, 1000 o más nucleótidos de longitud. El amplicón puede tener aproximadamente de 70 a aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, tal como de aproximadamente 70 a 800, aproximadamente 70 a aproximadamente 600, aproximadamente 70 a aproximadamente 500 nucleótidos de longitud, aproximadamente 70 a aproximadamente 400, aproximadamente 100 a aproximadamente 400 o aproximadamente 100 a aproximadamente 200 nucleótidos

de longitud.

Entre los ejemplos de secuencias de ácidos nucleicos diana adecuados para los métodos de la invención se incluyen las SEQ ID NO: 11, 12, 16, 17, 18, 19, 20 y 26.

5 La secuencia de ácido nucleico diana comprende regiones en dirección 5' y en dirección 3' que incluyen, cada una, regiones de unión para un oligonucleótido de invasión de cadena y un cebador. Las regiones de unión en dirección 5' para un oligonucleótido de invasión de cadena y un cebador pueden solapar en la secuencia o pueden no ser solapantes. De forma similar, las regiones de unión en dirección 3' para un oligonucleótido de invasión de cadena y un cebador pueden solapar en la secuencia o pueden no ser solapantes. La secuencia de ácido nucleico diana puede comprender también regiones de unión para una o más sondas de oligonucleótidos. Las regiones de unión para una sonda pueden solapar en secuencia con las regiones de unión en dirección 5' o en dirección 3' para un nucleótido de invasión de cadena y/o cebador o no ser solapantes con una región de unión para cualquier oligonucleótido de invasión de cadena o cebador. La región de unión para una sonda puede localizarse preferentemente entre las regiones de unión de oligonucleótidos de invasión de cadena en dirección 5' y en dirección 3' de la secuencia de ácido nucleico diana. La selección de regiones de unión para oligonucleótidos de invasión de cadena, cebadores y sondas y el diseño de secuencias apropiadas para estas se discute con mayor detalle más adelante.

20 Las longitudes de las regiones de unión para los oligonucleótidos de invasión de cadena, cebadores y sondas se definen mediante las longitudes de las secuencias complementarias a la diana que se incluyen en ella, como se describe con mayor detalle más adelante. Como se describe más adelante, un oligonucleótido de invasión de cadena típicamente incluye al menos 25 nucleótidos de secuencia complementaria a la diana y un cebador de al menos 10. Por tanto, cada región de unión del oligonucleótido de invasión de cadena de la secuencia diana puede ser de al menos 25 nucleótidos de longitud y cada región de unión de cebador de al menos 10 nucleótidos de longitud. La secuencia diana puede comprender adicionalmente una región de unión típicamente de al menos 10 nucleótidos de longitud.

30 Las regiones de unión de nucleótidos de invasión de cadena en dirección 5' y en dirección 3' pueden estar presentes en la misma cadena de la secuencia de ácido nucleico diana o pueden estar localizadas en cadenas opuestas de un dúplex que comprende la secuencia de ácido nucleico diana. El oligonucleótido u oligonucleótidos de invasión de cadena puede(n), por tanto, unirse a la secuencia de ácido nucleico diana en una orientación paralela sobre la misma cadena, que alinea 5' a 3' en la misma dirección. Como alternativa, el (o los) oligonucleótido(s) puede(n) unirse a cadenas opuestas de la secuencia de ácido nucleico diana en una orientación antiparalela, que alinea 5' a 3' en direcciones opuestas sobre el dúplex diana. En una orientación antiparalela, el extremo 3' de cada oligonucleótido de invasión de cadena se puede dirigir hacia o aparte uno de otro. Por tanto, los extremos 3' de cada oligonucleótido de invasión de cadena pueden mirar hacia el centro del amplicón (configuración antiparalela) o hacia su extremo de amplicón respectivo (configuración antiparalela inversa). El extremo 3' o el extremo 5' de un oligonucleótido de invasión de cadena se puede unir próximo a la región de unión para un cebador respectivo. Las configuraciones de unión anteriores se muestran en la Figura 1.

45 El uso de configuraciones de unión particulares puede proporcionar efectos alternativos sobre los parámetros de amplificación. Por ejemplo, cuando un oligonucleótido de invasión de cadena se une con su extremo 5' localizado próximo a la región de unión para un cebador respectivo, la unión del cebador puede tener una especificidad diferente y un perfil cinético distinto en comparación con un cebador que se une próximo al extremo 3' de un oligonucleótido de invasión de cadena. El extremo 3' de un oligonucleótido de invasión de cadena típicamente comprende un número de nucleótidos modificados (tales como nucleótidos de ARN 2'-O-metilo), que pueden influir sobre las interacciones de unión de una unión de cebador próximamente al mismo. En las configuraciones paralela y antiparalela inversa, se considera también que la especificidad de amplificación se puede mejorar dado que se requiere migración de la ramificación de los extremos 3' de los oligonucleótidos de invasión de cadena (que típicamente comprenden nucleótidos modificados) antes de que la unión de cebador sea posible. Por consiguiente, los métodos de la invención proporcionan una variante de la tasa de amplificación y de la especificidad de amplificación mediante la variación de las configuraciones de unión del (o los) oligonucleótido(s) de invasión de cadena.

55 Las regiones de unión de oligonucleótidos de invasión de cadena en dirección 5' y en dirección 3' de la secuencia de ácido nucleico diana pueden unir las mismas especies de oligonucleótido de invasión de cadena. Por tanto, se puede proporcionar una sola especie de oligonucleótido de invasión de cadena para iniciar la invasión de cadena en dos puntos en la secuencia de ácido nucleico diana, como se trata más adelante de forma detallada. En esta realización, cada una de las regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' comprende una secuencia complementaria de al menos una porción del oligonucleótido de invasión de cadena. Las regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' son típicamente homólogas o idénticas unas a otras. Las regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' pueden ser al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % homólogas o idénticas unas a otras o completamente idénticas. Las regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' pueden tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, tales como 1 a 5 o 1 a 3, desemparejamientos entre ellas. Adicionalmente, se puede proporcionar una sola especie de cebador para iniciar la amplificación en dos puntos en la secuencia de ácido nucleico, como se trata más adelante de forma

detallada. La secuencia de ácido nucleico diana, en este caso, comprenderá regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' que comprende, cada una, una secuencia complementaria de al menos una porción del cebador y pueden ser homólogas o idénticas unas a otras como se describió anteriormente.

- 5 Se puede detectar más de una secuencia de ácido nucleico en un método de la invención proporcionando combinaciones múltiples de oligonucleótido(s) de invasión de cadena, cebadores (y opcionalmente sondas), cada uno específico para una secuencia de ácido nucleico diferente. Típicamente, los pares oligonucleótido de invasión de cadena/cebador y/o sondas que se unen a diferentes secuencias de ácido nucleico diana se marcarán con diferentes pares fluoróforo/desactivador, permitiendo por tanto la multiplexación. Se pueden seleccionar al menos dos, tres, cuatro, cinco, diez o más secuencias diana diferentes. Se puede detectar más de una secuencia de ácido nucleico diana del mismo organismo. Como alternativa, se pueden detectar secuencias de ácidos nucleicos diana específicas para al menos dos, tres, cuatro, cinco, diez o más genotipos, organismos o patógenos diferentes.

Cebadores en dirección 5' y en dirección 3'

- 15 Se seleccionan cebadores en dirección 5' y en dirección 3' adecuados basándose en la secuencia de ácidos nucleicos diana de interés y teniendo en cuenta el sitio de unión del respectivo oligonucleótido de invasión de cadena que hace una región de unión en dirección 5' o en dirección 3' de la secuencia de ácido nucleico diana monocatenaria para permitir la unión del cebador respectivo.

- 20 Los cebadores en dirección 5' y en dirección 3' comprenden una secuencia que es complementaria parcial o totalmente complementaria con la diana y opcionalmente una secuencia no complementaria flanqueante 5' y/o 3'. Como alternativa, los cebadores en dirección 5' y en dirección 3' pueden consistir enteramente en una secuencia parcial o totalmente complementaria de la diana. La longitud de la secuencia del cebador, que es complementaria de la diana, es suficiente para proporcionar hibridación específica con la secuencia de ácido nucleico diana. La longitud de secuencia complementaria es de típicamente al menos 10 nucleótidos, más preferentemente al menos 15, al menos 16 o al menos 17 nucleótidos. La longitud de secuencia complementaria puede ser 10-25, 15-25, 10-30 o 15-30 nucleótidos.

- 30 Debe entenderse que las longitudes de secuencia anteriores se refieren a porciones de los cebadores que pueden ser parcial o totalmente complementarias de la secuencia de ácido nucleico diana. Pueden presentarse desemparejamientos entre los cebadores y la secuencia diana en posiciones particulares, sin dejar de permitir la amplificación y detección específicas de la secuencia diana, en particular teniendo en cuenta el uso combinado de cebadores en dirección 5' y en dirección 3' y la unión de oligonucleótido(s) de invasión de cadena a regiones en dirección 5' y en dirección 3' de la secuencia de ácido nucleico diana para conseguir amplificación. Podrían haber 1, 2, 3, 4 o 5 desemparejamientos entre la región complementaria del cebador y la región correspondiente de la secuencia diana.

- 40 Típicamente el cebador en dirección 5' y en dirección 3' será de menos de 30 nucleótidos de longitud total, más preferentemente de menos de 25 nucleótidos de longitud, tal como 15 a 25 o 15 a 23 nucleótidos de longitud. Se prefiere particularmente que se utilicen cebadores de menos de 30 nucleótidos de longitud cuando se usa una recombinasa para la invasión de cadena. Tales cebadores no son capaces de actuar como sustratos para las recombinasas. En algunas realizaciones se pueden utilizar cebadores de menos de 15 nucleótidos de longitud, tales como cebadores de aproximadamente 8 a aproximadamente 14, aproximadamente 10 a aproximadamente 14 o aproximadamente 12 a aproximadamente 14 nucleótidos de longitud. El uso de tales cebadores cortos es preferente en combinación con una sonda que tiene una región de unión en la secuencia de ácido nucleico diana que no solapa con la región de unión para un cebador u oligonucleótido de invasión de cadena. La detección de productos de amplificación no específicos producidos mediante cebadores cortos se puede reducir o eliminar mediante la utilización de una sonda con un sitio de unión no solapante.

- 50 El cebador en dirección 5' (o directo) se une a la región 3' de una cadena de la secuencia de ácido nucleico diana dúplex, en una posición próxima o que solapa con el sitio de unión del oligonucleótido de invasión de cadena. El cebador en dirección 3' (o inverso) se une a la región 3' de la cadena opuesta de la secuencia de ácido nucleico diana dúplex al cebador en dirección 5', en una posición próxima o que solapa con el sitio de unión del oligonucleótido de invasión de cadena. Los sitios de unión 5' de los cebadores en dirección 5' y en dirección 3' están separados típicamente al menos 60 nucleótidos, más preferentemente al menos 65 o al menos 70 nucleótidos de longitud sobre la secuencia diana dúplex.

- 60 Dependiendo de la configuración de unión del oligonucleótido de invasión de cadena, como se muestra en la Figura 1, el cebador en dirección 5' puede tener una región de solapamiento de secuencia o una región de complementariedad con la secuencia del respectivo oligonucleótido de invasión de cadena. La región de solapamiento de secuencia o complementariedad podría ser de 1-8 nucleótidos de longitud y puede ser de al menos 5 o al menos 6 nucleótidos de longitud. El cebador en dirección 3' puede asimismo tener una región de solapamiento de secuencia o una región de complementariedad de secuencia de 1-8 nucleótidos, tal como al menos 5 o al menos 6 nucleótidos de longitud con la secuencia del respectivo oligonucleótido de invasión de cadena.

5 Como alternativa, podría no haber solapamiento de secuencia o complementariedad entre el cebador en dirección 5' y el respectivo oligonucleótido de invasión de cadena y/o no haber solapamiento de secuencia o complementariedad entre el cebador en dirección 3' y el respectivo oligonucleótido de invasión de cadena, con la unión de cebador relevante en su lugar, en una posición que está próxima en la secuencia diana al sitio de unión del oligonucleótido de invasión de cadena.

10 El uso de uno o más cebadores que tienen regiones de unión en la diana que no solapan con regiones de unión para oligonucleótidos de invasión de cadena, puede proporcionar diferentes ventajas. En realizaciones en las que los métodos de la invención utilizan sondas de oligonucleótido para detectar amplificación de ADN, puede también no haber solapamiento de secuencia o complementariedad entre un oligonucleótido de invasión de cadena y la sonda y/o un cebador en dirección 5' y/o en dirección 3' y la sonda. Puede no haber solapamiento de secuencia entre las regiones de unión dentro de la secuencia de ácido nucleico diana para el cebador en dirección 5', el cebador en dirección 3', cada oligonucleótido de invasión de cadena y de alguna sonda. Puede también no haber complementariedad entre alguno de los cebadores, oligonucleótidos de invasión de cadena o sondas. El diseño de secuencias para las diferentes especies de oligonucleótidos de manera que se pueden unir a la secuencia de ácido nucleico diana en regiones independientes, no solapantes en la diana, pueden establecer menor competencia entre las especies de oligonucleótidos para unirse a la secuencias de ácido nucleico diana y también reducir la formación y/o evitar la detección de productos de amplificación no deseados.

20 Más detalladamente, los cebadores de entre 16 y 23 bases de longitud son utilizados típicamente en métodos de amplificación basados en invasión de cadena utilizando un solo oligonucleótido de invasión de cadena (métodos SIBA; del inglés, Strand Invasion Based Amplification o amplificación basada en invasión de cadena). Las secuencias en los extremos 3' de los cebadores tienen normalmente aproximadamente un solapamiento o complementariedad de 8 bases con el oligonucleótido de invasión de cadena (el cebador en dirección 5' solapa con el oligonucleótido de invasión de cadena mientras que el cebador en dirección 3' es complementario del oligonucleótido de invasión de cadena). Esta configuración asegura la amplificación eficaz del ADN diana y minimiza el riesgo de amplificación no específica. También resulta posible utilizar cebadores cortos de ≤ 14 bases de longitud, que no solapan con el oligonucleótido de invasión de cadena. Los cebadores cortos que no tienen secuencias que solapan con el oligonucleótido de invasión de cadena son capaces de amplificar el ADN diana más eficazmente que los cebadores largos solapantes. Esto se debe a que el extremo 3' de un cebador largo solapante compite con el oligonucleótido de invasión de cadena por un sitio de unión del molde diana. Por ejemplo, el cebador en dirección 5' necesita primero migrar de ramificación sobre el dúplex antes que desplazar el oligonucleótido de invasión de cadena.

35 Sin embargo, los cebadores cortos (≤ 14 bases) pueden generar productos de amplificación no específicos. Para evitar este problema, en SIBA se utilizan típicamente cebadores más largos (16-23 bases), con extremos 3' que solapan o son complementarios con el oligonucleótido de invasión de cadena. En esta configuración, la región periférica del oligonucleótido de invasión de cadena tiene todavía aproximadamente 14 bases de longitud. Esto deja solo una región periférica que se disocia cuando el ADN diana se amplifica.

40 En los métodos de la invención que comprenden invasión de cadena en dos puntos de la diana (en dirección 5' y en dirección 3'), pueden utilizarse cebadores más cortos que en SIBA. Asimismo, los cebadores no solapantes pueden utilizarse más eficazmente. Esto se debe a que es posible incorporar un sitio de unión de sonda sobre el ADN diana que es independiente de los oligonucleótidos de invasión de cadena. Asimismo, la capacidad de utilizar diferentes configuraciones de cebador y oligonucleótido de invasión de cadena, tales como la configuración antiparalela inversa en los métodos de la invención, minimizan o suprimen el riesgo de amplificación no específica inducida por cebadores cortos.

50 Cuando un cebador se une próximo a su respectivo oligonucleótido de invasión de cadena (sin solapamiento de secuencia o complementariedad), típicamente hay 15 nucleótidos o menos, preferentemente 10 nucleótidos o menos, tal como aproximadamente 1 a aproximadamente 15 nucleótidos, aproximadamente 5 a aproximadamente 15 nucleótidos, aproximadamente 5 a aproximadamente 10 nucleótidos o aproximadamente 3 a aproximadamente 8 nucleótidos, entre el límite más próximo de la región de unión del oligonucleótido de invasión de cadena y la región de unión del respectivo cebador. Esto garantiza que el cebador es capaz de hibridar con la región monocatenaria creada por la unión del oligonucleótido de invasión de cadena.

60 Preferentemente, se designa cada cebador para permitir la detección específica de una secuencia de ácido nucleico diana particular, tal como un genotipo particular o una secuencia de ácido nucleico presente en una diana particular, tal como un organismo particular o un patógeno particular. Por tanto, cada cebador típicamente hibrida específica o selectivamente con una secuencia complementaria encontrada solo en la diana. Sin embargo, cada cebador puede también hibridar con otras secuencias, tales como secuencias encontradas en otras especies, dado que cuando se usa en combinación con el segundo cebador, el oligonucleótido(s) de invasión de cadena y la sonda de oligonucleótido opcional, se obtiene la detección específica de la secuencia de ácido nucleico diana.

65 Cualquier cebador en dirección 5' o en dirección 3' utilizado en la invención puede comprender uno o más nucleótidos modificados y/o marcador detectable, por ejemplo, un colorante fluorescente. En algunas realizaciones

un cebador en dirección 5' o en dirección 3' puede formar un par FRET (transferencia de energía de resonancia fluorescente, del inglés, Fluorescence Resonance Energy Transfer) con un oligonucleótido de invasión de cadena y por tanto comprender un fluoróforo o un desactivador (del inglés, quencher), como se analiza a continuación.

- 5 Debe entenderse que los métodos de la invención pueden comprender el uso de más de un par de cebadores en dirección 5' y en dirección 3', típicamente cuando se ha de detectar más de una secuencia diana en paralelo en un sistema multiplexado.

Oligonucleótido(s) de invasión de cadena

- 10 Se seleccionan uno o más oligonucleótidos de invasión de cadena adecuados basándose en la secuencia de ácido nucleico diana de interés y teniendo en cuenta el sitio de unión de los cebadores en dirección 5' y en dirección 3' y la necesidad del (o los) oligonucleótido(s) de invasión de cadena para hacer la secuencia de ácido nucleico diana monocatenaria en las regiones relevantes para permitir la unión del cebador en dirección 5' y del cebador en dirección 3'. Cuando la secuencia de ácido nucleico diana comprende regiones de unión de oligonucleótidos de invasión de cadena en dirección 5' y en dirección 3' homólogas o idénticas, se puede proporcionar una sola especie de oligonucleótido de invasión de cadena para efectuar la amplificación. Como alternativa, se pueden proporcionar dos especies diferentes de secuencias divergentes de unión de oligonucleótidos de invasión de cadena (primera y segunda) en las porciones en dirección 5' y en dirección 3' de la secuencia de ácido nucleico diana. La siguiente descripción de las características de un oligonucleótido de invasión de cadena es aplicable tanto al primer oligonucleótido de invasión de cadena como al segundo, cuando estos se utilizan.

- 25 Cada oligonucleótido de invasión de cadena comprende una secuencia que es complementaria de la diana y opcionalmente una(s) secuencia(s) no complementaria(s) flanqueante(s) adicional(es). La longitud de la secuencia que es complementaria de la diana puede determinarse por el experto en la materia empíricamente y ser suficiente para proporcionar una eficaz invasión de cadena de la secuencia de ácido nucleico diana, opcionalmente en condiciones isotérmicas. La secuencia complementaria puede comprender emparejamiento de bases complementarias de ARN-ADN. Típicamente, la longitud de la secuencia complementaria es de al menos 25 o al menos 27 nucleótidos, típicamente al menos 30 nucleótidos, tal como al menos 32, al menos 33 o al menos 35 nucleótidos, más preferentemente al menos 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos de longitud o más. La longitud de la secuencia complementaria puede ser 30-50, 32-50, 35-50, 40-50, 35 a 48, 35 a 46, 38 a 45 o 40 a 45 nucleótidos de longitud.

- 35 Debe entenderse que las longitudes de secuencia anteriores se refieren a una porción de un oligonucleótido de invasión de cadena que puede ser parcial o totalmente complementario de la secuencia de ácido nucleico diana. Pueden presentarse desemparejamientos entre el oligonucleótido de invasión de cadena y la secuencia diana en posiciones particulares, sin dejar de permitir la amplificación y detección específicas de la secuencia diana, en particular, teniendo en cuenta el uso combinado de cebadores en dirección 5' y en dirección 3' y un oligonucleótido de invasión de cadena para conseguir la amplificación. Puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8, tal como 1 a 5 o 1 a 3 desemparejamientos entre la región complementaria del oligonucleótido de invasión de cadena y la región correspondiente de la secuencia diana, dependiendo de la longitud total de la secuencia complementaria.

