

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 022 638**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

C12Q 1/6848 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2010** E **17186755 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2025** EP **3360974**

54 Título: **Reactivos de amplificación por recombinasa polimerasa**

30 Prioridad:

05.06.2009 US 184397 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2025

73 Titular/es:

ABBOTT DIAGNOSTICS SCARBOROUGH, INC.
(100.00%)
10 Southgate Road
Scarborough, ME 04074, US

72 Inventor/es:

PIEPENBURG, OLAF y
ARMES, NIALL, A.

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 3 022 638 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

Reactivos de amplificación por recombinasa polimerasa

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente memoria descriptiva se refiere a reactivos y kits, y al uso de dichos reactivos y kits, para la amplificación de ácidos nucleicos. Más específicamente, la presente memoria descriptiva se refiere al uso de reactivos y kits en procesos de amplificación por recombinasa polimerasa.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La amplificación por la recombinasa polimerasa (RPA) es un proceso en el que el direccionamiento mediado por recombinasa de oligonucleótidos a dianas de ADN se acopla a la síntesis de ADN por una polimerasa (Patente de EE. UU. n.º 7.270.981, presentada el 21 de febrero de 2003; 7.399.590 presentada el 1 de septiembre de 2004; 7.435.561 presentada el 25 de julio de 2006 y 7.485.428 presentada el 13 de agosto de 2007, así como US2008/0293045, presentada el 30 de agosto de 2007; US2009/0029421 y WO2008035205 presentada el 4 de mayo de 2007 y solicitud de patente de Estados Unidos n.º 61/179.793 presentada el 20 de mayo de 2009. La RPA depende de componentes de la maquinaria de replicación y reparación del ADN celular. La idea de emplear parte de esta maquinaria para la amplificación de ADN *in vitro* existe desde hace tiempo (Zarling et al., patente de EE.UU. 5.223.414), sin embargo, el concepto no se ha transformado en una tecnología funcional hasta hace poco, ya que, a pesar de una larga historia de investigación en el área de la función de la recombinasa que involucra principalmente a la proteína RecA de *E. coli*, las condiciones *in vitro* que permiten una amplificación sensible del ADN solo se han determinado recientemente (Piepenburg et al. Patente de EE.UU. 7.399.590, también publicada como US 2005/112631 A1, Piepenburg et al., PlosBiology 2006yWO2005/118853 A2). El desarrollo de un entorno de recombinación "dinámico" con tasas adecuadas de carga y descarga de recombinasa que mantenga altos niveles de actividad de recombinación durante más de una hora en presencia de actividad de polimerasa resultó técnicamente desafiante y necesitó agentes de aglomeración específicos, en particular moléculas de PEG de alto peso molecular (por ejemplo, Carbowax 20M peso molecular 15-20000 y PEG peso molecular 35000), en combinación con el uso de factores de carga de recombinasa, polimerasas de desplazamiento de cadena específicas y un sistema robusto de regeneración de energía.

[0003] La tecnología de RPA dependía fundamentalmente del hallazgo empírico de que las especies de polietilenglicol de alto peso molecular (en particular, >10.000 Daltons o más) influían profundamente en el comportamiento de la reacción. Previamente se había descubierto que las especies de polietilenglicol que varían de tamaño con un peso molecular de al menos 12.000 a 100.000 estimulan fuertemente las reacciones de RPA. Si bien no está claro cómo influyen los agentes de aglomeración en los procesos dentro de una reacción de amplificación, se atribuyen una amplia variedad de consecuencias bioquímicas a los agentes de aglomeración y son probablemente claves para su influencia en las reacciones de RPA.

[0004] Se ha informado que los agentes de aglomeración mejoran la interacción de las enzimas polimerasas con el ADN (Zimmerman y Harrison, 1987), mejoran la actividad de las polimerasas (Chan EW et al., 1980) e influyen en la cinética de la unión de RecA al ADN en presencia de SSB (Lavery PE, Kowalczykowski SC. J Biol Chem. 5 de mayo de 1992;267(13):9307-14. Se ha informado que los agentes de aglomeración tienen una marcada influencia en sistemas donde se sabe que tiene lugar la unión cooperativa de monómeros, tal como durante la formación de bastones y filamentos (Rivas et al., 2003), al incrementar las constantes de asociación en potencialmente varios órdenes de magnitud (véase Minton, 2001). En el sistema de RPA, múltiples componentes dependen de la unión cooperativa a los ácidos nucleicos, incluyendo la formación de filamentos de SSB, filamentos de recombinasa y posiblemente la condensación de agentes de carga, tales como UvsY. También se sabe que los agentes de aglomeración mejoran la hibridación de los ácidos nucleicos (Amasino, 1986) y este es un proceso que también es necesario en las reacciones de RPA. Por último, y no menos importante, se sabe que el PEG impulsa la condensación de las moléculas de ADN en la que cambian de estructuras alargadas a formas globulares o toroidales compactas, imitando así estructuras más comunes en muchos contextos *in vivo* (véase Lerman, 1971; véase también Vasilevskaya et al., 1995; véase también Zinchenko y Anatoly, 2005) y también afecta la energía libre de superenrollamiento del ADN (Naimushin et al., 2001).

[0005] Sin pretender limitarnos a la teoría, es probable que los agentes de aglomeración influyan en la cinética de múltiples interacciones proteína-proteína, proteína-ácido nucleico y ácido nucleico-ácido nucleico dentro de la reacción. La dependencia de agentes de aglomeración de gran peso molecular para la mejora más sustancial de la reacción (probablemente mayor de aproximadamente 10.000 Daltons) puede reflejar la necesidad de restringir el efecto de aglomeración a los componentes de la reacción que superan cierto tamaño (por ejemplo, oligonucleótidos, filamentos oligonucleótido:proteína, productos dúplex, componentes proteicos), permitiendo al mismo tiempo la difusión eficiente de otros (por ejemplo, nucleótidos, péptidos más pequeños, tales como UvsY). Además, también podría ser que la preferencia por el alto peso molecular refleje hallazgos en otros estudios que indican que, a medida que aumenta el peso molecular del PEG, disminuye la concentración de iones metálicos necesarios para promover la condensación del ADN. En cualquier caso, es un hallazgo empírico que la RPA resulta efectiva mediante el uso de

polietilenglicoles de alto peso molecular.

[0006] Además de la necesidad para un tipo específico de condiciones específicas de reacción "aglomeradas", tal como se describió anteriormente (reacción en presencia de agentes aglomerantes), la cinética eficaz de la reacción de RPA depende de un alto grado de actividad "dinámica" dentro de la reacción con respecto a las interacciones recombinasa-ADN. En otras palabras, los datos disponibles, que incluyen (i) la inhibición de la reacción por ATP- γ -S, o la eliminación del extremo C ácido de RecA o UvsX, y (ii) la inhibición por exceso de ATP (Piepenburg et al., 2006), sugieren que no solo es importante que los filamentos de recombinasa se formen rápidamente, sino también que se desensamblen rápidamente. Estos datos concuerdan con las predicciones realizadas en la Patente de EE.UU. 7.270.981 anterior. La formación rápida de filamentos garantiza que en cualquier momento dado habrá un alto nivel de estado estable de filamentos de ADN-recombinasa funcionales, mientras que el desensamblaje rápido garantiza que las polimerasas puedan acceder a los complejos de intercambio de cadenas completos.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0007] La memoria descriptiva describe un kit y reactivos para, así como métodos de, amplificación de ADN, denominados RPA. La RPA comprende las siguientes etapas (véase la Figura 1): Primero, un agente recombinasa se pone en contacto con un primer y un segundo cebador de ácido nucleico para formar un primer y un segundo cebador de nucleoproteína. Segundo, el primer y segundo cebadores de nucleoproteína se ponen en contacto con una secuencia diana bicatenaria para formar una primera estructura bicatenaria en una primera parte de dicha primera cadena y formar una estructura bicatenaria en una segunda parte de dicha segunda cadena, de modo que los extremos 3' de dicho primer cebador de ácido nucleico y dicho segundo cebador de ácido nucleico se orienten uno hacia el otro en una molécula de ADN plantilla determinada. Tercero, el extremo 3' de dichos primer y segundo cebadores de nucleoproteína se extiende mediante ADN polimerasas para generar primer y segundo ácidos nucleicos bicatenarios, y primera y segunda cadenas desplazadas de ácido nucleico. Finalmente, la segunda y tercera etapa se repiten hasta alcanzar el grado deseado de amplificación.