- 45 La secuencia complementaria de un oligonucleótido de invasión de cadena híbrida con una porción de la secuencia diana que puede o no solapar con una porción de la secuencia diana formando una región de unión para un cebador. El oligonucleótido de invasión de cadena puede tener una región de solapamiento o complementariedad de 1-8 nucleótidos, tal como una región de al menos 5 o al menos 6 nucleótidos de longitud, con un cebador en dirección 5' o en dirección 3' respectivo. Como alternativa, la secuencia de un oligonucleótido de invasión de cadena puede no tener región de solapamiento con la secuencia de un cebador en dirección 5' o en dirección 3'. En esta realización, tal como se ha tratado anteriormente, un oligonucleótido de invasión de cadena se unirá en una región próxima a la región de unión para un cebador en dirección 5' o en dirección 3', de manera que puede hacer la región de unión para el cebador monocatenaria.

- 55 Los límites más próximos de las regiones de unión de oligonucleótidos de invasión de cadena en dirección 5' y en dirección 3' de la secuencia de ácido nucleico diana pueden localizarse al menos a 15, tal como al menos a 20 o al menos a 25 nucleótidos aparte en la secuencia de ácido nucleico diana, pero en algunas realizaciones pueden utilizarse distancias más cortas entre regiones de unión.

- 60 La porción 5' de la secuencia complementaria de un oligonucleótido de invasión de cadena típicamente se une a menos de 25 nucleótidos o menos, más preferentemente 20 nucleótidos o menos del límite relevante de la secuencia de nucleótidos diana dúplex para que sea fusionada (el amplicón).

- 65 Un oligonucleótido de invasión de cadena opcionalmente comprende adicionalmente región(es) de secuencia(s) no complementaria(s) de la diana que flanquea la región de secuencia complementaria. Un oligonucleótido de invasión de cadena puede comprender una región 5' no complementaria, que puede ser de cualquier secuencia de nucleótidos. La región 5' no complementaria es típicamente de al menos 3 nucleótidos de longitud, más típicamente de al menos 6, al menos 8, preferentemente de al menos 10, al menos 12 o al menos 14 nucleótidos de longitud. La

región 5' no complementaria puede ayudar a unirse a la recombinasa, dado que la recombinasa se une cooperativamente. Un oligonucleótido de invasión de cadena puede comprender una región 3' no complementaria típicamente de 1-3 nucleótidos de longitud que comprende nucleótidos que bloquean la elongación de polimerasas, tal como un dT invertido 3'.

5 Un oligonucleótido de invasión de cadena es típicamente de al menos 30 nucleótidos de longitud cuando se utiliza una recombinasa para la invasión de cadena en el método de amplificación en conjunción con el oligonucleótido de invasión de cadena. Un oligonucleótido de invasión de cadena es preferentemente al menos 35, al menos 40 o al menos 45 nucleótidos de longitud, más preferentemente al menos 50 y puede ser al menos 55 nucleótidos de longitud o mayor. El oligonucleótido de invasión de cadena puede ser 40-70, 45-70, 45-70, 50-70, 55-70, 45-65, 50-65, 50-60 o 55-65 nucleótidos de longitud.

15 Típicamente un oligonucleótido de invasión de cadena tiene un extremo 3' no elongable, de manera que no puede servir como un sustrato para una ADN polimerasa y la secuencia diana solo se amplifica después sobre la unión adicional de los cebadores en dirección 5' y en dirección 3' específicos. Esto evita la formación de productos de amplificación no específicos. Un oligonucleótido de invasión de cadena puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más nucleótidos modificados en su región 3', tal como en los 10-15 o 10-20 nucleótidos del extremo 3'. Un oligonucleótido de invasión de cadena puede comprender una modificación 3' del nucleótido de extremo 3' y puede ser un didesoxinucleótido o comprender un grupo amino-alilo 3', un espaciador de carbono 3', fosfato 3', biotina 3', sialil 3' o tiol 3'. El nucleótido 3' puede ser un nucleótido incorporado en una orientación inversa mediante un ligamiento 3'-3'. Como alternativa o adicionalmente, la región 3' del oligonucleótido de invasión de cadena puede comprender nucleótidos con capacidad de sustrato pobre para las ADN polimerasas, tales como nucleótidos de PNA (ácido peptidonucleico), LNA (ácido nucleico bloqueado), ADN ligado 2'-5', 2'-fluoro ARN o 2'-O-metil ARN o combinaciones de los mismos.

25 Cuando el oligonucleótido de invasión de cadena es un oligómero de PNA que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en nucleótidos de PNA, tal oligonucleótido puede desestabilizar e invadir ADN de dúplex en ausencia de una enzima recombinasa. Por tanto, cuando se utiliza un oligonucleótido de PNA, los métodos de la invención se pueden realizar sin presencia de una enzima recombinasa. Un oligonucleótido de PNA puede comprender nucleótidos de PNA y otros nucleótidos, tales como nucleótidos de ADN, dado que el oligonucleótido comprende suficientes nucleótidos de PNA para mediar la invasión de cadena de un dúplex. El experto en la materia puede determinar empíricamente el nivel de PNA a incorporar en un oligonucleótido probando su capacidad para efectuar invasión de cadena y permitir amplificación de ADN.

35 Un oligonucleótido de invasión de cadena puede comprender un marcador detectable, por ejemplo, un colorante fluorescente. En algunas realizaciones un oligonucleótido de invasión de cadena puede formar un par de FRET con un cebador en dirección 5' o en dirección 3' y por tanto comprender un fluoróforo o un desactivador, como se analiza a continuación.

40 Los métodos de la invención comprenden invasión de cadena en al menos dos sitios de una secuencia de ácido nucleico diana, mediada por un primer y segundo oligonucleótidos de invasión de cadena o por la misma especie de oligonucleótido de invasión de cadena donde la secuencia de ácido nucleico diana comprende dos sitios de unión para el mismo oligonucleótido de invasión de cadena. Debe entenderse que los métodos de la invención pueden comprender adicionalmente invasión de cadena mediante oligonucleótidos de invasión de cadena en sitios adicionales de una secuencia de ácido nucleico diana, tales como en 3 o más, 4 o más, 5 o más, 8 o más o 10 o más sitios. Adicionalmente, en un sistema multiplexado, los métodos de la invención pueden comprender el uso de oligonucleótidos de invasión de cadena adicionales, dirigidos a regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' de secuencias diana adicionales.

50 *Amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana*

El método de amplificación de ADN comprende la amplificación basada en invasión de cadena. La amplificación de invasión de cadena comprende la invasión de cadena en al menos dos sitios de las secuencias de ácido nucleico diana. La invasión de cadena sucede en regiones tanto en dirección 5' como en dirección 3' de la secuencia de ácido nucleico diana.

55 La secuencia de ácido nucleico diana se incuba con el cebador en dirección 5', cebador en dirección 3' y uno o más oligonucleótidos de invasión de cadena (tales como primero y segundo) capaces de hacer regiones de unión tanto en dirección 5' como en dirección 3' para los respectivos cebadores monocatenarias, en condiciones que promueven la amplificación de dicha secuencia de ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, una sola especie de cebador puede servir como cebador tanto la en dirección 5' como la en dirección 3'.

65 Tales condiciones típicamente comprenden la presencia de una enzima ADN polimerasa. Entre las condiciones adecuadas se incluye cualquier condición utilizada para proporcionar actividad de enzimas polimerasa conocidas en la técnica. Las condiciones típicamente incluyen la presencia de dNTP seleccionados de dATP, dTTP, dCTP, dGTP, dUTP y análogos de los mismos, agentes tamponadores/pH adecuados y otros factores que se requieren para el

funcionamiento enzimático o la estabilidad. Típicamente estarán presentes los cuatro, dATP, dTTP, dCTP y dGTP. Las condiciones pueden incluir la presencia de detergentes y agentes estabilizantes. La temperatura utilizada típicamente es isotérmica, es decir, constante a lo largo del proceso de amplificación. La temperatura utilizada típicamente depende de la naturaleza de la enzima polimerasa y otros componentes enzimáticos y también refleja la temperatura de hibridación necesaria para los cebadores y oligonucleótidos de invasión de cadena.

La polimerasa utilizada típicamente tiene actividad de desplazamiento de cadena. La expresión "desplazamiento de cadena" se utiliza en el presente documento para describir la capacidad de una ADN polimerasa, opcionalmente en conjunción con proteínas accesorias, para desplazar cadenas complementarias al encontrar una región de ADN bicatenario durante la síntesis de ADN. Entre las ADN polimerasas adecuadas se incluyen Poll de *E. coli*, *B. subtilis* o *B. stearothermophilus* y fragmentos funcionales o variantes de los mismos y ADN polimerasas T4 y T7 y fragmentos funcionales o variantes de los mismos. Una polimerasa preferida es ADN polimerasa Bsu o un fragmento funcional o variante del mismo.

Las condiciones de amplificación preferentemente comprenden la presencia de una recombinasa. Cualquier sistema de recombinasas puede utilizarse en el método de la invención. El sistema de recombinasas puede ser de origen procarionta o eucariota y puede ser bacteriano, de levadura, de fago o de mamífero. La recombinasa puede polimerizar sobre un oligonucleótido monocatenario en la dirección 5'-3' o 3'-5. La recombinasa puede derivar de un fago Myoviridae, tal como T4, T2, T6, Rb69, Aeh1, KVP40, fago 133 de Acinetobacter, fago 65 de Aeromonas, cianofago P-SSM2, cianofago PSSM4, cianofago S-PM2, Rbl4, Rb32, fago 25 de Aeromonas, fago nt-1 de Vibrio, phi-1, Rbl6, Rb43, Fago 31, fago 44RR2.8t, Rb49, fago Rb3 o fago LZ2. En una realización preferida, se utiliza la recombinasa UvsX de T4 (Número de entrada: P04529) o una variante funcional o fragmento del mismo. También se pueden utilizar los sistemas Rad de eucariotas o los sistemas recA-Reco de *E. coli* u otros sistemas procariontas. La recombinasa puede ser RecA de *E. coli*.

Las condiciones pueden comprender adicionalmente la presencia de proteínas accesorias recombinasas, tales como una proteína de unión monocatenaria (por ejemplo, T4 gp32, número de entrada P03695) y un agente de carga de recombinasa (por ejemplo, UvsY, número de entrada NP_049799.2). En una realización preferida, las condiciones comprenden la presencia de las proteínas T4 gp32, UvsX y UvsY. La recombinasa (tal como UvsX) y donde se utilizó el agente de carga de recombinasa (tal como UvsY) y una proteína de unión de ADN monocatenario (tal como gp32), pueden ser cada una proteínas nativas, híbridas o mutantes de las mismas o distintas fuentes de fago myoviridae. Una proteína nativa puede ser una variante tipo silvestre o natural de una proteína.

Las condiciones pueden comprender adicionalmente otros factores utilizados para potenciar la eficacia de la recombinasa, tal como compuestos utilizados para controlar interacciones de ADN, por ejemplo, prolina, DMSO, BSA, PEG u otros agentes aglutinantes que se conocen por potenciar la carga de recombinasas sobre ADN (Lavery P. et al. J. Biol. Chem. 1992, 267, (13), 9307-9314).

Las condiciones pueden comprender también la presencia de un sistema de regeneración de ATP. Los expertos en la materia conocen varios sistemas de regeneración de ATP e incluyen enzimas glicolíticas. Entre los componentes adecuados de un sistema de regeneración de ATP se pueden incluir uno o más de fosfocreatina, creatina quinasa, mioquinasa, pirofosfatasa, sacarosa y sacarosa fosforilasa. Las condiciones pueden comprender adicionalmente la presencia de ATP.

Pueden incluirse también componentes adicionales tales como iones de magnesio, DTT u otros agentes reductores, sales.

Se pueden incluir entre los componentes adicionales una o más enzimas de restricción (tales como una o más endonucleasas de restricción) para digerir un ácido nucleico, que comprende una secuencia de ácido nucleico diana, antes de o al mismo tiempo que se pone en contacto la secuencia de ácido nucleico diana con otros reactivos de amplificación. La tasa de amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana comprendida en el plásmido de ADN puede incrementarse mediante la digestión del plásmido con una enzima de restricción, por tanto, para linealizar el molde de partida. Por tanto, los métodos de la invención pueden comprender el contacto de un ácido nucleico que comprende el ácido nucleico diana a amplificar con una enzima de restricción. Cualquier enzima de restricción adecuada, que tiene un sitio de reconocimiento adecuado en un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico diana, puede utilizarse para la digestión. El sitio de reconocimiento típicamente está localizado en una región del ácido nucleico distinta de la secuencia de ácido nucleico diana.

Los diversos componentes descritos anteriormente pueden proporcionarse en concentraciones variables para proporcionar amplificación de ADN. El experto en la materia puede seleccionar concentraciones de trabajo adecuadas de los diversos componentes en la práctica.

Detección de presencia de ADN amplificado

La presencia de ADN amplificado que resulta del contacto de la secuencia de ácido nucleico diana con los cebadores y el (o los) oligonucleótido(s) de invasión de cadena en condiciones que promueven la amplificación de

ADN se pueden monitorizar mediante cualquier medio adecuado.

Uno o los dos cebadores o uno o más de los oligonucleótidos de invasión de cadena (tales como el primer y/o segundo oligonucleótido(s) de invasión de cadena) pueden incorporar un marcador u otro resto detectable. Puede utilizarse cualquier marcador o resto detectable. Entre los ejemplos de marcadores adecuados se incluyen moléculas fluorescentes y pares de FRET de un fluoróforo y un resto aceptor. Por ejemplo, el cebador en dirección 5' puede formar un par de FRET con un oligonucleótido de invasión de cadena que tiene una región de unión en dirección 5' en la secuencia de ácido nucleico diana y/o el cebador en dirección 3' puede formar un par de FRET con un oligonucleótido de invasión de cadena que tiene una región de unión en dirección 3' en la secuencia de ácido nucleico diana. El (o los) cebador(es) se pueden marcar con un fluoróforo o un desactivador, con el (o los) oligonucleótido(s) de invasión de cadena marcado(s) con el miembro correspondiente de un par de FRET, un desactivador o un fluoróforo. A continuación, se describen los marcadores y sitios de unión adecuados. El uso de tales pares de FRET puede proporcionar métodos que detectan invasión de cadena y amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana. Pueden emplearse también otros sistemas de desactivación que detectan cambios en la interacción de dos restos detectables, incluyendo la desactivación por contacto.

Más preferentemente o adicionalmente, se pueden utilizar una o más sondas que detectan el ADN amplificado, de nuevo incorporando un marcador u otro resto detectable. Preferentemente, la señal de la sonda se monitoriza a tiempo real, en conjunción con la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana. Una sonda se puede unir en cualquier localización adecuada en la secuencia de ácido nucleico diana. Una sonda puede particular y preferentemente unirse a una región de la secuencia de ácido nucleico diana que no solapa con la región de unión para un cebador y/o un oligonucleótido de invasión de cadena. Por tanto, una sonda puede particular y preferentemente tener un sitio de unión dentro de la secuencia nucleica diana que es independiente del sitio de unión para una o más especies distintas de oligonucleótidos. La selección de una región de unión no solapante para la sonda puede reducir la competencia para la unión de la sonda durante la amplificación. El empleo de una sonda que se une en una localización independiente en la secuencia de ácido nucleico diana puede también reducir o eliminar la detección de productos de amplificación no específicos tales como dímeros de cebadores, que proporcionan una detección más aguda de la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana.

Las sondas que detectan diferentes secuencias diana amplificadas pueden señalar a diferentes longitudes de onda fluorescentes para proporcionar detección multiplexada. Dos o más, tal como tres, cuatro, cinco, seis, ocho, diez o más sondas diferentes pueden emplearse para la detección multiplexada de varias secuencias diana diferentes en una sola reacción. Una sonda de oligonucleótido para utilizar en los métodos de la invención tiene típicamente aproximadamente de 8 a 25 nucleótidos de longitud, tal como aproximadamente de 10 a aproximadamente 20, aproximadamente 12 a aproximadamente 25 o aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones la sonda puede también funcionar como un oligonucleótido de invasión de cadena (y por tanto, tener características descritas para los oligonucleótidos de invasión de cadena descritos anteriormente). Por ejemplo, se puede proporcionar un oligonucleótido de invasión de cadena marcado adicional que actúa como una sonda, el cual tiene una región de unión en la secuencia de ácido nucleico diana próxima a la región de unión del oligonucleótido de invasión de cadena en dirección 5' o en dirección 3', de manera que puede formar un par de FRET con el respectivo oligonucleótido de invasión de cadena que se une a la región en dirección 5' o en dirección 3'. En esta realización, el oligonucleótido de invasión de cadena que se une a la región en dirección 5' o en dirección 3' se puede marcar con un fluoróforo o desactivador y marcar el oligonucleótido de invasión de cadena adicional con el correspondiente resto detectable que interacciona (desactivador o fluoróforo).

La sonda puede comprender una secuencia que es totalmente complementaria de secuencia con la secuencia de ácido nucleico diana o puede tener uno o más desemparejamientos, tales como 2 o 3 desemparejamientos con la secuencia diana, dado que es capaz de detectar específicamente la secuencia diana en combinación con el (o los) oligonucleótido(s) de invasión de cadena y cebador(es). Una sonda de oligonucleótido para utilizar en la invención puede ser una sonda de hibridación que muestra cambios conformacionales sobre la unión de diana (como se describe por ejemplo en US7241596), una baliza molecular (como se describe en el ejemplo US5925517) o una sonda escindible, tal como una sonda escindible de endonucleasa (como se describe, por ejemplo, en US7435561 y US20050214809) o una sonda escindible de enzima de restricción.

Se puede marcar un cebador, un oligonucleótido de invasión de cadena o una sonda utilizados en los métodos de la invención con cualquier fluoróforo o desactivador. El fluoróforo y el desactivador se seleccionarán de manera que el espectro de absorción del desactivador solape con el espectro de emisión del fluoróforo. El fluoróforo y el desactivador se seleccionarán y posicionarán adicionalmente, de manera que, por hibridación con un molde diana, el fluoróforo produce un incremento de señal debido al efecto de apagado reducido.

El desactivador puede no ser fluorescente, por ejemplo, un cromóforo no fluorescente. Un desactivador puede ser un desactivador oscuro. Como alternativa, el desactivador puede fluorescer con un espectro de emisión diferente al fluoróforo, de manera que cuando se monitoriza específicamente la fluorescencia del fluoróforo o del desactivador, se puede reportar un cambio en cualquier señal sobre la hibridación del molde diana. Un fluoróforo o un desactivador se puede posicionar en los extremos 5' o 3' de una especie de oligonucleótido marcada. Una localización de extremo 3' puede ser útil en particular en realizaciones donde no es deseable la elongación dependiente de polimerasa. Un

floróforo o un desactivador también puede localizarse en una posición interna, tal como diez o menos nucleótidos aparte del extremo 5' o 3' de las especies marcadas.

El fluoróforo puede ser cualquier resto fluorescente, típicamente un colorante orgánico fluorescente. El desactivador puede ser cualquier resto que apague la fluorescencia del fluoróforo y es típicamente una molécula cromogénica, tal como un colorante orgánico. El experto en la materia puede seleccionar pares fluoróforo-desactivador adecuados para una sonda de oligonucleótido basada en su conocimiento general común. Los emparejamientos se discuten, por ejemplo, en las siguientes referencias: Marras SE: Selection of Fluorophore and Quencher Pairs for Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes. En: Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes. Edited by Didenko V, vol. 335: Humana Press; 2006: 3-16 y Didenko VV: DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. Biotechniques 2001, 31 (5): 1106-1116, 1118, 1120-1101.

Entre los fluoróforos adecuados se incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína y derivados de fluoresceína, tales como carboxifluoresceínas (FAM, incluyendo 6-FAM, 5-FAM, dT FAM), VIC, hexacloro-6-carboxifluoresceína (HEX) y JOE, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), cumarina y derivados de cumarina tales como 3-fenil-7-isocianatocumarina, amarillo Lucifer, NED, rojo Texas, tetrametilrodamina, carboxitetrametilrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 5 carboxirodamina, N-(p-(2-benzoxazolil)fenil)maleimida, colorantes de cianina tales como CY5, colorantes de rodamina, colorantes de xanteno, naftilaminas, acridinas, benzoxadiazoles, estilbenos y pirenos. Entre los desactivadores adecuados se incluyen, pero no se limitan a, DABSYL, ácido 4'-(4-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL), 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-maleimida (DABMI), tetrametilrodamina, carboxitetrametilrodamina (TAMRA), Black Hole Quencher 1, Black Hole Quencher 2, Black Hole Quencher 3, Dark Quencher 1, Dark Quencher 2, Iowa Black RQ, Iowa Black FQ.

Entre los pares fluoróforo/desactivador se incluyen:

- TAMRA y Black Hole Quencher 2;
- ROX y Black Hole Quencher 2;
- ROX y DABCYL;
- FAM (tal como dT-FAM) y Iowa Black FQ;
- FAM (tal como dT-FAM) y DABCYL;
- ROX y Iowa Black FQ;
- CY5 y Iowa Black RQ.

El fluoróforo o el desactivador típicamente se unen covalentemente a la especie marcada de oligonucleótido. El fluoróforo o el desactivador puede estar unido mediante cualquier enlazador adecuado a uno o más nucleótidos presentes en la secuencia de la especie de oligonucleótido. El experto en la materia es capaz de seleccionar cualquier enlazador apropiado basándose en su conocimiento general común. Se debate sobre enlazadores adecuados, por ejemplo, en Agrawal S (ed.): Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties: Humana Press; 1993.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención pueden comprender el uso de una o más sondas que comprenden una región complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana, un fluoróforo y un desactivador. La secuencia de tal sonda de oligonucleótido puede comprender al menos el 20 % de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de PNA. El uso de tales sondas tiene ventajas para prevenir una señal fluorescente de la sonda en presencia de una proteína capaz de unirse a ADN monocatenario (tal como una recombinasa) en la ausencia de una secuencia molde complementaria. En otras palabras, al menos un 20 % de los nucleótidos presentes en la sonda de oligonucleótido son nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de PNA. Más preferentemente, la secuencia de sonda de oligonucleótido puede comprender al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o al menos un 90 % de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN modificados y/o nucleótidos de PNA. Donde las bases de ARN se incluyen en una sonda, una enzima RNasa H, tal como la RNasa H2, se puede proporcionar en el método de la invención para potenciar señal de la sonda mediante la escisión del dúplex sonda-diana y la reducción de la desactivación. Una enzima RNasa H2 preferida es la RNasa H2 de *Thermococcus gammatolerans*. Como alternativa, como se ha descrito anteriormente, se pueden utilizar otras formas de sonda escindible, tal como sondas de enzima de restricción o de escisión de endonucleasas.

Cuando se utiliza una sonda marcada con un fluoróforo y un desactivador, el fluoróforo y el desactivador típicamente se posicionan al menos ocho nucleótidos aparte en la secuencia de la sonda, más preferentemente al menos diez o al menos doce nucleótidos aparte, dependiendo de la longitud de la sonda. El fluoróforo y el desactivador pueden estar localizados en los extremos 5' y 3' y por tanto es posible la máxima distancia aparte que es posible en la sonda. La distancia entre el fluoróforo y el desactivador se seleccionará de manera que cuando la sonda se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana (en una conformación abierta o lineal) se reducirá la desactivación del fluoróforo por el desactivador, conduciendo a una señal detectable para la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana. Una distancia apropiada entre el fluoróforo y el desactivador puede optimizarse empíricamente.

Se pueden utilizar también colorantes que se intercalan con ADN amplificado, tales como Sybr green I y naranja

tiazol.

La detección de la señal del ADN amplificado puede hacerse mediante cualquier sistema adecuado, incluyendo los métodos de detección en tiempo real.

5

Aplicaciones para métodos de amplificación

Los métodos de amplificación de la invención se pueden utilizar para cualquier solicitud donde se desea la amplificación específica de una secuencia de ácido nucleico diana.

10

Los métodos de la invención se pueden utilizar para detectar una secuencia de ácido nucleico diana y por ejemplo, para la diagnosis de si una muestra clínica contiene una secuencia de ácido nucleico diana. La presente invención es particularmente ventajosa en el escenario médico. Los métodos de detección descritos en el presente documento proporcionan una prueba altamente específica para permitir la determinación de presencia de una secuencia de ácido nucleico diana. El método puede aplicarse a una gama de escenarios médicos. En el presente documento se describe un método para el diagnóstico de una enfermedad en un sujeto, que comprende llevar a cabo un método de amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana de la invención en una muestra de dicho sujeto para detectar una secuencia de ácido nucleico diana asociada con dicha enfermedad.

15

20

Se puede utilizar cualquier muestra para la detección de la secuencia de ácido nucleico diana, dado que el ácido nucleico puede obtenerse o derivarse de la muestra. La muestra puede ser, por ejemplo, una muestra del medioambiente, una muestra de referencia o una muestra clínica. Cuando los métodos de la invención se utilizan para el diagnóstico de una enfermedad mediante la detección de una secuencia de ácido nucleico diana, la muestra es normalmente una muestra clínica, por ejemplo una muestra obtenida de un paciente sospechoso de tener o haber tenido la enfermedad. Los tipos adecuados de muestras clínicas varían según el tipo particular de enfermedad o infección que está presente o que se sospecha que está presente en un sujeto. La muestra puede ser una muestra de saliva, esputo, sangre, plasma, suero, orina o heces. La muestra puede ser una célula o una muestra de tejido. En realizaciones preferidas, las muestras se toman de sujetos animales, tales como sujetos mamíferos. Las muestras se tomarán comúnmente de sujetos humanos, pero la presente invención es también aplicable en general a animales domésticos, ganado, aves y pescado. Por ejemplo, la invención pueden aplicarse en un escenario veterinario o agrícola. La muestra comprende ácido nucleico que puede ser ADN o ARN. Si el ácido nucleico está presente en la muestra en una forma adecuada para permitir la detección según la invención, la muestra se puede utilizar directamente. Sin embargo, típicamente, el ácido nucleico se deriva, obtiene o extrae de la muestra. Los métodos para procesar muestras que contienen ácidos nucleicos, extraen ácidos nucleicos y/o purifican ácidos nucleicos para utilizarlos en métodos de detección se conocen bien en la técnica. El ácido nucleico total se puede aislar o se puede aislar ADN y ARN separadamente.

25

30

35

Típicamente, una muestra se procesa de una forma adecuada de manera que el ácido nucleico se proporcione en una forma conveniente para contactar con los cebadores y oligonucleótido(s) de invasión de cadena y reactivos adicionales optativos. Cuando el ácido nucleico es ADN, el ADN se proporciona típicamente en forma bicatenaria. Cuando el ácido nucleico es ARN, típicamente se convierte en ADNc utilizando transcriptasa inversa o una polimerasa con actividad transcriptasa inversa. El ARN puede ser útil para la detección bacteriana, debido al gran número de ribosomas presentes en células bacterianas que amplifican eficazmente la concentración de secuencias diana. Además de ARN ribosómico (ARNr), otras formas de ARN, por ejemplo, ARN de transferencia (ARNt), ARN mensajeros (ARNm), ARN interferentes pequeños (ARNip), ácido ribonucleico nuclear pequeño (ARN-np), microARN (ARNmi), pueden también ser útiles para la detección procariota y eucariota.

40

45

Un método de la invención puede usarse para el diagnóstico de una infección mediante un patógeno en un sujeto, que comprende la detección de una secuencia de ácido nucleico diana de dicho patógeno. La determinación de si el patógeno está presente o no puede estar en el contexto de la enfermedad o dolencia presente o sospechosa de estar presente en un paciente. Tales enfermedades pueden incluir aquellas causadas por, ligadas a o exacerbadas por la presencia del patógeno. Por tanto, un paciente puede mostrar síntomas que indican la presencia del patógeno y se puede obtener una muestra del paciente para determinar la presencia del patógeno mediante el método descrito anteriormente.

55

Se puede detectar cualquier patógeno. El patógeno puede ser un virus o bacteria o parásito. El patógeno puede ser un patógeno, tal como, pero no se limita a, hongos, virus, que incluyen el virus del papiloma humano (HPV), VIH, HSV2/HSV1, virus de la gripe (tipos A, B y C), virus de la polio, virus VSR, rinovirus, rotavirus, virus de la hepatitis A, virus del grupo Norwalk, enterovirus, astrovirus, virus del sarampión, virus de la parainfluenza, virus de las paperas, Zostervirus de la varicela, Cytomegalovirus, virus de Epstein-Barr, adenovirus, virus de la rubeola, virus linfotrópico humano de linfocitos T de tipo I (HTLV-I), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la hepatitis D, virus de la viruela, Marburg y Ebola; bacterias, que incluyen *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Treponema pallidum*, *Pseudomonas*, *Bordetella pertussis*, *Brucella*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Leptospira interrogans*, *Legionella pneumophila*, *Yersinia pestis*, *Streptococcus* (tipos A y B), neumococo, meningococo, *Haemophilus influenzae* (tipo b), *Toxoplasma gondii*, campilobacteriosis, *Moraxella catarrhalis*, donovanosis y actinomicosis; patógenos fúngicos que incluyen

60

65

candidiasis y aspergilosis; patógenos parásitos que incluyen *Taenia*, duelas, lombrices intestinales, amebiasis, giardiasis, *Cryptosporidium*, esquistosomiasis, *Pneumocystis carinii*, tricomoniasis y triquinosis.

5 Las solicitudes adicionales de los métodos de la invención incluyen análisis de fragmentos, clonación y detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

10 En otro aspecto de la invención, una secuencia de ácido nucleico diana se puede amplificar para permitir que su secuencia se determine. En tal realización una secuencia de ácido nucleico, cuya secuencia es parcial o enteramente desconocida, puede amplificarse mediante la provisión de regiones de unión adecuadas para uno o más oligonucleótidos de invasión de cadena que flanquean la región cuya secuencia se va a determinar. La invención proporciona adicionalmente un método para determinar la secuencia de un ácido nucleico que comprende una región de secuencia desconocida, que comprende la creación de una secuencia de ácido nucleico diana que comprende regiones de unión de oligonucleótidos de invasión de cadena en dirección 5' y en dirección 3' de dicha región de secuencia desconocida, amplificar dicha secuencia de ácido nucleico diana según un método de amplificación de la invención descrita anteriormente y determinar la secuencia de dicha región de secuencia desconocida. La invención proporciona adicionalmente un método de amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana que comprende una región de secuencia desconocida que comprende la creación de una secuencia de ácido nucleico diana que comprende regiones de unión de oligonucleótidos de invasión de cadena en dirección 5' y en dirección 3' de dicha región de secuencia desconocida y amplificar dicha secuencia de ácido nucleico diana según un método de la invención descrita anteriormente. La secuencia de ácido nucleico diana que comprende regiones de unión de oligonucleótidos de invasión de cadena en dirección 5' y en dirección 3' puede crearse mediante ligamiento de oligonucleótidos que comprenden regiones de unión de oligonucleótidos de invasión de cadena a los extremos 5' y/o 3' de una secuencia de ácido nucleico de interés. Como alternativa, una secuencia de ácido nucleico de interés puede insertarse o ligarse dentro de un vector de ácido nucleico adecuado, tal como un plásmido, que comprende las regiones de unión de oligonucleótidos de invasión de cadena que flanquean el sitio en el que la secuencia de ácido nucleico se va a introducir, creando de este modo la secuencia de ácido nucleico diana. En otras realizaciones, la secuencia a determinar puede ser parcialmente conocida, de manera que se puede diseñar una especie de oligonucleótido de invasión de cadena (y su respectivo cebador) para unirse a la región de secuencia conocida y la otra especie de oligonucleótido de invasión de cadena y cebador para unirse a una secuencia de adaptador introducida que flanquea la región de secuencia desconocida. La amplificación basada en invasión de cadena en dirección 5' de la secuencia conocida y en dirección 3' de la secuencia desconocida puede utilizarse después para amplificar la región de la secuencia desconocida, de manera que su secuencia se pueda determinar.

35 Los oligonucleótidos que comprende las regiones de unión de oligonucleótidos de invasión de cadena son adaptadores de ADN adecuados, proporcionados típicamente en forma bicatenaria, con o sin salientes. El adaptador normalmente tiene extremos romos cuando se proporciona como un oligonucleótido bicatenario, para permitir su ligamiento a un fragmento de ADN de interés. Los oligonucleótidos que comprenden regiones de unión de oligonucleótido de invasión de cadena pueden comprender adicionalmente regiones de unión de cebador. Se puede proporcionar una sola especie de oligonucleótido que comprende una región de unión de oligonucleótido de invasión de cadena (y opcionalmente también una región de unión de cebador), cuando la misma especie de oligonucleótido de invasión de cadena (y opcionalmente la misma especie de cebador) se utiliza para invadir la secuencia nucleica diana en localizaciones en dirección 5' y en dirección 3'.

45 La determinación de la secuencia del ácido nucleico diana se puede llevar a cabo utilizando cualquier método de secuenciación adecuado. Entre los métodos de secuenciación adecuados se incluyen la secuenciación Sanger o los métodos de secuenciación de última generación como Ion Torrent, SOLiD, Illumina y secuenciación 454. Los fragmentos a secuenciar se pueden preamplificar directamente desde sus adaptadores unidos o se pueden clonar primero en plásmidos de secuenciación. En el último caso, el fragmento clonado puede contener secuencia(s) de adaptador o estas las puede proporcionar el fragmento que está ligado dentro del plásmido.

50 Se puede utilizar cualquier secuencia de adaptador adecuada que permita la unión de un oligonucleótido de invasión de cadena y/o un cebador cuando está incorporada en una posición flanqueante o al interior de una secuencia de ácido nucleico diana para permitir la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana. La secuencia de adaptador incorporada en una posición flanqueante o al interior de una secuencia de ácido nucleico diana típicamente será idéntica a la secuencia de adaptador incorporada en una posición flanqueante o al interior de la región en dirección 3' de la secuencia de ácido nucleico diana. Sin embargo, se pueden utilizar diferentes secuencias de adaptador para los extremos en dirección 5' y en dirección 3' de la secuencia de ácido nucleico diana, dado que se proporcionan uno o más oligonucleótidos de invasión de cadena y uno o más cebadores capaces de amplificar la secuencia de ácido nucleico diana basada en los diferentes adaptadores. El experto en la materia es capaz de seleccionar una secuencia de adaptador apropiada para una secuencia diana particular. Se pueden elegir secuencias de adaptador libremente de manera que no interfieran potencialmente con ninguna secuencia presente. Las secuencias de adaptador se pueden elegir también para atender a la preferencia de la recombinasa por la pirimidina. Las secuencias de adaptador pueden comprender etiquetas para purificar o separar antes de la amplificación o después. Se pueden añadir sitios de restricción o sitios de reconocimiento de enzimas de mellado para ayudar en el procesamiento adicional de los amplicones.

Kits y composiciones

5 En el presente documento se describe un kit o composición que comprende al menos un cebador en dirección 5' y al menos un cebador en dirección 3' para una secuencia de ácido nucleico diana y un primer y segundo oligonucleótidos de invasión de cadena que tienen regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' en dicha secuencia de ácido nucleico diana.

10 La divulgación proporciona adicionalmente un kit o composición que comprende un oligonucleótido de invasión de cadena que puede unirse a una región de unión en dirección 5' y una región de unión en dirección 3' en una secuencia de ácido nucleico diana, uno o más cebadores capaces de amplificar dicha secuencia de ácido nucleico diana y al menos un adaptador de ADN. El adaptador de ADN está típicamente en una forma bicatenaria. El kit o composición puede comprender adicionalmente una ADN ligasa, que se puede utilizar para ligar el adaptador de ADN a un ácido nucleico de interés. El kit o composición puede comprender adicionalmente una o más enzimas de restricción. Típicamente, La región de unión en dirección 5' y en dirección 3' para el oligonucleótido de invasión de cadena incluye la secuencia del adaptador de ADN y por tanto el oligonucleótido de invasión de cadena es capaz de unirse al menos a una porción del adaptador de ADN. El oligonucleótido de invasión de cadena es capaz de hacer regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' para el (o los) cebador(es) monocatenarias. El cebador o cebadores, por tanto, se unen a regiones de la secuencia de ácido nucleico diana próxima a las regiones de unión de oligonucleótido de invasión de cadena. El cebador o cebadores pueden unirse también a la secuencia de adaptador de ADN, de manera que el adaptador de ADN proporciona el mecanismo tanto para la invasión de cadena como para la amplificación de la secuencia desconocida. El kit o composición puede comprender una sola especie de cebador que puede unirse tanto a una región de unión en dirección 5' como a una en dirección 3' en la secuencia de ácido nucleico diana (típicamente una secuencia de adaptador) o cebadores en dirección 5' y en dirección 3' para dicha secuencia de ácido nucleico diana.

20 En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona un kit o composición que comprende un oligonucleótido de invasión de cadena que puede unirse tanto a una región de unión en dirección 5' como a una región de unión en dirección 3' en una secuencia de ácido nucleico diana y uno o más cebadores capaces de amplificar dicha secuencia de ácido nucleico diana, en la que el oligonucleótido de invasión de cadena es capaz de hacer regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' para el (o los) cebador(es) monocatenarias y en la que el oligonucleótido de invasión de cadena y el (o los) cebador(es) se une(n) a una secuencia de adaptador de ADN. El oligonucleótido de invasión de cadena y el (o los) cebador(es) pueden por tanto ser capaces cada uno de unirse a una secuencia de adaptador de ADN idéntica presente en localizaciones en dirección 5' y en dirección 3' en una secuencia de ácido nucleico diana. El kit o composición puede comprender un vector de ácido nucleico que comprende secuencias de adaptador que flanquean un sitio de clonación.

30 El (o los) cebador(es) y el (o los) oligonucleótido(s) proporcionados en los kits o composiciones anteriores pueden ser cualquiera de aquellos descritos anteriormente para utilizar en los métodos relevantes de la invención. Los kits y composiciones descritos en el presente documento pueden comprender además uno o más oligonucleótidos de invasión de cadena adicionales.

40 La composición puede ser, por ejemplo, una solución, liofilización, suspensión o una emulsión en un vehículo oleoso o acuoso.

45 En un kit como se describe en el presente documento, se pueden proporcionar las diferentes especies de oligonucleótido (tales como el (o los) cebador(es) y oligonucleótido(s) de invasión de cadena) como una mezcla o en envases separados. El kit puede comprender adicionalmente instrucciones para usar en un método de la invención. Por tanto, un kit que comprende un primer y un segundo oligonucleótidos de invasión de cadena puede comprender instrucciones para utilizar en el método de la invención para amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana que comprende utilizar un primer y un segundo oligonucleótidos de invasión de cadena. El kit puede comprender un medio para la detección de ADN amplificado. El kit comprende reactivos para secuenciar ADN.

50 Un kit o composición puede comprender opcionalmente una o más sondas que detectan ADN amplificado. Una sonda proporcionada en el kit o composición puede ser cualquiera de aquellas descritas anteriormente para utilizar en los métodos de la invención.

60 El kit o composición puede comprender opcionalmente una, o más, ADN polimerasa, una recombinasa y proteínas accesorias de recombinasa. Preferentemente, la ADN polimerasa es Bsu polimerasa. Preferentemente, la recombinasa es el bacteriófago T4 UvsX, opcionalmente en combinación con las proteínas accesorias de recombinasa UvsY y gp32. El kit o composición puede comprender adicionalmente dNTP, tampones adecuados y otros factores que se requieren para la amplificación de ADN en el método de la invención como se describió anteriormente.

65 Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 Amplificación de ADN diana utilizando dos oligonucleótidos de invasión

5 El uso de dos oligonucleótidos de invasión en la amplificación de una diana de ADN artificial se muestra en las Figuras 1 y 2. Todos los oligonucleótidos utilizados se compraron a MWG Eurofins (Alemania) o en IDT DNA Technologies (Bélgica). Todos los reactivos y tampones que incluyen creatina quinasa y sacarosa fosforilasa se compraron a Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, EE.UU.). La proteína de unión monocatenaria T4 (gp32) y la BSU polimerasa se compraron a New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, EE.UU.). UvsX y UvsY se purificaron como se describió previamente [1,2], *Thermococcus gammatolerans* RNase HII se compró a GeneSys Ltd (Reino Unido).

15 Las reacciones de amplificación de ADN se realizaron a 40 °C durante al menos 90 minutos. El volumen de reacción fue de 20 ml, a menos que se indique otra cosa. La solución tampón para las reacciones fue Tris-acetato pH 8,0 10 mM, acetato de magnesio 10 mM, DMSO 5 %, PEG 1000 5 %, DTT 4 mM, EDTA 0,5 mM, 0,1 mg/ml de BSA, sacarosa 150 mM, ATP 2 mM, dNTP 200 mM, SybrGreen I 1:100000, Tris-Fosfocreatina 60 mM. Las proteínas incluidas en el tampón fueron gp32 250ng/ml, UvsX 5 mM, BSU 0,0625U/ml, fosforilasa de sacarosa 0,0125U/ml y creatina quinasa 0,025U/ml. La concentración de cada cebador y oligonucleótido de invasión fue 200 nM, a menos que se indique otra cosa. Los oligonucleótidos de invasión se designaron para unirse en configuración paralela o antiparalela al dúplex diana (Figura 1). Las reacciones se iniciaron añadiendo acetato de magnesio junto con o el ADN diana o por separado, que estaba presente a 10 fM o 1 pM. La detección de amplificación en tiempo real se realizó mediante el instrumento Agilent MX pro. El instrumento se programó con ciclos de 40 °C durante 60 segundos con detección de fluorescencia de cada ciclo. Se calculó la especificidad de los productos de reacción mediante análisis de fusión inmediatamente después de los ciclos. Esto se realizó mediante el calentamiento de la reacción rápidamente hasta 95 °C durante 15 segundos, seguido de una etapa de enfriamiento rápido a 25 °C durante 60 segundos. Después, las reacciones se calentaron lentamente de 25 °C a 85 °C, con medición de fluorescencia en intervalos de 0,5 °C.