[0008] La presente memoria descriptiva proporciona composiciones y kits para procesos de amplificación de ADN mediante la amplificación por recombinasa polimerasa de una molécula de ácido nucleico diana, que incluyen uno o más pellets liofilizados. Por ejemplo, cada pellet liofilizado incluye una combinación de los siguientes reactivos en las siguientes concentraciones (que, a menos que se indique lo contrario, pueden ser las concentraciones al reconstituirse o al liofilizarse): (1) 1,5 % - 5 % (peso/volumen de la mezcla de liofilización) de polietilenglicol (por ejemplo, 2,28 % (peso/volumen de la mezcla de liofilización) de polietilenglicol con un peso molecular de 35 kilodaltons); (2) 2,5 % - 7,5 % en peso/volumen de trehalosa (por ejemplo, 5,7 %); (3) 0 - 60 mM de tampón Tris; (4) 1 - 10 mM de DTT; (5) 150 - 400 μ M de dNTP; (6) 1,5 - 3,5 mM de ATP; (7) 100 - 350 ng/ μ L de recombinasa uvsX; (8) opcionalmente 50 - 200 ng/ μ L de uvsY; (9) 150 - 800 ng/ μ L de gp32; (10) 30 - 150 ng/ μ L de polimerasa Pol I de *Bacillus subtilis* (Bsu) o fragmento grande de Pol I de *S. aureus* (polimerasa Sau); (11) 20 - 75 mM de fosfocreatina; y (12) 10 - 200 ng/ μ L de creatina quinasa.

[0009] Se describen tampones de rehidratación para la reconstitución de pellets liofilizados para la amplificación de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, los kits descritos en este documento incluyen tampón de rehidratación para la reconstitución de los pellets liofilizados, y el tampón de rehidratación incluye tampón Tris de 0 a 60 mM, acetato de potasio de 50 a 150 mM y polietilenglicol (2,5 % a 7,5 % en peso/volumen). En ciertas realizaciones, los kits también incluyen una solución de acetato de magnesio de 160 a 320 mM.

[0010] En ciertas realizaciones de las composiciones y kits descritos en este documento, los pellets liofilizados también incluyen el primer y/o el segundo cebador de ácido nucleico para el proceso de RPA. En ciertas realizaciones de los kits anteriores, los pellets liofilizados también incluyen una nucleasa. Por ejemplo, la nucleasa es la exonucleasa III (exoIII), la endonucleasa IV (Nfo) o la 8-oxoguanina ADN glicosilasa (fpg).

[0011] En ciertas realizaciones de las composiciones y kits descritos en este documento, los kits o composiciones pueden incluir además cebadores de control positivo y ADN diana para evaluar la actividad de los componentes del kit. Por ejemplo, el kit puede incluir un ADN de control positivo (por ejemplo, ADN genómico humano) y un primer y un segundo cebador específicos para el ADN de control positivo.

[0012] Se proporcionan métodos de amplificación por la recombinasa polimerasa que comprenden las siguientes etapas: Primero, se proporciona uno de los kits o composiciones descritos en este documento, que incluyen uno o más pellets liofilizados y tampón de rehidratación. Segundo, se reconstituye al menos uno de los pellets liofilizados, en cualquier orden, con el tampón de rehidratación, el primer y el segundo cebador de ácido nucleico para el proceso de RPA, el ácido nucleico diana y, opcionalmente, agua, hasta alcanzar el volumen deseado. Tercero, se añade magnesio (por ejemplo, solución de acetato de magnesio) para iniciar la reacción. Finalmente, se incuba la reacción hasta alcanzar el grado de amplificación deseado. En algunas realizaciones, esta última etapa comprende mezclar la muestra varios minutos después del inicio de la reacción.

[0013] Se describen métodos para controlar las reacciones de RPA, que se logran iniciando la reacción de RPA con la adición de magnesio (por ejemplo, acetato de magnesio). Por ejemplo, los métodos incluyen al menos tres etapas.

En la primera etapa, se combinan los siguientes reactivos en una solución en ausencia de magnesio: (1) al menos una recombinasa; (2) al menos una proteína de unión a ADN monocatenario; (3) al menos una ADN polimerasa; (4) dNTP o una mezcla de dNTP y ddNTP; (5) un agente de aglomeración (por ejemplo, polietilenglicol); (6) un tampón; (7) un agente reductor; (8) ATP o análogo de ATP; (9) opcionalmente al menos una proteína de carga de recombinasa; (10) un primer cebador y opcionalmente un segundo cebador; y (11) una molécula de ácido nucleico diana. En la segunda etapa, se añade magnesio para iniciar la reacción. En la tercera etapa, la reacción se incuba hasta alcanzar el grado de amplificación deseado. En ciertas realizaciones, uno o más reactivos se liofilizan antes de la primera etapa.

[0014] Se describen mezclas de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos para la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos. Por ejemplo, las mezclas incluyen al menos: (1) al menos una recombinasa; (2) al menos una proteína de unión a ADN monocatenario; (3) al menos una polimerasa, ADN polimerasa, de desplazamiento de cadena; (4) dNTP o una mezcla de dNTP y ddNTP; (5) ATP o análogo de ATP; (6) trehalosa; (7) opcionalmente al menos una proteína de carga de recombinasa; (8) opcionalmente polietilenglicol; (9) opcionalmente un primer cebador y opcionalmente un segundo cebador; y (10) opcionalmente una molécula de ácido nucleico diana.

[0015] Se describen kits para procesos de amplificación de ácidos nucleicos, tales como los procesos isotérmicos de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, amplificación de ADN mediante RPA) de una molécula de ácido nucleico diana, que incluyen uno o más pellets liofilizados. En algunas realizaciones, los pellets liofilizados comprenden polietilenglicol. Por ejemplo, la cantidad de polietilenglicol en los pellets liofilizados es una cantidad que permite que el proceso de amplificación se lleve a cabo (0,3 % - 7,5 % en peso/volumen de la mezcla de liofilización de PEG). En algunas realizaciones, los pellets liofilizados comprenden trehalosa. Por ejemplo, la cantidad de trehalosa en los pellets liofilizados es del 2,5 % - 7,5 % en peso/volumen de la mezcla de liofilización de trehalosa.

[0016] La presente invención incluye cualquiera de los pellets liofilizados reivindicados en este documento. En algunas realizaciones, los pellets liofilizados comprenden polietilenglicol. Por ejemplo, la cantidad de polietilenglicol en los pellets liofilizados es una cantidad que permite que el proceso de amplificación se lleve a cabo (0,3 % - 7,5 % en peso/volumen de la mezcla de liofilización de PEG). Los pellets liofilizados comprenden trehalosa. Por ejemplo, la cantidad de trehalosa en los pellets liofilizados es del 2,5 % - 7,5 % en peso/volumen de la mezcla de liofilización de trehalosa.

[0017] En el presente documento se describen tampones de rehidratación para la reconstitución de los pellets liofilizados. En algunas realizaciones, el tampón de rehidratación comprende polietilenglicol (por ejemplo, 0,3 % - 7,5 % en peso/volumen de PEG). Se proporciona un kit que comprende cualquiera de los tampones de rehidratación anteriores. Con base en la presente memoria descriptiva, la presente invención proporciona un pellet liofilizado para un proceso de amplificación de ADN de una molécula nucleica diana mediante amplificación por recombinasa polimerasa, que comprende una recombinasa, una proteína de carga de la recombinasa, una proteína de unión a ADN monocatenario, una ADN polimerasa de desplazamiento de cadena, trehalosa, un agente de aglomeración, en el que el agente de aglomeración es polietilenglicol, un primer cebador y, opcionalmente, un segundo cebador; en el que en dicho pellet no está presente acetato de potasio; y el tampón TRIS está presente en dicho pellet, y en el que la concentración de dicho tampón TRIS es de 25 nM o menos. La presente invención y sus realizaciones se establecen en las reivindicaciones adjuntas.

[0018] Otros objetivos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y las reivindicaciones adjuntas. Se contempla que, cuando sea apropiado, cualquier divulgación de la presente memoria descriptiva pueda combinarse con una o más divulgaciones adicionales de la presente memoria descriptiva, incluso cuando las divulgaciones se describen en contextos diferentes de la presente memoria descriptiva.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0019]

La Figura 1 representa esquemáticamente una reacción de RPA.

La Figura 2 representa la estructura de una sonda exo hibridada. El residuo de THF abásico es escindido por la exonucleasa solo cuando la sonda está unida. La escisión por exonucleasa separa el fluoróforo y el desactivador, y genera una señal fluorescente.

La Figura 3 representa la estructura de una sonda LF hibridada. El residuo de THF abásico es escindido por Nfo solo cuando la sonda está unida.

La Figura 4 representa la estructura de una sonda Fpg hibridada. El residuo dR abásico es escindido por fpg solo cuando la sonda está unida. La escisión por fpg libera el fluoróforo de la sonda y genera una señal fluorescente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Breve descripción de RPA

[0020] La RPA es un método (procedimiento) para amplificar fragmentos de ADN. La RPA emplea enzimas, conocidas como recombinasas, capaces de emparejar cebadores de oligonucleótidos con la secuencia homóloga del ADN dúplex. De esta forma, la síntesis de ADN se dirige a puntos definidos en un ADN de muestra. Utilizando dos cebadores

específicos para cada gen, se inicia una reacción de amplificación exponencial si la secuencia diana está presente. La reacción progresa rápidamente y produce una amplificación específica a partir de unas pocas copias diana (tales como menos de 10.000 copias, menos de 1.000 copias, menos de 100 copias o menos de 10 copias) hasta niveles detectables en tan solo 20-40 minutos.

5 [0021] Las reacciones de RPA contienen una combinación de proteínas y otros factores necesarios para sustentar tanto la actividad del elemento de recombinación del sistema como la de aquellos que sustentan la síntesis de ADN a partir de los extremos 3' de oligonucleótidos emparejados con sustratos complementarios. El componente proteico clave del sistema de recombinación es la propia recombinasa, que puede tener origen procariota, viral o eucariota. 10 Además, sin embargo, se requieren proteínas de unión al ADN monocatenario para estabilizar los ácidos nucleicos durante las diversas transacciones de intercambio que tienen lugar en la reacción. Se requiere una polimerasa con capacidad de desplazamiento de cadena, específicamente porque muchos sustratos aún presentan una estructura parcialmente dúplex. La reducción a la práctica ha establecido que, para que la reacción pueda amplificar a partir de 15 trazas de ácidos nucleicos, se requieren condiciones *in vitro* precisas que incluyen el uso de agentes de aglomeración y proteínas de carga. Se ha demostrado que un sistema que comprende una recombinasa UvsX del bacteriófago T6 (por ejemplo, H66S de UvsX de T6), un agente de carga UvsY del bacteriófago Rb69, un gp32 del bacteriófago Rb69 y un fragmento grande de Pol I de *S. aureus* es eficaz.

20 [0022] La presente memoria descriptiva proporciona una Amplificación por la Recombinasa polimerasa (RPA), un método para la amplificación de polímeros de ácidos nucleicos diana. También proporciona un entorno *in vitro* general en el que se mantiene una alta actividad de la recombinasa en un entorno de recombinación altamente dinámico, con el apoyo de ATP. Una ventaja de la RPA es que puede realizarse sin necesidad de fusión térmica de plantillas bicatenarias. Por lo tanto, también se elimina la necesidad de costosos termocicladores.

25 [0023] A lo largo de esta memoria descriptiva, se citan diversas patentes, solicitudes de patente publicadas y referencias científicas para describir el estado y el contenido de la técnica.

[0024] En la amplificación por la recombinasa polimerasa, se dirigen cebadores de ácidos nucleicos monocatenarios o parcialmente monocatenarios a secuencias homólogas bicatenarias o parcialmente bicatenarias utilizando agentes 30 de recombinasa que forman estructuras de bucle D. Los cebadores monocatenarios invasores, que forman parte de los bucles D, se utilizan para iniciar las reacciones de síntesis de la polimerasa. Una sola especie de cebador amplificará una secuencia de ácido nucleico diana mediante múltiples rondas de invasión bicatenaria seguida de síntesis. Si se utilizan dos cebadores opuestos, se puede lograr la amplificación de un fragmento: la secuencia diana.

35 [0025] La secuencia diana que se amplificará, en cualquiera de las realizaciones de la presente memoria descriptiva, es preferiblemente un ADN bicatenario. Sin embargo, las realizaciones de la presente memoria descriptiva no se limitan al ADN bicatenario, ya que otras moléculas de ácido nucleico, tales como el ADN o ARN monocatenario, pueden ser transformadas en ADN bicatenario por un experto en la materia utilizando métodos conocidos. El ADN 40 diana bicatenario adecuado puede ser un ADN genómico o un ADNc. Una RPA de la presente memoria descriptiva puede amplificar un ácido nucleico diana al menos 10 veces, preferiblemente, al menos 100 veces, más preferiblemente, al menos 1000 veces, aún más preferiblemente, al menos 10000 veces y, lo más preferiblemente, al menos, 1000000 de veces.

45 [0026] Los términos "polímero de ácido nucleico" o "ácidos nucleicos", tal como se utilizan en esta descripción, se pueden interpretar de manera amplia e incluyen ADN y ARN, así como otras moléculas similares a ácidos nucleicos hibridantes, tales como aquellas con cadenas principales sustituidas, por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos con cadena principal morfolino, ácido nucleico bloqueado u otros ácidos nucleicos con bases y azúcares modificados.

50 [0027] Además, los ácidos nucleicos de las realizaciones de la presente memoria descriptiva pueden marcarse con un marcador detectable. Un marcador detectable incluye, por ejemplo, un fluorocromo, una enzima, un desactivador de fluorescencia, un inhibidor enzimático, un marcador radiactivo y una combinación de los mismos.

55 **Liofilización de la reacción de RPA**

[0028] Una ventaja de la RPA es que los reactivos para RPA pueden liofilizarse antes de su uso. Los reactivos liofilizados ofrecen la ventaja de no requerir refrigeración para mantener su actividad. Por ejemplo, un tubo de reactivos 60 de RPA puede almacenarse a temperatura ambiente. Esta ventaja es especialmente útil en condiciones de campo donde el acceso a la refrigeración es limitado. Los reactivos liofilizados también ofrecen la ventaja de un almacenamiento a largo plazo sin una pérdida significativa de actividad. Por ejemplo, un tubo de reactivos de RPA puede almacenarse a -20 °C hasta seis meses sin una pérdida significativa de actividad.

65 [0029] Si bien la liofilización es un proceso bien establecido, no se garantiza que todos los componentes de un sistema de reacción se coliofilicen y reconstituyan con éxito en las mismas condiciones. Se ha intentado liofilizar reacciones de RPA con y sin varios de los componentes finales de la reacción. En estos experimentos, se ha demostrado que el azúcar disacárido trehalosa es necesario para estabilizar el liofilizado, lo que permite su almacenamiento a

temperatura ambiente durante al menos 10 días. También se ha observado que es preferible excluir la sal (por ejemplo, acetato de potasio) y reducir la concentración del tampón a 25 mM de Tris o menos del liofilizado para maximizar su estabilidad, particularmente para el almacenamiento a temperaturas superiores a 0 °C.

5 [0030] También se ha observado que, si una sal está presente en el liofilizado, se requiere polietilenglicol para estabilizar el liofilizado. Por el contrario, si una sal no está presente, entonces no se requiere PEG para estabilizar el liofilizado, y solo debe proporcionarse en el tampón de rehidratación. Una reacción típica de RPA tendrá una concentración final de PEG en la reacción del 5 % al 6 % (p/v).

10 [0031] Además de la trehalosa y el PEG, los reactivos que pueden liofilizarse antes de su uso pueden incluir, al menos, la recombinasa, la proteína de unión a ADN monocatenario, la ADN polimerasa, los dNTP o la mezcla de dNTP y ddNTP, el agente reductor, el ATP o análogo de ATP, la proteína de carga de recombinasa y el primer cebador y opcionalmente un segundo cebador o una combinación de cualquiera de estos.

15 [0032] En algunas realizaciones, los reactivos de RPA pueden liofilizarse en el fondo de un tubo o en una perla (u otro tipo de soporte sólido). Durante su uso, los reactivos se reconstituyen con tampón: (a) tampón de Tris-acetato a una concentración de entre 0 mM y 60 mM; (b) acetato de potasio de 50 mM a 150 mM; y (c) polietilenglicol a una concentración de entre el 2,5 % y el 7,5 % en peso/volumen. Los cebadores no añadidos antes de la liofilización pueden añadirse en esta etapa. Finalmente, se añade un ácido nucleico diana o una muestra que se sospecha que contiene un ácido nucleico diana para iniciar la reacción. El ácido nucleico diana o la muestra pueden estar contenidos en el tampón de reconstitución como consecuencia de etapas previas de extracción o procesamiento. La reacción se incuba hasta alcanzar el grado de amplificación deseado.

25 [0033] Hemos descubierto que es posible aumentar la sensibilidad de la reacción de RPA agitando o mezclando la muestra durante varios minutos (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis) después de reconstituirla e iniciar la reacción. Por ejemplo, tras reconstituirla e iniciar la reacción de RPA, el tubo que contiene la reacción de RPA se coloca en un bloque de incubación fijado a una temperatura de 37 °C y se incuba durante 4 minutos. A continuación, se extrae la muestra de la incubadora, se agita en vórtice y se centrifuga. A continuación, se devuelve la muestra al bloque de incubación y se incuba durante 15-40 minutos adicionales.

30 [0034] Se describen kits para realizar reacciones de RPA. En ciertas realizaciones, los kits incluyen uno o más pellets liofilizados, cada uno incluyendo una combinación de reactivos para realizar reacciones de RPA. En ciertas realizaciones, los kits comprenden 8 pellets liofilizados. En algunas realizaciones, los kits comprenden 96 pellets liofilizados. Si se desea, los reactivos liofilizados pueden almacenarse durante 1 día, 1 semana, 1 mes o 1 año o más antes de su uso.

35 [0035] En ciertas realizaciones, los pellets se pueden ensamblar combinando cada reactivo en las siguientes concentraciones (que a menos que se indique lo contrario pueden ser la concentración cuando se reconstituyen o cuando se liofilizan): (1) 1,5 % - 5 % (peso/volumen de la mezcla de liofilización) de polietilenglicol; (2) 2,5 % - 7,5 % en peso/volumen de trehalosa; (3) 0 - 60 mM de tampón Tris; (4) 1 - 10 mM de DTT; (5) 150 - 400 μM de dNTP; (6) 1,5 - 3,5 mM de ATP; (7) 100 - 350 ng/μL de recombinasa uvsX; (8) opcionalmente 50 - 200 ng/μL de uvsY; (9) 150 - 800 ng/μL de gp32; (10) 30-150 ng/μL de polimerasa Bsu o polimerasa Sau; (11) 20-75 mM de fosfocreatina; y (12) 10-200 ng/μL de creatina quinasa. Por ejemplo, los reactivos en la mezcla de solución congelada para liofilización pueden tener aproximadamente las siguientes concentraciones: (1) 2,28 % en peso/volumen de polietilenglicol con un peso molecular de 35 kilodaltons; (2) 5,7 % en peso/volumen de trehalosa; (3) 25 mM de tampón Tris; (4) 5 mM de DTT; (5) 240 μM de dNTP; (6) 2,5 mM de ATP; (7) 260 ng/μL de recombinasa uvsX; (8) 88 ng/μL de uvsY; (9) 254 ng/μL de gp32; (10) 90 ng/μL de polimerasa Bsu o polimerasa Sau; (11) 50 mM de fosfocreatina; y (12) 100 ng/μL de creatina quinasa. Los reactivos pueden liofilizarse en el fondo de un tubo o en un pocillo de un recipiente multipocillo. Los reactivos pueden secarse o fijarse a un soporte sólido móvil, tal como una perla, una tira o un pocillo.

50 [0036] Si bien suele preferirse que el volumen de la mezcla de reactivos que está congelada y liofilizada sea igual al volumen final de la reacción de RPA tras la rehidratación, esto no es necesario. Por ejemplo, se puede liofilizar un volumen de 80 μL de reactivos, que posteriormente se puede reconstituir hasta obtener un volumen final de reacción de RPA de 50 μL.

55 [0037] En ciertas realizaciones, los kits incluyen además un tampón de rehidratación para reconstituir los pellets liofilizados, en los que el tampón de rehidratación incluye 0-60 mM de tampón Tris, 50-150 mM de acetato de potasio y 0,3-7,5 % en peso/volumen de polietilenglicol. Por ejemplo, el tampón de rehidratación incluye aproximadamente 25 mM de tampón Tris, 100 mM de acetato de potasio y 5,46 % en peso/volumen de polietilenglicol con un peso molecular de 35 kilodaltons. En ciertas realizaciones, el kit comprenderá 4 ml de tampón de rehidratación.

60 [0038] En ciertas realizaciones, los kits incluyen además una solución de acetato de magnesio 160 a 320 mM (por ejemplo, solución de acetato de magnesio aproximadamente 280 mM). En algunas realizaciones, el kit comprenderá 250 μL de la solución de acetato de magnesio. En otras realizaciones, el tampón de rehidratación en sí comprenderá de 8 a 16 mM de acetato de magnesio (por ejemplo., aproximadamente 14 mM de acetato de magnesio).

[0039] En ciertas realizaciones de los kits anteriores, los pellets liofilizados incluyen el primer y el segundo cebador de ácido nucleico para el proceso de RPA. En ciertas realizaciones de los kits anteriores, los pellets liofilizados también incluyen entre 50 y 200 ng/μL de exonucleasa III (exoIII), endonucleasa IV (Nfo) o 8-oxoguanina ADN glicosilasa (fpg).

5 [0040] En cualquiera de las realizaciones anteriores, el kit puede incluir además cebadores de control positivo y ADN diana para evaluar la actividad de los componentes del kit. Por ejemplo, el kit puede incluir un ADN de control positivo (por ejemplo, ADN genómico humano) y un primer y un segundo cebador específicos para el ADN de control positivo.

10 [0041] Se describen mezclas de amplificación de ácido nucleico para la amplificación isotérmica de ácido nucleico. Por ejemplo, las mezclas incluyen al menos: (1) al menos una recombinasa; (2) al menos una proteína de unión a ADN monocatenario; (3) al menos una polimerasa, ADN polimerasa, de desplazamiento de cadena,; (4) dNTP o una mezcla de dNTP y ddNTP; (5) ATP o análogo de ATP; (6) trehalosa; (7) opcionalmente al menos una proteína de carga de recombinasa; (8) opcionalmente polietilenglicol; (9) opcionalmente un primer cebador y opcionalmente un segundo cebador; y (10) opcionalmente una molécula de ácido nucleico diana.

15 [0042] Se describen kits para procesos de amplificación de ácidos nucleicos, tales como los procesos isotérmicos de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, amplificación de ADN mediante RPA) de una molécula de ácido nucleico diana, que incluyen uno o más pellets liofilizados. En algunas realizaciones, los pellets liofilizados comprenden polietilenglicol. Por ejemplo, la cantidad de polietilenglicol en los pellets liofilizados es una cantidad que permite que el proceso de amplificación se lleve a cabo (0,3 % - 7,5 % en peso/volumen de la mezcla de liofilización de PEG). En algunas realizaciones, los pellets liofilizados comprenden trehalosa. Por ejemplo, la cantidad de trehalosa en los pellets liofilizados es del 2,5 % - 7,5 % en peso/volumen de la mezcla de liofilización de trehalosa.

20 [0043] En algunas realizaciones, los pellets liofilizados comprenden polietilenglicol. Por ejemplo, la cantidad de polietilenglicol en los pellets liofilizados es una cantidad que permite que el proceso de amplificación se lleve a cabo (0,3 % - 7,5 % en peso/volumen de la mezcla de liofilización de PEG). Los pellets liofilizados comprenden trehalosa. Por ejemplo, la cantidad de trehalosa en los pellets liofilizados es del 2,5 % - 7,5 % en peso/volumen de la mezcla de liofilización de trehalosa.

25 [0044] En el presente documento se describen tampones de rehidratación para la reconstitución de los pellets liofilizados. En algunas realizaciones, el tampón de rehidratación comprende polietilenglicol (por ejemplo, 0,3 % - 7,5 % en peso/volumen de PEG). En algunas realizaciones, se proporciona un kit que comprende cualquiera de los tampones de rehidratación mencionados.

35 **Iniciación de RPA por magnesio**

[0045] Se proporcionan métodos de amplificación por la recombinasa polimerasa que comprenden las siguientes etapas: Primero, se proporciona uno de los kits anteriores que incluye uno o más pellets liofilizados y tampón de rehidratación. Segundo, se reconstituye al menos uno de los pellets liofilizados, en cualquier orden, con el tampón de rehidratación, el primer y el segundo cebador de ácido nucleico para el proceso de RPA, el ácido nucleico diana y, opcionalmente, agua, hasta alcanzar el volumen deseado. Tercero, se añade magnesio (por ejemplo, solución de acetato de magnesio) para iniciar la reacción. Finalmente, se incuba la reacción hasta alcanzar el grado de amplificación deseado.

40 [0046] La RPA es un método versátil, pero puede mejorarse incorporando características para controlar la reacción de RPA. También se describen métodos para controlar las reacciones de RPA, que se logran iniciando la reacción de RPA con la adición de magnesio (por ejemplo, con acetato de magnesio). Por ejemplo, el método incluye al menos tres etapas. En la primera etapa, se combinan los siguientes reactivos en una solución en ausencia de magnesio: (1) al menos una recombinasa; (2) al menos una proteína de unión a ADN monocatenario; (3) al menos una ADN polimerasa; (4) dNTP o una mezcla de dNTP y ddNTP; (5) un agente de aglomeración (por ejemplo, polietilenglicol); (6) un tampón; (7) un agente reductor; (8) ATP o análogo de ATP; (9) opcionalmente al menos una proteína de carga de recombinasa; (10) un primer cebador y opcionalmente un segundo cebador; y (11) una molécula de ácido nucleico diana. En la segunda etapa, se añade magnesio para iniciar la reacción. En la tercera etapa, la reacción se incuba hasta alcanzar el grado de amplificación deseado. En ciertas realizaciones, uno o más reactivos se liofilizan antes de la primera etapa. Además, es posible iniciar varias reacciones de RPA simultáneamente mediante la adición simultánea de magnesio a cada reacción.

EJEMPLOS

60 [0047] La presente invención se define adicionalmente en los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos, si bien indican realizaciones preferidas de la invención, se ofrecen únicamente a modo de ilustración.

EJEMPLO 1

65 **Reactivos para reacciones de RPA**

ES 3 022 638 T3

[0048] Para formar un pellet de reacción liofilizado para una reacción de RPA básica única típica, los siguientes reactivos de RPA con las concentraciones indicadas se liofilizan en el fondo de un tubo:

PELLET DE REACCIÓN LIOFILIZADO DE RPA BÁSICA	
Componente	Concentración
PEG 35.000	2,28% (p/v)
Trehalosa	5,7 % (p/v)
Recombinasa UvsX	260 ng/μL
UvsY	88 ng/μL
Gp32	254 ng/μL
Polimerasa Sau	90 ng/μL
ATP	2,5 mM
dNTP	240 μM
Tampón Tris	25 mM
DTT	5 mM
Fosfocreatina	50 mM
Creatina quinasa	100 ng/μL

5 [0049] Para reconstituir el pellet de reacción liofilizado, se prepara una solución de rehidratación a partir del siguiente tampón de rehidratación:

TAMPÓN DE REHIDRATACIÓN:

10 [0050]

Componente	Concentración
Tampón Tris	25 mM
Acetato de potasio	100 mM
PEG 35.000	5,46 % (p/v)

15 [0051] A diferencia de la PCR, que requiere volúmenes pequeños para cambios rápidos de temperatura, el volumen de reacción de la RPA es ilimitado. Se pueden realizar volúmenes de reacción de 25 μL, 50 μL, 100 μL, 1 mL, 10 mL y 100 mL o mayores en un mismo recipiente. Para los ejemplos que se presentan a continuación, se utiliza un volumen de reacción de 50 μL.

20 [0052] Para monitorizar la reacción de RPA, también se puede añadir una nucleasa a cada pellet de reacción liofilizado. Por ejemplo, el "Pellet de reacción de RPA liofilizado con Exo" es el pellet de reacción de RPA básica liofilizado más 96 ng/μL de exonucleasa III (exoIII). De igual forma, el "Pellet de reacción de RPA liofilizado con Nfo" es el pellet de reacción de RPA básica liofilizado más 62 ng/μL de endonucleasa IV (Nfo). Finalmente, el "Pellet de reacción de RPA liofilizado con Fpg" es el pellet de reacción de RPA básica liofilizado más 114 ng/μL de 8-oxoguanina ADN glicosilasa (fpg).

25 [0053] Los tubos con los pellets liofilizados pueden sellarse al vacío en bolsas, por ejemplo, en 12 tiras de 8 bolsas/tira para un total de 96 reacciones de RPA. Si bien las bolsas selladas al vacío pueden almacenarse a temperatura ambiente durante días sin pérdida de actividad, se prefiere el almacenamiento a largo plazo (hasta al menos aproximadamente seis meses) a -20 °C. El tampón de rehidratación puede almacenarse como alícuotas congeladas, por ejemplo, 4 alícuotas de 1,2 mL. Para el almacenamiento a largo plazo (hasta al menos aproximadamente seis meses), se prefiere el almacenamiento a -20 °C. El tampón de rehidratación no utilizado puede volver a congelarse o almacenarse a 4 °C hasta una semana. Sin embargo, deben evitarse los ciclos de congelación-descongelación excesivos.

EJEMPLO 2

35

Reacción de RPA básica

40 [0054] Se establece una reacción de RPA básica para cada muestra reconstituyendo el pellet de reacción de RPA básica liofilizado del Ejemplo 1 con una solución de rehidratación adecuada. La solución de rehidratación se prepara a partir del tampón de rehidratación del Ejemplo 1, cebadores de amplificación y plantilla (y agua hasta un volumen total de 47,5 μL por muestra).

45 [0055] Los componentes de la solución de rehidratación pueden combinarse en una mezcla maestra para el número de muestras necesario. En algunas circunstancias, por ejemplo, al realizar un cribado de cebadores, se deben preparar varias soluciones de rehidratación diferentes (en este caso, según el número de pares de cebadores que se vayan a analizar). En ese caso, los componentes comunes a todas las reacciones (por ejemplo, plantilla, tampón de rehidratación, agua) se preparan como mezcla maestra, se distribuyen en un volumen correspondiente en tubos

nuevos y se combinan con el volumen necesario de los diferentes pares de cebadores. Las diferentes soluciones de rehidratación se utilizan entonces de forma habitual según el protocolo que se describe a continuación.

5 [0056] La reacción se inicia mediante la adición de 2,5 µL de una solución de acetato de magnesio de 280 mM, lo que lleva el volumen de reacción final a 50 µL por muestra.

10 [0057] Para cada muestra, se prepara la solución de rehidratación añadiendo 2,4 µL del primer cebador (10 µM), 2,4 µL del segundo cebador (10 µM), la plantilla y H₂O hasta un volumen total de 18 µL. Se añaden 29,5 µL del tampón de rehidratación del Ejemplo 1. A continuación, se agita en vórtice la solución de rehidratación y se centrifuga brevemente.

15 [0058] Para cada muestra, los 47,5 µL de solución de rehidratación se transfieren a un pellet de reacción liofilizado RPA básico del Ejemplo 1. La muestra se mezcla pipeteando verticalmente hasta que todo el pellet se haya resuspendido.

20 [0059] Para cada muestra, se añaden 2,5 µL de acetato de magnesio 280 mM y se mezcla bien. Una forma de hacerlo simultáneamente para varias muestras es colocar el acetato de magnesio en la tapa de los tubos de reacción y, a continuación, centrifugarlo en los tubos para iniciar las reacciones. La mezcla de reacción se agita brevemente en vórtice y se centrifuga de nuevo.

25 [0060] Los tubos se colocan en un bloque de incubación adecuado (por ejemplo, fijado a una temperatura de 37-39 °C) y se incuban durante 4 minutos. Para una sensibilidad ultraalta, después de 4 minutos, las muestras se extraen de la incubadora, se agitan en vórtice, se centrifugan y se devuelven al bloque de incubación. El tiempo total de incubación es de 20 a 40 minutos. Si se desea una evolución con el tiempo de la reacción, el tiempo de incubación se ajusta según sea necesario. Una vez completada la reacción, el resultado de cada reacción se analiza típicamente mediante un método de punto final, tal como la electroforesis en gel de agarosa.

EJEMPLO 3

30 Sondas de detección para uso con reacciones RPA

[0061] Se puede utilizar una sonda de detección para monitorizar las reacciones de RPA. La sonda es un tercer cebador oligonucleotídico que reconoce el amplicón diana y típicamente es homóloga a las secuencias entre los cebadores de amplificación principales. El uso de fluoróforo/desactivador con sondas en formatos de detección en tiempo real es una forma muy conveniente de monitorizar los eventos de amplificación en las reacciones de RPA.

[0062] La tecnología RPA es compatible con una variedad de diversos tipos de sondas de oligonucleótidos. A continuación, se describen las estructuras de tres tipos: sondas Exo, sondas LF y sondas Fpg .

40 Sondas exo

45 [0063] Las sondas exo suelen tener una longitud de 46 a 52 oligonucleótidos. La señal es generada por un fluoróforo dT interno (fluoresceína o TAMRA) y se desactiva mediante un desactivador dT interno (típicamente Black Hole Quencher [BHQ] 1 o 2) ubicado entre 1 y 5 bases en el extremo 3' con respecto al fluoróforo. En este caso, las sondas se limitan a contener secuencias donde se pueden encontrar dos timinas con <6 nucleótidos intermedios. Una de las bases entre el fluoróforo y el desactivador es el análogo de nucleótido abásico, tetrahidrofurano (THF, a veces denominado "dSpacer"). Debe haber al menos 30 nucleótidos en el extremo 5' con respecto al sitio THF y al menos otros 15 en el extremo 3' con respecto al mismo. Cuando la sonda se ha hibridado con la secuencia diana, la exonucleasa III reconocerá y escindirá el THF, separando así el fluoróforo y el desactivador, y generando una señal fluorescente. El THF debe estar al menos a 31 bases del extremo 5' de la sonda y a 16 bases del extremo 3'. Finalmente, un grupo bloqueador 3' (por ejemplo, Biotina-TEG) bloquea la extensión con la polimerasa con la sonda. La Figura 2 representa una sonda Exo hibridada típica.

55 [0064] Si bien no existe una regla fija que describa la mejor posición de una sonda dada con respecto a sus cebadores de amplificación correspondientes, se debe tener cuidado para evitar la posibilidad que la sonda pueda detectar artefactos de cebador. Si bien los cebadores que tienen la misma dirección que la sonda pueden incluso solaparse con su parte 5', este solapamiento no debe extenderse hasta la parte del fluoróforo/sitio abásico/desactivador de la sonda (es decir, el solapamiento del cebador debe restringirse a los 27 nucleótidos o así más cercanos al extremo 5' de la sonda). Este diseño evitará la generación inadvertida de dianas de hibridación para el elemento de secuencia "sensible" de la sonda por artefactos de cebador. Los cebadores opuestos a la dirección de la sonda no deben solaparse para evitar la aparición de dímeros cebador-sonda.

Sondas LF

65 [0065] Las sondas LF tienen a menudo entre 46 y 52 oligonucleótidos de longitud y están diseñadas para la detección de reacciones de RPA en ensayos sándwich simples, tales como las tiras de flujo lateral. Se bloquea la extensión por

la polimerasa con la sonda convirtiendo el último nucleótido en un didesoxinucleótido. Al igual que en una sonda Exo, un THF se coloca típicamente a aproximadamente 30 bases del extremo 5' de la sonda y a 16 bases del extremo 3'. Cuando la sonda se ha hibridado a la secuencia diana, la nucleasa Nfo reconocerá y escindirá el THF. Esto permite que la parte 5' de la sonda cortada actúe entonces como cebador, dando lugar finalmente a un amplicón que contiene la parte 5' de la sonda unida al cebador opuesto. El amplicón se detecta gracias a marcadores unidos al extremo 5' del cebador opuesto (normalmente biotina) y al extremo 5' de la sonda (normalmente FAM). El dúplex formado se captura en una superficie recubierta con la molécula de captura adecuada (por ejemplo, estreptavidina para biotina o un anticuerpo anti-FAM para FAM). Los productos de RPA se procesan en tiras de flujo lateral, tales como las disponibles en Milenia Biotec. La Figura 3 representa una sonda LF hibridada típica.

[0066] Si bien no existe una regla fija que describa la mejor posición de una sonda dada con respecto a sus cebadores de amplificación correspondientes, se debe tener cuidado para evitar la posibilidad que la sonda pueda detectar artefactos de cebador. Si bien los cebadores que tienen la misma dirección que la sonda pueden incluso solaparse con su parte 5', este solapamiento no debe extenderse hasta la parte del sitio abásico de la sonda (es decir, el solapamiento del cebador debe restringirse a los 27 nucleótidos o así más cercanos al extremo 5' de la sonda). Este diseño evitará la generación inadvertida de dianas de hibridación para el elemento de secuencia "sensible" de la sonda por artefactos de cebador. Los cebadores opuestos a la dirección de la sonda no deben solaparse para evitar la aparición de dímeros cebador-sonda. El cebador de amplificación opuesto suele estar marcado con biotina.

20 Sondas Fpg

[0067] Las sondas fpg suelen tener una longitud de 35 oligonucleótidos. En el extremo 5' de la sonda es un desactivador (típicamente Black Hole Quencher [BHQ] 1 o 2). La señal se genera mediante un fluoróforo (típicamente FAM o Texas Red) unido a la ribosa de un análogo de nucleótido sin base (un residuo denominado dR; un fluoróforo/O-enlazador reemplaza eficazmente la base en la posición C1 de la ribosa) 4-6 bases en dirección 3' del extremo 5'. Cuando la sonda se ha hibridado a la secuencia diana, fpg reconocerá y escindirá el dR, liberando así el fluoróforo de la sonda y generando una señal fluorescente. Finalmente, un grupo bloqueador 3' (por ejemplo, Biotina-TEG) bloquea la extensión con la polimerasa con la sonda. La Figura 4 es un esquema de una sonda Fpg hibridada típica. La Figura 7 muestra la estructura de una sonda Fpg hibridada. El residuo dR abásico es escindido por fpg solo cuando la sonda está unida. Esto libera el fluoróforo de la sonda y genera una señal fluorescente.

[0068] Si bien no existe una regla fija que describa la mejor posición de una sonda Fpg determinada en relación con los cebadores de amplificación con los que se utiliza, se debe tener cuidado para evitar la posibilidad de que la sonda pueda detectar artefactos del cebador. Como resultado, se debe evitar cualquier solapamiento entre los cebadores y la sonda.

EJEMPLO 4

Reacción de RPA con monitorización en tiempo real utilizando exonucleasa III

[0069] Se realiza una reacción de RPA utilizando exonucleasa III siguiendo un protocolo modificado del Ejemplo 2. Cada muestra se establece reconstituyendo el pellet de reacción RPA liofilizado con Exo del Ejemplo 1 con una solución de rehidratación adecuada. La solución de rehidratación se prepara a partir del tampón de rehidratación del Ejemplo 1, cebadores de amplificación, una plantilla y una sonda Exo (y agua hasta un volumen total de 47,5 µL por muestra). La reacción se inicia añadiendo 2,5 µL de una solución de acetato de magnesio 280 mM, lo que lleva el volumen de reacción final a 50 µL por muestra.

[0070] Para cada muestra, se prepara la solución de rehidratación añadiendo 2,4 µL del primer cebador (10 µM), 2,4 µL del segundo cebador (10 µM), la plantilla y 0,6 µL de una sonda Exo (10 µM), tal como se describe en el Ejemplo 3. Se añade H₂O para llevar el volumen total de los componentes anteriores a 18 µL. Se añaden 29,5 µL del tampón de rehidratación del Ejemplo 1. A continuación, se agita la solución de rehidratación en vórtice y se centrifuga brevemente.

[0071] Para cada muestra, se transfieren los 47,5 µL de solución de rehidratación a un pellet de reacción RPA liofilizado con Exo del Ejemplo 1. La muestra se mezcla pipeteando verticalmente hasta que se resuspenda todo el pellet. Para cada muestra, se añaden 2,5 µL de acetato de magnesio 280 mM y se mezcla bien para iniciar la reacción.

[0072] Los tubos se colocan en una incubadora térmica/fluorómetro adecuado (por ejemplo, isotérmicamente ajustados a una temperatura de 37-39 °C) y se incuban mientras se toman mediciones de fluorescencia periódicamente. Después de 4 minutos, las muestras se extraen de la incubadora, se agitan en vórtice, se centrifugan y se devuelven a la incubadora/fluorómetro. El tiempo total de incubación/detección es de 20 minutos.

EJEMPLO 5

Reacción de RPA usando Nfo

5 [0073] Se realiza una reacción de RPA usando Nfo siguiendo un protocolo modificado del Ejemplo 2. Cada muestra se establece reconstituyendo el pellet de reacción de RPA liofilizado con Nfo del Ejemplo 1 con una solución de rehidratación adecuada. La solución de rehidratación se prepara a partir del tampón de rehidratación del Ejemplo 1, cebadores de amplificación, una plantilla y una sonda de LF (y agua hasta un volumen total de 47,5 µL por muestra). La reacción se inicia añadiendo 2,5 µL de una solución de acetato de magnesio 280 mM, llevando el volumen final de la reacción a 50 µL por muestra.

10 [0074] Para cada muestra, se prepara la solución de rehidratación añadiendo 2,4 µL del primer cebador (10 µM), 2,4 µL del segundo cebador (10 µM), la plantilla y 0,6 µL de una sonda LF (10 µM), como se describe en el Ejemplo 3. Se añade H₂O para completar el volumen total de los componentes anteriores a 18 µL. Se añaden 29,5 µL del tampón de rehidratación del Ejemplo 1. A continuación, se agita la solución de rehidratación en vórtice y se centrifuga brevemente.

15 [0075] Para cada muestra, se transfieren los 47,5 µL de solución de rehidratación a un pellet de reacción RPA liofilizado con Nfo del Ejemplo 1. La muestra se mezcla pipeteando verticalmente hasta que se resuspenda todo el pellet. Para cada muestra, se añaden 2,5 µL de acetato de magnesio 280 mM y se mezcla bien para iniciar la reacción .

20 [0076] Los tubos se colocan en un bloque de incubación adecuado (por ejemplo, fijado a una temperatura de 37-39 °C) y se incuban durante 4 minutos. Para obtener una sensibilidad ultraalta, después de 4 minutos, las muestras se extraen de la incubadora, se agitan en vórtice, se centrifugan y se devuelven al bloque de incubación. El tiempo total de incubación es de 15 a 30 minutos. Una vez completada la reacción, el resultado de cada reacción se analiza típicamente mediante un método de punto final, tal como un ensayo sándwich.

EJEMPLO 6

25 Reacción de RPA con monitorización en tiempo real mediante Fpg

30 [0077] Se realiza una reacción de RPA utilizando fpg siguiendo un protocolo modificado del Ejemplo 2. Cada muestra se establece reconstituyendo el pellet de reacción liofilizado de RPA con Fpg del Ejemplo 1 con una solución de rehidratación adecuada. Esta solución de rehidratación se prepara a partir del tampón de rehidratación del Ejemplo 1, cebadores de amplificación, una plantilla y una sonda de Fpg (y agua hasta un volumen total de 47,5 µL por muestra). La reacción se inicia añadiendo 2,5 µL de una solución de acetato de magnesio 280 mM, lo que lleva el volumen de reacción final a 50 µL por muestra.

35 [0078] Para cada muestra, se prepara la solución de rehidratación añadiendo 2,4 µL del primer cebador (10 µM), 2,4 µL del segundo cebador (10 µM), la plantilla y 0,6 µL de una sonda de Fpg (10 µM), tal como se describe en el Ejemplo 3. Se añade H₂O para llevar el volumen total de los componentes anteriores a 18 µL. Se añaden 29,5 µL del tampón de rehidratación del Ejemplo 1. A continuación, se agita la solución de rehidratación en vórtice y se centrifuga brevemente.

40 [0079] Para cada muestra, se transfieren 47,5 µL de solución de rehidratación a un pellet de reacción de RPA liofilizado con Fpg del Ejemplo 1. La muestra se mezcla pipeteando verticalmente hasta que se resuspenda todo el pellet. Para cada muestra, se añaden 2,5 µL de acetato de magnesio 280 mM y se mezcla bien para iniciar la reacción.

45 [0080] Los tubos se colocan en una incubadora térmica/fluorómetro adecuada (por ejemplo, isotérmicamente ajustada a una temperatura de 37-39 °C) y se incuban mientras se toman mediciones de fluorescencia periódicamente. Después de 4 minutos, las muestras se extraen de la incubadora, se agitan en vórtice, se centrifugan y se devuelven a la incubadora/fluorómetro. El tiempo total de incubación/detección es de 20 minutos.

50 [0081] Los detalles de una o más realizaciones de la divulgación se han expuesto en la descripción adjunta. A continuación se describen los métodos y materiales preferidos. Otras características, objetivos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones.

55 [0082] En la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares incluyen los referentes plurales, salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Salvo que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Salvo que se indique expresamente lo contrario, las técnicas empleadas o contempladas en este documento son metodologías estándar bien conocidas por un experto en la materia.

REIVINDICACIONES

1. Pellet liofilizado para un proceso de amplificación por recombinasa polimerasa de amplificación de ADN de una molécula de ácido nucleico diana, que comprende:
- 5 (a) una recombinasa;
(b) una proteína de carga de la recombinasa;
(c) una proteína de unión a ADN monocatenario;
(d) una ADN polimerasa de desplazamiento de cadena;
(e) trehalosa;
- 10 (f) un agente de aglomeración, en el que el agente de aglomeración es polietilenglicol;
(g) un primer cebador; y opcionalmente
(h) un segundo cebador,
- en el que:
- 15 (i) no hay acetato de potasio presente en dicho pellet; y
(ii) hay tampón TRIS presente en dicho pellet, y en el que la concentración de dicho tampón TRIS es de 25 mM o menos.
2. Pellet liofilizado, según la reivindicación 1, en el que:
la recombinasa es la recombinasa UvsX del bacteriófago T6;
20 la proteína de carga de la recombinasa es la UvsY del bacteriófago Rb69;
la proteína de unión al ADN monocatenario es la gp32 del bacteriófago Rb69; y
la ADN polimerasa es el fragmento grande de la Pol I de *S. aureus*.
3. Pellet liofilizado, según la reivindicación 2, en el que la recombinasa es H66S de UvsX del bacteriófago T6.
- 25 4. Pellet liofilizado, según cualquier reivindicación anterior, en el que la concentración de dicho tampón TRIS es 25 mM.
5. Pellet liofilizado, según cualquier reivindicación anterior, en el que dicho pellet comprende de 2,5 % a 7,5 % en peso/volumen de la mezcla de liofilización de trehalosa.
- 30 6. Pellet liofilizado, según cualquier reivindicación anterior, que comprende además una nucleasa.
7. Pellet liofilizado, según la reivindicación 6, en el que la nucleasa se selecciona del grupo que consiste en
35 exonucleasa III (exoIII), endonucleasa IV (Nfo) y 8-oxoguanina ADN glicosilasa (fpg).
8. Pellet liofilizado, según cualquier reivindicación anterior, que comprende además dNTPs, un agente reductor y ATP.
9. Pellet liofilizado, según cualquier reivindicación anterior, en el que la cantidad de polietilenglicol en el pellet es de
40 0,3 % a 7,5 % en peso/volumen de mezcla de liofilización de polietilenglicol.

FIGURA 1

El ciclo de RPA

Todas las etapas se realizan a baja temperatura constante (óptima de 37°C)

a. Complejos de recombinasa/cebador de oligonucleótidos forman y reconocen ADN homólogo

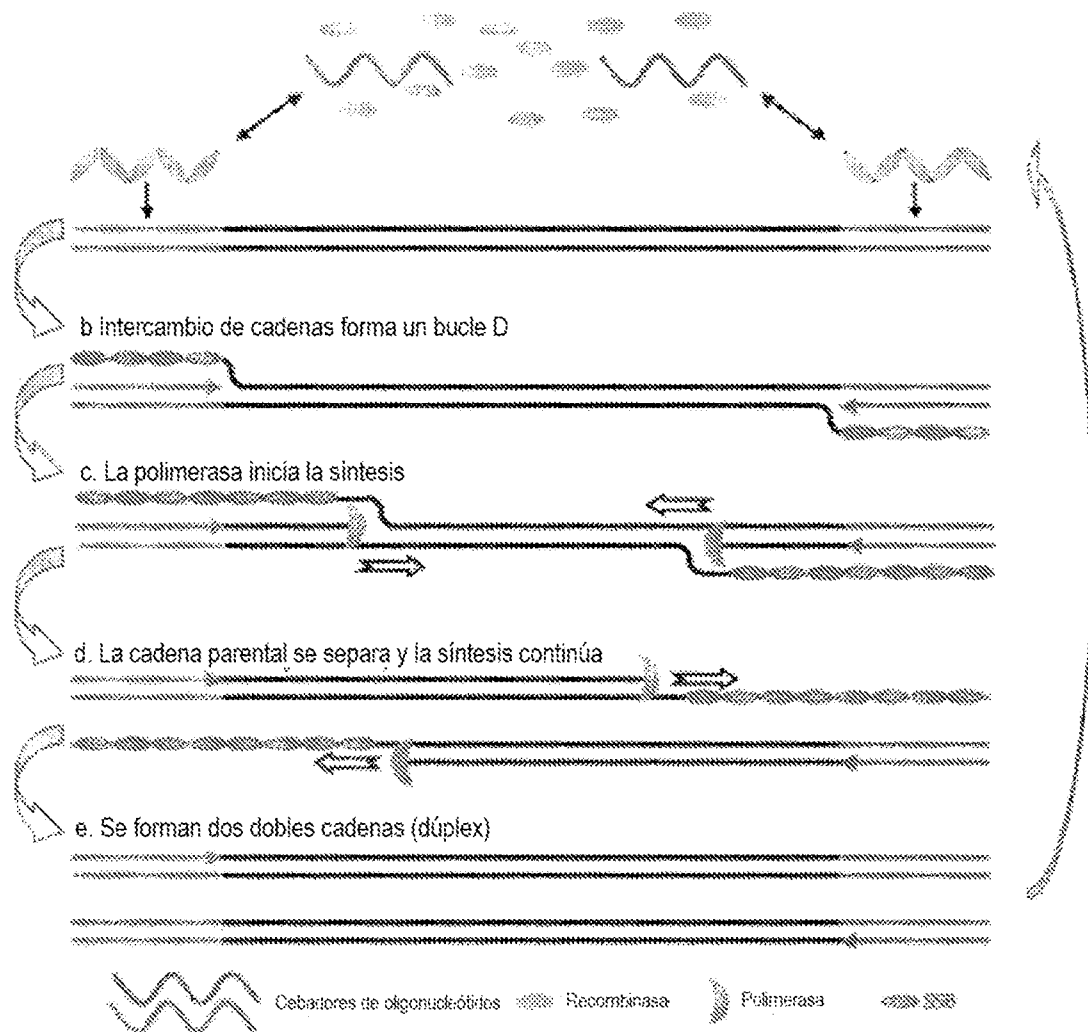


FIGURA 2

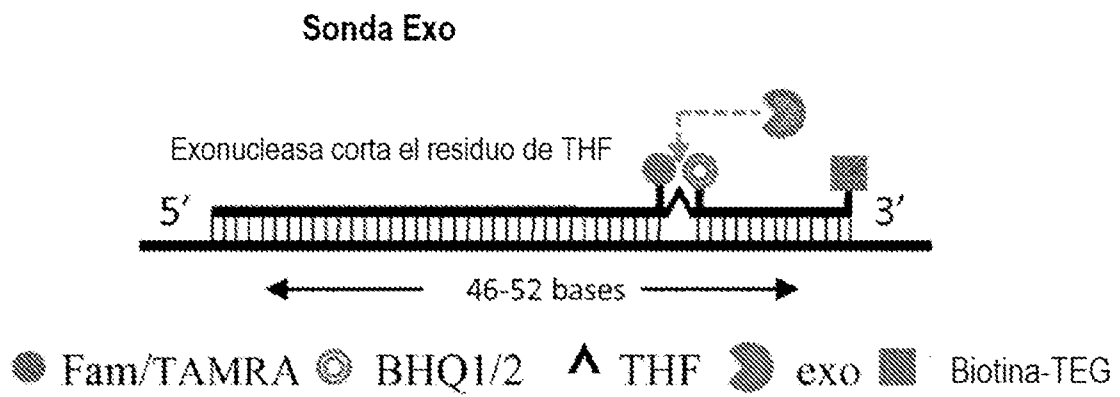


FIGURA 3

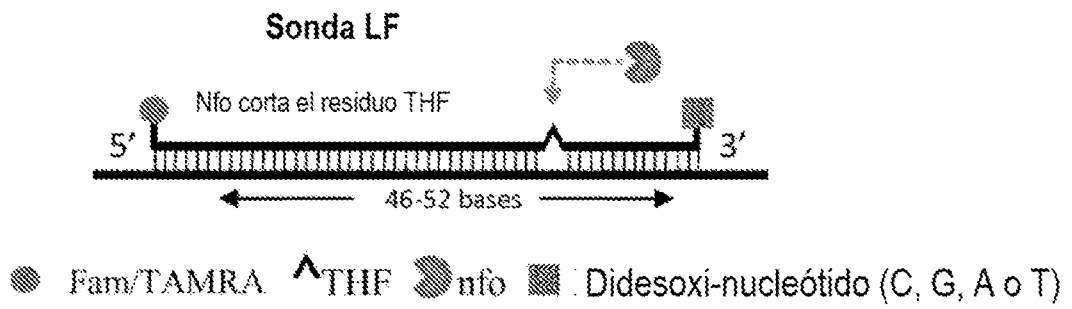


FIGURA 4