30 Para la configuración paralela, se utilizaron dos oligonucleótidos de invasión (SEQ ID NO: 1 y 2) y cebadores directo (SEQ ID NO: 3) e inverso (SEQ ID NO: 4). La amplificación solo se detectó en reacciones que contenían un ADN diana que comprende la secuencia SEQ ID NO: 11. Las reacciones sin el ADN diana (control sin molde, NTC; del inglés, no template control) no produjeron amplificación, como se detectó por la ausencia de señal de Sybr Green I (Figura 2a). La especificidad de la configuración paralela se demostró adicionalmente mediante la adición de una mezcla de ADN genómico de 15 especies de bacterias que no contienen el ADN diana (se añadieron 1000 copias de ADN genómico por reacción). La amplificación no se detectó en esta mezcla, que demuestra adicionalmente que esta configuración detecta solo el ADN diana. Los análisis de fusión con Sybr Green I confirmaron adicionalmente que existieron reacciones de amplificación específicas en tubos que contenían el ADN diana (Figura 2b).

40 Para la configuración antiparalela, se utilizaron dos oligonucleótidos de invasión (SEQ ID NO: 1 y 2) y cebadores directo (SEQ ID NO: 3) e inverso (SEQ ID NO: 5). La amplificación solo se detectó cuando el ADN diana que comprende la secuencia diana de la SEQ ID NO: 12 se añadió a la reacción (Figura 2c). Además, ni el NTC ni la mezcla de ADN genómico de especies de bacterias dieron como resultado la amplificación con esta configuración. Los análisis de fusión con Sybr Green I confirmaron que existieron reacciones de específicas en tubos que contenían el ADN diana (Figura 2d).

45 También se probó la configuración antiparalela inversa mostrada en la Figura 1c. Se utilizaron dos oligonucleótidos de invasión (SEQ ID NO: 1 y 13) y cebadores directo (SEQ ID NO: 14) e inverso (SEQ ID NO: 25) para amplificar un molde de ADN diana que comprende la secuencia SEQ ID NO: 26. La amplificación solo se detectó cuando el ADN diana se añadió a la reacción (Figura 2e). No se observó señal detectable en la muestra en la ausencia de ADN diana. Los análisis de fusión con Sybr Green I confirmaron adicionalmente que existieron reacciones de específicas en tubos que contenían el ADN diana (Figura 2f).

Ejemplo 2 Requisito de los oligonucleótidos de invasión para amplificación

55 Se requirieron ambos oligonucleótidos de invasión para la amplificación exponencial del ADN diana. Esto se demostró utilizando dos oligonucleótidos de invasión complementarios de la secuencia de ADN diana o con un oligonucleótido de invasión complementario y otro no complementario. En las configuraciones paralela (Figura 3a) y antiparalela (Figura 3b), el otro oligonucleótido de invasión (SEQ ID NO: 1) complementario de la secuencia de ADN complementaria se reemplazó por un oligonucleótido de invasión no complementario (SEQ ID NO: 6). Los cebadores y reactivos utilizados para ambas configuraciones fueron como los descritos en el Ejemplo 1. Las reacciones de amplificación se realizaron en presencia de ADN diana 1pM. El ADN diana solo se amplificó cuando ambos oligonucleótidos de invasión resultaron complementarios de la secuencia de ADN diana (Figura 3). Esto sugiere también que el producto amplificado contiene la longitud completa del molde diana. Asimismo, el NTC o el reemplazo de oligonucleótido de invasión complementario con un uno no complementario, no resultó en amplificación. Esto demuestra que los cebadores no amplifican el ADN diana en la ausencia del oligonucleótido de invasión.

Ejemplo 3 Requisito de los cebadores para amplificación

Se requieren cebadores directos e inversos para la amplificación del ADN diana. Esto se demostró mediante la sustitución de uno de los cebadores complementarios del ADN diana con un cebador no complementario. Las reacciones de amplificación se realizaron en presencia del cebador inverso (SEQ ID NO: 4) o en presencia de un cebador inverso no complementario del ADN diana (SEQ ID NO: 7). La concentración del ADN diana fue 1pM. Solo se detectó amplificación en reacciones que contienen el cebador inverso (SEQ ID NO: 4) complementario al ADN diana (Figura 4). En las reacciones donde el cebador inverso complementario (SEQ ID NO: 4) se sustituyó con el cebador inverso no complementario (SEQ ID NO: 7) no se detectó amplificación. Esto indica que los oligonucleótidos de invasión no amplifican la secuencia de ADN independientemente debido a su incapacidad para actuar como sustratos de polimerasa. Asimismo, esto demuestra que se requieren todos los oligonucleótidos para que la amplificación tenga lugar.

15 Ejemplo 4 Compatibilidad de la sonda específica de diana con dos oligonucleótidos de invasión

La amplificación basada en invasión de cadena con dos oligonucleótidos de invasión permite posibilidades mejoradas para diseñar sondas específicas de ADN diana. En configuraciones tanto paralelas como antiparalelas hay regiones sobre el ADN diana que no son complementarias de los oligonucleótidos de invasión ni de los cebadores. Esto implica que se pueden diseñar sondas adicionales para unirse a estas regiones sin competir con los oligonucleótidos de invasión o los cebadores (Figura 5a). La amplificación en la configuración antiparalela se probó en presencia de la sonda específica de diana. La sonda comprende un fluoróforo y un desactivador separados por una base de ARN. La sonda está también bloqueada en el extremo 3' para asegurar adicionalmente que se produzca elongación no específica. La concentración de los oligonucleótidos de invasión (SEQ ID NO: 1 y 2) fue 200 nM, mientras que la concentración de los cebadores (SEQ ID NO: 3 y 4 y la sonda (SEQ ID NO: 8) fue 400 nM. La reacción de amplificación estándar se realizó como se describe en el Ejemplo 1 en presencia de 10 mg/ml de RNasa H2 de *Thermococcus gammatolerans*. La amplificación en tiempo real se detectó con Sybr Green I o con la sonda marcada con un fluoróforo y un desactivador (Figura 5b). Esto demuestra que la sonda se une eficazmente al ADN diana durante la reacción y produce una señal detectable.

En la amplificación basada en invasión de cadena descrita anteriormente utilizando solo un oligonucleótido de invasión, (SIBA) el diseño bioquímico de la sonda es complejo, porque la configuración no soporta fácilmente una unión libre de la sonda sobre la región de ADN diana. Esto se debe a que todas las regiones del ADN diana sirven típicamente como un sitio de unión para el oligonucleótido de invasión o los cebadores. Por tanto, la sonda específica de diana tendrá que competir con el oligonucleótido de invasión y los cebadores para unirse, a menos que se diseñen especialmente. Los resultados mostrados en la Figura 5 c ilustraron el problema asociado con el uso de una sonda específica de diana específica para la misma región diana como el oligonucleótido de invasión en SIBA. En el ensayo de SIBA, las concentraciones del oligonucleótido de invasión (SEQ ID NO: 1), cebador directo (SEQ ID NO: 3) y cebador inverso (SEQ ID NO: 5) fueron 200 nM, mientras que la concentración de la sonda (SEQ ID NO: 9) fue 400 nM. La amplificación en tiempo real se monitorizó con Sybr Green I o la sonda (Figura 5c). El aumento en la señal de Sybr Green I en la reacción que contiene el ADN diana mostró que existe amplificación. Sin embargo, con la sonda solapando el sitio de unión del oligonucleótido de invasión no se detectó señal, lo que sugiere que la sonda no fue capaz de unirse al ADN diana. Es probable que esto se deba a la competencia entre el oligonucleótido de invasión y la sonda.

45 Ejemplo 5 Uso de la sonda específica de diana en la configuración de dos oligonucleótidos de invasión reduce la señal de amplificación no específica creada por cebadores cortos.

El uso de cebadores muy cortos puede conducir a amplificación no específica en SIBA debido a la elongación potencial del oligonucleótido de invasión. Tal amplificación no específica se detectó con ciertos cebadores cortos (14 bases) que pueden elongar potencialmente la región de ADN del oligonucleótido de invasión (Figura 6b). Por tanto, en SIBA estándar los cebadores se diseñan para tener aproximadamente 16-23 bases de longitud y sus extremos 3' son parcialmente homólogos del oligonucleótido de invasión. En la configuración de dos oligonucleótidos de invasión el método de amplificación es menos propenso a la detección de productos de amplificación no específicos de cebadores cortos. Esto se debe al hecho de que un sitio de unión de la sonda se puede utilizar, el cual no es solapante con los sitios de unión de los oligonucleótidos de invasión o de los cebadores.

La Figura 6 demuestra la reacción de amplificación realizada con dos oligonucleótidos de invasión en la configuración antiparalela o con el SIBA convencional. En ambos métodos de amplificación basados en invasión de cadena, el uso de cebadores cortos (14 bases en este ejemplo) y cebadores largos (en este ejemplo 21 bases) condujeron a un incremento en la señal de Sybr Green I con el molde diana. Sin embargo, se detectó también una pequeña señal con cebadores cortos desde NTC, mientras que los cebadores largos no produjeron señal en NTC. La configuración con dos oligonucleótidos de invasión, sin embargo, permitió la unión de la sonda a la secuencia diana sin competir con el oligonucleótido de invasión y los cebadores. Tal configuración eliminó la detección de la señal creada con cebadores cortos en NTC (Figura 6a).

Ejemplo 6 Amplificación del plásmido de ADN utilizando dos oligonucleótidos de invasión

Se puede utilizar el método de amplificación de los dos oligonucleótidos de invasión para amplificar diferentes tipos de moldes de ADN. El dúplex de ADN diana (diana para la configuración anti/paralela, SEQ ID NO: 20) se clonó en el vector pCR2.1 comercialmente disponible MWG Eurofins (Alemania). El inserto estuvo flanqueado por sitios de restricción de EcoRI. El plásmido se utilizó después como un molde para la configuración antiparalela del método de dos oligonucleótidos de invasión, como se describió en el Ejemplo 1. La concentración de cada oligonucleótido de invasión, cebador y sonda, fue 200, 400 and 600 nM, respectivamente. Se añadieron a la reacción las cantidades apropiadas (100fM-10pM) de plásmido digerido o no digerido, como se muestra en la Figura 7. El plásmido digerido se preparó mediante la incubación del plásmido diana con la enzima de restricción EcoRV-HF (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, EE.UU.) durante 3 horas a 37 °C. Como se muestra en la Figura 7, el método consiguió amplificar el ADN diana de plásmido digerido y no digerido. El plásmido de ADN digerido con enzima de restricción, sin embargo, se detectó antes que el plásmido no digerido. Esto puede deberse a una demora asociada con la primera ronda de amplificación cuando se usaron plásmidos circularizados como un molde diana. Esto sugiere también que las enzimas de restricción se pudieron usar para minimizar el tiempo de retardo durante la primera ronda de amplificación, cuando se utilizó ADN complejo como el molde. Esto se pudo hacer incubando primero el ADN complejo con las enzimas de restricción apropiadas o incluyendo la enzima de restricción en reactivos de amplificación.

Ejemplo 7 Amplificación de un ADN diana con sitios de invasión múltiples

El dúplex diana se puede diseñar para tener regiones que contienen sitios de unión idénticos para oligonucleótidos de invasión. Esto implica que solo se requiere un sitio de invasión de oligonucleótido para disociar ambos extremos del dúplex diana. Tal dúplex diana simula una librería de fragmentos de ADN que se han ligado con adaptadores (secuencia conocida) o donde solo parte de la secuencia del fragmento de ADN se conoce. Estos fragmentos de ADN desconocidos se pueden amplificar después utilizando cebadores específicos de adaptadores. Los productos amplificados después sirven como un molde para aplicaciones posteriores como la secuenciación de ADN. Tal sistema se puede aplicar también para otras aplicaciones posteriores como los análisis de fragmentos, clonación, detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, del inglés, single-nucleotide polymorphism). Los fragmentos de ADN se pueden amplificar eficazmente utilizando dos secuencias diana idénticas para un solo oligonucleótido de invasión en las configuraciones paralela, antiparalela o antiparalela inversa (Figura 8). En este ejemplo, la reacción de amplificación estándar se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1, con la excepción de que el PEG 1000 5 % se reemplazó por PEG 400 7,5 %.

Para la configuración paralela, se utilizaron 400 nM de un oligonucleótido de invasión (SEQ ID NO: 13), 200 nM de cebador directo (SEQ ID NO: 14) y 200 nM de cebador inverso (SEQ ID NO: 15) para amplificar una cantidad apropiada de ADN de dúplex diana de 324 pb (SEQ ID NO: 16). El dúplex diana (SEQ ID NO: 16) contenía un fragmento génico de lactasa humana (LCT) de 200 pb flanqueado por secuencias que sirvieron como sitios de unión para el oligonucleótido de invasión (SEQ ID NO: 28 y 29). La amplificación solo se detectó en reacciones que contuvieron el ADN de dúplex diana (SEQ ID NO: 16) y las reacciones sin el ADN de dúplex diana (control sin molde, NTC) no produjeron ninguna señal detectable de Sybr Green I (Figura 8a). La tasa de amplificación fue muy rápida y eficaz con 1000 copias de ADN diana siendo detectadas dentro de los 20 minutos desde el inicio de la reacción. El análisis de fusión con Sybr Green I confirmó adicionalmente que las reacciones fueron específicas (Figura 8b).

La configuración paralela se demostró adicionalmente utilizando 400 nM de un oligonucleótido de invasión (SEQ ID NO: 2), 200 nM de cebador directo (SEQ ID NO: 5) y 200 nM de cebador inverso (SEQ ID NO: 4) para amplificar otro ADN diana (SEQ ID NO: 17) que comprende secuencias flanqueantes que sirvieron como sitios de unión para el oligonucleótido de invasión (SEQ ID NO: 30 y 31). La reacción mostró un rendimiento similar a lo observado previamente en la Figura 8a. Se halló que la amplificación del ADN diana (SEQ ID NO: 17) fue también muy eficaz con 1000 copias siendo detectadas dentro de los 20 minutos desde el inicio de la reacción (Figura 8C). Los análisis de fusión con Sybr Green I confirmaron adicionalmente que existieron reacciones de amplificación específicas en tubos que contenían el ADN diana (Figura 8D).

Para la configuración antiparalela, se utilizaron 400 nM del oligonucleótido de invasión (SEQ ID NO: 2) y 400 nM de cebador (SEQ ID NO: 5) para amplificar un ADN diana (SEQ ID NO: 18) que comprende una secuencia de adaptador (SEQ ID NO: 27). El cebador (SEQ ID NO: 5) sirvió tanto como cebador directo como inverso. Por consiguiente, se pueden utilizar solo un OI y una especie de cebador para amplificar un ADN diana cuando se proporcionan las secuencias de unión apropiadas. La amplificación solo se detectó en reacciones que contenían el ADN diana (SEQ ID NO: 18). Las reacciones sin el ADN diana (control sin molde, NTC) no produjeron ninguna señal detectable con Sybr Green I (Figura 8e). El análisis de fusión con Sybr Green I demostró adicionalmente que la reacción fue específica de diana (Figura 8f).

Se condujeron estudios similares utilizando la configuración antiparalela. Se utilizaron 400 nM de oligonucleótido de invasión (SEQ ID NO: 13) y 400 nM de cebador (SEQ ID NO: 15) para amplificar el ADN diana (SEQ ID NO: 19). El cebador (SEQ ID NO: 15) sirvió tanto como cebador directo como inverso. Esta configuración fue capaz también de amplificar específicamente el ADN diana y en el NTC no se observaron reacciones no específicas (Figura 8g). Los

análisis de fusión con Sybr Green I demostraron adicionalmente que la reacción fue específica de diana (Figura 8h).

La tasa de amplificación utilizando la configuración antiparalela inversa resultó ser más lenta que las configuraciones paralela y antiparalela. La configuración paralela pareció mostrar la tasa de amplificación más rápida. Las diferencias en la tasa de amplificación pueden estar mediadas por diferentes factores. Por ejemplo, aunque los tres sistemas utilizan un oligonucleótido de invasión similar, los cebadores son distintos. Esto puede explicar algunas diferencias en la tasa de amplificación, dado que la temperatura de fusión y la longitud de los cebadores pueden impactar sobre la tasa de amplificación.

Las reacciones que utilizan la configuración antiparalela estuvieron sujetas adicionalmente a electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) no desnaturizante (Figura 8i). Se condujo una reacción de amplificación estándar como se describe en el ejemplo 1, excepto que el acetato de magnesio se utilizó a 20 mM, el PEG 1000 5 % se reemplazó por PEG 400 7,5 % y las reacciones se realizaron a 44 °C utilizando un dispositivo Bio Rad CFX 96 PCR durante 120 minutos. Se utilizaron 200 nM de oligonucleótido de invasión (SEQ ID NO: 2) y 400 nM de cebador (SEQ ID NO: 5) para amplificar la cantidad apropiada de ADN diana (SEQ ID NO: 18). El cebador (SEQ ID NO: 5) sirvió tanto como cebador directo como inverso. Por consiguiente, se pueden utilizar solo un OI y una especie de cebador para amplificar el ADN diana dado que se proporcionan las secuencias de unión apropiadas. Para la PAGE, una alícuota de 5 ml de la mezcla de reacción se cargó en un gel TBE 8 % (Invitrogen, Reino Unido) y se realizó electroforesis a 150 V (constante) durante 60 min. Los geles se tiñeron con una tinción de gel de ácido fluorescente (GelRed; Biotium, Estados Unidos) y se visualizaron utilizando un sistema Gel Doc™ EZ System (BioRad, Reino Unido). Apareció una banda diferente que corresponde con la longitud esperada de producto de amplificación, solo en reacciones que contenían el molde diana. No se detectaron bandas en muestras sin el molde diana, demostrando que estuvieron ausentes productos de amplificación no específicos.

25 **Ejemplo 8 Sondas basadas en FRET para monitorizar la invasión de cadena y la amplificación**

El ejemplo 8 describe el desarrollo de la bioquímica de la sonda de FRET para monitorizar la invasión y amplificación de ADN diana. La bioquímica permite monitorizar simultáneamente el proceso de invasión que tiene lugar en ambas regiones extremas del dúplex diana. Esto es también un método confirmatorio para asegurar que la longitud completa del ADN diana se amplifica. Los cebadores y los oligonucleótidos de invasión se marcan con fluoróforos y desactivadores respectivamente para formar un sistema de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET), como se muestra en la Figura 9a. Los cebadores que determinan el extremo terminal del dúplex diana son marcados con un fluoróforo en el extremo 5' o internamente (fluoróforo diferente para los cebadores directo e inverso). El oligonucleótido de invasión que se une al extremo en dirección 3' del ADN diana se marca con un desactivador en el extremo 3' mientras que el oligonucleótido de invasión que se une al extremo en dirección 3' del ADN diana se marca con un desactivador en el extremo 5'.

Se llevó a cabo una reacción de amplificación estándar utilizando la configuración paralela, como se describe en el Ejemplo 1, con la excepción de que el PEG 1000 5 % se reemplazó por PEG 400 7,5 %. Se utilizaron 200 nM de un oligonucleótido de invasión marcado con un desactivador cercano a su extremo 5' (SEQ ID NO: 21) y 200 nM de un oligonucleótido de invasión con un desactivador en el extremo 3' (SEQ ID NO: 22). Los cebadores directo (SEQ ID NO: 23) e inverso (SEQ ID NO: 24) con fluoróforo marcado internamente ROX y Cy5 respectivamente, se utilizaron a 200 nM. Estos oligonucleótidos se utilizaron para amplificar un ADN diana (SEQ ID NO: 17). La detección de amplificación en tiempo real se realizó utilizando un dispositivo Bio Rad CFX 96 PCR. Las señales se midieron después de cada ciclo durante 120 ciclos (cada ciclo igual a 30 segundos) y las señales se registraron como unidades relativas de fluorescencia (RFU, del inglés relative fluorescence unit).

La Figura 9b muestra el perfil de señal del sistema de FRET durante la amplificación del molde diana (SEQ ID NO: 17). Durante la reacción, los extremos terminales del amplicón llegaron a incorporar fluoróforos diferentes. La región en dirección 5' en este caso incorporará el fluoróforo ROX mientras que la región en dirección 3' incorpora el fluoróforo Cy5. Durante la invasión del amplicón, la señal de fluoróforo emitida disminuyó (dado que los oligonucleótidos de invasión marcados con desactivador llegaron a estar muy próximos al extremo terminal del amplicón) como se observa en la Figura 9b.

El descenso simultáneo de la señal emitida por los cebadores directos e inversos sugirió que ambos cebadores se incorporaron dentro del amplicón.

60 **Ejemplo 9 Sensibilidad del sistema de invasión múltiple**

En este ejemplo, se evaluó la sensibilidad analítica de tres ensayos diferentes. Se condujo una reacción de amplificación estándar como se describe en el Ejemplo 1, excepto que el PEG 1000 5 % se reemplazó por PEG 400 7,5%. Se utilizaron los ensayos 1, 2 y 3 para amplificar el ADN 1 diana (SEQ ID NO: 16), DNA 2 diana (SEQ ID NO: 17) y DNA 3 diana (SEQ ID NO: 18), respectivamente. Los oligonucleótidos así como sus concentraciones utilizados fueron como los descritos en el Ejemplo 7. Se probó una dilución serial de diez veces para el ADN diana desde 10⁶ copias a 1 copia. Los resultados se muestran en la figura 10. Los tres ensayos resultaron sensibles a al menos 100 copias de ADN diana (Se muestran los ensayos 1, 2 y 3 en la Figura 10a, 10b y 10c, respectivamente). El ensayo 3

mostró en algunos experimentos sensibilidad para detectar incluso una sola copia de ADN diana (Figura 11c).

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> ORION DIAGNOSTICA OY
 <120> METHOD
 <130> N402749WO
 10 <150> GB 1410022.6
 <151> 05/06/2014
 <160> 31
 15 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 61
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO DE INVASIÓN
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (48)..(60)
 <223> ARN 2'-O-METILO
 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (61)..(61)
 <223> dTTP INVERTIDO
 35 <400> 1
 ttgtccatag actgctcgac ctgatacacg ttatcgtcca tacggatucg ggaucaua 60
 t 61
 40 <210> 2
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO DE INVASIÓN
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (44)..(56)
 <223> ARN 2'-O-METILO
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (57)..(57)
 <223> dTTP INVERTIDO
 <400> 2
 tcctcctgta cctcgttaca aacaggtgta ttagtacag aagauggauu uaaauat 57
 60 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN

ES 2 776 427 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> PRIMER
 5
 <400> 3
 aacaagaagg cgactcgcac c 21
 <210> 4
 10 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> PRIMER
 <400> 4
 tggggcaaaa tattta 16
 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> PRIMER
 <400> 5
 30 aaccaaagtg gagtgtaca a 21
 <210> 6
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO DE INVASIÓN NO COMPLEMENTARIO
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (47)..(61)
 <223> ARN 2'-O-METILO
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (62)..(62)
 <223> dTTP INVERTIDO
 <400> 6
 50
 ttgtccatag actgctgaaa aaaccgcatc atttatgata tgcttcuccu cgcauaaucu 60
 at 62
 <210> 7
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> CEBADOR NO COMPLEMENTARIO
 <400> 7
 gtgtacagag catttaagat t 21

ES 2 776 427 T3

<210> 8
 <211> 27
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> PROBE

 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> MARCADOR DE CARBOXITETRAMETILRODAMINA

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> ETIQUETA DE BLACK HOLE QUENCHER 2

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(27)
 <223> dTTP INVERTIDO

 25 <400> 8
 gtacacatca acugttagct ggggcat 27

 <210> 9
 <211> 31
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> PROBE
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> MARCADOR DE CARBOXITETRAMETILRODAMINA
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> ETIQUETA DE BLACK HOLE QUENCHER 2
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> dTTP INVERTIDO
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> dTTP INVERTIDO
 55
 <400> 9
 tgatacacgt tatcgucatt acggattcgg t 31

 <210> 10
 60 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> PRIMER

ES 2 776 427 T3

<400> 10
aacaagaagg cgta 14

5 <210> 11
<211> 129
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> MOLDE DIANA

<400> 11

aacaagaagg cgtactcgac ctgatacacg ttatcgtcca tacggattcg ggatctcagt 60
acacatcaac tggttacaaa caggtgtatt tagtacagaa gatggattta aatattttgc 120
cccagctaa 129

15 <210> 12
<211> 143
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> MOLDE DIANA

25 <400> 12

aacaagaagg cgtactcgac ctgatacacg ttatcgtcca tacggattcg ggatctcagt 60
acacatcaac tgtagctgg ggcaaaatat ttaaattccat cttctgtact aaatacacct 120
gtttgtaaca ctccactttg gtt 143

30 <210> 13
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> OLIGONUCLEÓTIDO DE INVASIÓN

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(59)
<223> ARN 2'-O-METILO

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (60)..(60)
<223> dTTP INVERTIDO

<400> 13
ttgtccatag acacgcaaat gaaagacggt ctaacaagt ttcagaaaga uuugauggct 60

50 <210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> PRIMER

ES 2 776 427 T3

<400> 14
gctttaaccg aacagcaaat 20

5 <210> 15
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> PRIMER

<400> 15
gcagtacgct tagccatca 19

15 <210> 16
<211> 324
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> MOLDE DIANA

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(63)
<223> REGIÓN DE ADAPTADOR

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (264)..(320)
<223> REGIÓN DE ADAPTADOR

35 <400> 16

aaaagcttta accgaacagc aaatgaaaga cgttcttaac aagtttcaga aagatttgat 60

ggctgtctgt gcttctgtgg tgccgagcat tagccccagg aactgcacct cctcctgtct 120

cacggggctg atggtgggtc cagcatctag gagagtgtga cacaggggtg ttggtgctct 180

ggcgtgatt tgagttctca gatctctgag accccagcag aggctgcacg gtaccccaaa 240

tccgcacagc cattgacggg atggcaaatg aaagacgttc ttaacaagtt tcagaaagat 300

ttgatggcta agcgtactgc aaaa 324

40 <210> 17
<211> 191
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> MOLDE DIANA

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(60)
<223> REGIÓN DE ADAPTADOR

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (136)..(187)

ES 2 776 427 T3

<223> REGIÓN DE ADAPTADOR

<400> 17

```

tcagaaccaa agtggagtgt tacaacagc tgtatattagt acagaagatg gatttaaata      60
acacatacat aacagacctt tatcttatat cccctcggca accctgaagc tgcaatgaat      120
tgatatctgt cgttcggtac aaacaggtgt atttagtaca gaagatggat ttaaataattt      180
tgcccatca g                                                                191

```

5

<210> 18

<211> 195

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> MOLDE DIANA

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(60)

<223> REGIÓN DE ADAPTADOR

20

<400> 18

```

aaaaaaccaa agtggagtgt tacaacagc tgtatattagt acagaagatg gatttaaata      60
cacccaaggc ctcacactcg atactgtttt gagcgcctct gtcattggtg atatggtcat      120
cagggccaag tggaatattt aaatccatct tctgtactaa atacacctgt ttgtaaacact      180
ccactttggt taaaa                                                         195

```

25

<210> 19

<211> 197

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> MOLDE DIANA

<400> 19

```

tcaggcagta cgcttagcca tcaaactttt ctgaaacttg ttaagaacgt ctttcatttg      60
cccggcaaat tgagtcacgg tcggtaacac tttcagcaaa gtccggattt gaagcgtaac      120
ccgcattaaa agaaatgcaa atgaaagacg ttcttaacaa gtttcagaaa gatttgatgg      180
ctaagcgtac tgctcag                                                         197

```

35

<210> 20

<211> 140

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> MOLDE DIANA

<400> 20

ES 2 776 427 T3

	aagaagcgt actcgacctg atacacgtta tcgtccatac ggattcggga tctcagtaca	60
	catcaactgt tagctggggc aaaatattta aatccatctt ctgtactaaa tacacctgtt	120
	tgtaaacactc cactttggtt	140
5	<210> 21 <211> 56 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> OLIGONUCLEÓTIDO DE INVASIÓN MARCADO	
15	<220> <221> misc_feature <222> (13)..(13) <223> ETIQUETA DE BLACK HOLE QUENCHER 2	
20	<220> <221> misc_feature <222> (44)..(56) <223> ARN 2'-O-METILO	
	<400> 21 tcctcctgta cctcgttaca aacaggtgta ttagtacag aagauggauu uaaaua	56
25	<210> 22 <211> 56 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> OLIGONUCLEÓTIDO DE INVASIÓN MARCADO	
35	<220> <221> misc_feature <222> (44)..(56) <223> ARN 2'-O-METILO	
40	<220> <221> misc_feature <222> (56)..(56) <223> ETIQUETA DE BLACK HOLE QUENCHER 3	
45	<400> 22 tcctcctgta cctcgttaca aacaggtgta ttagtacag aagauggauu uaaaua	56
50	<210> 23 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> CEBADOR MARCADO	
55	<220> <221> misc_feature <222> (14)..(14) <223> 6-CARBOXY-X-RHODAMINE TAG	
60	<400> 23 aaccaaagtg gagtgttaca a	21

ES 2 776 427 T3

<210> 24
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> CEBADOR MERCADO
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Cy5 TAG
 <400> 24
 15 tggggcaaaa tattta 16
 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> PRIMER
 25 <400> 25
 agttgatgtg tactgagatc 20
 <210> 26
 <211> 151
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> MOLDE DIANA
 35 <400> 26
 cagttgatgt gtactgagat ccogaatccg tatggacgat aacgtgtatc aggtcgagaa 60
 aagtacacat caactgtag ctggggcaaaa aaagcaaatg aaagacgttc ttaacaagtt 120
 tcagaaagat ttgatggcta gcgtactgct g 151
 <210> 27
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> ADAPTADOR
 <400> 27
 50 aaccaaagtg gagtggtaca aacaggtgta ttagtacag aagatggatt taaata 56
 <210> 28
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> ADAPTADOR
 <400> 28
 60 gctttaaccg aacagcaaat gaaagacgtt ctaacaagt tcagaaaga ttgatggc 59

ES 2 776 427 T3

5
<210> 29
<211> 57
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADAPTADOR

10 <400> 29
gcagtagcgt tagccatcaa atcttctga aactgttaa gaacgtctt catttgc 57

15 <210> 30
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADAPTADOR

20 <400> 30
aaccaaagtg gagtgttaca aacaggtgta ttagtacag aagatggatt taaata 56

25 <210> 31
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADAPTADOR

30 <400> 31
tggggcaaaa tatttaaact catctctgt actaaataca cctgttga ac 52

REIVINDICACIONES

1. Un método para la amplificación de una secuencia nucleica diana que comprende regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' para uno o más oligonucleótidos de invasión de cadena, en el que las regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' incorporan, cada una, una secuencia de adaptador, el método que comprende poner en contacto dicha secuencia de ácido nucleico diana con uno o más oligonucleótidos de invasión de cadena y uno o más cebadores capaces de amplificar la secuencia de ácido nucleico diana, en el que dichos uno o más oligonucleótidos de invasión de cadena se unen a las secuencias de adaptador para hacer las regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' de la secuencia de ácido nucleico diana monocatenarias para permitir la unión de dichos uno o más cebadores.
2. El método según la reivindicación 1, en el que las regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' para uno o más oligonucleótidos de invasión de cadena están presentes en la misma cadena de la secuencia de ácido nucleico diana.
3. El método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que las regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' para uno o más oligonucleótidos de invasión de cadena están presentes en cadenas opuestas de la secuencia de ácido nucleico diana; opcionalmente, en el que dichos uno o más oligonucleótidos de invasión de cadena están unidos a las cadenas opuestas de la secuencia de ácido nucleico diana con sus extremos 3' dirigidos hacia o aparte uno de otro.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que:
- (a) la región de unión del oligonucleótido de invasión en dirección 5' y/o en dirección 3' de la secuencia de ácido nucleico diana no solapa con la región de unión para el cebador en dirección 5' o en dirección 3' respectivo; y/o
 - (b) las condiciones que promueven la amplificación de dicha secuencia de ácido nucleico diana incluyen la presencia de una recombinasa; y/o
 - (c) el método se lleva a cabo en condiciones isotérmicas que promueven la amplificación de dicha secuencia de ácido nucleico diana; y/o
 - (d) el método comprende poner en contacto dicha secuencia de ácido nucleico diana con uno o más oligonucleótidos de invasión de cadena adicionales; y/o
 - (e) el método comprende adicionalmente poner en contacto la secuencia de ácido nucleico diana con una sonda de oligonucleótido; opcionalmente en el que la región de unión para la sonda en la secuencia de ácido nucleico diana no solapa con la región de unión para un oligonucleótido de invasión de cadena y/o la región de unión para un cebador; más adicionalmente en el que la región de unión para la sonda está entre las regiones de unión de oligonucleótidos de invasión de cadena en dirección 5' y en dirección 3' de la secuencia de ácido nucleico diana; y/o
 - (f) un oligonucleótido de invasión de cadena y un cebador, el cual permite unirse a la secuencia de ácido nucleico diana, forman un sistema de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET).
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende poner en contacto dicha secuencia de ácido nucleico diana con al menos un cebador en dirección 5' y al menos un cebador en dirección 3', en el que uno o más oligonucleótidos de invasión de cadena hace las regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' de la secuencia de ácido nucleico diana monocatenarias para permitir la unión del cebador en dirección 5' y en dirección 3'.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende poner en contacto dicha secuencia de ácido nucleico diana con una sola especie de cebador que puede unirse a regiones de unión tanto en dirección 5' como en dirección 3' en la secuencia de ácido nucleico diana, en la que uno o más oligonucleótidos de invasión de cadena hace las regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' de la secuencia de ácido nucleico diana monocatenarias para permitir la unión de la especie sola de cebador a sus regiones de unión tanto en dirección 5' como en dirección 3'.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que un oligonucleótido de invasión de cadena se une a las secuencias de adaptador en las regiones de unión, tanto en dirección 5' como en dirección 3', en la secuencia de ácido nucleico diana para hacerlas monocatenarias.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las regiones de unión en dirección 5' y en dirección 3' incorporan diferentes secuencias de adaptador.
9. Un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana que comprende una región de secuencia desconocida que comprende crear una secuencia de ácido nucleico diana que comprende regiones de unión de oligonucleótidos de invasión de cadena en dirección 5' y en dirección 3' de dicha región de secuencia desconocida, dichas secuencias de unión que incorporan, cada una, una secuencia de adaptador y que amplifican dicha

secuencia de ácido nucleico diana llevando a cabo el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

5 10. Un método para determinar la secuencia de un ácido nucleico que comprende una región de secuencia desconocida, que comprende la creación de una secuencia de ácido nucleico diana que comprende regiones de unión de oligonucleótidos de invasión de cadena en dirección 5' y en dirección 3' de dicha región de secuencia desconocida, dichas secuencias de unión incorporando, cada una, una secuencia de adaptador, que amplifica dicha secuencia de ácido nucleico diana llevando a cabo el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y que determina la secuencia de dicha región de secuencia desconocida.

10 11. Utilización de un kit en el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el kit comprende un oligonucleótido de invasión de cadena y uno o más cebadores y al menos un adaptador de ADN, en el que dicho oligonucleótido de invasión de cadena puede unirse al adaptador de ADN, cuando está presente, en una región de unión en dirección 5' y en una región de unión en dirección 3' de una secuencia de ácido nucleico diana y en el que dichos uno o más cebadores son capaces de amplificar dicha secuencia de ácido nucleico diana.

15 12. El uso según la reivindicación 11, en el que el kit comprende:

- (a) al menos un cebador en dirección 5' y al menos un cebador en dirección 3' para dicha secuencia de ácido nucleico diana; y/o
- 20 (b) una sola especie de cebador que puede unirse tanto a una región de unión en dirección 5' como a una región de unión en dirección 3' en la secuencia de ácido nucleico diana,

en el que opcionalmente dicho kit comprende adicionalmente al menos una ADN ligasa.

25 13. El uso según la reivindicación 11 o 12, en el que:

- (a) la región de unión de oligonucleótido de invasión de cadena en dirección 5' y/o en dirección 3' en la secuencia de ácido nucleico diana no solapa con la región de unión para el respectivo cebador en dirección 5' o en dirección 3'; y/o
- 30 (b) el kit adicionalmente comprende al menos una sonda de oligonucleótido; opcionalmente en el que la región de unión para la sonda en la secuencia de ácido nucleico diana no solapa con la región de unión para un oligonucleótido de invasión de cadena y/o la región de unión para un cebador; más adicionalmente en el que la región de unión para la sonda está entre las regiones de unión de oligonucleótidos de invasión de cadena en dirección 5' y en dirección 3' de la secuencia de ácido nucleico diana.

35 14. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 en el que:

- (a) un oligonucleótido de invasión de cadena y el cebador que se unen a la región en dirección 5' y/o en dirección 3' de la secuencia de ácido nucleico diana forman un sistema de FRET; y/o
- 40 (b) el kit comprende adicionalmente al menos una endonucleasa de restricción; y/o
- (c) el kit comprende uno o más oligonucleótidos de invasión de cadena adicionales.

45 15. El método según las reivindicaciones 9 o 10, en el que las regiones de unión de oligonucleótidos de invasión de cadena en dirección 5' y en dirección 3' comprenden, cada una, una secuencia de adaptador de ADN y una sola especie de oligonucleótido de invasión de cadena se une a la secuencia de adaptador de ADN tanto en la región de unión en dirección 5' como en la región de unión en dirección 3'.

Figura 1:

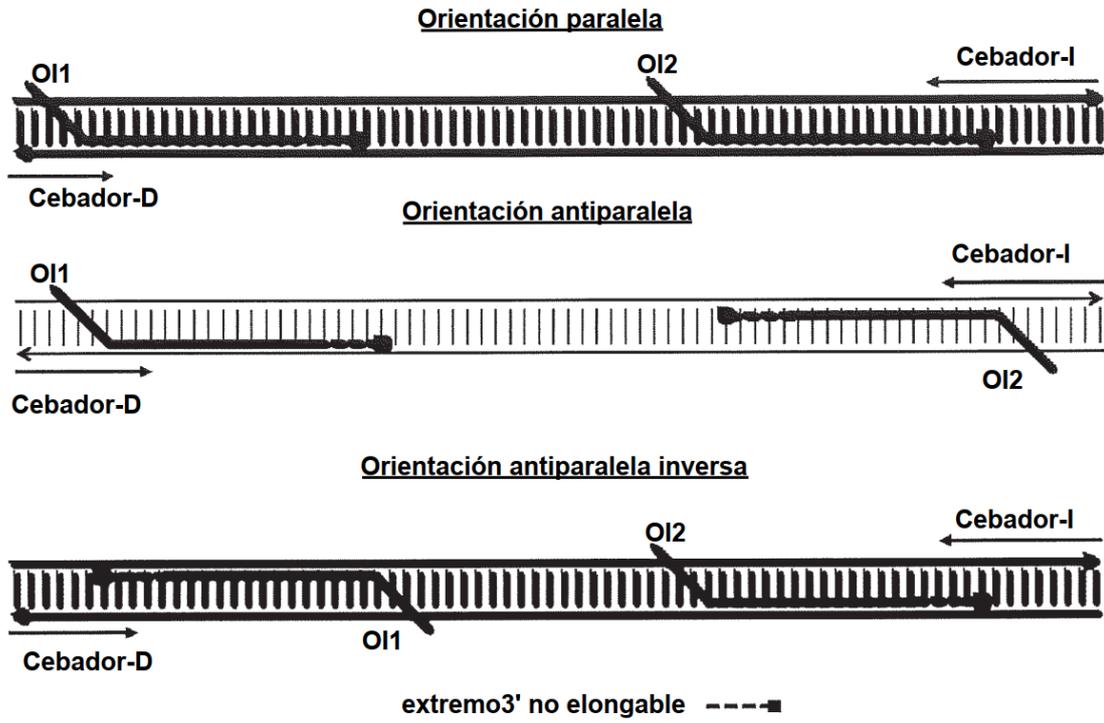


Figura 2a

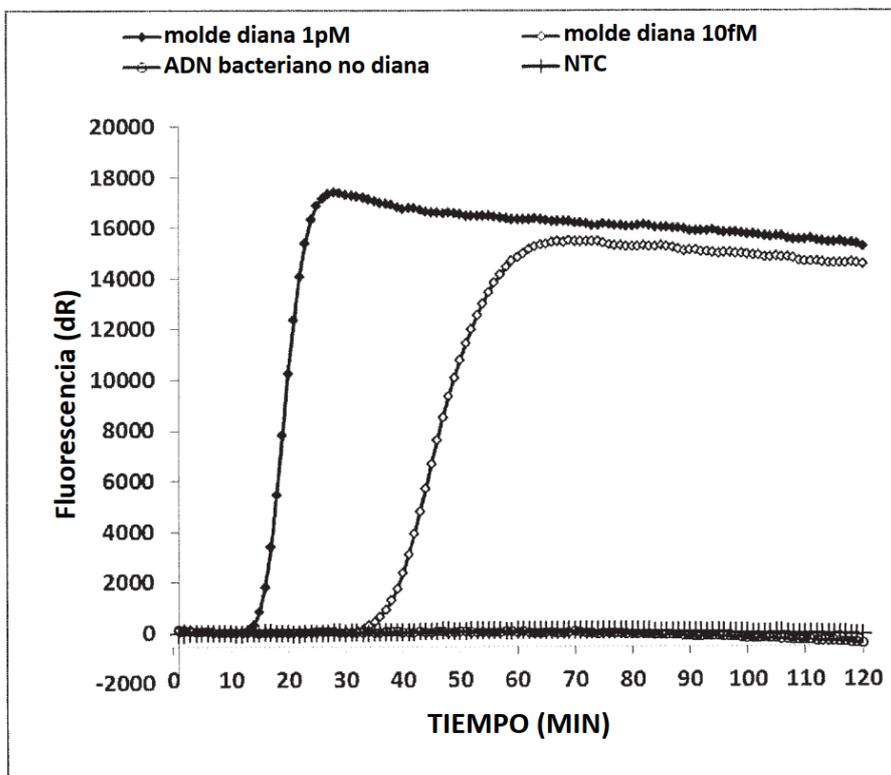


Figura 2b:

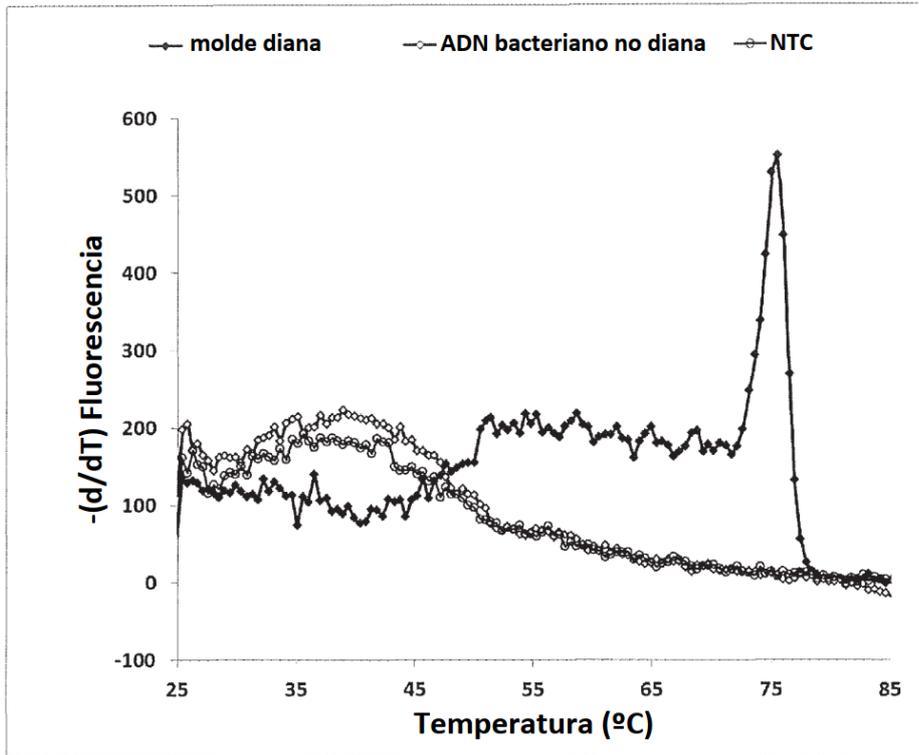


Figura 2c:

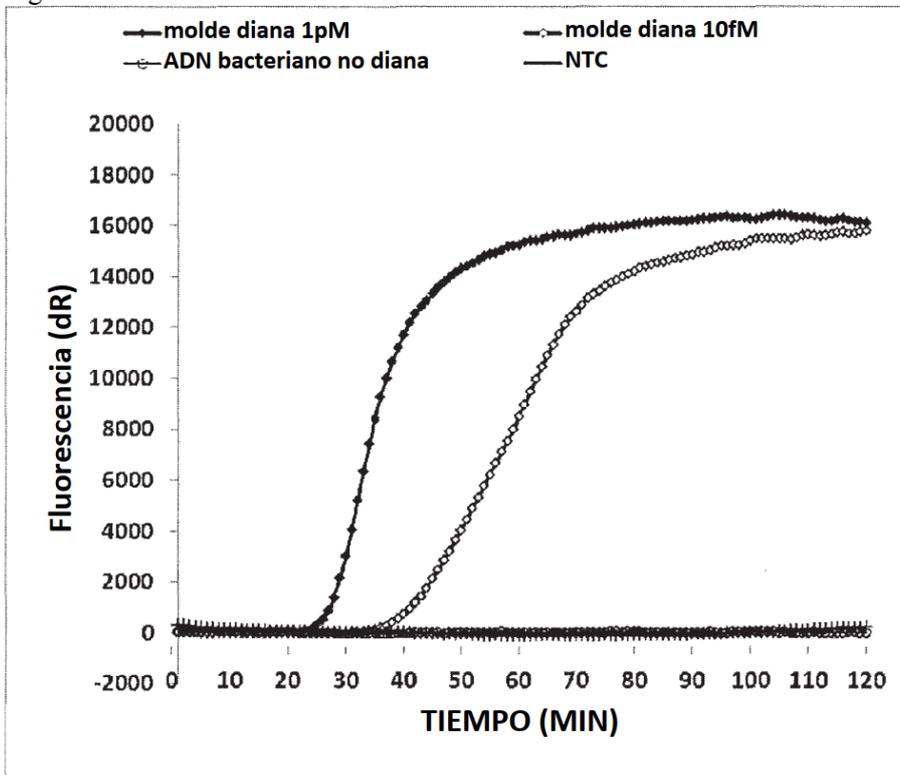


Figura 2d:

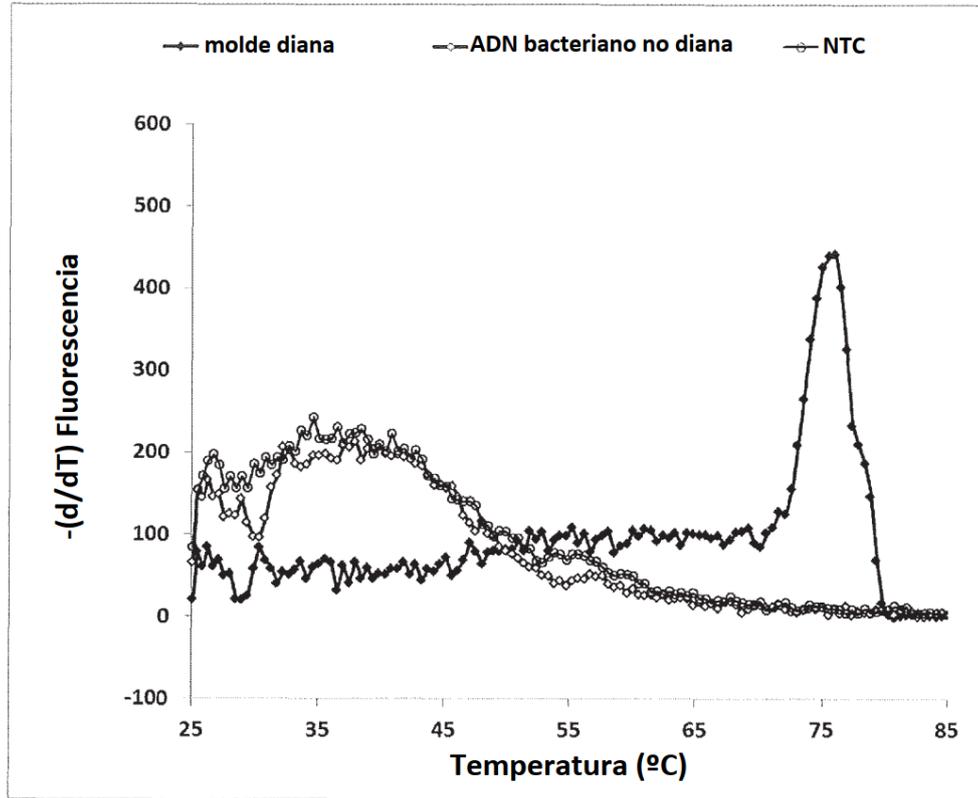


Figura 2e:

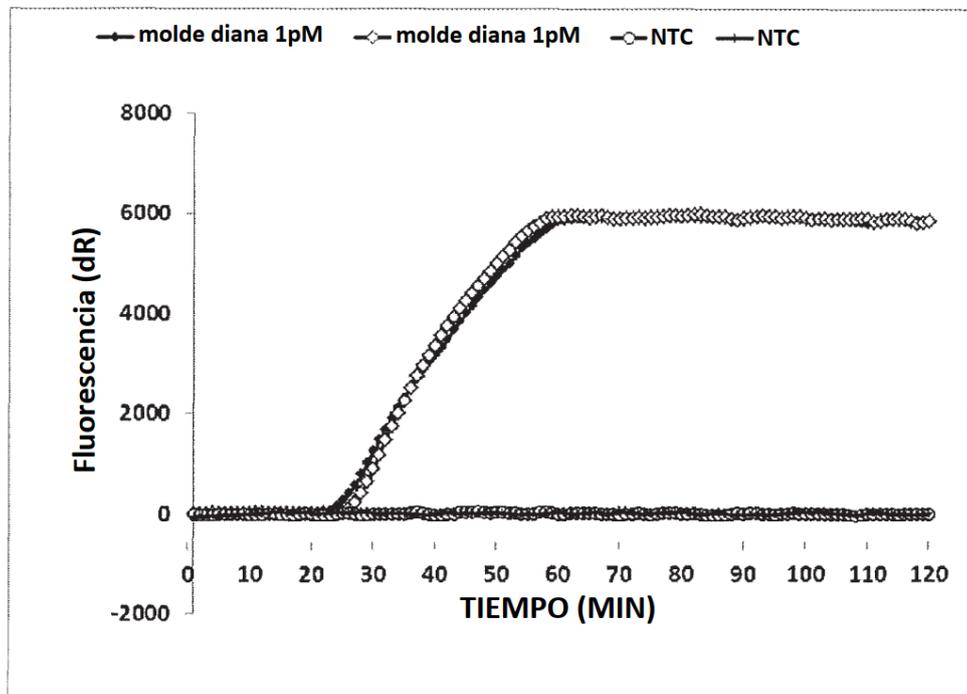


Figura 2f

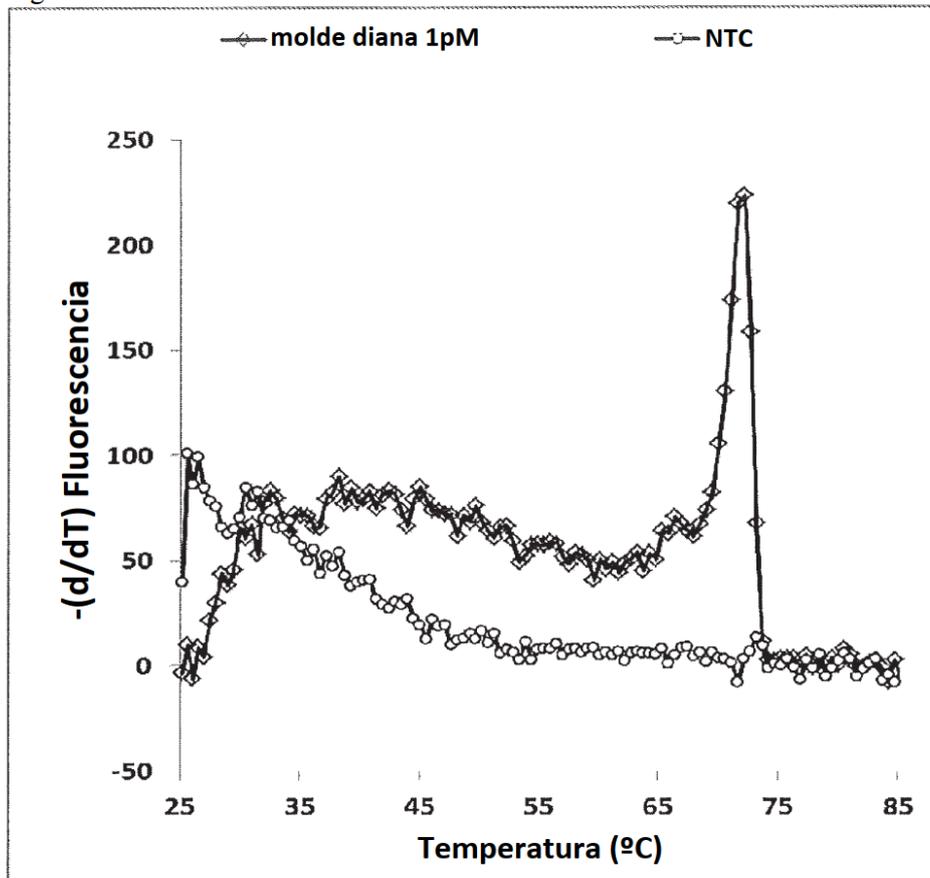


Figura 3a:

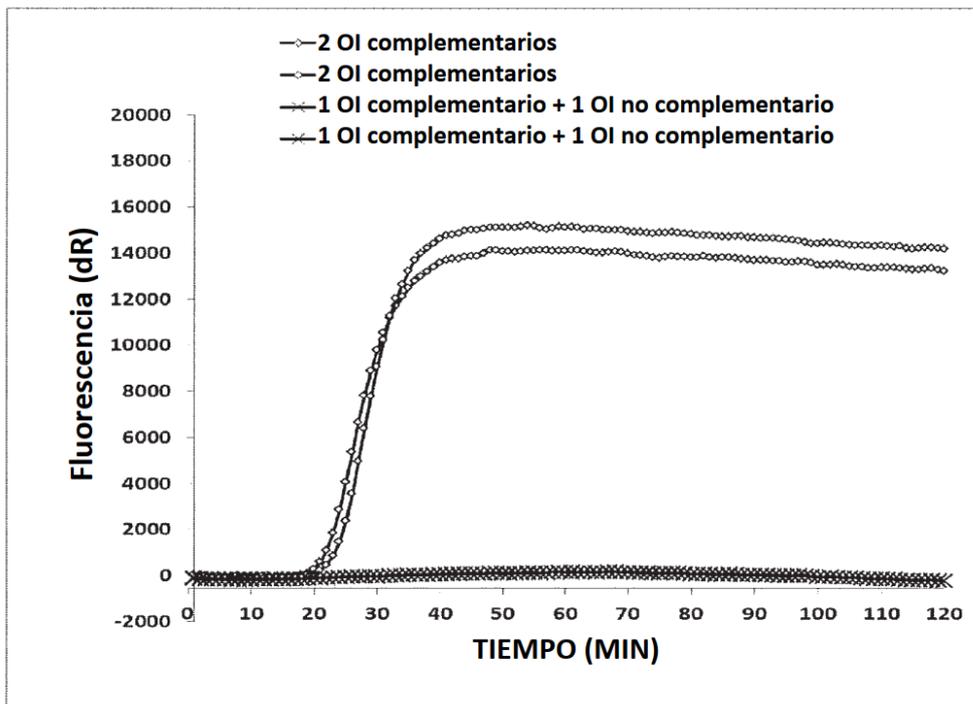


Figura 3b:

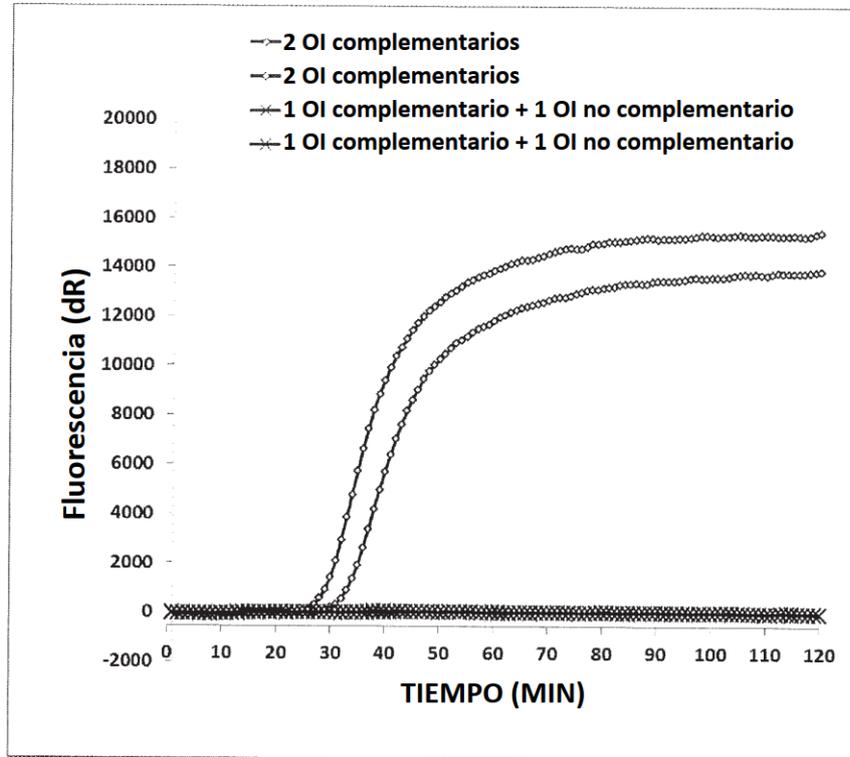


Figura 4:

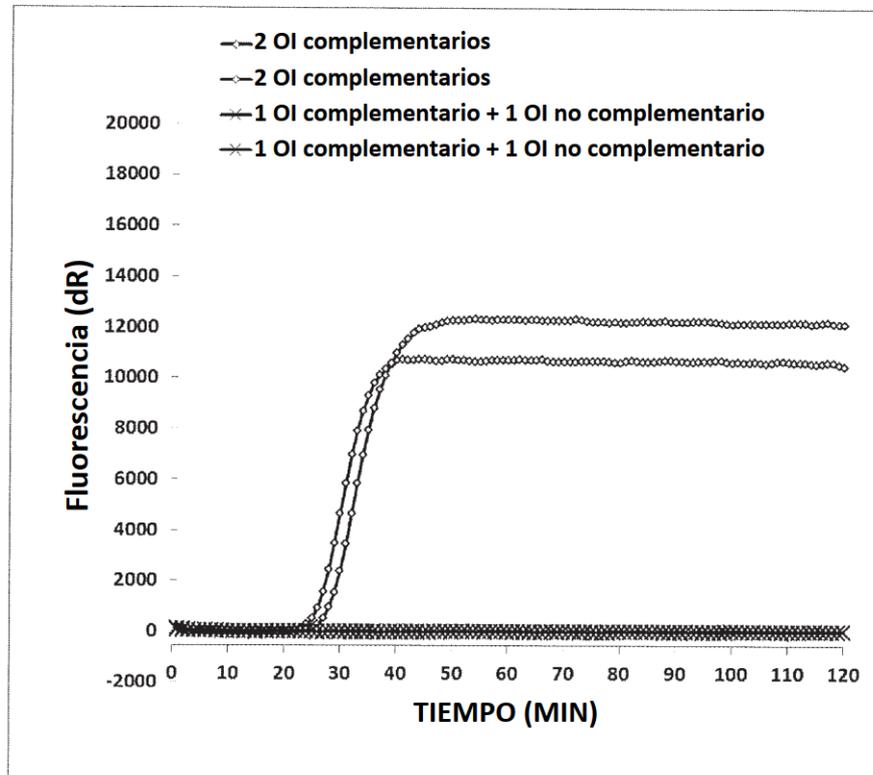


Figura 5a

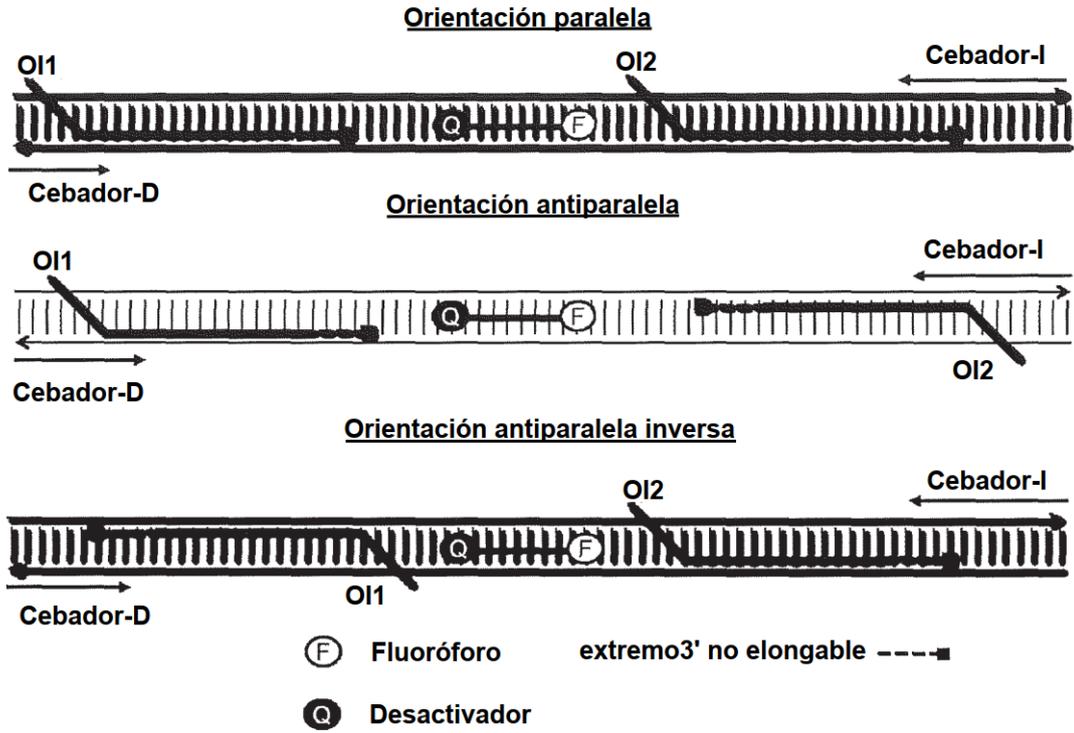


Figura 5b:

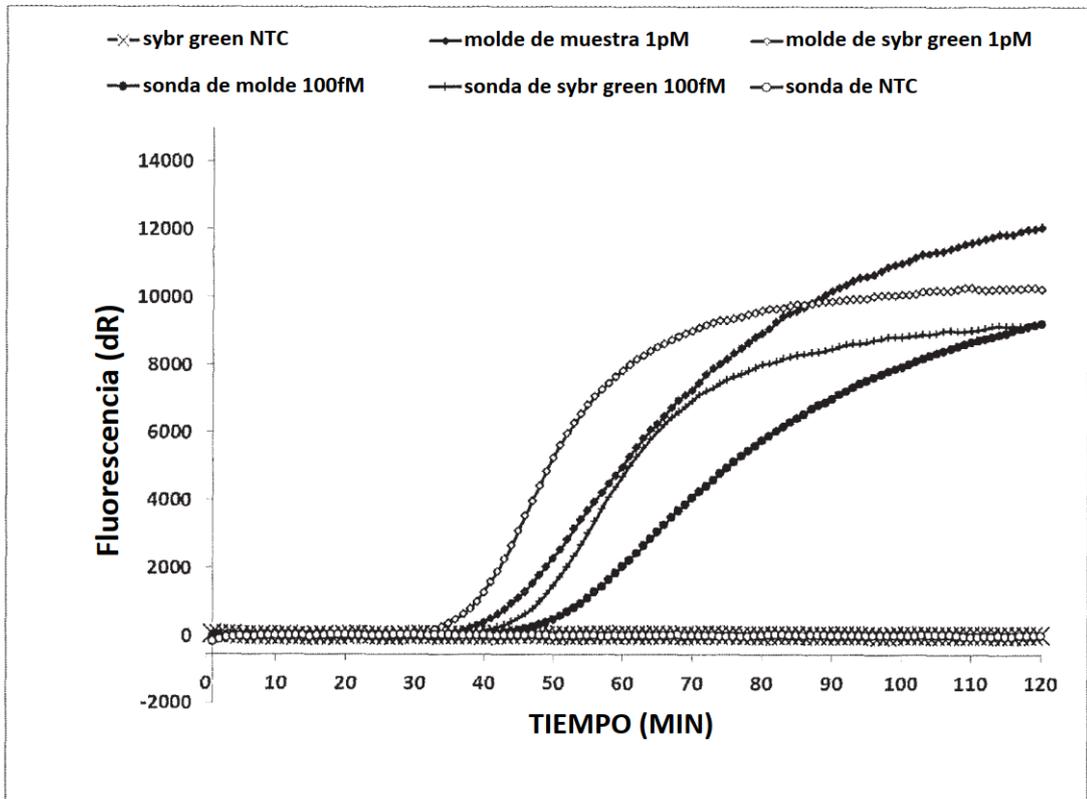


Figura 5c:

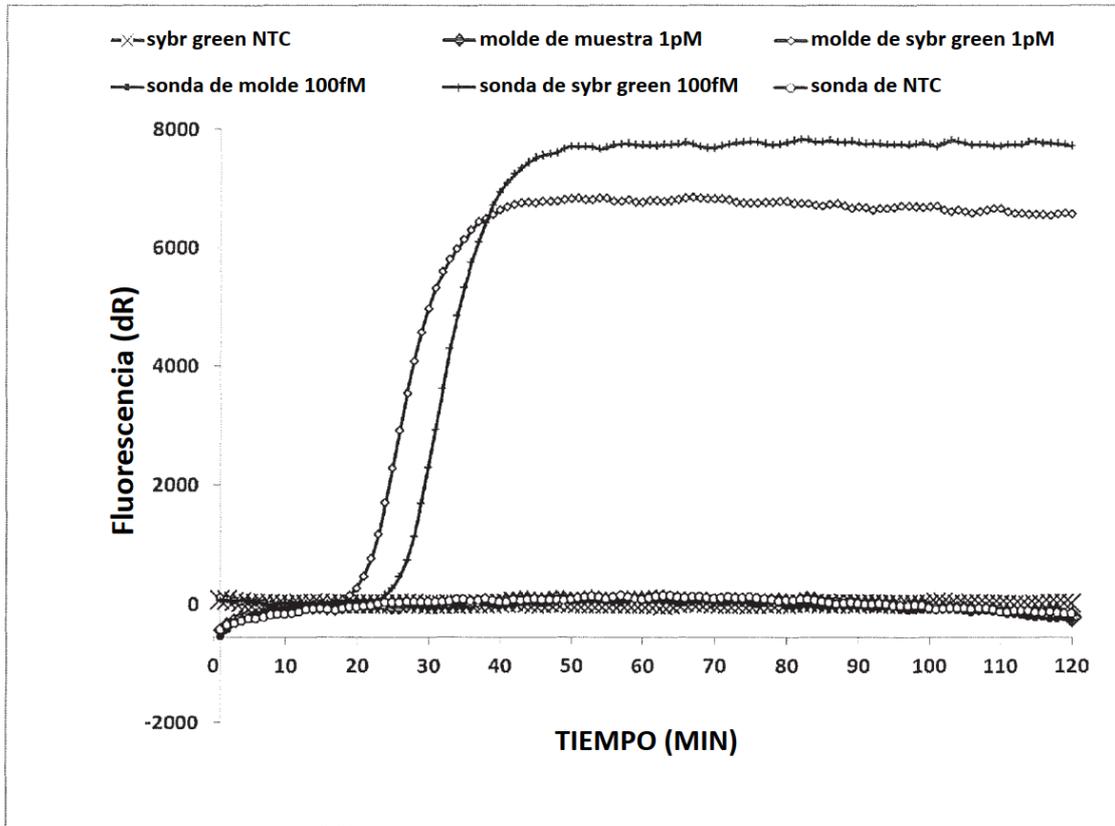


Figura 6a:

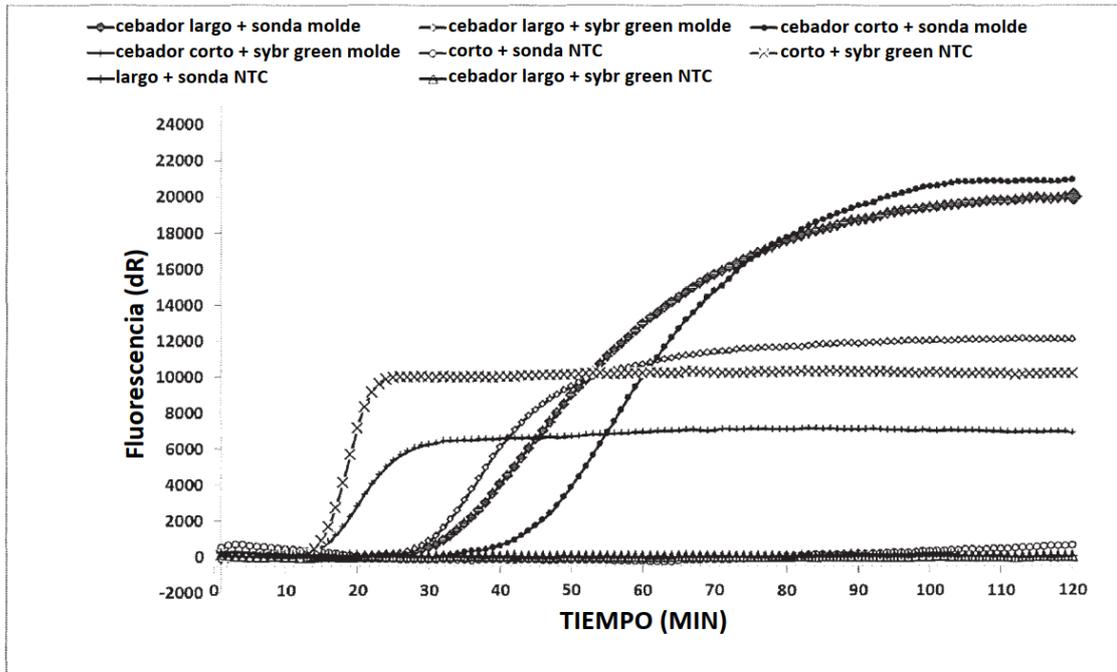


Figura 6b:

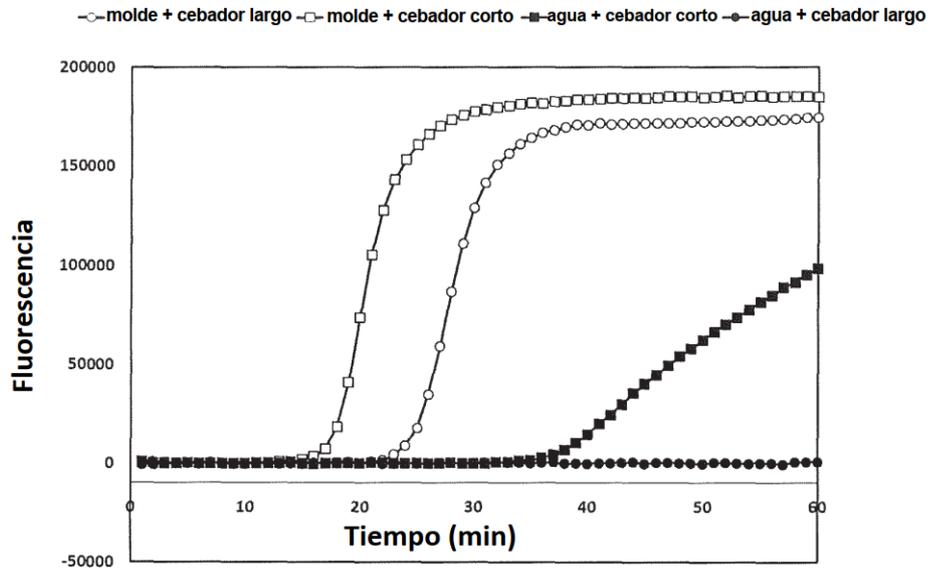


Figura 7:

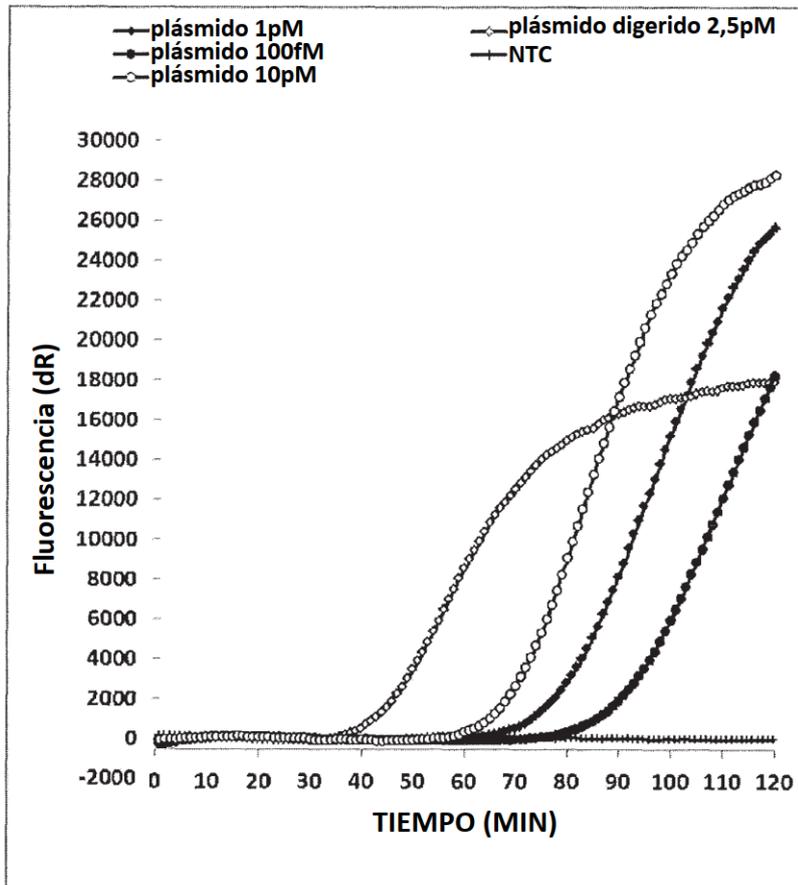


Figura 8a:

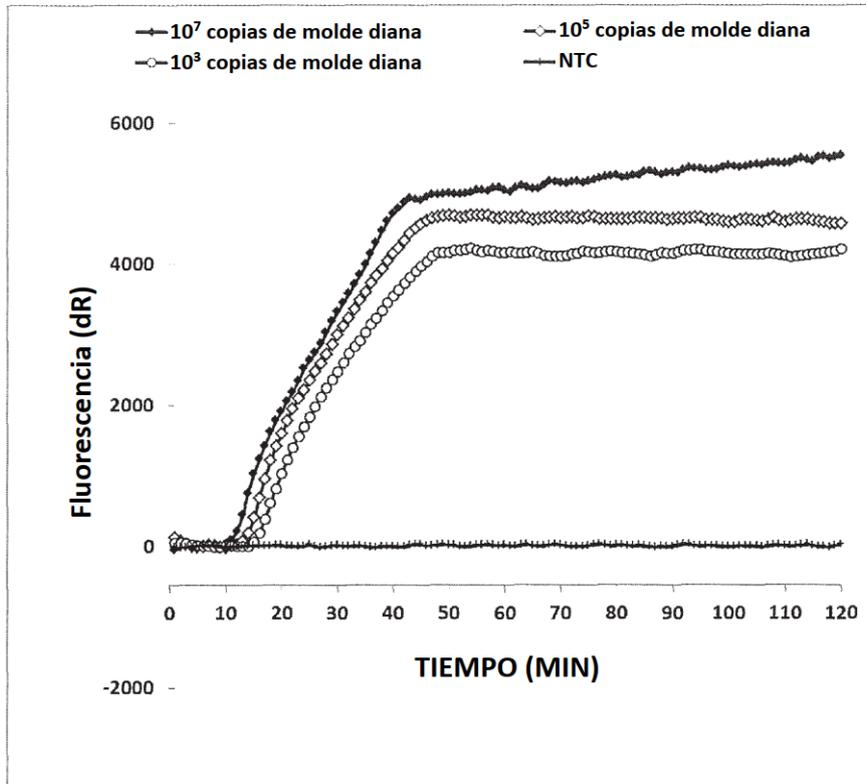


Figura 8b:

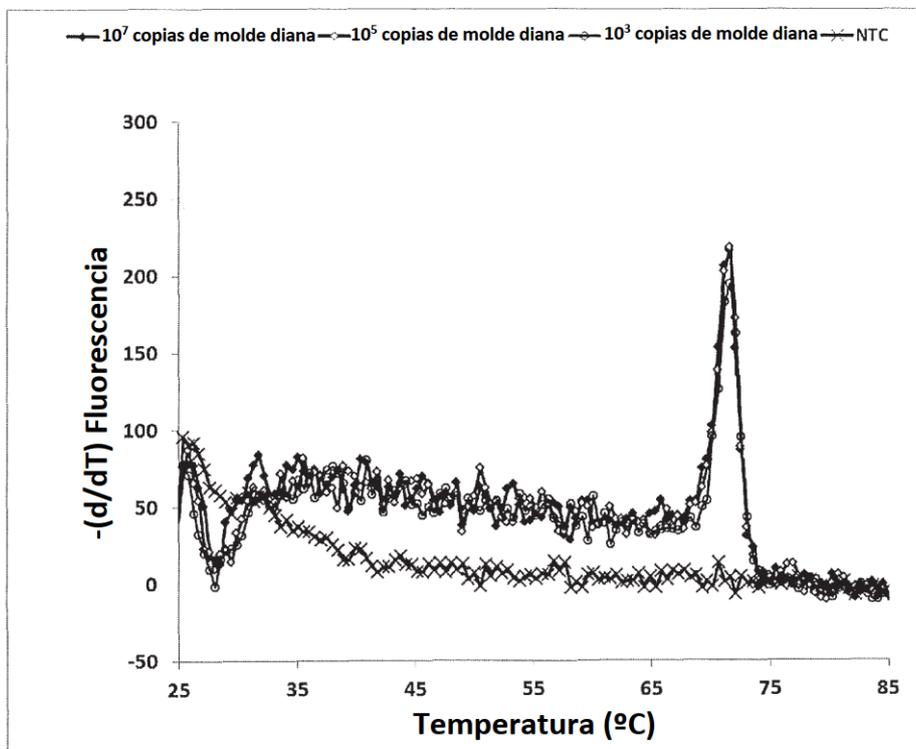


Figura 8c:

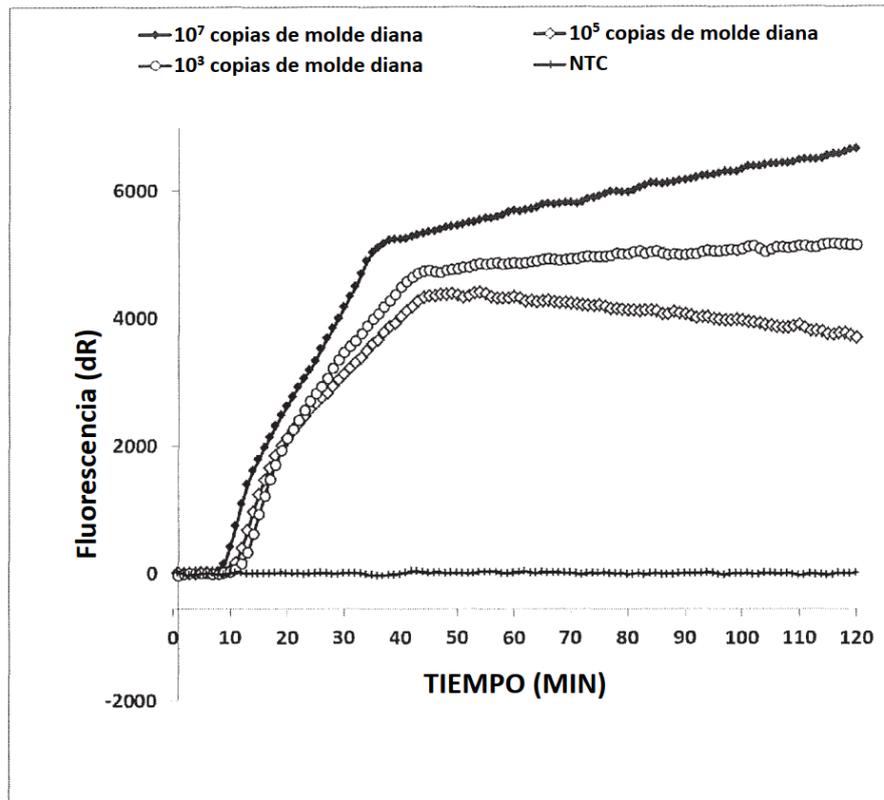


Figura 8d:

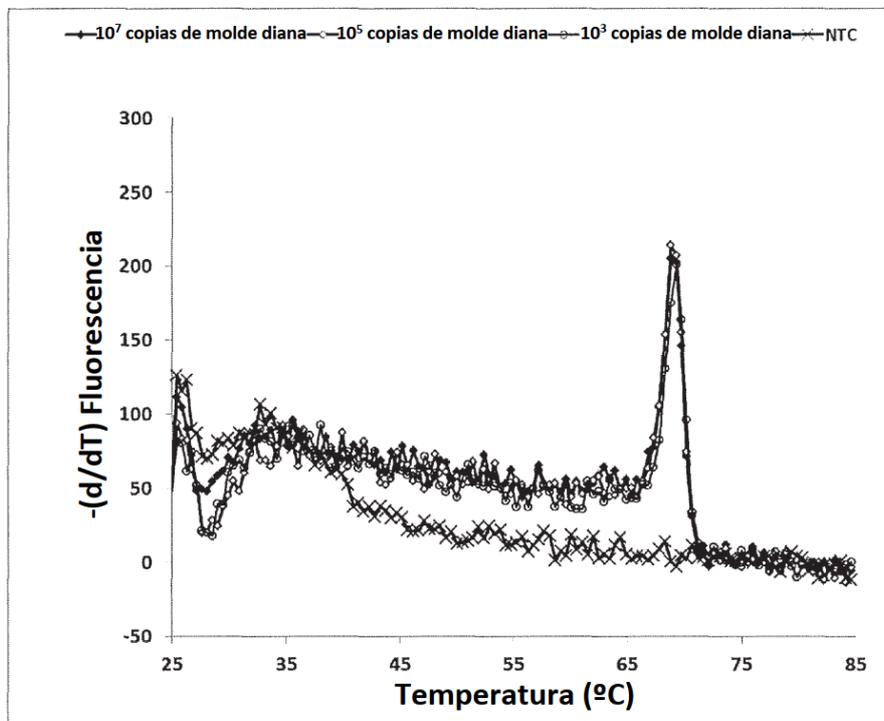


Figura 8e:

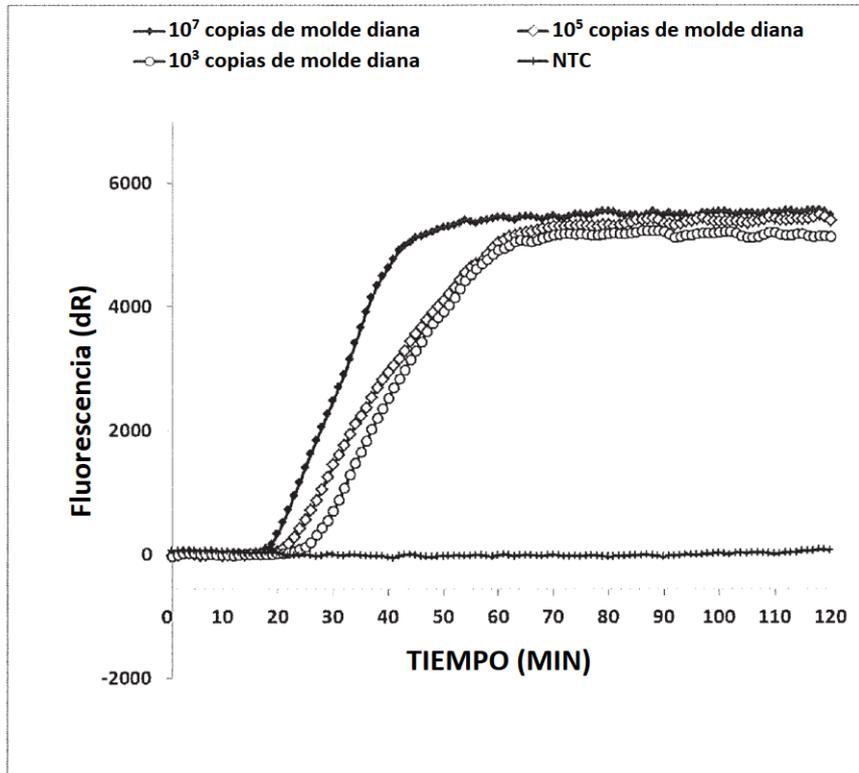


Figura 8f:

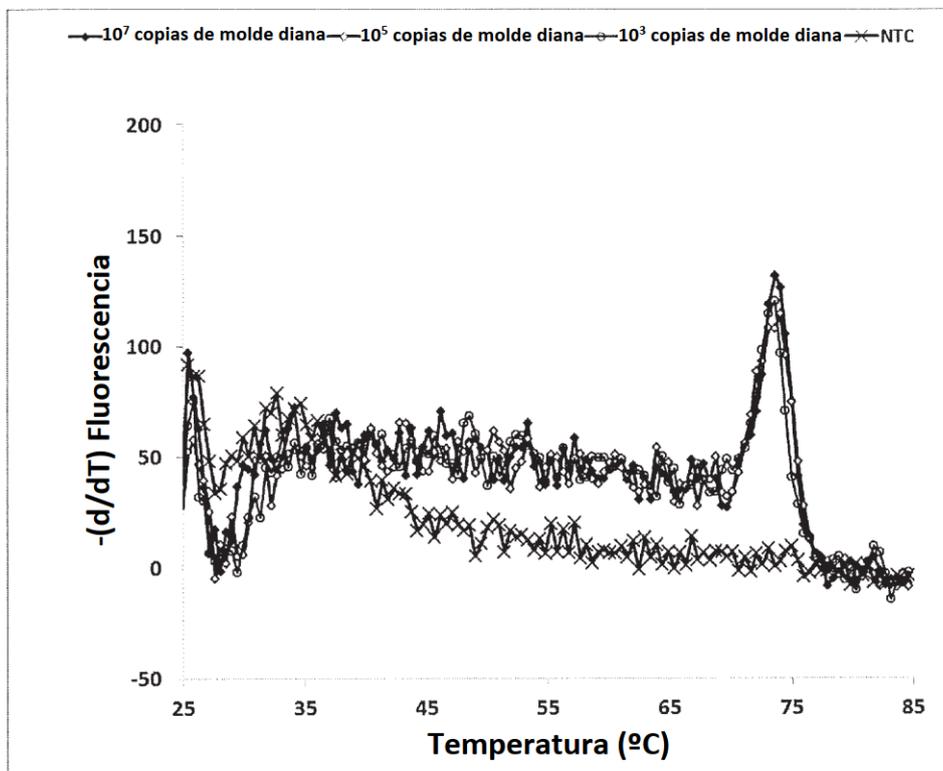


Figura 8g:

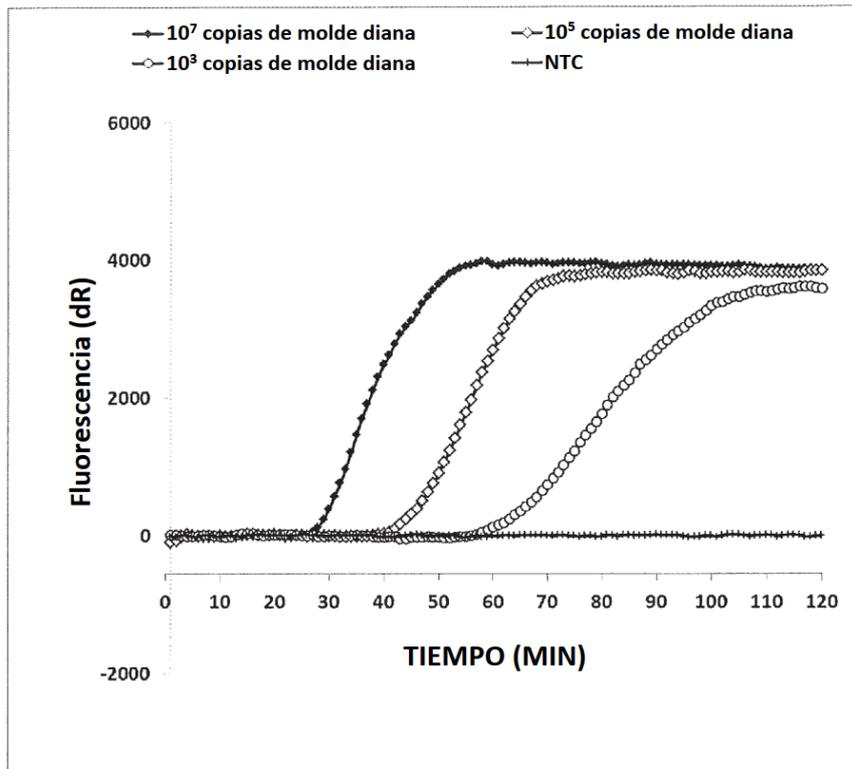


Figura 8h:

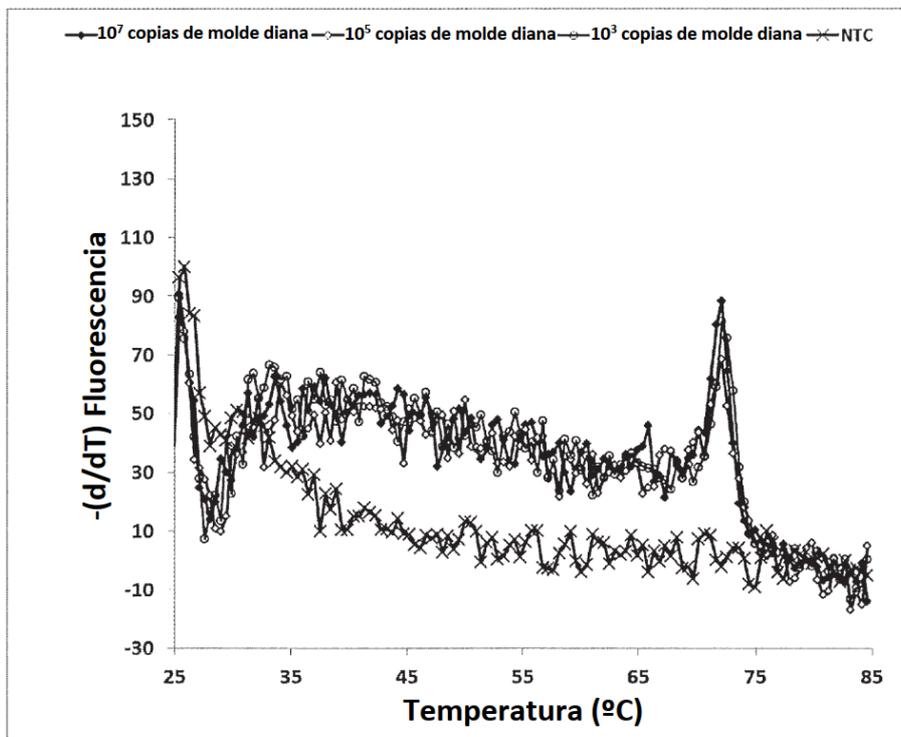
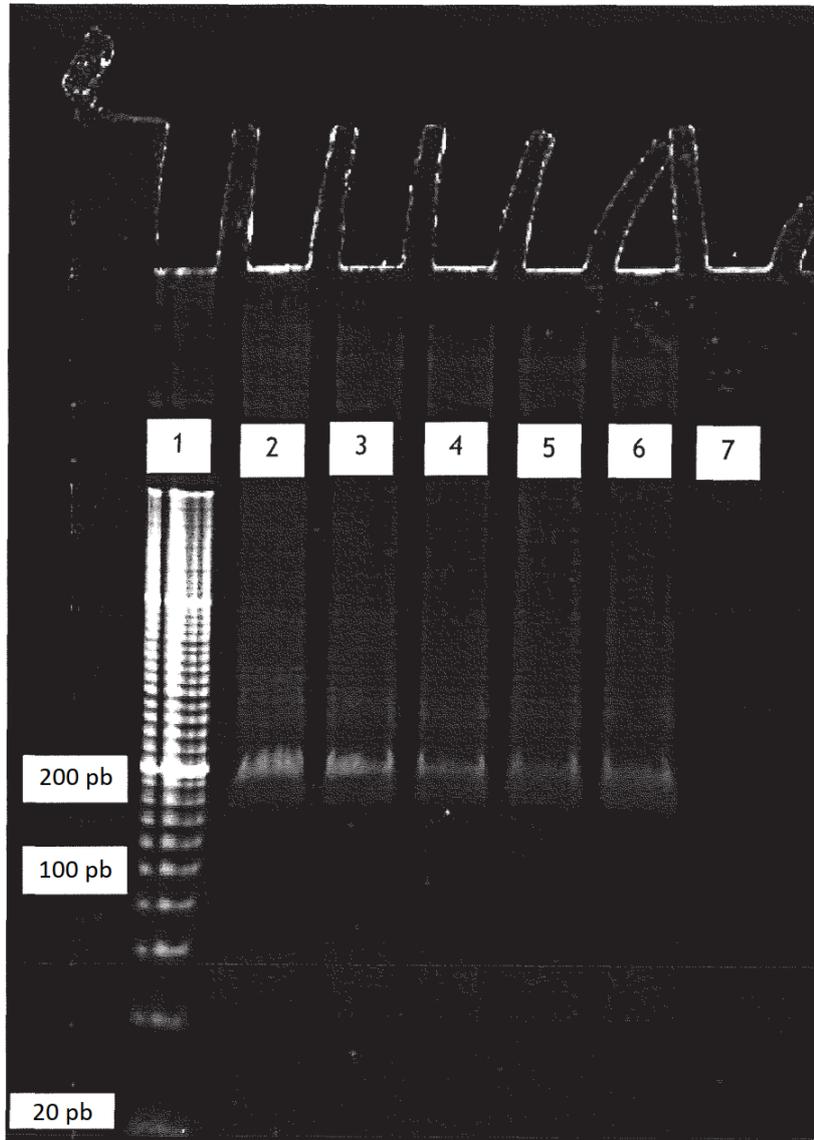


Figura 8i



Electroforesis no desnaturizante de los correspondientes productos de reacción. Carril 1, BioRad EZ Carga 20 pb Regla Molecular; carriles 2-6 copiados 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 y 10^3 respectivamente; carril 7, agua.

Figura 9A:



Figura 9B:

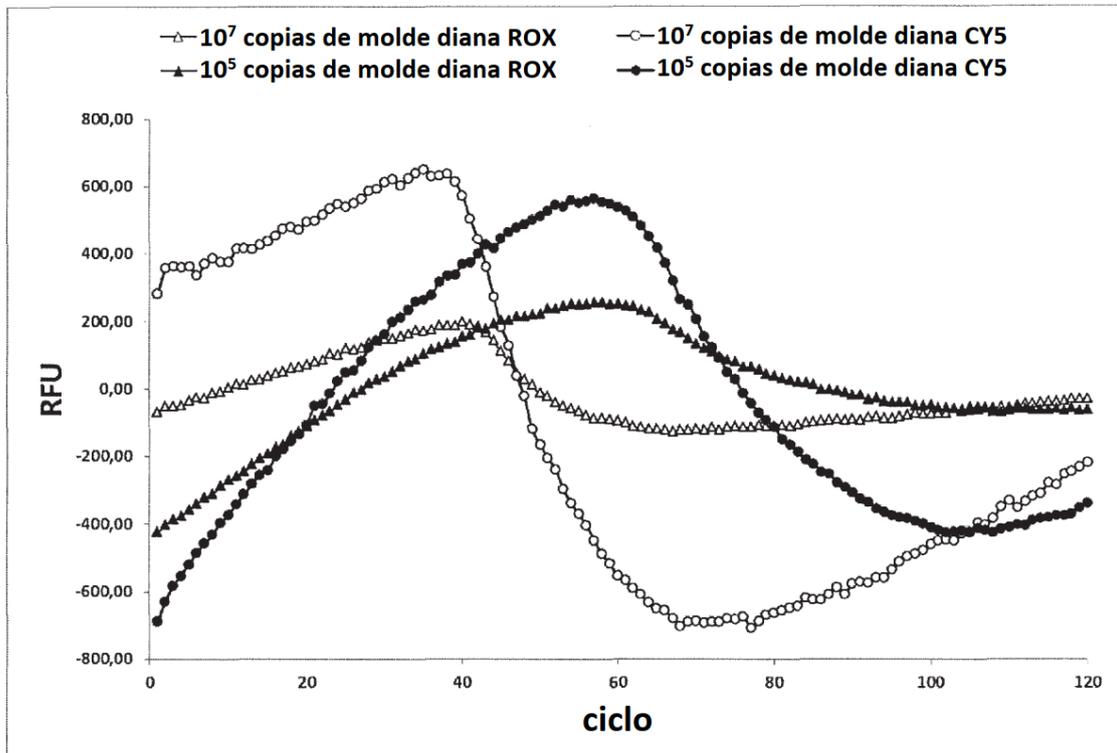


Figura 10A:

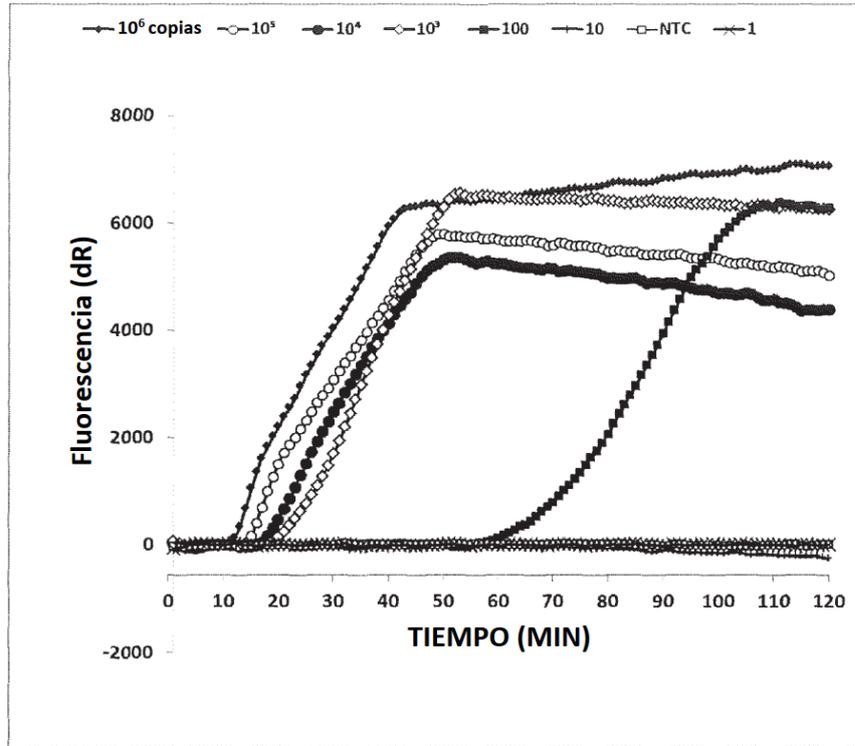


Figura 10B:

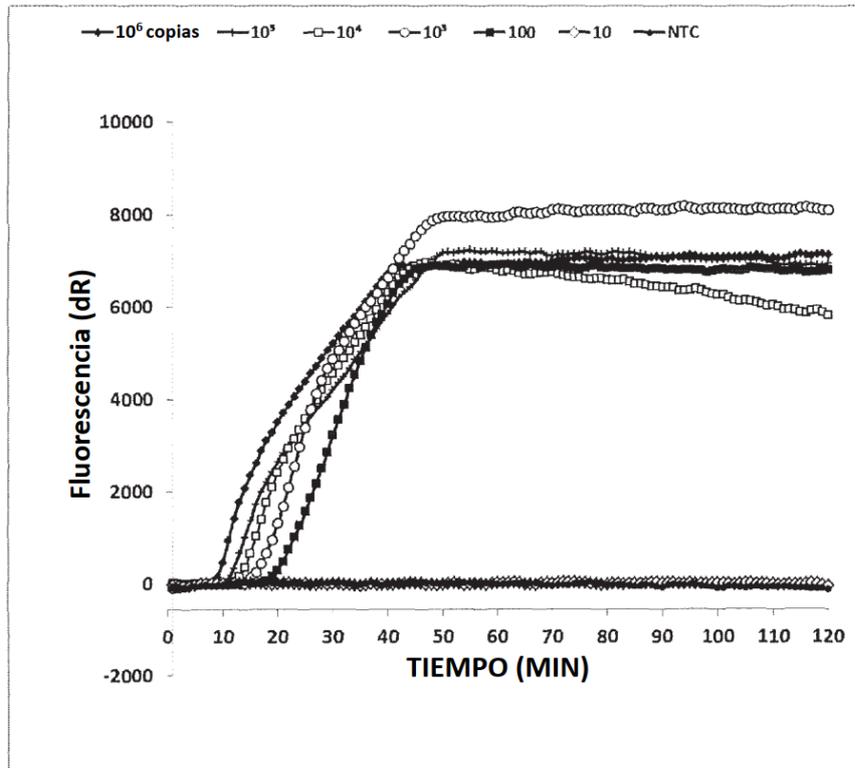


Figura 10C:

